

Juni 2018

Håndbok for *ipsogen*[®] BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit



Versjon 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrument

CE

REF

670923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R4 **MAT** 1114278NO

Innhold

Tiltenkt bruk	5
Sammendrag og forklaring	5
Bakgrunn om kronisk myelogen leukemi	5
Overvåking av sykdommen.....	6
Prosedyreprinsipp	8
Materialer som medfølger.....	11
Settets innhold.....	11
Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med	12
Advarsler og forholdsregler.....	15
Sikkerhetsinformasjon	15
Generelle forholdsregler.....	15
Håndtering og oppbevaring av reagenser	17
Forsendelsesbetingelser	17
Oppbevaringsforhold.....	17
Stabilitet	18
Håndtering og oppbevaring av prøver	18
Fullblodsprøver.....	18
RNA-prøver	19
Prosedyre	20
Protokoll for lysering av erythrocytter for å isolere totale leukocyter fra fullblod	20
Isolering av totalt RNA	22
Kvalifisering og kvantifisering av RNA	25

RNA-konsentrasjon	25
Revers transkripsjon	28
Manuell analyse: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med rotor for 72-rør med RGQ-programvare	31
Automatisert analyse: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med rotor for 72-rør med RGAM-programvare	37
Tolkning av resultater på RGQ-programvare	47
Prinsipp for dataanalyse	47
Standardkurver og kvalitetskriterier som gjelder for rådata	49
Tolkning av resultater på RGAM-programvare	57
Feilsøkningsveiledning	64
Kvalitetskontroll	66
Begrensninger	66
Ytelsesegenskaper	68
Grense for blank prøve	68
Deteksjonsgrense	68
Linearitet	68
Repeterbarhet og reproduserbarhet	69
Interfererende stoffer	69
Klinisk validering og metodesammenligning	70
Konkordansstudie: ERM-AD623 BCR-ABL1 enkeltplasmidstandard (IRMM) versus <i>ipsogen</i> enkeltplasmidstandard (QIAGEN)	72
Referanser	74
Symboler	76
Bestillingsinformasjon	77

Endringshistorikk for håndbok	79
-------------------------------------	----

Tiltenkt bruk

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit er en kvantitativ in vitro-diagnostisk test for måling av BCR-ABL1-fusjonsgenets b3a2 (e14a2)- og b2a2 (e13a2)-transkripter i totalt RNA ekstrahert fra fullblod.

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit brukes til å overvåke dyp molekylær respons hos pasienter diagnostisert med Philadelphia-kromosom-positiv (Ph+) p210 kronisk myelogen leukemi (KML) i kronisk fase.

Det er kalibrert mot World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel (Verdens helseorganisasjons (WHO) internasjonale genetiske referansepanel).

Sammendrag og forklaring

Bakgrunn om kronisk myelogen leukemi

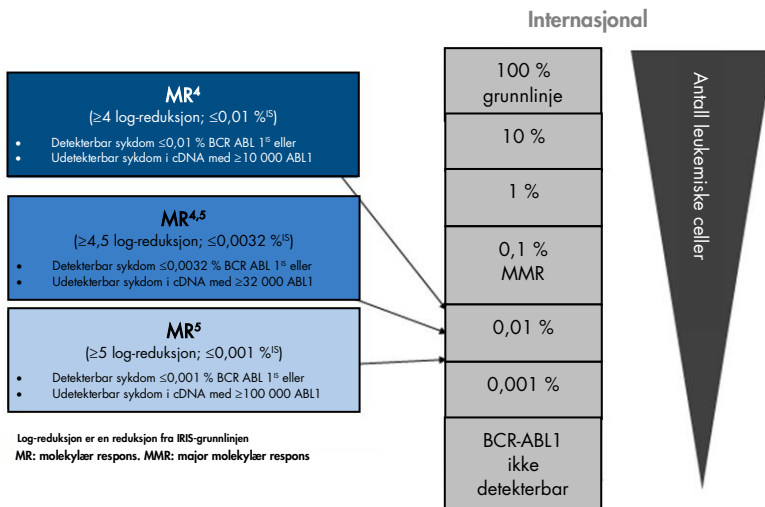
KML hører til gruppen av myeloproliferative neoplasmer og ses hos >90 % av tilfeller karakterisert av tilstedeværelsen av Philadelphia-kromosomet (Ph CHRS). Dette kromosomet er produktet av en resiprok translokasjon mellom de lange armene til kromosomene 9 og 22, t(9;22), og BCR (breakpoint cluster region) på kromosom 22 og c-ABL-onkogenet på kromosom 9. Det tilsvarende fusjonsgenet, BCR-ABL1, transkriberes til et 8,5 kb mRNA, med 2 forbindelsesvarianter, b2a2 (observert i 40 % av tilfellene) og b3a2 (til stede i 55 % av tilfellene). Dette fusjonsgenet koder et kimerisk protein, p210, med forhøyet tyrosinkinaseaktivitet. b2a3- og b3a3-transkriptene representerer mindre enn 5 % av tilfellene. Et Ph-kromosom kan også detekteres hos 35 % av voksne pasienter med akutt lymfoblastisk leukemi (ALL).

Den årlige insidensen av KML er cirka 1–2 per 100 000, og KML utgjør 20 % av alle leukemifellene hos voksne. Klinisk karakteriseres den av et overskudd av myelogene celler som differensierer seg og fungerer normalt. 190–95 % av KML-tilfellene blir pasientene diagnostisert med kronisk eller stabil fase av sykdommen. Tidligere progredierte pasienter til blastkriser og akutt leukemi med fatale konsekvenser i løpet av gjennomsnittlig 4 til 6 år. Introduksjonen av imatinib og i senere tid, 2. generasjon tyrosinkinasehemmere (TKH), har imidlertid ført til en dramatisk endring av sykdommens naturlige forløp. De fleste pasienter vil nå forbli i remisjon og dermed kreve langvarig oppfølging og sykdomsovervåking.

Overvåking av sykdommen

KML-behandlingens aktuelle mål er å oppnå 100 % overlevelse og Ph-kromosom-negativitet. Sykdomsovervåking er derfor et avgjørende verktøy for å vurdere behandlingsrespons og oppdage tilbakefall hos den enkelte pasient så tidlig som mulig. Når pasienter behandles med TKH-er, progredierer de vanligvis fra hematologisk til cytogenetisk og deretter molekylær remisjon, med en tilsvarende reduksjon i antall leukemiske celler og BCR-ABL1-transkripter, som vist i

Figur 1.



Figur 1. Definisjon av molekylær respons. Tilpasset fra referanse 1, 2 og 9. **MR:** molekylær respons. **MMR:** major molekylær respons.

Referansemetoden for å estimere tumorbelastningen hos KML-pasienter er tradisjonelt cytogenetisk analyse (G-bånd) av beinmargsmetafaser (BM-metafaser). Cytogen respons er vurdert på minst 20 margmetafaser. Nivået på cytogenetisk respons estimeres basert på prosentandelen av Ph-kromosom-positive metafaser (3). Denne vurderingen påvirkes imidlertid av laboratoriets ytelser og ekspertise, og har en lav sensitivitet på 5 % når 20 metafaser analyseres.

Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)-kvantifisering i sanntid av BCR-ABL1 Mbc mRNA-prøver på perifert blod (PB) definerer den molekylære responsen, og dette er nå del av sykdomsovervåkingsteknikkene som brukes ved KML. Den er mindre invasiv enn tradisjonell beinmargsmetafase-cytogenetikk, og mer sensitiv.

Anbefalinger for KML-sykdomsovervåking har også nylig blitt oppdatert og omfatter nå ny klinisk evidens fra legemiddelstudier, høyere klinisk effektivitet ved bruk av 2. generasjons

TKH-er og tekniske forbedringer innenfor BCR-ABL1-kvantifisering. Alt dette bidrar til å forbedre målene for sykdomsovervåking. Særlig 2. generasjons TKH-er fører til en mer signifikant molekylær respons hos et stort antall KML-pasienter og oppnår noe som defineres som dyp molekylær respons, dvs. en BCR-ABL1-belastning på under 0,01 % (MR4,0) eller 0,0032 % (MR4,5). Det å kunne kvantifisere disse svært lave nivåene av BCR-ABL1-belastning på en nøyaktig måte kan være klinisk relevant, ettersom observasjonsstudier har vist at behandling med TKH-er trygt kan avsluttes hos pasienter med en opprettholdt molekylær respons på MR4,5 (4). Ytterligere kliniske studier er imidlertid iverksatt for å bekrefte disse funnene.

De nyeste anbefalingene for responsdefinisjon og overvåking av KML-pasienter som behandles med TKH-er, kommer fra ELN-eksperter (3).

Fra et teknisk ståsted har internasjonale eksperter gjort en innsats for å harmonisere BCR-ABL1 Mbcr-testing og -rapportering (5–7). I tillegg har et referansepanel nylig blitt validert under veiledning av WHO for å muliggjøre en enkel standardisering av BCR-ABL1-kvantifisering (8).

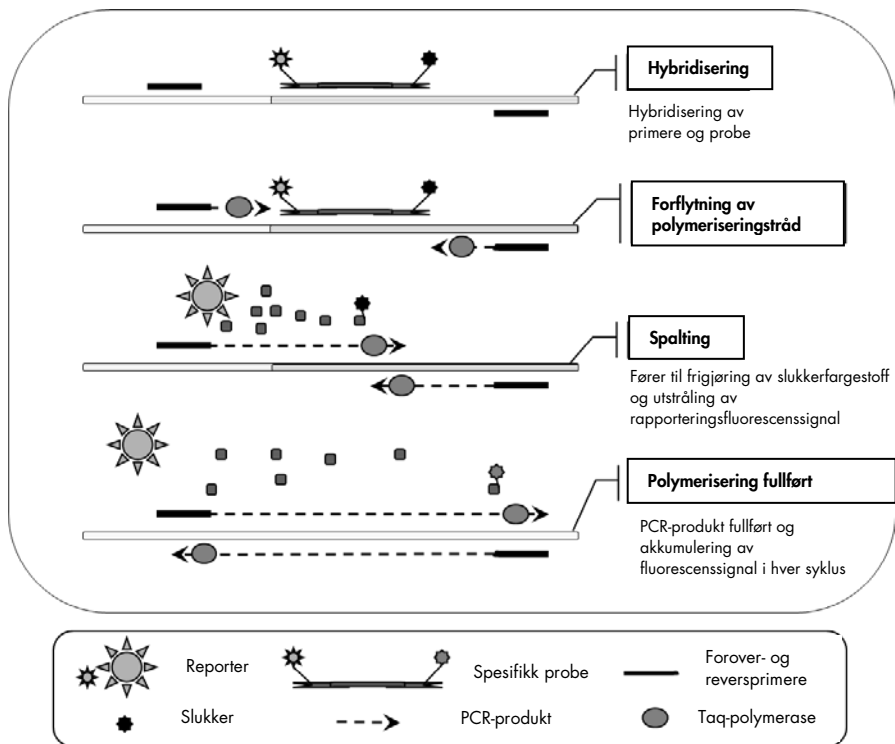
Prosedyreprinsipp

qPCR tillater nøyaktig kvantifisering av PCR-produkter under den eksponensielle fasen av PCR-amplifikasjonsprosessen. qPCR-data kan oppnås raskt, uten PCR-behandling i etterkant, gjennom detektering av fluorescenssignaler i sanntid under og/eller etter PCR-syklusene, og reduserer dermed drastisk risikoen for kontaminering av PCR-produkter. Per i dag finnes det tre hovedtyper av qPCR-teknikker: qPCR-analyse ved bruk av SYBR® Green I Dye, qPCR-analyse ved bruk av hydrolyseprober og qPCR-analyse ved bruk av hybridiseringsprober.

Denne analysen benytter qPCR-prinsippet for hydrolyse av dobbeltfarget oligonukleotid. Under PCR hybridiseres forover- og reversprimere til en spesifikk sekvens. Blandingen inneholder også et dobbeltfarget oligonukleotid. Denne proben, som består av et oligonukleotid merket med et 5'rapporteringsfargestoff og et nedstrøms 3'slukkerfargestoff, hybridiseres til en målsekvens i PCR-produktet. qPCR-analysen med hydrolyseprober benytter 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymerasen. Når proben er intakt, vil rapporteringsfargestoffets nærhet til quencher-fargestoffet føre til suppresjon av rapporteringsfluorescensen primært ved energioverføring av Förster-typen.

Under PCR, hvis interessenålet er til stede, hybridiseres proben spesifikt mellom forover- og reversprimerstedene. 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til DNA-polymerasen spalter proben mellom rapportøren og quencheren bare hvis proben hybridiseres til målet. Probefragmentene forflyttes deretter fra målet, og polymerisering av tråden fortsetter. 3'-enden av proben blokkes for å forhindre forlengelse av proben under PCR (Figur 2). Denne prosessen forekommer i hver syklus og forstyrrer ikke den eksponentielle produktakkumuleringen.

Økningen i fluorescenssignal registreres kun hvis målsekvensen er komplementær til proben og dermed amplifisert under PCR. Disse betingelsene gjør at ikke-spesifikk amplifikasjon ikke blir detektert. Økningen i fluorescens blir dermed direkte proporsjonal med målampifikasjonen under PCR.



Figur 2. Reaksjonsprinsipp. Totalt RNA er reverstranskribert, og cDNA-et som genereres, forsterkes med PCR ved bruk av et par spesifikke primere og en spesifikk intern dobbeltfarget probe (FAM™-BHQ®-1). Proben bindes til amplikonet under hvert hybridiseringstrinn i PCR. Når *Taq* forlenges fra primeren som er bundet til amplikonet, flyttes 5'enden av proben, som deretter degraderes av 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til *Taq* DNA-polymerasen. Spalting fortsetter til den resterende proben smelter fra amplikonet. Denne prosessen frigjør fluorofor og slukker i løsningen, noe som separerer dem spatielt og fører til en økning av fluorescens fra FAM og en reduksjon av fluorescens fra BHQ-1.

