

Handbok för *ipsogen*[®] BCR-ABL1 Mbcr-kit



Version 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], LightCycler[®]
och SmartCycler[®]-instrument



REF

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden,
Tyskland

R2

MAT

1072507SV



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar framgång från prov till resultat.

QIAGEN bestämmer normerna vid:

- rening av DNA, RNA och proteiner
- nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- automatisering av provtagnings- och analystekniker

Vårt uppdrag är att göra det möjligt för dig att uppnå utomordentliga framgångar och genombrott. Det finns mer information på www.qiagen.com.

Innehåll

Användningsområde	4
Sammanfattning och förklaring	4
Sjukdomsövervakning	4
Princip för proceduren	6
Material som medföljer	9
Kitinnehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	10
Varningar och försiktighet	11
Allmänna försiktighetsåtgärder	11
Förvaring och hantering av reagens	12
Procedur	13
Beredning av prov-RNA	13
Protokoll	
■ Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription	13
■ qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor	16
■ qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, och LightCycler 480-instrument	20
■ qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument	24
Tolkning av resultat	31
Dataanalysprincip	31
Resultat	32
Felsökningshandbok	34
Kvalitetskontroll	37
Begränsningar	38
Prestandaegenskaper	38
Icke-kliniska studier	38
Kliniska studier	41
Litteraturhänvisningar	44
Symboler	45
Kontaktinformation	46
Beställningsinformation	47

Användningsområde

ipsogen BCR-ABL1 Mbc-kitet är avsett för kvantifieringen av BCR-ABL p210 b2a2- eller b3a2-transkript i benmärg eller i prov på perifert blod från patienter med akut lymfoblastisk leukemi (ALL) eller kronisk myeloisk leukemi (KML) som tidigare har fått diagnos på bildande av fusionsgenen (FG) BCR-ABL Mbc. Testet är avsett för att utvärdera nivån av molekyärt svar; resultat kan användas för uppföljning av minimal restsjukdom.

Sammanfattning och förklaring

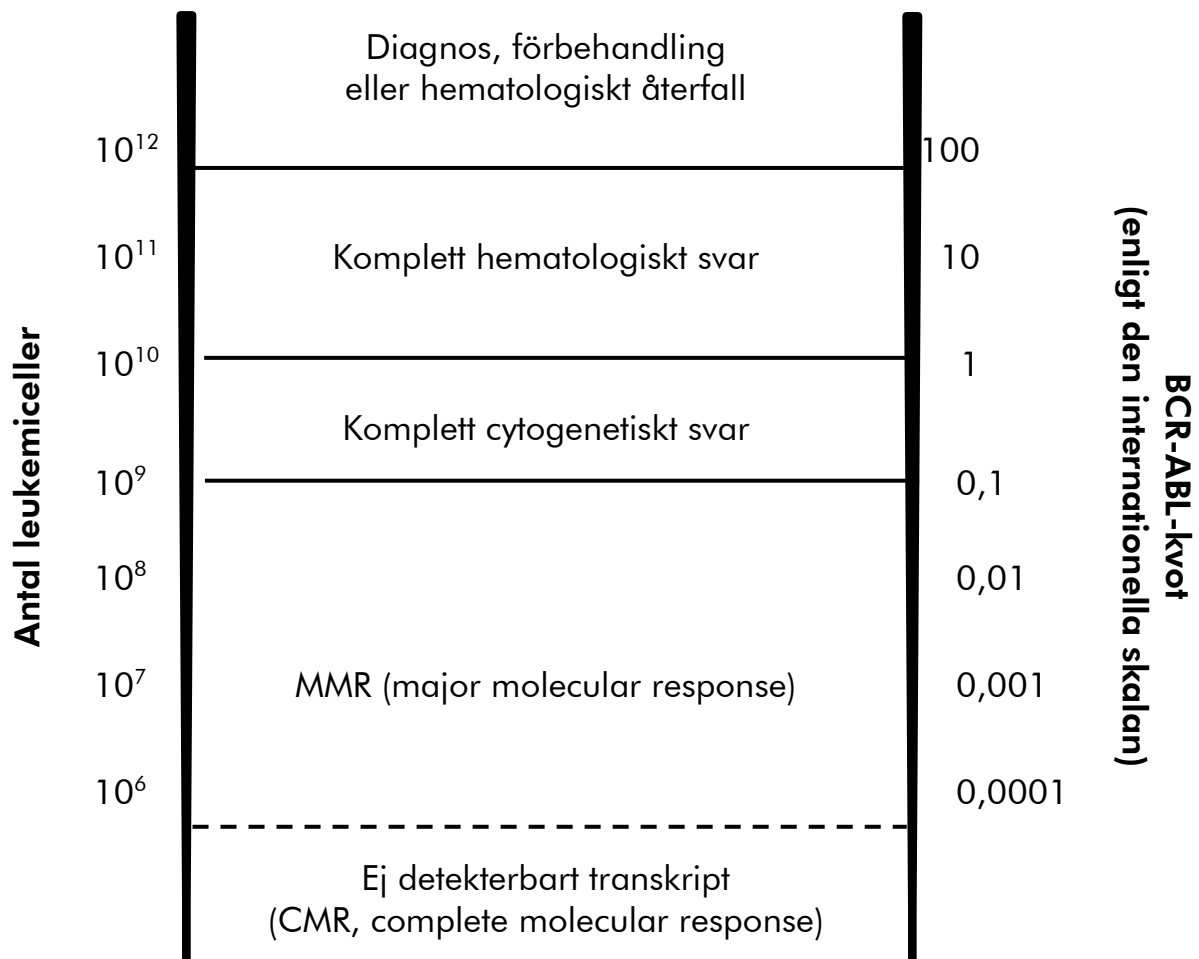
KML tillhör gruppen myeloproliferativa neoplasmer och kännetecknas i > 90 % av fallen av förekomsten av Philadelphia-kromosomen (Ph CHR5).