Materialer som medfølger

Settets innhold

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit		(24)
Katalognr.		670923
Antall reaksjoner		24
Reagents for reverse transcription (Reagenser for revers transkripsjon) (RT)		24 µl
Reverse transcriptase (Revers transkriptase)	Lilla	100 µl
RT Mix (RT-blanding)	Lilla	300 µl
Reagenser for kalibrering		
High Positive RNA Control (Høy positiv RNA-kontroll)	Hvit	15 µl × 3
Low Positive RNA Control (Lav positiv RNA-kontroll)	Hvit	15 µl × 3
IS-MMR Calibrator (IS-MMR-kalibrator)	Hvit	15 µl × 3
SP1-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ¹ kopier/5 µl)	Gul	35 µl
SP2-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ² kopier/5 µl)	Gul	35 µl
SP3-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ³ kopier/5 µl)	Gul	70 µl
SP4-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁴ kopier/5 µl)	Gul	35 µl
SP5-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁵ kopier/5 µl)	Gul	70 µl
SP6-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁶ kopier/5 µl)	Gul	70 µl

Tabellen fortsetter på neste side

Tabellen fortsetter fra forrige side

Reagenser for qPCR		
Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymerase)	Mint	85 µl
qPCR Mix ABL1 (qPCR-blanding ABL1)*	Grønn	720 µl × 3
qPCR Mix Mbcr (qPCR-blanding Mbcr)†	Rød	720 µl × 3
ipsogen <i>håndbok for BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR</i>		1

* Inneholder en blanding av spesifikke revers- og foroverprimere for ABL1-kontrollgenet pluss en spesifikk FAM-BHQ-1-probe.

† Inneholder en blanding av spesifikke revers- og foroverprimere for BCR-ABL1 Mbcr-fusjonsgenet pluss en spesifikk FAM-BHQ-1-probe.

Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Reagenser for lysering av erythrocytter

- Erythrocyte Lysis (EL) Buffer (kat.nr. 79217)
- 14,3 M β-merkaptoetanol*
- RNeasy® Midi Kit (kat.nr. 75144)

* Anbefalte kjemikalier og utstyr for lysering av erythrocytter og RNA-isolering kan utgjøre en fare. Se til at egnet personlig verneutstyr og egnede beskyttelsestiltak er fastsatt før bruk.

Reagenser for isolering av totalt RNA

- RNeasy Midi Kit (katalognr. 75144)
- Etanol (70 %, 80 % og 96–100 %)
- Trinn for opprensing og konsentrering av RNA: RNeasy MinElute® Cleanup Kit (katalognr. 74204)
- Nukleasefritt PCR-gradert vann

Forbruksartikler

- Nukleasefrie, aerosol-resistente og sterile PCR-pipettespisser med vannavstøtende filtre
- 18–20 gauge nål* montert på RNase-fri sprøyte
- 0,5 ml eller 0,2 ml nukleasefrie rør
- 1,5 ml eller 2 ml nukleasefrie rør
- 50 ml sentrifugerør
- Strip Tubes and Caps 0.1 ml for the Rotor-Gene Q (kat.nr. 981103 or 981106)
- Is

Utstyr

- Pipetter* beregnet på PCR (1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl)
- Bordsentrifuge* med rotor for 0,2 ml og 2 ml reaksjonsrør (opptil 8000 × g eller 10 000 o/min)
- Spektrofotometer*
- Laboratoriesentrifuge* med rotor for 15 ml og 50 ml sentrifugerør (opptil 3000–5000 × g) som tillater nedkjølt sentrifugering (4 °C)

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

- Termomikser, oppvarmet orbitalinkubator, varmeblokk eller vannbad (til det reverse transkripsjonstrinnet)*
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* (kat.nr. 9002032) og tilknyttet spesifikt materiale
Merknad: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM kan ikke brukes til trinnet med revers transkripsjon.

Utstyr for qPCR med manuell analyse

Rotor-Gene Q programvareversjon 2.1.0 eller høyereUtstyr for qPCR med automatisert analyse

- Rotor-Gene AssayManager® programvareversjon 2.1.x ($x \geq 0$)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0.x ($x \geq 0$)
- Analyseprofilen ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE_V1_0_x.iap ($x \geq 1$)

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i et praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN®-sett og hver settkomponent.

Alle kjemikalier og biologiske materialer er potensielt farlige. Prøver kan være smittefarlige og må behandles som smittefarlig biologisk materiale. Blod kan være smittefarlig. Alle nødvendige forholdsregler som er anbefalt av de relevante tilsynsmyndighetene i landet hvor det brukes, skal tas ved arbeid med fullblod.

Anbefalte kjemikalier og utstyr for lysering av erytrocytter og RNA-isolering kan utgjøre en fare. Se til at egnet personlig verneutstyr og egnede beskyttelsestiltak er fastsatt før bruk.

Generelle forholdsregler

Bruk av qPCR-tester krever god laboratoriepraksis, inkludert vedlikehold av utstyr som er dedikert til molekylærbiologi og i samsvar med gjeldende regelverk og relevante standarder. Komponentene i dette produktet er tilstrekkelige til å utføre 24 reaksjoner i hver analyseserie.

- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Reagenser som leveres sammen med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit, er optimalt fortynnet. Reagensene må ikke fortynnes ytterligere, ettersom dette kan føre til redusert ytelse.

- Alle reagensene som følger med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit, er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Ikke bytt noen reagenser mellom *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kits, ettersom dette kan påvirke ytelsen.
- Se brukerhåndboken for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 og Gamma plug-in for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.
- Endring av inkubasjonstider og/eller temperaturer kan føre til feilaktige eller uforenlige data.
- Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.
- Utvis ekstrem forsiktighet for å unngå krysskontaminering ved bruk av positive kontroller.
- Utvis ekstrem forsiktighet for å unngå overføringskontaminering av cDNA- eller PCR-produkt, som kan føre til et falskt positivt signal.
- Utvis ekstrem forsiktighet for å forhindre kontaminering med RNase eller DNase, som kan forårsake degradering av RNA- eller cDNA-templater.
- Ikke åpne Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet før kjøringen er ferdig.
- Det er viktig at prøvetesting utføres riktig, og at man unngår feil ved innsetting av prøve, innlasting og pipettering.
- Sørg for at prøvene håndteres på en systematisk måte for å sikre riktig identifisering til enhver tid slik at sporbarheten opprettholdes.

Vi anbefaler derfor følgende:

- Bruk nukleasefritt laboratorieutstyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonsflasker).
- Bruk nye aerosol-resistente pipettespisser for alle pipetteringsstrinn for å unngå krysskontaminering av prøver og reagenser.
- Klargjør pre-PCR-masterblandinger med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.) i et dedikert område hvor ingen DNA-matriser (cDNA, plasmid eller PCR-produkter) blir innført.

- Tilsett templat i en separat sone (helst i et eget rom) med spesifikke materialer (pipetter, spisser osv.).

Se de tilsvarende håndbøkene for sikkerhetsinformasjon vedrørende reagensene og settene som brukes ved prøveklargjøring. Sikkerhetsinformasjon for RNeasy Midi Kit (kat.nr. 75144) i forbindelse med Buffer EL (kat.nr. 79217) finnes i *håndboken for RNeasy Midi/Maxi*, og sikkerhetsinformasjon for RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr. 74204) finnes i *håndboken for RNeasy MinElute Cleanup*.

Håndtering og oppbevaring av reagenser

Forsendelsesbetingelser

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit sendes på tørris. Hvis en komponent i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ikke er frosset ved ankomst, hvis den ytre emballasjen har blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel eller ikke inneholder reagenser, må du kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren (se bak på omslaget eller gå til www.qiagen.com).

Oppbevaringsforhold

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit skal umiddelbart etter mottak plasseres i en fryser som holder en konstant temperatur på mellom -30 og -15 °C. Det er viktig at qPCR-blandingene beskyttes mot lys.

For informasjon om oppbevaring av reagensene og settene som brukes til prøveklargjøring – RNeasy Midi Kit (kat.nr. 75144), Buffer EL (kat.nr. 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr. 74204) – se de tilsvarende håndbøkene.

Stabilitet

Når *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit oppbevares under de angitte oppbevaringsforholdene, er settet stabilt frem til angitt utløpsdato.

Når reagenser først er åpnet, kan de oppbevares i originalemballasjen ved -30 til -15 °C frem til utløpsdatoen på emballasjen. Maks. fem fryse- og tinesykluser kan utføres.

For informasjon om stabiliteten til reagensene og settene som brukes til prøveklargjøring – RNeasy Midi Kit (kat.nr. 75144), Buffer EL (kat.nr. 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr. 74204) – se de tilsvarende håndbøkene.

Håndtering og oppbevaring av prøver

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit er beregnet for bruk med RNA-prøver ekstrahert fra fullblod. Alle prøver skal behandles som potensielt smittefarlig materiale.

Fullblodsprøver

- Fullblodsprøver skal være antikoagulert med kalium-EDTA (K_2 -EDTA) og oppbevart ved $2-8$ °C i maks. 4 dager før RNA-ekstraksjon.
- Bruk ikke frossent blod.
- Blodprøver må merkes, håndteres og oppbevares på en kontrollert måte i henhold til lokale prosedyrer.

Merk: Fullblodsprøver må sendes under de samme forholdene som de som gjelder for oppbevaring for å unngå temperaturendringer.

RNA-prøver

- Etter isolering kan rensset RNA oppbevares fra -30 til -15 °C, eller lavere (-90 til -65 °C) hvis de skal oppbevares over lang tid.
- RNA-prøver må merkes, håndteres og oppbevares på en kontrollert måte i henhold til lokale prosedyrer.

Merk: RNA-prøver må sendes under de samme forholdene som de som gjelder for oppbevaring for å unngå temperaturendringer.

Prosedyre

Totalt RNA skal renses fra 10 ml perifert fullblod som er tappet i EDTA-rør.

- Kontroller at reagenser som skal brukes til lysering av erythrocytter, RNA-isolering og RNA-konsentrasjon ikke har utløpt, og at de er blitt transportert og oppbevart under riktige forhold.
- Bruk RNeasy Midi Kit (kat.nr. 75144) og Buffer EL for erythrocyte lysis (kat.nr. 79217) til RNA-rensing fra perifert fullblod.

Protokoll for lysering av erythrocytter for å isolere totale leukocyter fra fullblod

Denne protokollen er ment for isolering av totale leukocyter fra 10 ml humant fullblod ved bruk av Buffer EL (kat.nr. 79217).

Merk: Denne protokollen er ikke beregnet for bruk av frosne fullblodsprøver.

Viktige merknader før du starter

- Blod og kroppsvæsker fra alle mennesker kan være smittefarlige. Alle nødvendige forholdsregler som er anbefalt av de relevante tilsynsmyndighetene i landet hvor det brukes, skal tas ved arbeid med fullblod.
- RLT-buffer (Buffer RLT) kan danne et presipitat under oppbevaring. Løs om nødvendig opp ved oppvarming og plasser i romtemperatur.
- Trinnet for lysering av erythrocytter skal utføres på is.
- Sentrifugerinn 3 og 5 i denne protokollen skal utføres ved 4 °C i en standard laboratoriesentrifuge.

Dette må du gjøre før du starter

- Klargjør Buffer RLT (med RNeasy Midi Kit) ved å tilsette β -merkaptoetanol (β -ME): Tilsett 10 μ l β -ME per 1 ml Buffer RLT.
- RLT-bufferen er stabil i én måned etter tilsetting av β -ME.
Merk: β -ME er giftig. Pipetter under en avtrekkshette og bruk egnet verneutstyr.
Merk: RLT-buffer inneholder guanidinisotiocyanat som kan danne svært reaktive stoffer i kombinasjon med blekemiddel. Ikke tilsett blekemiddel eller syreløsninger direkte i avfall som er knyttet til prøveklargjøringen.

Prosedyre

1. Tilsett 40 ml Buffer EL til 10 ml fullblod i ett enkelt 50 ml sentrifugerør. Bland ved å vende røret en kort stund.
2. Inkuber i 15 minutter på is. Bland ved å vende røret en kort stund to ganger under inkubasjonen.
Merk: Den uklare suspensjonen blir gjennomsiktig under inkubasjon, noe som angir lysering av røde blodceller.
3. Sentrifuger ved 400 \times g i 10 minutter ved 4 °C. Kast all supernatant. Ta vare på leukocyttpelletten.
Merk: Leukocytterne danner en pellet etter sentrifugering. Sørg for å fjerne all supernatant. Spormengder av røde blodceller som kan være igjen, fjernes i de følgende trinnene. Ufullstendig fjerning av supernatanten vil hemme lysering og fortynne lysatet, noe som vil påvirke RNA-bindingen til RNeasy-membranen. Begge forholdene kan redusere RNA-utbyttet.
4. Tilsett 20 ml Buffer EL til leukocyttpelletten, og suspender på nytt ved å pipettere opp og ned.

5. Sentrifuger ved $400 \times g$ i 10 minutter ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kast all supernatant. Ta vare på leukocyttpelleten.

Merk: Følgende sentrifugeringstrinn (f.eks. RNA-isolering) må utføres ved $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. Løsne leukocyttpelleten ved å slå lett på røret i 4 ml RLT-buffer tilsatt β -ME. Vorteks eller pipetter for å blande.

Merk: Se til at β -ME er tilsatt RLT-bufferen, før bruk.

7. Knusing utføres med en konvensjonell rotor/stator-homogenisator i minst 45 sekunder ved full hastighet til prøven er helt homogen. Alternativt kan prøven vortekses i 10 sekunder før lysatet føres minst 10 ganger gjennom en 18–20 gauge nål montert på en RNase-fri sprøyte.

Merk: Ufullstendig knusing vil føre til betydelig redusert utbytte som følge av gjentetting av RNeasy-kolonnen. Knusing med rotor/stator-homogenisatorer resulterer vanligvis i høyere totalt RNA-utbytte sammenlignet med andre homogeniseringsmetoder.

Merk: Prøver kan oppbevares ved -90 til $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ i lyseringsbuffer etter knusing. Frosne prøver er stabile i flere måneder.

Isolering av totalt RNA

Denne protokollen brukes til å isolere totalt cellulært RNA fra homogenisert leukocyttylsat resuspendert i 4 ml RLT/ β -ME.

Viktige merknader før du starter

- DNase-nedbrytning er ikke nødvendig ettersom RNeasy-silikamembranteknologien effektivt fjerner mesteparten av DNA-et.
- RLT-buffer og RW1-buffer (Buffer RW1) inneholder et guanidinsalt og er derfor ikke kompatible med desinfeksjonsmidler som inneholder blekemiddel. Guanidin er et irriterende stoff. Ta egnede forholdsregler og bruk hansker ved håndtering.

- RNeasy-protokollen skal utføres ved romtemperatur. Det er viktig å arbeide raskt under denne prosedyren.
- Alle sentrifugetrinn utføres ved 20–25 °C. Se til at sentrifugen ikke kjøler ned under 20 °C.
- Hele volumet må passere gjennom kolonnen ved hvert sentrifugetrinn. Det kan bli nødvendig å gjenta sentrifugeringen.

Dette må du gjøre før du starter

- Tin om nødvendig leukocytlysatet i romtemperatur før du starter protokollen for RNA-isolering.
- Klargjør 4 ml 70 % etanol per prøve.
- RPE-buffer (RPE Buffer) leveres som et konsentrat. Før den brukes første gang, skal 4 volumer etanol (96–100 %) tilsettes, som angitt på flasken, for å få en aktiv løsning.

Prosedyre

1. Tilsett 4 ml 70 % etanol til lysatet, og bland godt ved å riste kraftig. Skal ikke sentrifugeres.

Merk: Synlige presipitater kan dannes etter tilsetting av etanol. Løs opp presipitater ved å riste kraftig, og gå umiddelbart videre til trinn 2. Utilstrekkelig oppløsning av presipitater kan forårsake DNA-kontaminering, noe som kan føre til en uren prøve med totalt RNA.

2. Tilsett prøven, inkludert eventuelt presipitat som har dannet seg, i en RNeasy Midi-kolonne plassert i et 15 ml sentrifugerør (følger med). Lukk røret forsiktig, og sentrifuger i 5 minutter ved 4000 × g. Kast gjennomstrømningen.

Merk: Maksimalt innlastingsvolum er 4 ml. Hvis volumet overstiger 4,0 ml, skal alikvoter lastes inn på RNeasy-kolonnen og sentrifugeres som beskrevet ovenfor. Kast væsken etter hvert sentrifugeringstrinn.

Bruk det samme sentrifugerøret i trinn 3.

3. Tilsett 4 ml RW1-buffer til RNeasy-kolonnen. Lukk sentrifugerøret forsiktig, og sentrifuger i 5 minutter ved $4000 \times g$ for å vaske kolonnen. Kast væsken.

Merk: Væsken inneholder RLT-buffer eller RW1-buffer og er derfor ikke kompatibel med blekemiddel.

Bruk det samme sentrifugerøret i trinn 4.

4. Tilsett 2,5 ml RPE-buffer til RNeasy-kolonnen. Lukk sentrifugerøret forsiktig, og sentrifuger i 2 minutter ved $4000 \times g$ for å vaske kolonnen.

Merk: RPE-buffer leveres som et konsentrat. Se til at etanol er tilsatt RPE-bufferen før bruk.

Bruk det samme sentrifugerøret i trinn 5. Det er ikke nødvendig å kaste væsken.

5. Tilsett ytterligere 2,5 ml RPE-buffer til RNeasy-kolonnen. Lukk sentrifugerøret forsiktig, og sentrifuger i 5 minutter ved $4000 \times g$ for å tørke RNeasy-silikagelmembranen.

Merk: Det er viktig å tørke RNeasy-membranen, ettersom etanolrester kan interferere med nedstrømsreaksjoner. Denne sentrifugeringen sikrer at det ikke overføres etanol under eluering.

Merk: Etter sentrifugeringen må RNeasy-kolonnen fjernes forsiktig fra sentrifugerøret slik at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken, fordi det vil føre til overføring av etanol.

6. Eluering utføres ved å overføre RNeasy-kolonnen til et nytt 15 ml prøverør (følger med). Pipetter 200 μ l RNase-fritt vann direkte på RNeasy-silikagelmembranen. Lukk røret forsiktig. La det stå i 1 minutt, og sentrifuger deretter røret i 3 minutter ved $4000 \times g$.
7. Gjenta elueringstrinnet (trinn 6) med eluatet fra trinn 6, og sentrifuger deretter i 5 minutter ved $4000 \times g$.

Merk: Ved langtidsoppbevaring kan RNA oppbevares ved -90 til -65 °C.

Kvalifisering og kvantifisering av RNA

Analysekvaliteten avhenger i stor grad av kvaliteten på input-RNA. Vi anbefaler bruk av RNA som er rensset med agarosegel-elektroforese eller spektrofotometri før analyse.

- En blank med nukleasefritt PCR-gradert vann må brukes for å kalibrere spektrofotometeret.
- OD av 1,0 ved 260 nm tilsvarer ca. 40 µg/ml enkeltrådet RNA.
- Et OD₂₆₀/OD₂₈₀-forhold mellom 1,8 og 2,1 er et tegn på høyrenset RNA.

For å utføre RT-trinnet må RNA-konsentrasjonen være 200 ng/µl. Hvis RNA-konsentrasjonen i eluatet er mindre enn 200 ng/µl, må RNA-konsentrasjonen i eluatet økes ved bruk av RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, kat.nr. 74204).

Hvis RNA-konsentrasjonen i eluatet er over maksgrensen, må konsentrasjonen justeres til 200 ng/µl med RNase-fritt vann.

Merk: Kontroller RNA-konsentrasjonen etter normalisering.

RNA-konsentrasjon

Denne protokollen er optimalisert for å oppkonsentrere RNA.

Viktige merknader før du starter

- DNase-nedbrytning er ikke nødvendig ettersom RNeasy MinElute-silikamembranteknologien effektivt fjerner mesteparten av DNA-et.
- RLT-buffer inneholder et guanidinsalt og er derfor ikke kompatibel med desinfeksjonsmidler som inneholder blekemiddel.
- Utfør alle trinnene i prosedyren ved romtemperatur (15–25 °C). Det er viktig å arbeide raskt under denne prosedyren.

- Utfør alle sentrifugetrinnene ved 20–25 °C i en standard mikrosentrifuge. Se til at sentrifugen ikke gir nedkjøling til under 20 °C.
- RLT-buffer kan danne et presipitat under oppbevaring. Løs opp ved oppvarming om nødvendig, og plasser den i romtemperatur (15–25 °C).

Dette må du gjøre før du starter

- Klargjør 500 µl 80 % etanol for hver RNA-prøve som skal oppkonsentreres.
- RPE-buffer leveres som et konsentrat. Før den brukes første gang, skal 4 volumer etanol (96–100 %) tilsettes, som angitt på flasken, for å få en aktiv løsning.
- Sett opp kolonnene i romtemperatur før start.
- Mål volumet til prøvene som skal behandles, og juster slik at det endelige prøvevolumet er 200 µl.

Prosedyre

1. Etter at prøvevolumet er justert til 200 µl med RNase-fritt vann, skal 700 µl RLT-buffer tilsettes. Bland godt.
2. Tilsett 500 µl 96–100 % etanol til det fortynnede RNA-et, og bland godt ved å pipettere. Skal ikke sentrifugeres. Gå umiddelbart videre til trinn 3.
3. Overfør maks. 700 µl av prøven til en RNeasy MinElute-spinnkolonne plassert i et 2 ml prøverør (følger med). Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 15 sekunder ved $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ o/min). Kast væsken. Overfør eventuell resterende prøve (opptil 700 µl), og gjenta sentrifugeringen. Kast væsken.

Merk: Væsken inneholder RLT-buffer og er derfor ikke kompatibel med blekemiddel. Se "Advarsler og forholdsregler", side 15, for sikkerhetsinformasjon.

4. Plasser RNeasy MinElute-spinnkolonnen i et nytt 2 ml rør (følger med).

5. Tilsett 500 µl RPE-buffer til spinnkolonnen. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 15 sekunder ved $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ o/min) for å vaske spinnkolonnens membran. Kast væsken.
Merk: RPE-buffer leveres som et konsentrat. Se til at etanol er tilsatt RPE-bufferen før bruk. Bruk det samme prøverøret i trinn 6.
6. Tilsett 500 µl 80 % etanol til RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 2 minutter ved $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ o/min) for å vaske spinnkolonnens membran. Kast væsken og prøverøret.
Merk: Væsken inneholder RLT-buffer og er derfor ikke kompatibel med blekemiddel.
Merk: Etter sentrifugering må RNeasy MinElute-spinnkolonnen fjernes forsiktig fra prøverøret slik at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken. Ellers vil overføring av etanol finne sted.
7. Plasser RNeasy MinElute-spinnkolonnen i et nytt 2 ml rør (følger med).
8. Åpne lokket til spinnkolonnen, og sentrifuger ved full hastighet i 5 minutter. Kast væsken og prøverøret.
For å unngå skade på spinnkolonnenes lokk skal spinnkolonnene plasseres i sentrifugen med minst én tom posisjon mellom kolonnene. Vri lokkene slik at de peker i motsatt retning av rotorens rotasjonsretning (f.eks. hvis rotoren roterer med klokken, skal lokkene peke mot klokken).
Det er viktig å tørke spinnkolonnens membran ettersom etanolrester kan interferere med nedstrømsreaksjoner. Sentrifugering av spinnkolonnene med åpne lokk sikrer at etanol ikke overføres under RNA-eluering.
9. Plasser RNeasy MinElute-spinnkolonnen i et nytt 1,5 ml rør (følger med).
10. Tilsett 20 µl RNase-fritt vann direkte i midten av spinnkolonnens membran. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 1 minutt ved full hastighet for å eluere RNA-et.
11. Legg prøvene på is når elueringstrinnet er fullført.

12. Mål volumet til prøvene som skal behandles, og juster slik at den endelige konsentrasjonen er 200 ng/ μ l.

Se Kvalifisering og kvantifisering av RNA på side 25 for mer informasjon om nødvendig.

Revers transkripsjon

Dette må du gjøre før du starter

- Tin alle nødvendige komponenter bortsett fra revers transkriptase, som må oppbevares i fryseren når den ikke er i bruk. Legg rørene som inneholder komponentene som skal tines, på is.

Merk: Sørg for at opptiningstrinnet ikke overstiger 30 minutter, for å unngå degradering av materiale.

- Rengjør benkeområdet dedikert for klargjøring av revers transkripsjon (RT)-blandingen for å unngå templat- eller nukleasekontaminering.
- Bland godt ved å pipettere rørene som inneholder reagenser for revers transkripsjon, RNA-prøver, positive kontroller og IS-MMR-kalibrator, opp og ned 10 ganger, og sentrifuger kort før bruk. Oppbevar deretter på is.
- Den RT-negative kontrollen genereres under det reverse transkripsjonstrinnet ved bruk av nukleasefritt PCR-gradert vann.
- Nødvendig input er 3 μ g RNA per prøve.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit inneholder nok reagenser til å utføre tre kjøring med åtte prøver.

Prosedyre

1. Inkuber 15 μ l av hver prøve, positive kontroller (høye og lave positive kontroller), vann (brukes til å generere den RT-negative kontrollen) og IS-MMR-kalibrator i 5 minutter ved 65 °C. Avkjøl deretter umiddelbart på is i minst 5 minutter.

2. Sentrifuger kort (ca. 5 sekunder) for å samle væsken i bunnen av røret. Oppbevar deretter på is.
3. Klargjør følgende RT-blanding i henhold til antall prøver, kontroller og kalibratorer som behandles (Tabell 1).

Merk: Det endelige volumet per reaksjon må være 25 µl.

Tabell 1. Klargjøring av RT-blanding

Komponent	Volum per prøve (µl)	RT-blanding: 12 + 1 reaksjoner (µl)	Endelig konsentrasjon
RT-blanding, 3,33x	7,5	97,5	1x
Revers transkriptase, 10x	2,5	32,5	1x
Endelig volum av RT-blanding (som skal tilsettes i trinn 4)	10	130	–
Prøve, positive kontroller, IS-MMR-kalibrator eller vann (fra trinn 1)	15	15 hver	–
Totalt volum	25	25 hver	–

4. Pipetter 10 µl RT-blanding i hvert merket rør som inneholder RNA-prøve, positive kontroller, vann eller kalibrator (fra trinn 3).
5. Bland godt ved å pipettere opp og ned 10 ganger, og sentrifuger kort (ca. 5 sekunder) for å samle væsken i bunnen av røret.

Merk: Sett alle reagensene for revers transkripsjon i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit tilbake i fryseren etter oppsett av reaksjonene for å unngå degradering av materiale.

6. Sett rørene inn i termosentrifugen, og start programmet for revers transkripsjon (Tabell 2).

Tabell 2. Temperaturprofil for revers transkripsjon

Trinn	Parametere
Reverse transcription 1 (Revers transkripsjon 1)	Temperature (Temperatur): 25 °C Time (Tid): 10 minutter
Reverse transcription 2 (Revers transkripsjon 2)	Temperature (Temperatur): 46 °C Time (Tid): 45 minutter
Inactivation (Inaktivering)	Temperature (Temperatur): 85 °C Time (Tid): 5 minutter
Cooling (Nedkjøling)	Temperature (Temperatur): 4 °C Time (Tid): 5 minutter

7. Når programmet er ferdig, skal rørene sentrifuseres kort (ca. 5 sekunder) for å samle væsken i bunnen av røret. Oppbevar rørene på is eller ved -20 °C til qPCR-forsøket skal utføres.

Manuell analyse: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med rotor for 72-rør med RGQ-programvare

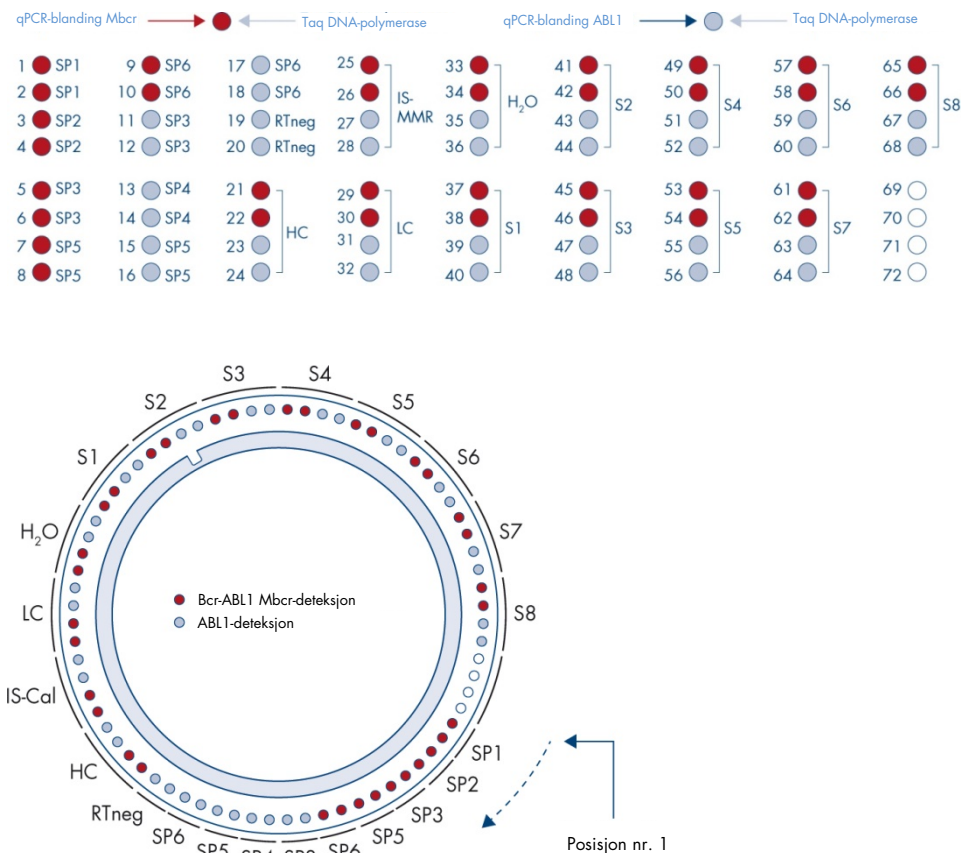
Vi anbefaler at alle målinger utføres i duplikat, som angitt i Tabell 3. Settet tillater testing av åtte cDNA-prøver i samme forsøk i duplikat. Det kan utføres tre forsøk med *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit.