Denna kromosom är produkten av en reciprok translokation mellan de långa armarna i kromosom 9 och 22, t(9;22), med BCR ("breakpoint cluster region") belägen på kromosom 22 och c-ABL-onkogenen härrörande från kromosom 9. Den motsvarande fusionsgenen, BCR-ABL, transkriberas till ett 8,5 kb mRNA med 2 föreningspunktsvarianter, b2a2 (i 40 % av fallen) och b3a2 (i 55 % av fallen). Det kodar ett chimärt protein, p210, med förhöjd tyrosinkinasaktivitet. Transkripten b2a3 and b3a3 utgör mindre än 5 % av fallen. En Ph-kromosom kan också detekteras hos 35 % av vuxna ALL-patienter.

Den årliga incidensen av KML är cirka 1–2 per 100 000, och KML står för 20 % av leukemierna hos vuxna. Den kännetecknas kliniskt av ett överskott på myeloiska celler som differentieras och fungerar normalt. KML-patienter diagnostiseras i 90–95 % av fallen i den kroniska eller stabila fasen av sjukdomen. Historiskt sett gick patienterna, efter i genomsnitt 4 till 6 år, in i en accelererad fas som ledde till blastkris och akut leukemi, vilket alltid leder till döden. Tillkomsten av imatinib, och på senare tid andra generationens tyrosinkinashämmare (TKI), förändrade dramatiskt sjukdomens naturliga förlopp: de flesta av patienterna är nu i remission och behöver långvarig uppföljning och sjukdomsövervakning.

Sjukdomsövervakning

Hittills har målet för KML-terapi varit att uppnå 100 % överlevnad och Ph-kromosomnegativitet. Därför är sjukdomsövervakning ett väsentligt verktyg för att bedöma behandlingssvaret och detektera tidiga återfall för varje enskild patient. Under TKI-terapi brukar patienterna progrediera från hematologisk till cytogenetisk och sedan molekyär remission, vilket motsvarar ett minskande antal leukemiceller och BCR-ABL-transkript så som beskrivs närmare i figur 1 nedan.



Figur 1. Hämtad från litteraturhänvisning 1.

Standardmetoden för att beräkna tumörbördan hos KML-patienter är konventionell cytogenetisk analys (G-banding) på metafaser i benmärg (BM). Cytogenetiskt svar bedöms på minst 20 benmärgsmetafaser. Nivån av cytogenetiskt svar beräknas på procentandelen Ph-kromosompositiva metafaser (se tabell 1, litteraturhänvisning 2). Denna bedömning är dock beroende av laboratoriets prestanda och har en låg sensitivitet på 5 % när 20 metafaser analyseras.

Realtids kvantitativ polymeraskedjereaktion (qPCR) som kvantifierar BCR-ABL M_{bcr}-mRNA på prover av perifert blod (PB) ingår numera i metoderna för sjukdomsövervakning av KML som behandlas. Metoden är mindre invasiv än konventionell cytogenetik för benmärgsmetafaser och dessutom känsligare.

Rekommendationerna för KML-sjukdomsövervakning har även uppdaterats nyligen så att de innefattar nya kliniska evidens från kliniska prövningar samt förbättrade mål och verktyg för sjukdomsövervakning. De senaste rekommendationerna för svarsdefinition och övervakning av patienter på imatinib kommer från ELN-experterna (2).

Ur en teknisk ståndpunkt har insatser gjorts av internationella experter för att harmonisera testning och rapportering av BCR-ABL M_{bcr} (3–5). Dessutom har en referenspanel validerats nyligen under beskydd av WHO, i syfte att möjliggöra en enkel standardisering av BCR-ABL-kvantifiering (6).