Tabell 3. Antall reaksjoner for Rotor-Gene Q-instrument med rotor for 72 rør

Prøve	Reaksjoner
Med qPCR-blanding ABL1 (34 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8x2 reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA lav positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	4 x 2 reaksjoner (SP3, SP4, SP5 og SP6)
RT-negativ kontroll	2 reaksjoner
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med qPCR-blanding MbcR (34 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8x2 reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA lav positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	5 x 2 reaksjoner (SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6)
Vannkontroll	2 reaksjoner

Oppsett av lasteblokk og rotor

Vi anbefaler at du tester minst åtte cDNA-prøver i samme forsøk for å optimalisere bruken av standardene, primerne og probeblandningene. Rotoroppsettet i Figur 3 viser et eksempelforsøk.



Figur 3. Rotoroppsett for hvert forsøk. SP1–SP6: BCR-ABL1 MbcR- og ABL1-standarder, RTneg: RT-negativ kontroll; IS-Cal: IS-MMR-kalibrator; HC: høy positiv kontroll; LC: lav positiv kontroll; H₂O: vannkontroll; S1–S8: cDNA-prøver.

Merk: Fyll alle tomme posisjoner med tomme rør. Tallene angir posisjoner i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon.

Sette opp qPCR-en

Dette må du gjøre før du starter

- Tin alle nødvendige komponenter bortsett fra *Taq* DNA-polymerasen, som må oppbevares i fryseren når den ikke er i bruk. Legg rørene som inneholder komponentene som skal tines, på is.

Merk: Sørg for at opptiningstrinnet ikke overstiger 30 minutter, for å unngå degradering av materiale.

- Rengjør benkeområdet dedikert for klargjøring av PCR-blandingen for å unngå templat- eller nukleasekontaminering.
- Bland godt ved å pipettere rørene som inneholder qPCR-blanding ABL1 og qPCR-blanding Mbcr, opp og ned 10 ganger, og sentrifuger kort før bruk. Oppbevar deretter på is.

Prosedyre

1. Klargjør PCR-masterblanding i henhold til antall prøver som behandles.

Tabell 4 beskriver pipetteringsskjemaet for klargjøring av en reagensblanding, beregnet på å oppnå et endelig reaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending klargjøres i henhold til antall reaksjoner ved bruk av de samme primerne og den samme probeblandingen (enten qPCR-blanding ABL1 eller qPCR-blanding Mbcr). Ekstra volumer er inkludert for å kompensere for pipetteringsfeil.

Merk: Bruk ikke reaksjonsvolumer (reaksjonsblanding pluss prøve) som er mindre enn 25 µl.

Tabell 4. Klargjøring av PCR-masterblanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	Forhåndsblanding ABL1 eller Mbcr: 34 + 2 reaksjoner (µl)	Endelig konsentrasjon
qPCR-blanding (enten qPCR-blanding ABL1 eller qPCR-blanding Mbcr)	19,75	711	1×
Taq DNA-polymerase	0,25	9	1×
Prøve, standard, kontroll eller IS-MMR-kalibrator (som skal tilsettes i trinn 3)	5	5 hver	–
Totalt volum	25	25 hver	–

- Pipetter 20 µl qPCR-forhåndsblanding i hvert 0,1 ml Rotor-Gene Q-rør.
- Tilsett 5 µl RT-produkt (cDNA) oppnådd i reverstranskripsjonstrinnet (se Revers transkripsjon, side 28), 5 µl standarder, 5 µl kontroller eller IS-MMR-kalibrator i henhold til prøveoppsettet som vist i Figur 4 (totalt volum 25 µl).
- Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.

Klargjøre Rotor-Gene MDx og starte qPCR-kjøring

- Plasser rørene i adapteren som følger med instrumentet.
Merk: Ubrukte posisjoner må fylles med tomme rør.
- Plasser låseringen over rørene, og trykk for å låse.
- Sett den fulle adapteren inn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
- Programmer Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med det termiske syklusprogrammet som angitt i Tabell 5.

Merk: Sett alle komponentene i *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit tilbake i fryseren for å unngå degradering av materiale.

Tabell 5. Temperaturprofil for qPCR

Trinn	Parametere
Mode of analysis (Analysemodus)	Quantitation (Kvantitering)
Hold 1(Pause)1	Temperature (Temperatur): 95 °C Time (Tid): 15 minutter
Cycling (Sykling)	50 sykluser 94 °C, 15 sekunder 60 °C, 60 sekunder med avlesning av FAM- fluorescens i den grønne kanalen.

5. Klikk på "Gain Optimisation" (Optimal forsterkning) i dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) for å åpne dialogboksen "Auto-Gain Optimisation Setup" (Autooppsett av optimal forsterkning). Kontroller at området for den grønne kanalen er fra "5 Fl" for "Min Reading" (Min. avlesning) til "10 Fl" for "Max Reading" (Maks. avlesning) og det akseptable forsterkningsområdet fra -10 til 10.
6. Kontroller at det er merket av for "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Utfør optimalisering før 1. avlesning), og lukk dialogboksen "Auto-Gain Optimisation Setup" (Autooppsett av optimal forsterkning).
7. Start det termiske syklusprogrammet.
8. Opprett både ABL1- og Mbcr-undersett, som vises i vinduet "Edit samples" (Rediger prøver).
9. Velg "Options" (Alternativer) og "Crop Start Cycles" (Kutt startsykluser) når termosyklusprogrammet er ferdig. Fjern data før syklus 10. Velg deretter "Analysis" (Analyse) og "Cycling A. Green from 10" (Syklus A, grønn fra 10), som i rapporten angis som "left threshold = 10.00" (venstre terskelverdi = 10,00).

10. Gjør som følger for både ABL1 og Mbcr:

- Velg "Cancel" (Avbryt) hvis vinduet "Calculate Automatic Threshold" (Beregn automatisk terskel) åpnes.
- Definer terskelen ved 0,03 (nederst til høyre i vinduet).
- Velg Dynamic Tube (Dynamisk rør) som normaliseringsmetode i rapporten, og "Slope Correct" (Riktig helning) for å korrigere støyhelningen.
- Kontroller at "Outlier Removal" (Avviksfjerning) er satt til 0 % (svarer til NTC-terskelen), og at "Reaction Efficiency Threshold" (Terskel for reaksjonseffektivitet) er deaktivert.
- Sett grafen til lineær skala og "Auto-Scale" (Autoskala).
- Høyreklikk i vinduet for å vise amplifikasjonskurver, og kontroller at "Digital filter" (Digitalt filter) er satt til "Light" (Lys).
- Velg alternativet "named on" (navngitt) (til høyre i vinduet) for å sikre at alle prøver vises. Når alle trinnene er utført, skal rådata registreres. Gå videre til analyse av resultatene (se "Prinsipp for dataanalyse", side 47).

Automatisert analyse: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med rotor for 72-rør med RGAM-programvare

Vi anbefaler at alle målinger utføres i duplikat, som angitt i Tabell 6. Settet tillater testing av åtte cDNA-prøver i samme forsøk i duplikat. Det kan utføres tre forsøk med *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit.

Tabell 6. Antall reaksjoner for Rotor-Gene Q-instrument med rotor for 72 rør

Prøve	Reaksjoner
Med qPCR-blanding ABL1 (34 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8x2 reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA lav positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	4 x 2 reaksjoner (SP3, SP4, SP5 og SP6)
RT-negativ kontroll	2 reaksjoner
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med qPCR-blanding MbcR (34 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8x2 reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA lav positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	5 x 2 reaksjoner (SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6)
Vannkontroll	2 reaksjoner

Viktige merknader før du starter

Ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit må kjøres på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med Rotor-Gene AssayManager v2.1. Det er viktig at du gjør deg godt kjent med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet før du starter protokollen. Se brukerhåndbøkene for instrumentet, Rotor-Gene AssayManager programvareversjon 2.1 og Gamma Plug-in for mer informasjon.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 muliggjør automatisert tolkning av PCR-resultatene. Syklusparametrene er låst for kjøringen.

Dette må du gjøre før du starter

Programvaren Rotor-Gene AssayManager versjon 2.1 må være installert på datamaskinen som er koblet til Rotor-Gene Q, og kan lastes ned fra QIAGENs nettside: http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. For detaljert informasjon om installasjon av kjerneprogramvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1 kan du se brukerhåndboken for programvaren (*brukerhåndbok for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*).

- *Ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit krever den spesifikke Gamma Plug-in. Denne plug-in-en kan lastes ned fra QIAGENs nettside: <https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bfb8c9a8-245b-4ab4-99ea-1b39e2c243a0&lang=en>. Denne plug-in-en må installeres på en datamaskin som allerede har Rotor-Gene AssayManager v2.1 installert.
- *Ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit krever også en analyseprofil. Denne analyseprofilen (*.iap-fil) inneholder alle nødvendige parametere for sykluser og analysering av qPCR-analysen. Den kan lastes ned fra den spesifikke nettsiden for *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit på QIAGENs nettsted <https://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen->

bcr-abl1-mbcr-rgq-rt-pcr-kit-ce/#resources. Analyseprofilen må importeres i programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Merk: *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit kan bare kjøres hvis visse konfigurasjonsinnstillinger i Rotor-Gen AssayManager-programvaren v2.1 er programmert.

Av systemsikkerhetshensyn må følgende konfigurasjonsinnstillinger stilles inn for lukket modus:

- "Material number required" (Krever materialnummer)
- "Valid expiry date required" (Krever gyldig utløpsdato)
- "Lot number required" (Krever lotnummer)

Installasjon av Gamma Plug-in og import av analyseprofilen

Installasjon og import av Gamma Plug-in og analyseprofilen er beskrevet i brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 og Gamma Plug-in, henholdsvis (*brukerhåndbok for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*) og (*brukerhåndbok for Gamma Plug-in*).

- Last ned både Gamma Plug-in og den nyeste versjonen av *ipsogen*_BCR-ABL1Mbcr(ABL)_blood_CE-analyseprofilen fra QIAGENs nettside.
- Start installasjonen ved å dobbeltklikke på RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi-filen, og følg installasjonsveiledningen. En detaljert beskrivelse av denne prosessen finnes i avsnittet om installasjon av plugin-moduler i *brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

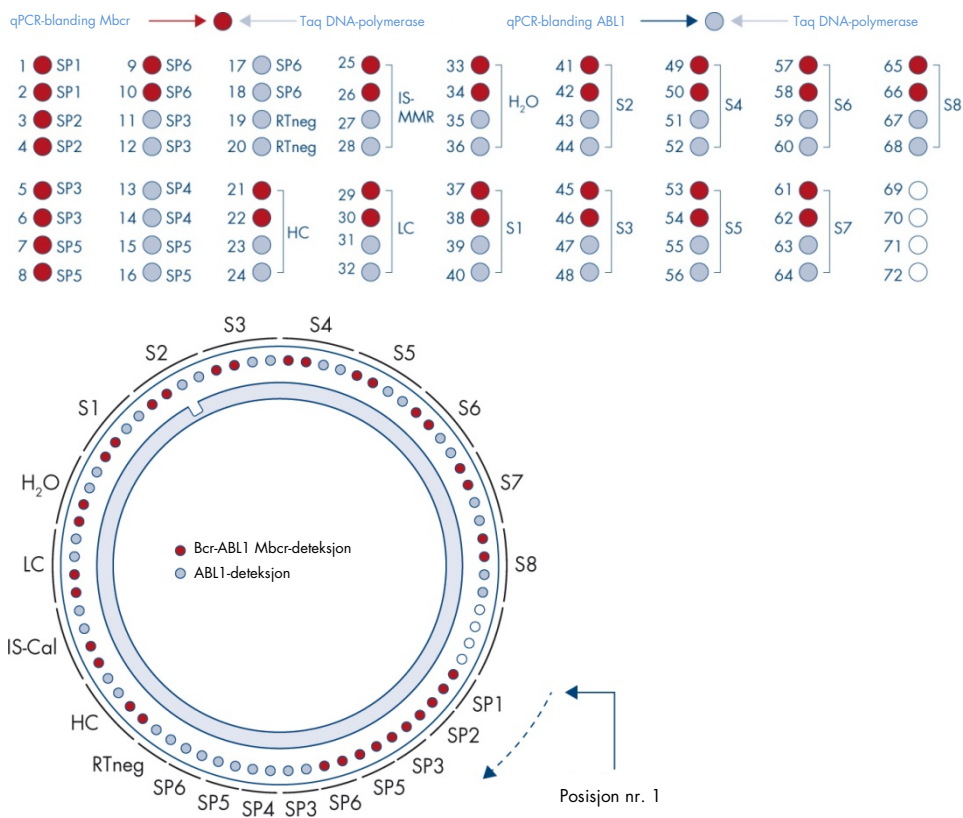
Merk: Av systemsikkerhetshensyn velger du fanen "Settings" (Innstillinger) og merker av i boksene "Material number required" (Krever materialnummer), "Valid expiry date required" (Krever gyldig utløpsdato) og "Lot number required" (Krever lotnummer) for "Closed Mode" (Lukket modus) (i delen Work list (Arbeidsliste)). Hvis de ikke er aktivert (merket av), klikker du for å aktivere dem.

-
- Når plug-in-en er installert, må en person med administratorrettigheter for programvaren Rotor-Gene AssayManager importere ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE-analyseprofilen som følger:
 1. Logg inn på Rotor-Gene AssayManager v2.1-programvaren som bruker med administratorrettigheter.
 2. Velg miljøet "Configuration" (Konfigurasjon).
 3. Velg fanen "Assay Profiles" (Analyseprofiler).
 4. Klikk på knappen "Import" (Importer).
 5. Velg analyseprofilen ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE som skal importeres i dialogboksen. Klikk på "Open" (Åpne).
 6. Når analyseprofilen er importert, kan den brukes i miljøet "Setup" (Oppsett).

Merk: Samme versjon av en analyseprofil kan ikke importeres to ganger.

Oppsett av lasteblokk og rotor

Vi anbefaler at du tester minst åtte cDNA-prøver i samme forsøk for å optimalisere bruken av standardene, primerne og probeblandningene. Rotoroppsettet i Figur 4 viser et eksempelforsøk.



Figur 4. Rotoroppsett for hvert forsøk. SP1–SP6: BCR-ABL1 MbcR- og ABL1-standarder, **RTneg:** RT-negativ kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **HC:** høy positiv kontroll; **LC:** lav positiv kontroll; **H₂O:** vannkontroll; **S1–S8:** cDNA-prøver. **Merk:** Fyll alle tomme posisjoner med tomme rør. Tallene angir posisjoner i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon.



Rørene må settes inn i rotoren som angitt i Figur 4, ettersom den automatiserte analysen definert i analyseprofilen er basert på dette oppsettet. Hvis det brukes et annet oppsett, vil resultatene bli feil.

Merk: Fyll alle gjenværende posisjoner med tomme rør.

Opprette en arbeidsliste

Opprett en arbeidsliste for prøvene som skal behandles, på følgende måte:

1. Slå på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
2. Åpne Rotor-Gene AssayManager v2.1-programvaren, logg inn som en bruker med operatørrolle i lukket modus.
3. Klikk på knappen "New manual work list" (Ny manuell arbeidsliste) i arbeidslisteadministratoren (miljøet "Setup" (Oppsett)).
4. Velg "ipsogen_BCR-ABL1 Mbc(ABL)_blood_CE"-analyseprofilen fra listen over tilgjengelige analyseprofiler i trinnet "Assay" (Analyse).
5. Klikk på knappen "Add assay to work list" (Legg til analyse i arbeidsliste) for å overføre den valgte analyseprofilen til listen "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler). Analyseprofilen skal nå vises i listen "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler).
6. Angi antall prøver i det tilhørende feltet.
7. Velg "Kit information" (Informasjon om settet), og legg inn følgende informasjon om *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit, som er trykt på lokket på esken.
 - Materialnummer: 0670923
 - Gyldig utløpsdato
 - Lotnummer.
8. Velg trinnet "Samples" (Prøver). En liste med detaljer om prøvene vises. Denne listen representerer det forventede oppsettet for rotoren.

9. Legg inn prøveidentifikasjonsnummeret/-numrene i listen samt all annen valgfri informasjon om prøvene som kommentar til hver enkelt prøve.
10. Velg trinnet "Properties" (Egenskaper), og angi navn på arbeidslisten.
11. Aktiver boksen "is applicable" (gjelder).
12. Lagre arbeidslisten.
13. Arbeidslisten kan skrives ut for å gjøre det enklere å klargjøre og sette opp qPCR. Trykk på knappen "Print work list" (Skriv ut arbeidsliste) for å skrive ut arbeidslisten. Prøveinformasjon er inkludert som en del av arbeidslisten.
Merk: Arbeidslisten kan opprettes så snart forsøket er satt opp i instrumentet, eller før prøvene legges til i instrumentet, ettersom arbeidslistefilen kan lagres.

Sette opp qPCR-en

Dette må du gjøre før du starter

- Tin alle nødvendige komponenter bortsett fra *Taq* DNA-polymerasen, som må oppbevares i fryseren når den ikke er i bruk. Legg rørene som inneholder komponentene som skal tines, på is.
Merk: Sørg for at opptiningstrinnet ikke overstiger 30 minutter, for å unngå degradering av materiale.
- Rengjør benkeområdet dedikert for klargjøring av PCR-blandingen for å unngå templat- eller nukleasekontaminering.
- Bland godt ved å pipettere rørene som inneholder qPCR-blanding ABL1 og qPCR-blanding Mbcr, opp og ned 10 ganger, og sentrifuger kort før bruk. Oppbevar deretter på is.

Prosedyre

1. Klargjør PCR-masterblanding i henhold til antall prøver som behandles.

Tabell 7 beskriver pipetteringsskjemaet for klargjøring av en reagensblanding, beregnet på å oppnå et endelig reaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending klargjøres i henhold til antall reaksjoner ved bruk av de samme primerne og den samme probeblandingen (enten qPCR-blanding ABL1 eller qPCR-blanding Mbcr). Ekstra volumer er inkludert for å kompensere for pipetteringsfeil.

Merk: Bruk ikke reaksjonsvolumer (reaksjonsblanding pluss prøve) som er mindre enn 25 µl.

Tabell 7. Klargjøring av PCR-masterblanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	Forhåndsblending ABL1 eller Mbcr:34 + 2 reaksjoner (µl)	Endelig konsentrasjon
qPCR-blanding (enten qPCR-blanding ABL1 eller qPCR-blanding Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNA-polymerase	0,25	9	1x
Prøve, standard, kontroll eller IS-MMR-kalibrator (som skal tilsettes i trinn 3)	5	5 hver	–
Totalt volum	25	25 hver	–

2. Pipetter 20 µl qPCR-forhåndsblending i hvert 0,1 ml Rotor-Gene Q-rør.
3. Tilsett 5 µl RT-produkt (cDNA) oppnådd i reverstranskripsjonstrinnet (se "Revers transkripsjon", side 28), 5 µl standarder, 5 µl kontroller eller IS-MMR-kalibrator i henhold til prøveoppsettet som vist i Figur 4 (totalt volum 25 µl).
4. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.

Klargjøre Rotor-Gene MDx og starte qPCR-kjøring

1. Sett en rotor med 72 brønner inn i rotorholderen på Rotor-Gene Q MDx.
2. Fyll rotoren med rørremser i henhold til tildelte posisjoner, start i posisjon 1, som vist i Figur 4 med tomme lukkede rør plassert i alle ubrukte posisjoner.
Merk: Forsikre deg om at det første røret er satt inn i posisjon 1, og at rørremserne er plassert i riktig retning og posisjon, som vist i Figur 4.
3. Fest låseringen.
4. Sett inn rotoren og låseringen i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og lukk instrumentlokket.
5. I programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1 velger du tilhørende arbeidsliste fra arbeidslisteadministratoren og klikker på knappen "Apply" (Bruk), eller du kan klikke på knappen "Apply" (Bruk) hvis arbeidslisten fortsatt er åpen.
Merk: Hvis arbeidslisten for forsøket ikke er opprettet ennå, logger du inn på Rotor-Gene AssayManager v2.1 og følger trinn "Opprette en arbeidsliste", side 42, før du fortsetter som beskrevet nedenfor.
6. Legg inn forsøkets navn.
7. Velg sykleren som skal brukes i dialogboksen "Cycler selection" (Valg av sykler).
8. Kontroller at låseringen er festet riktig, og bekreft på skjermen at låseringen er festet.
9. Klikk på knappen "Start run" (Start kjøring). *Ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR-kjøringen bør starte.

Frigi og rapportere qPCR-resultater

1. Når kjøringen er ferdig, klikker du på "Finish run" (Fullfør kjøring).
2. Frigi og godkjenn kjøringen:
 - For brukere som er logget inn med rollen "Approver" (Godkjenner): Klikk på "Release and go to Approval" (Frigi og gå til godkjenning).

- For brukere som er logget inn med rollen "Operator" (Operatør): Klikk på "Release" (Frigi).
3. Hvis du klikket på "Release and go to approval" (Frigi og gå videre til godkjenning), vises resultatene fra forsøket.
 4. Hvis en bruker med brukerrolle klikket på "Release" (Frigi), må noen med rollen "Approver" (Godkjenner) logge seg inn og velge miljøet "Approval" (Godkjenning).
 - a. Filtrer analysen som skal godkjennes, ved å velge filteralternativene og klikke på knappen "Apply" (Bruk).
 - b. Aktiver boksen ved siden av forsøket som skal godkjennes.
 - c. Klikk på knappen "Start approval" (Start godkjenning).

Siden forsøket inneholder én kalibrator, må obligatorisk informasjon om kalibratoren angi i fanen "Calibrator" (Kalibrator) før prøver til slutt kan godkjennes.

5. Velg knappen "Use calibrator" (Bruk kalibrator) og angi den tilsvarende verdien (finnes på IS-MMR-kalibratorrøret eller på analysesertifikatet).

Merk: Du må angi denne verdien to ganger i feltene "Enter calibrator value" (Angi kalibratorverdi) og "Reenter calibrator value" (Angi kalibratorverdi på nytt).

Bekreft de angitte verdiene ved å trykke på knappen "Apply" (Bruk): Resultater er oppdatert.

Merk: Straks minst én prøve er frisatt, kan ikke kalibratoren endres lenger.

6. Se gjennom resultatene, og klikk på knappen "Release/Report data" (Frigi/rapporter data).

Klikk på "OK". Rapporten vil bli opprettet i *.pdf-format og lagres automatisk i den forhåndsdefinerte mappen.

Mappebanen er som standard: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Eksport > Rapporter)**

Merk: Denne banen og mappen kan endres i miljøet "Configuration" (Konfigurasjon).

Merk: Ved feilsøking kan det være behov for en støttepakke fra kjøringen. Støttepakker kan genereres fra miljøene "Approval" (Godkjenning) eller "Archive" (Arkiv) (*brugerhåndbok for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, avsnitt 1.8, "Feilsøking" > "Opprette en støttepakke"). I tillegg kan et revisjonsspor fra ± 1 dag fra tidspunktet for hendelsen være nyttig. Revisjonssporet kan hentes fra miljøet "Service" (se *brugerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*, punkt 1.5.5.5).

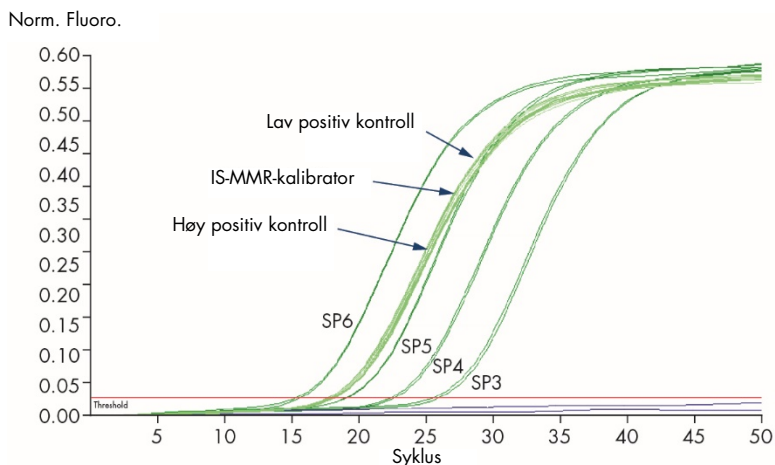
7. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og kast remserørene i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Tolkning av resultater på RGQ-programvare

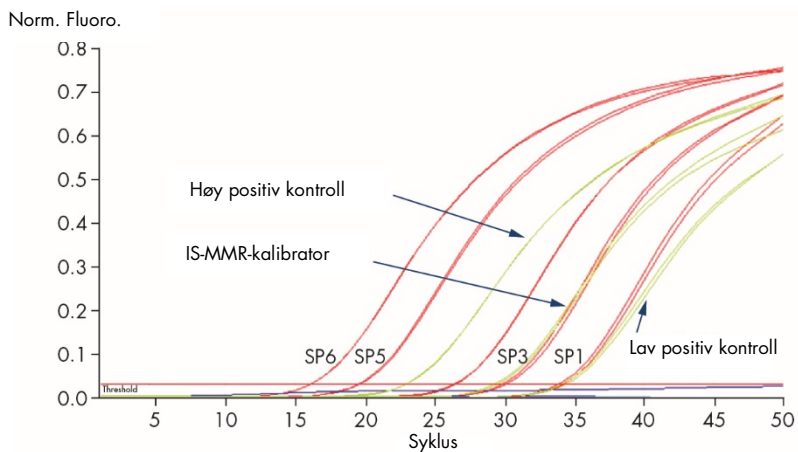
Prinsipp for dataanalyse

Ved bruk av TaqMan®-teknologien blir antall PCR-sykluser som er nødvendige for å detektere et signal over terskelen, kalt terskelsyklusen (C_T), og denne er direkte proporsjonal med målmengden som er til stede i begynnelsen av reaksjonen.

Ved bruk av standarder med et kjent antall molekyler, kan man etablere en standardkurve og bestemme nøyaktig mengde av målet i testprøven. Standardkurvene er plasmidbaserte. For å sikre nøyaktige standardkurver bruker man fire standardfortynninger for ABL1 og fem standardfortynninger for Mbcr. Settet inneholder også en IS-kalibrator som gjør det mulig å konvertere resultater til den internasjonale skalaen. Figur 5 og Figur 6 viser eksempler på TaqMan-amplifikasjonskurver som ligner på de som oppnås for standarder, IS-MMR-kalibratoren, den høye positive RNA-kontrollen og den lave positive RNA-kontrollen med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit.



Figur 5. Deteksjon av ABL1 med kontroller og standarder SP3, SP4, SP5 og SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 og 10^6 kopier/reaksjon.



Figur 6. Deteksjon av BCR-ABL1 Mbcr med kontroller og standarder SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 og 10^6 kopier/reaksjon.

Standardkurver og kvalitetskriterier som gjelder for rådata

Reproduserbarhet mellom replikater

Variasjonen i C_T -verdier mellom replikater skal være ≤ 2 , hvis ikke skal duplikatet ugyldiggjøres, bortsett fra i følgende tilfeller:

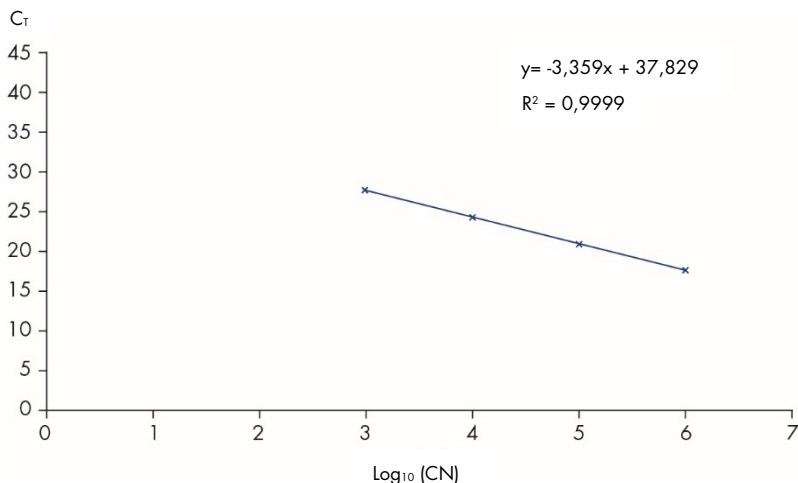
Hvis gjennomsnittlig $C_T \geq 36$, eller hvis $C_{T_a} \geq 36$ og C_{T_b} er "ikke detektert", gjelder ikke ΔC_T -kriteriet; duplikatet samsvarer. Hvis dette er tilfellet, skal kopinummeret (copy number, CN) beregnet for C_{T_a} divideres med 2.

Merk: Brukere må måle reproduserbarhet på eget laboratorium.

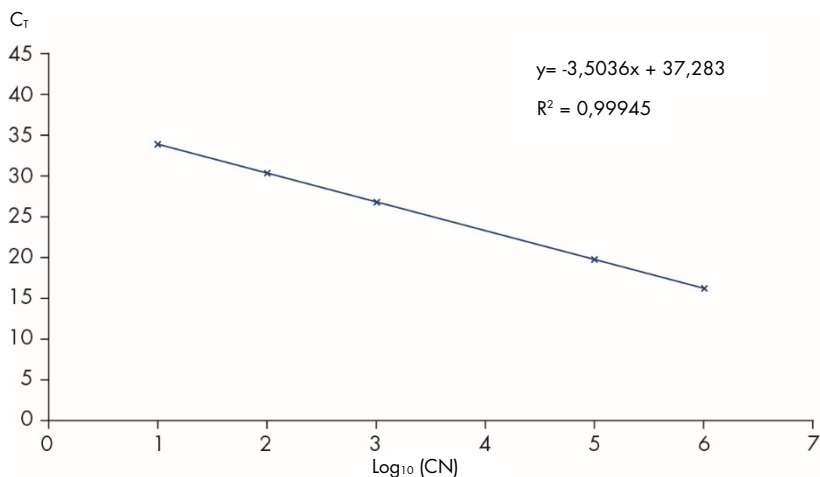
Standardkurver

Rådata kan limes inn i en Excel®-fil for analyse.

For hvert gen (ABL1 og BCR-ABL1 Mbcf) blir C_T -verdier oppnådd fra plasmidstandardfortynninger plottet i henhold til log-kopinummeret (3, 4, 5 og 6 for SP3, SP4, SP5 og SP6; 1, 2, 3, 5 og 6 for SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6). Figur 7 viser et eksempel på en ABL1-kurve beregnet ut fra fire standardfortynninger. Figur 8 viser et eksempel på en BCR-ABL1 Mbcf-kurve beregnet ut fra fem standardfortynninger.



Figur 7. Standardkurve for ABL1 beregnet ut fra fire standardfortynninger. En lineær regresjonskurve ($y = ax + b$) beregnes, der "a" er linjens stigningstall og "b" er y-skjæringspunktet, som er y-kordinaten til punktet der linjen krysser y-aksen. Ligningen og bestemmelseskoeffisienten (R^2) vises i grafen.



Figur 8. Standardkurve for BCR-ABL1 Mbcr beregnet ut fra fem standardfortynninger. En lineær regresjonskurve ($y = ax + b$) beregnes, der "a" er linjens stigningstall og "b" er y-skjæringspunktet, som er y-koordinaten til punktet der linjen krysser y-aksen. Ligningen og bestemmelseskoeffisienten (R^2) vises i grafen.

Ettersom standarder er tifoldts fortyninger, er kurvens teoretiske stigningstall $-3,3$. Et stigningstall mellom $-3,1$ og $-3,6$ er akseptabelt så fremt R^2 er $>0,95$. Det er imidlertid ønskelig med en verdi for $R^2 >0,98$ for å sikre nøyaktige resultater.

Merk: SP1-standardfortynningen (BCR-ABL1-plasmid, 10 kopier) må detekteres for å etablere BCR-ABL Mbcr-standardkurven.

Kopinummer (CN)

Ligningen for ABL1- eller BCR-ABL1 Mbcr-standardkurven skal brukes til å konvertere C_T -råverdier (oppnådd med qPCR-blanding ABL1 eller qPCR-blanding Mbcr) for de ukjente prøvene til ABL1- eller BCR-ABL1-kopinummer ($ABL1_{CN}$ eller $BCR-ABL1 Mbcr_{CN}$).

$$\text{Log}_{10}\text{-prøve ABL1}_{\text{CN}} = \frac{\text{Gjennomsnitt for ABL } C_T - \text{skjæringspunkt for ABL1-standarkurve}}{\text{Stigningstall for ABL-standarkurve}}$$

$$\text{Log}_{10}\text{-prøve BCR-ABL1 Mbcrcn} = \frac{\text{Gjennomsnitt for BCR-ABL1 Mbcrcn } C_T - \text{skjæringspunkt for BCR-ABL1 Mbcrcn-standarkurve}}{\text{Stigningstall for BCR-ABL1 Mbcrcn-standarkurve}}$$

Kvalitetskontroll på alle ABL1_{CN}-verdier

Dårlig RNA-kvalitet eller problemer under RT-qPCR kan føre til lave ABL1-kopinumre.

For å sikre optimal sensitivitet for testen må ABL1_{CN} være lik eller større enn 100 000 for den høye positive RNA-kontrollen, den lave positive RNA-kontrollen og IS-MMR-kalibratoren.

RT-negativ kontroll og vannkontroll

Ikke-templatkontrollen (NTC) for PCR-trinnet (vannkontroll) og reverstranskripsjonstrinnet (RT-negativ kontroll) skal gi null CN for både ABL1 og BCR-ABL1 Mbcrcn. Det betyr at ingen C_T skal oppnås, eller at C_T-verdien er over skjæringspunktet til standardkurver. Et positivt resultat for disse NTC-ene angir krysskontaminering under revers transkripsjon og/eller qPCR.

Normalisert kopinummer (NCN)

Forholdet mellom disse CN-verdiene gir det normaliserte kopinummeret (NCN):

$$\text{NCN} = \frac{\text{BCR-ABL1 M}_{\text{bcrcn}}}{\text{ABL1}_{\text{CN}}} \times 100$$

Beregn NCN-resultatet for den høye positive RNA-kontrollen (NCN_{HC}), den lave positive RNA-kontrollen (NCN_{LC}), IS-MMR-kalibratoren (NCN_{kal}) og hver prøve (NCN_{prøve}).

Kvalitetskontroll på normaliserte kopinummerverdier

Høy positiv RNA-kontroll, lav positiv RNA-kontroll og IS-MMR-kalibrator muliggjør overvåking av reverstranskripsjons- og amplifikasjonstrinnet til ABL1 og BCR-ABL1 M_{bcrcn} under kvantifisering av transkript.

- NCN-resultatet oppnådd for IS-MMR-kalibratoren, testet med *ipsogen* BCR-ABL1 M_{bcrcn} RGQ RT-PCR Kit, må være innenfor intervallet 0,05–0,3, ettersom NCN-verdier ellers ikke kan konverteres til den internasjonale skalaen.
- Forsøkets sensitivitet kan bare vurderes hvis den lave positive RNA-kontrollen detekteres.

Konvertering til internasjonal skala

Merk: Se verdien angitt på etiketten til IS-MMR-kalibratorrøret eller på analysesertifikatet som følger med settet, før tolkning. (Kontroller at samme verdi er angitt på både etiketten og sertifikatet).

Bruk NCN-resultatet fra den eksperimentelle IS-MMR-kalibratoren (NCN-beregn.), og verdien den er tilordnet (IS-kal.-verdi) angitt i analysesertifikatet, for å beregne det normaliserte kopinummet på den internasjonale skalaen (IS-NCNprøve).

$$\text{IS-NCN}_{\text{prøve}} = \frac{\text{NCN}_{\text{prøve}} \times \text{IS-Cal-verdi}}{\text{NCN}_{\text{kal}}}$$

Kvalitetskontroll på IS-NCN-verdier

- IS-NCN_{HC}-resultatet (NCN på den internasjonale skalaen for den høye positive RNA-kontrollen) skal gi ingen major molekylær respons ("Ingen MMR", se Rapportering av molekylær respons nedenfor).
- IS-NCN_{LC}-resultatet (NCN på den internasjonale skalaen for den lave positive RNA-kontrollen) skal være <0,01 (MR4) for å sikre at MR4,5-statusen trygt kan etableres.

Rapportering av molekylær respons

Bestem statusen for molekylær respons for hver prøve i henhold til tolkningen i Tabell 8.

Tabell 8. Rapportering av molekylær respons

Tilfelle	ABL CN	BCR-ABL1 Mbc CN	IS-NCN%	Status
1	<10 000	<10	–	Prøve av dårlig kvalitet
2	<10 000	≥10	>0,1	Ingen MMR
		≥10	≤0,1	Ikke-konkluderende
3	10 000 ≤ CN _{ABL} < 32 000	≥LOD	>0,1	Ingen MMR
		Erstatt CN med LOD	≤0,1	MMR
		≤LOB	–	Ikke detektert/MR4
		≥LOD	>0,1	Ingen MMR
4	32 000 ≤ CN _{ABL} < 100 000	Erstatt CN med LOD	0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
		≥LOD	≤0,01	MR4
		LOB < CN < LOD	>0,1	Ingen MMR
		Erstatt CN med LOD	0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
		≥LOD	≤0,01	MR4
		≤LOB	–	Ikke detektert/MR4,5
5	100 000 ≤ CN _{ABL}	≥LOD	>0,1	Ingen MMR
		Erstatt CN med LOD	0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
		LOB < CN < LOD	0,0032 < IS ≤ 0,01	MR4
		Erstatt CN med LOD	≤0,0032	MR4,5
		≥LOD	>0,1	Ingen MMR
		Erstatt CN med LOD	0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
		LOB < CN < LOD	0,0032 < IS ≤ 0,01	MR4
		Erstatt CN med LOD	≤0,0032	MR4,5
	≤LOB	–	Ikke detektert/MR5	

LOB: limit of blank (grense for blank prøve); **LOD:** limit of detection (deteksjonsgrense); **MR:** molecular response (molekylær respons); **MMR:** major molecular response (major molekylær respons).

Sammendrag av kvalitetskriterier

Tabell 9 gir en oversikt over ulike kvalitetskriterier og tilhørende verdier eller resultater.

Tabell 9. Sammendrag av kvalitetskriterier

Kriterier	Akseptable verdier/resultater
Variasjoner i C_T -verdier mellom replikater	$\leq 2 C_T$ Bortsett fra hvis gjennomsnittlig $C_T \geq 36$, eller hvis $C_{T_0} \geq 36$ og C_{T_0} er "not detected" (ikke detektert): Duplikatet samsvarer. CN beregnet for C_{T_0} skal divideres med 2.
Stigningstall for standardkurver	Mellom -3,1 og -3,6
R^2 for standardkurver	Minst >0,95 (ideelt sett >0,98)
SP1-standardfortynning (BCR-ABL1 10 kopier plasmid)	Må detekteres for å etablere standardkurven
Kvalitetskontroll på ABL_{CN} -verdi for biologiske prøver	Se Tabell 8.
Høy positiv RNA-kontroll, lav positiv RNA-kontroll og IS-MMR-kalibrator	$ABL_{CN} \geq 100\ 000$
NTC-kontroll (vann) og RTneg-kontroll	For hver $ABL_{CN} = 0$ og $M_{bcrcn} = 0$ (ingen C_T -verdi eller $C_T >$ skjæringspunkt for standardkurve)
NCN oppnådd for IS-MMR-kalibrator (NCN _{kal})	Må være innenfor området 0,05–0,3
High Positive RNA Control (Høy positiv RNA-kontroll)	Må detekteres
Low Positive RNA Control (Lav positiv RNA-kontroll)	Må detekteres
IS-NCN _{HC}	Status: Ingen major molekylær respons
IS-NCN _{LC}	IS-NCN _{LC} $\leq 0,01$ (MR4) Må detekteres for å sikre at MR4,5-status trygt kan etableres.

C_T: threshold cycle (terskelverdisyklus); **HC**: high control (høy kontroll); **IS**: International Standard (Internasjonal standard); **LC**: : low control (lav kontroll); **MR**: molecular response (molekylær respons); **MMR**: major molecular response (major molekylær respons); **NCN**: normalized copy number (normalisert kopinummer); **NTC**: No Template Control (Ikke-templatkontroll); **RTneg**: reverse transcription negative (revers transkripsjon negativ).

Tolkning av resultater på RGAM-programvare

Analysen er helautomatisert.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserer først amplifikasjonskurver, og kan ugyldiggjøre feilaktige kurver, avhengig av form og støyamplitude. Hvis dette er tilfellet, vil et flagg bli knyttet til den ugyldige kurven.

Resultatene fra testprøvene blir automatisk analysert og innstilt av Rotor-Gene AssayManager v2.1, men må godkjennes og utgis av brukeren logget inn med rollen som godkjenner. Resultatene av prøvene som skal godkjennes, har tre ekstra godkjenningsknapper i enden av den dedikerte raden. Disse knappene brukes til interaktivt å godkjenne eller avvise resultatene av prøvene. For mer informasjon kan du se (*brukerhåndboken for Gamma Plug-in*).

Rotor-Gene AssayManager v2.1 vil deretter analysere kjørek kontrollene:

- NTC (RT-neg og H2O) kontrolleres for fravær av spesifikk amplifikasjon (ABL1 og BCR-ABL1 Mbc).r).
- ABL1 og BCR-ABL1 Mbc SP: Valideringen er basert på R^2 og helningsverdiene for begge.
- HC: Det totale ABL1-kopinummeret må være høyt nok for at denne kontrollen skal bli tolket. Hvis dette er tilfellet, vil IS-NCN-prosentsen bli beregnet. Denne kjørek kontrollen valideres hvis statusen er No MMR (Ingen MMR) i henhold til testen.
- LC: Det totale ABL1-kopinummeret må være høyt nok for at denne kontrollen skal bli tolket. Hvis dette er tilfellet, vil IS-NCN-prosentsen bli beregnet. Denne kjørek kontrollen valideres hvis statusen er MR4 i henhold til testen.

- IS-MMR-kalibrator: Det totale ABL1-kopinummeret må være høyt nok for at denne kontrollen skal bli tolket. Hvis dette er tilfellet, vil NCN bli beregnet. Denne kjørekontrollen valideres hvis NCN er innenfor det akseptable området i henhold til testen.

Merk: Rapporten som genereres mot slutten av kjøringen, viser resultatene som ble oppnådd på kjørekontrollene, med ugyldiggjørende flagg foran ugyldige data.

Hvis alle kontrollene i kjøringen er riktige, vil Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysere de ukjente prøvene.

I prøven må variasjonen i C_T -verdier mellom replikater være lav nok for at resultatene skal bli tolket. IS-NCN-prosentsen vil deretter bli beregnet, og prøvestatus vil bli gitt.

Merk: Hvis både kjørekontrollene og prøveresultatene er gyldige, vil rapporten vise kopinumrene ABL1 og BCR-ABL1 Mbcr, NCN (%), IS-NCN (%) og status for molekylær respons for hver prøve.

Tabell 10 og Tabell 11 viser de ugyldiggjørende og advarende prøveflaggene som kan tildeles et enkelt rør under analysen med Rotor-Gene AssayManager v2.1, sammen med en forklaring på hva flagget betyr.

Tabell 10. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk

Flagg	Beskrivelse
ANALYSIS_FAILED (Analyse mislyktes)	Analysen er satt til ugyldig fordi analysen har mislyktes. Kontakt QIAGENS tekniske serviceavdeling.
ASSAY_INVALID (Analyse ugyldig)	Analysen er ugyldig fordi minst én ekstern kontroll er ugyldig.
CONSECUTIVE_FAULT (Følgefeil)	Et mål som er brukt til beregning av dette målet er ugyldig.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (Unormal kurveform)	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater.
FLAT_BUMP (Flat hump)	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som en flat hump som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater (f.eks. feil bestemmelse av C_T -verdi).
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (Høy PC høy delta-CT) (ABL eller Mbcr)	Variasjon i C_T -verdier mellom Høy positiv kontroll-replikater i kontrollgenblandingen er for høy.
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (Høy PC høy delta-CT) (Mbcr)	Variasjon i C_T -verdier mellom Høy positiv kontroll-replikater i fusjonsgenblandingen er for høy.
HIGH_PC_LOW_ABL_CN (Høy PC lav ABL CN)	Kontrollgenkopinummer for den høye positive kontrollen er for lavt.
HIGH_PC_LOW_IS-NCN (Høy PC lav IS-NCN)	Det normaliserte kopinummeret (internasjonal skala) for den høye positive kontrollen er for lavt.
HIGH_PC_NO_CT (Høy PC ingen CT) (ABL)	Ingen påviselig C_T for den høye positive kontrollen i kontrollgenblandingen.
HIGH_PC_NO_CT (Høy PC ingen CT) (Mbcr)	Ingen påviselig C_T for den høye positive kontrollen i fusjonsgenblandingen.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (Høy PC-replikater ingen CT) (ABL)	Et av Høy positiv kontroll-replikaten som ikke ble detektert i kontrollgenblandingen.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (Høy PC-replikater ingen CT) (Mbcr)	Et av Høy positiv kontroll-replikaten som ikke ble detektert i fusjonsgenblandingen.
INVALID_CALCULATION (Ugyldig beregning)	Beregningen for dette målet mislyktes.
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (IS-CAL høy delta-CT) (ABL)	Variasjon i C_T -verdier mellom replikater for IS-MMR-kalibrator i kontrollgenblandingen er for høy.

Flagg	Beskrivelse
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (IS-CAL høy delta-CT) (Mbc _r)	Variasjon i C _T -verdier mellom IS-MMR-kalibratorreplikater i fusjonsgenblandingen er for høy.
IS-CAL_HIGH_NCN (IS-CAL høy NCN)	Det normaliserte kopinummeret for IS-MMR-kalibratoren er for høyt.
IS-CAL_LOW_ABL_CN (IS-CAL lav ABL CN)	Kontrollgenkopinummer for IS-MMR-kalibrator er for lavt.
IS-CAL_LOW_NCN (IS-CAL lav NCN)	Det normaliserte kopinummeret for IS-MMR-kalibratoren er for lavt.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (IS-CAL-replikat ingen CT) (ABL)	Et av IS-MMR-kalibratorreplikatene som ikke ble detektert i kontrollgenblandingen.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (IS-CAL-replikat ingen CT) (Mbc _r)	Et av IS-MMR-kalibratorreplikatene som ikke ble detektert i fusjonsgenblandingen.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (Lav PC høy delta-CT) (ABL)	Variasjon i C _T -verdier mellom Lav positiv kontrollreplikater i kontrollgenblandingen er for høy.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (Lav PC høy delta-CT) (Mbc _r)	Variasjon i C _T -verdier mellom Lav positiv kontrollreplikater i fusjonsgenblandingen er for høy.
LOW_PC_HIGH_IS-NCN (Lav PC høy IS-NCN)	Det normaliserte kopinummeret (internasjonal skala) for den lave positive kontrollen er for høyt.
LOW_PC_LOW_ABL_CN (Lav PC lav ABL CN)	Kontrollgenkopinummer for lav positiv kontroll er for lavt.
LOW_PC_NO_CT (Lav PC ingen CT) (ABL)	Ingen påviselig C _T for den lave positive kontrollen i kontrollgenblandingen.
LOW_PC_NO_CT (Lav PC ingen CT) (Mbc _r)	Ingen påviselig C _T for den lave positive kontrollen i fusjonsgenblandingen.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (Lav PC-replikat ingen CT) (ABL)	Et av Lav positiv kontrollreplikatene som ikke ble detektert i kontrollgenblandingen.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (Lav PC-replikat ingen CT) (Mbc _r)	Et av Lav positiv kontrollreplikatene som ikke ble detektert i fusjonsgenblandingen.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (Kryssing av terskel flere ganger)	Amplifikasjonskurven krysser terskelen mer enn én gang. En utvetydig C _T kan ikke bestemmes.
NO_BASELINE (Ingen baseline)	Ingen innledende baseline funnet. Den etterfølgende analysen kan ikke utføres.
NTC_UNEXPECTED_VALUE (Uventet verdi for NTC)	C _T er påvist i ikke-templatkontrollen.
OTHER_TARGET_INVALID (Annet mål ugyldig)	Et annet mål for samme prøve er ugyldig.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE (Utenfor beregningsområde)	Den beregnede konsentrasjonen for denne prøven overskrider den tekniske grensen.

Flagg	Beskrivelse
RUN_FAILED (Kjøring mislyktes)	Analysen er satt til ugyldig på grunn av et problem med sentrifugen eller sentrifugeforbindelsen.
RUN_STOPPED (Kjøring stoppet)	Analysen er satt til ugyldig fordi kjøringen er stoppet manuelt.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (Prøve høy delta-CT) (ABL)	Variasjon i C_T -verdier mellom testprøvereplikater i kontrollgenblandingen er for høy.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (Prøve høy delta-CT) (Mbcr)	Variasjon i C_T -verdier mellom testprøvereplikater i fusjonsgenblandingen er for høy.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (Prøvereplikater ingen CT) (ABL)	Et av testprøvereplikatene som ikke ble detektert i kontrollgenblandingen.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (Prøvereplikater ingen CT) (Mbcr)	Et av testprøvereplikatene som ikke ble detektert i fusjonsgenblandingen.
SATURATION (Metning)	Rådatafluorescensen mettes i stor grad før amplifikasjonskurvens infleksjonspunkt.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (Utslag nær CT)	Et utslag er detektert i amplifikasjonskurven i nærheten til C_T .
SP_HIGH_SLOPE (Høy helning for SP) (ABL)	Den øvre grensen for kontrollgenhelningen er overskredet.
SP_HIGH_SLOPE (Høy helning for SP) (Mbcr)	Den øvre grensen for fusjonsgenhelningen er overskredet.
SP_LOW_RSQUARED (SP lav Rsquared) (ABL)	Den nedre grensen for kontrollgen- R^2 er ikke nådd.
SP_LOW_RSQUARED (SP lav Rsquared) (Mbcr)	Den nedre grensen for fusjonsgen- R^2 er ikke nådd.
SP_LOW_SLOPE (Lav helning for SP) (ABL)	Den nedre grensen for kontrollgenhelningen er ikke nådd.
SP_LOW_SLOPE (Lav helning for SP) (Mbcr)	Den nedre grensen for fusjonsgenhelningen er ikke nådd.
SP1_NO_CT (SP1 ingen CT) (Mbcr)	Ingen påviselig C_T for standardplasmid 1 i fusjonsgenblandingen.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (Standard høy delta-CT) (ABL)	Variasjon i C_T -verdier mellom standardreplikater i kontrollgenblandingen er for høy.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (Standard høy delta-CT) (Mbcr)	Variasjon i C_T -verdier mellom standardreplikater i fusjonsgenblandingen er for høy.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (Standardreplikater ingen CT) (ABL)	Et av standardreplikatene som ikke ble detektert i kontrollgenblandingen.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (Standardreplikater ingen CT) (Mbcr)	Et av standardreplikatene som ikke ble detektert i fusjonsgenblandingen.

STEEP_BASELINE (Bratt baseline)

En bratt stigende baseline for rådatafluorescens er påvist i amplifikasjonskurven.

Flagg	Beskrivelse
STRONG_BASELINE_DIP (Stort fall i baseline)	Et stort fall i baseline for rådatafluorescens er påvist i amplifikasjonskurven.
STRONG_NOISE (Sterk støy)	Sterk støy er påvist utenfor vekstfasen i amplifikasjonskurven.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (Sterk støy i vekstfase)	Sterk støy er påvist i vekstfasen (eksponentiell fase) i amplifikasjonskurven.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (Bølgeformet baseline for fluorescens)	En bølgeformet baseline for rådatafluorescens er påvist i amplifikasjonskurven.

Tabell 11. Advarselprøveflagg og beskrivelse av uttrykk

Flagg	Beskrivelse
CN Mbc _r Between LOB and LOD (CN Mbc _r mellom LOB og LOD)	Fusjongsgekopinummeret for testprøve er mellom LOB- og LoD-verdiene og erstattes av LoD-verdien.
CN Mbc _r Single Replicate (CN Mbc _r -enkeltrepliket)	Fusjongsgekopinummeret for testprøve beregnes fra bare ett replikat og deles på 2.
CN Mbc _r Single Replicate Between LOB and LOD (CN Mbc _r -enkeltrepliket mellom LOB og LOD)	Fusjongsgekopinummeret for testprøve (beregnet fra bare ett replikat og delt på 2) er mellom LOB- og LoD-verdiene og erstattes av LoD-verdien.
IS-NCN (%) Between LOB and LOD (IS-NCN (%) mellom LOB og LOD)	Det normaliserte kopinummeret (internasjonal skala) for testprøve oppnås basert på en fusjongsgekopinummerverdi mellom LOB og LOD.
IS-NCN (%) Single Replicate (IS-NCN (%) enkeltrepliket)	Det normaliserte kopinummeret (internasjonal skala) for testprøve oppnås basert på et fusjongsgekopinummer beregnet fra bare ett replikat.
IS-NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (IS-NCN (%) enkeltrepliket mellom LOB og LOD)	Det normaliserte kopinummeret (internasjonal skala) for test oppnås basert på en fusjongsgekopinummerverdi (beregnet fra bare ett replikat) mellom LOB- og LOD-verdiene.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (Lav fluorescensendring)	Den prosentvise fluorescensendringen for denne prøven i forhold til prøverøret med den største fluorescensendringen, er lavere enn en definert grense.
LOW_REACTION_EFFICIENCY (Lav reaksjonseffektivitet)	Reaksjonseffektiviteten for denne prøven har ikke nådd en definert grense.
NCN (%) Between LOB and LOD (NCN (%) mellom LOB og LOD)	Det normaliserte kopinummeret for testprøve oppnås basert på en fusjongsgekopinummerverdi mellom LOB og LOD.
NCN (%) Single Replicate (NCN (%) enkeltrepliket)	Det normaliserte kopinummeret for testprøve oppnås basert på et fusjongsgekopinummer beregnet fra bare ett replikat.
NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (NCN (%) enkeltrepliket mellom LOB og LOD)	Det normaliserte kopinummeret for testprøve oppnås basert på en fusjongsgekopinummerverdi (beregnet fra bare ett replikat) mellom LOB- og LOD-verdiene.
SPIKE (Utslag)	Det er påvist et utslag i rådatafluorescensen i amplifikasjonskurven, men utenfor området hvor C _T blir bestemt.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. For mer informasjon, se også siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENS tekniske avdelinger er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

RNA-isolering

For feilsøking i forbindelse med RNA-rensing fra fullblod ved bruk av RNeasy Midi Kit og Buffer EL, se de relevante håndbøkene.

Utilstrekkelig RNA i eluatet

Utilstrekkelig blod brukt Gjenta RNA-isolering med flere prøver. Vurder å poole begge eluatene og å oppkonsentrere RNA ved bruk av RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr. 74204).

Utilstrekkelig RNA i eluatet

RNA-konsentrasjonen må være 200 ng/µl for å sikre optimal sensitivitet Bruk RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr. 74204) for å oppkonsentrere prøven, og juster deretter konsentrasjonen til 200 ng/µl.

Standard, kontroll eller IS-kal. ikke detektert

- Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnumbytting Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen.
- Feil oppbevaring av komponenter i settet Oppbevar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit ved -30 til -15 °C, og sørg for at qPCR-blanding ABL1 og qPCR-blanding Mbcr er beskyttet mot lys. Maks. tre fryse- og tinesykluser kan utføres.
- ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit er utløpt Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt sett.

Kommentarer og forslag

Ingen signal, inkludert ingen signal for kontroller

- | | |
|---|--|
| a) Ingen reaksjonsrør i posisjon 1 på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet | Sørg alltid for å plassere en prøve i rotorens posisjon 1. Ellers vil ikke instrumentet utføre kalibrering, og feil fluorescensdata vil bli avlest. |
| b) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnombyting | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
| c) Feil oppbevaring av komponenter i settet | Oppbevar <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, og sørg for at primer- og probeblandinger er beskyttet mot lys. Maks. tre fryse- og tinesykluser kan utføres. |
| d) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit er utløpt | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt sett. |
| e) Feil påvisningskanal valgt | Still inn påvisningskanalen til Cycling Green (Syklus grønn) eller 470 nm/510 nm. |
| f) Ikke noe datainnsamlingsprogram | Kontroller syklusprogrammet. Se Tabell 5 på side 35. Velg innsamlingsmodusen "Single" (Enkeltnvis) ved slutten av hvert hybridiseringssegment i PCR-programmet. |

Fluorescensintensiteten varierer

- | | |
|--|--|
| Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser, rør eller brønnombyting | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
|--|--|

Fluorescensintensiteten er for lav

- | | |
|--|--|
| a) Feil oppbevaring av komponenter i settet | Oppbevar <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ved -30 til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, og sørg for at qPCR-blanding ABL1 og qPCR-blanding MbcR er beskyttet mot lys. Maks. tre fryse- og tinesykluser kan utføres. |
| b) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit er utløpt | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk om nødvendig et nytt sett. |
| c) Meget lav mengde av mål-RNA | Kontroller alltid RNA-konsentrasjonen før start. |

Kommentarer og forslag

Negativ kontroll (H₂O) gir et positivt resultat

Krysskontaminering, reagenskontaminering, instrumentfeil, brønn- eller kapillarrørrombytting, eller probedegradering

Bytt ut alle kritiske reagenser eller bruk et nytt sett.

Sørg for alltid å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksartikler i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre krysskontaminering.

Oppbevar qPCR-blanding ABL1 og qPCR-blanding Mbcr beskyttet mot lys.

Se etter eventuelle falske positive avlesninger på fluorescenskurver.

Kontroller reaksjonsoppsettet.

Tolkning av resultater

For informasjon om feilsøking knyttet til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet og Rotor-Gene Q-programvaren eller Rotor-Gene AssayManager-programvaren v2.1, se de respektive brukerhåndbøkene.

Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll for hele settet ble utført på et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Dette settet er produsert i henhold til ISO 13485-standarden. Analysesertifikat fås på forespørsel på www.qiagen.com/support/.

Begrensninger

Settet er beregnet for profesjonell bruk.

Produktet skal bare brukes av personell som har fått spesialinstruksjoner og opplæring i molekylær-biologiske teknikker og som er kjent med denne teknologien.

Dette settet bør brukes i henhold til instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med et godkjent instrument nevnt i "Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med", side 12.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er angitt på eskens etikett. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato.

Alle reagensene som følger med *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Bruk av andre reagenser eller reagenser fra andre partier (lot) kan påvirke ytelsen.

Ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit er kun validert for fullblod som er antikoagulert i kalium-EDTA (K₂EDTA) og tatt fra pasienter diagnostisert med Philadelphia-kromosom positiv i kronisk fase (Ph+) p210 KML.

Ytelsen til *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ble etablert ved bruk av RNeasy Midi Kit (kat.nr. 75144), Buffer EL (kat.nr. 79217) samt RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr. 74204) for trinnet for opprensing og oppkonsentrering av RNA.

Kun Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet er validert for PCR med dette settet.

Annen bruk av dette produktet enn den som er angitt på etikettene, og/eller modifisering av komponentene, vil annullere QIAGENs ansvar.

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGENs ytelsesundersøkelser.

Ytelsesegenskaper

Grense for blank prøve

Grense for blank prøve (LOB) ble bestemt i samsvar med CLSI/NCCLS EP17-2A-standarden på friske fullblodsprøver (7 prøver, 12 målinger/2 partier).

LOB ble funnet å være lik 1,02 kopier av BCR-ABL1 Mbc-transkript.

Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrense (LOD eller analytisk sensitivitet) ble bestemt basert på "den klassiske fremgangsmåten" beskrevet i CLSI/NCCLS EP17-2A-standarden. I denne studien ble kjente lave positive prøver (7 prøver, 12 målinger/2 partier) analysert.

LOD ble funnet å være lik 3,21 kopier av BCR-ABL1 Mbc-transkript eller 0,0030 % IS-NCN.

Linearitet

Linearitet ble bestemt i samsvar med CLSI/NCCLS EP6-A-standarden med ett parti av *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit på ni ulike prøver klargjort med suksessive fortyninger av positivt RNA ekstrahert fra cellelinje til negativt RNA ekstrahert fra friske donorer. Bestemmelsen ble utført for tre ulike RNA-input.

Kvantifiseringen av BCR-ABL1 Mbc-transkriptet er lineær fra LOD-verdien til 56 % IS-NCN, så lenge den kvantifiserte prøve-RNA-konsentrasjonen er nær 200 ng/μl, dvs. anbefalt analyseinput (totalt input 3 μg).

Ved lavere RNA-input kan linearitetsområdet være redusert.

Repeterbarhet og reproduserbarhet

Presisjonsstudien ble utført i samsvar med CLSI/NCCLS EP5-A2-standarden. Testing ble utført på ni ulike prøver som ble testet 45 ganger i duplikater på 45 analyser utført over 23 dager, noe som ga 90 målinger per prøve.

Presisjonsresultatene er oppsummert i Tabell 12.

Tabell 12. Presisjonsresultater

Prøve	Gjennomsnittlig BCR-ABL1 Mbc IS-NCN	SDR+	SDRUN++	SDTOTAL+++	CV _{TOTAL}
S1	64,5243	4,3105	12,3610	13,0910	20,29 %
S2	36,1684	1,7104	5,9078	6,8581	18,96 %
S3	6,4876	0,4231	0,7857	1,0941	16,86 %
S4	0,7305	0,0512	0,0779	0,1178	16,12 %
S5	0,0754	0,0068	0,0073	0,0133	17,62 %
S6	0,0075	0,0016	0,0009	0,0022	28,81 %
S7	0,0036	0,0014	0,0002	0,0014	38,64 %
S8	0,0020	0,0010	0,0000	0,0010	48,71 %
S9	0,0011	0,0007	0,0000	0,0007	63,32 %

CV_{TOTAL}: Variasjonskoeffisient for den totale presisjonen (BCR-ABL1 Mbc IS-NCN); **SD**: standardavvik; **R+**: Repeterbarhet; **RUN++**: Reproduserbarhet mellom analyseserier; **S**: standard; **TOTAL+++**: total presisjon (inkludert mellom instrumenter, mellom operatører og mellom loter).

Interfererende stoffer

Studiedesignen var basert på anbefalinger beskrevet i NCCLS-standarden EP7-A2 "Interference Testing in clinical Chemistry". Følgende stoffer som kan være til stede i blodprøven, eller som kan bli innført under RNA-rensingen, ble valgt på bakgrunn av den mulige virkningen på PCR (ukonjugert bilirubin, konjugert bilirubin, hemoglobin [humant], serumalbumin [humant], overskudd av kalium-EDTA [K2-EDTA], etanol).

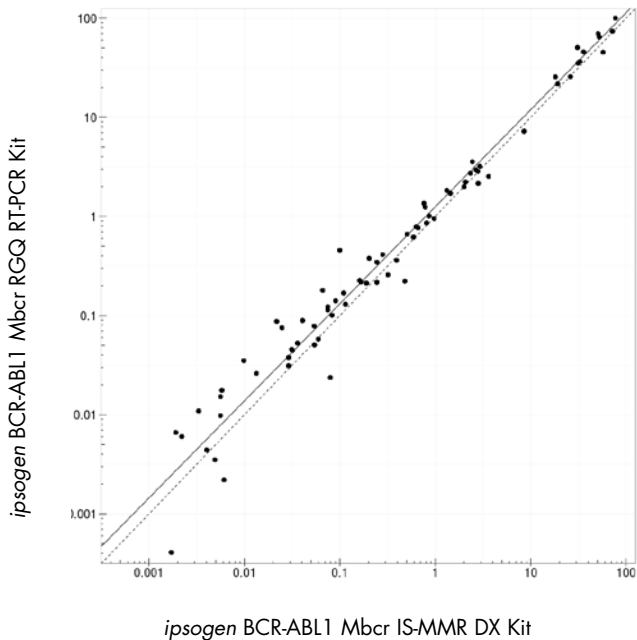
De oppnådde resultatene viste ingen interfererende virkning for disse stoffene.

Klinisk validering og metodesammenligning

To studier ble utført for å sammenligne *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit med alternative metoder.

Studie 1: 76 RNA-prøver ekstrahert fra perifert blod ble analysert med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit og *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-settet.

Demings regresjonsanalyse sammenlignet målt IS-NCN fra begge metoder. Det var en sterk korrelasjon mellom *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit og *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX Kit ($R^2 = 0,97$), som vist i Figur 9.



Figur 9. Plott av IS-NCN oppnådd med *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* og *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit*.

Studie 2: 39 RNA-prøver ekstrahert fra perifert blod hos pasienter tidligere diagnostisert med Ph+ KML og under TKH-behandling, ble analysert på en fransk klinikk med *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* og en laboratoriet utviklet test (referansemetode). Referansemetoden kunne rapportere resultater standardisert til den internasjonale skalaen ved bruk av en konverteringsfaktor.

Følgende kontingenstabell ble utarbeidet for å sammenligne den kliniske statusen etablert med de to metodene. Det var en sterk likhet mellom *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* og referansemetoden (total likhet = 97,4 %), som vist i Figur 10.

		Referansemetode		n
		ingen MR 4	MR 4 eller under	
ipsogen BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit	ingen MR 4	15	1	16
	MR 4 eller under	0	23	23
	n	15	24	39

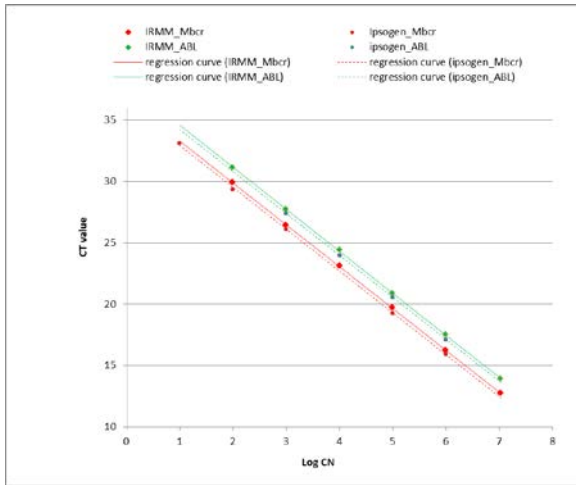
Figur 10. Kontingenstabell som sammenligner *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit og en laboratorieutviklet test standardisert til den internasjonale skalaen.

Konkordansstudie: ERM-AD623 BCR-ABL1 enkeltplasmidstandard (IRMM) versus *ipsogen* enkeltplasmidstandard (QIAGEN)

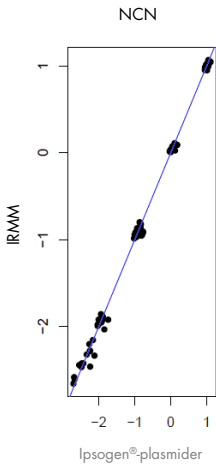
De nyeste arbeidsdefinisjonene for BCR-ABL1 Mbc molekylær respons i CML er angitt av European LeukemiaNet / European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS) Molecular Monitoring Steering Group, som anbefaler bruk av ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmid fra Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Belgia (9).

For å følge denne anbefalingen utførte QIAGEN en konkordansstudie for å sammenligne *ipsogen* enkeltplasmid til flere mål, brukt i *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit (24) CE (kat.nr. 670923) med ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmid (IRMM).

Sammenligningen var basert på BCR-ABL1 Mbc/ABL1 med normalisert kopinummerforhold (NCN) og vurderte de to standardenes fortyninger (*ipsogen* eller ERM-AD623 BCR-ABL1) på kontrollprøver inkludert i *ipsogen*-sett og på sertifisert referansemateriale fra National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (8). Resultatene viser at de to standardkurvene er innrettet (Figur 11), og at NCN-forholdene er sammenlignbare (Figur 12).



Figur 11. Sammenligning av *ipsogen*- og ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmider viser at standardkurvene er innrettet.



Figur 12. NCN-verdier for *ipsogen*- og ERM-AD623-plasmider er sammenlignbare.

QIAGEN-studien konkluderte med at det ikke var noen statistisk signifikant forskjell: ERM-AD623 BCR-ABL1 enkeltplasmidstandard og *ipsogen* enkeltplasmidstandard gir ekvivalente resultater.

Referanser

Angitte referanser

1. Cross, N.C., White, H.E., Müller, M.C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012) Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 2172.
2. Mahon, F.X., Etienne, G. (2013) Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin. Cancer Res.* **20**, 310.
3. Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* **122**, 872.
4. Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., et al. (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J. Clin. Oncol.* **32**, 424.
5. Branford, S., Cross, N.C., Hochhaus, A., 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.
6. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
7. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
8. White, H.E., Matejschuk, P., Rigsby, P., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.

-
9. Cross, N.C., White, H.E., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 999.

Nyttige referanser

Baccarani, M., et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.












Beillard, E., V.H., 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.

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.

van der Velden, V.H., et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time qPCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:

Symbol	Symboldefinisjon
	Brukes innen
	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent
	Skal beskyttes mot lys
	Se bruksanvisningen
	Forsiktig

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit (24)	Til 24 reaksjoner: ABL1 og BCR-ABL1 Mbcr kvantitative enkeltplasmidstandarder, lave og høye positive kontroller, IS-MMR-kalibrator, qPCR-blanding ABL1, qPCR-blanding Mbcr, reagenser for revers transkripsjon og qPCR-reagenser.	670923
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument – for IVD-godkjent PCR-analyse i sanntid til klinisk bruk		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare og tilbehør: inkluderer ett års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring ikke inkludert.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare og tilbehør: inkluderer ett års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring.	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Programvare for rutinemessig testing i kombinasjon med Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	En enkelt programvarelisens for installasjon på én datamaskin	9025620

Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en ékanalspipette i rør på 72 x 0,1 ml.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner.	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner.	981106
RNA-isolering		
RNeasy Midi Kit	50 RNeasy Midi-spinnkolonner, prøverør (15 ml), RNase-frie reagenser og buffere. Til rensing av totalt RNA.	75144
Buffer EL	1000 ml Erythrocyte Lysis Buffer.	79217
RNeasy MinElute Cleanup Kit	50 RNeasy MinElute-spinnkolonner, prøverør (1,5 ml og 2 ml), RNase-frie reagenser og buffere. Til opprensing og oppkonsentrering av RNA med små elueringsvolumer.	74204

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Endringshistorikk for håndbok

Dokument	Endringer	Dato
HB-1904_005	Inkludering av avsnitt "Automatisert analyse: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med rotor for 72-rør med RGAM-programvare" og "Tolkning av resultater på RGAM-programvare".	Juni 2018

Dette produktet er beregnet til bruk i in vitro-diagnostikk. QIAGEN-produkter kan ikke selges videre, modifiseres for videresalg eller brukes til å produsere kommersielle produkter uten skriftlig godkjenning fra QIAGEN.

Informasjon i dette dokumentet kan endres uten forvarsel. QIAGEN påtar seg ikke ansvar for noen feil som kan forekomme i dette dokumentet. Dette dokumentet anses å være fullstendig og nøyaktig på utgivelsestidspunktet. QIAGEN er under ingen omstendigheter ansvarlig for tilfældige, spesielle eller flere skader eller følgeskader i forbindelse med eller som resultat av bruken av dette dokumentet.

QIAGEN-produkter er garantert å oppfylle de spesifikasjonene som er angitt. QIAGENS eneste ansvar og kundens eneste rettsmiddel er begrenset til kostnadsfri erstating av produkter hvis produktene ikke fungerer i samsvar med garantien.

Innkjøpet av dette produktet gjør det mulig for kjøperen å bruke det til å utføre diagnostikkjenester for human in vitro-diagnostikk. Det gis ingen generelle patent- eller andre lisensrettigheter i forbindelse med kjøpet bortsett fra bruksretten.

Varemerker: QIAGEN®, *ipsogen*®, MinElute®, RNeasy®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); FAM™, SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); BHQ-1® (Biosearch Technologies, Inc); Exce!® (Microsoft Corporation); TaqMan® (Roche Group).

Begrenset lisensavtale for *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem, og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller anlydet, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

1114278NO 06/2018 HB-1904-005 © 2016 QIAGEN, med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/contact | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettside www.qiagen.com