Tabell 1. Internationella rekommendationer för hanteringen av KML-patienter (hämtad från litteraturhänvisning 2)

	Hematologiskt svar	Cytogenetiskt svar	Molekylärt svar (Kvoten för BCR-ABL och kontrollgenen enligt den internationella skalan)
Definitioner	Komplett: Trombocytantal <math>< 450 \times 10^9</math>/liter Antal vita blodceller <math>< 10 \times 10^9</math>/liter Differential utan omogna granulocyter och med mindre än 5 % basofiler Ej palpabel mjälte	Komplett: Ph+ 0 % Partiellt: Ph+ 1–35 % Mindre: Ph+ 36–65 % Minimalt: Ph+ 66–95 % Inget: Ph+ >95 %	”Komplett” indikerar ej kvantifierbara och ej detekterbara transkript Betydande: ≤ 0.1
Övervakning	Kontrollera varannan vecka tills komplett svar har uppnåtts och bekräftats, sedan var tredje månad tills annat behov uppstår	Kontrollera minst var sjätte månad tills komplett svar har uppnåtts och bekräftats, sedan minst var tolfte månad	Kontrollera var tredje månad Mutationsanalys i fall av svikt, suboptimalt svar eller höjd transkriptnivå

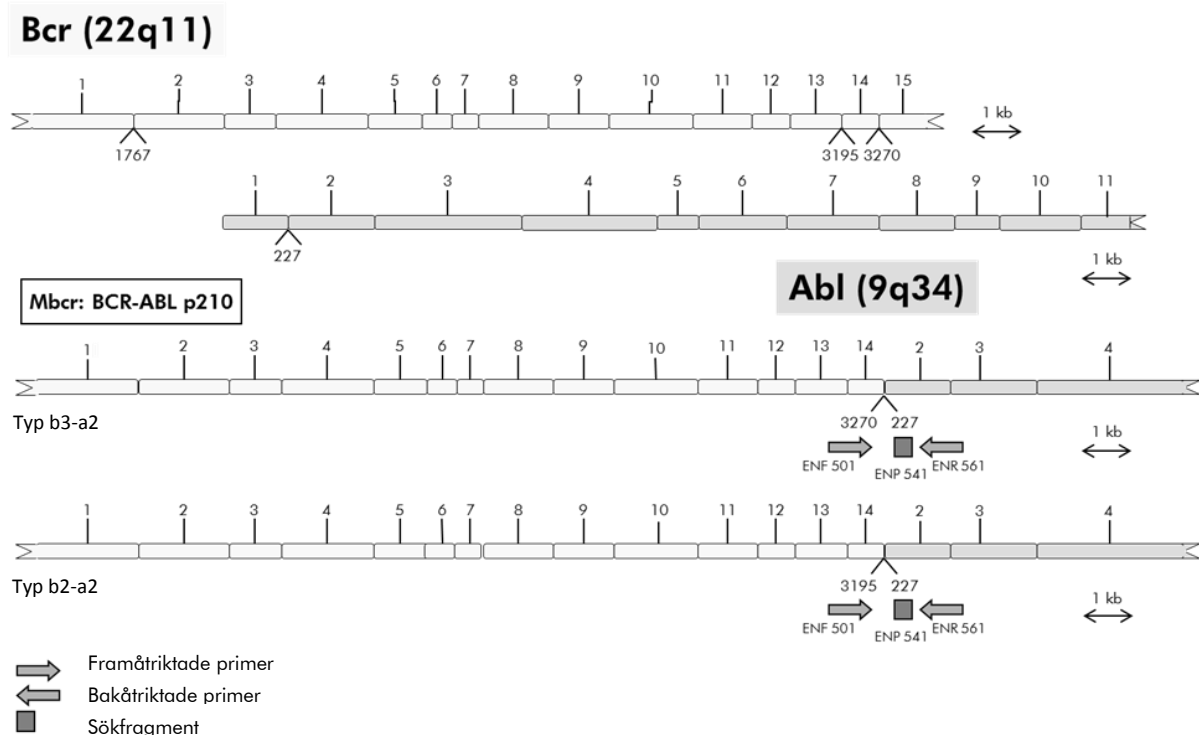
Komplett hematologiskt svar, cytogenetiskt svar och molekylärt svar ska bekräftas vid två tillfällen i följd. Cytogenetiskt svar utvärderas med morfologisk cytogenetik på minst 20 benmärgsmetafaser. FISH (fluorescence in situ hybridization) på celler från perifert blod ska endast användas om det inte går att erhålla några benmärgsceller. Molekylärt svar bedöms på celler från perifert blod.

Princip för proceduren

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

I-färg, qPCR-analys med hydrolyssökfragment och qPCR-analys med hybridiseringsökfragment.

I denna analys utnyttjas principen för qPCR-dubbelfärgad oligonukleotidhydrolyys. Under PCR hybridiseras framåtriktade och bakåtriktade primers till en specifik sekvens (figur 2). En dubbelfärgad oligonukleotid ingår i samma blandning. Detta sökfragment, vilket består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporter-färg och en nedströms 3'-quencher-färg, hybridiseras till en målsekvens inom PCR-produkten. Vid qPCR-analys med hydrolyssökfragment utnyttjas 5'→3'-exonukleasaktiviteten hos DNA-polymeraset för *Thermus aquaticus* (*Taq*). När sökfragmentet är intakt, leder närheten mellan reporter-färgen och quencher-färgen till suppression av reporter-fluorescensen, primärt genom energiöverföring av Förster-typ.

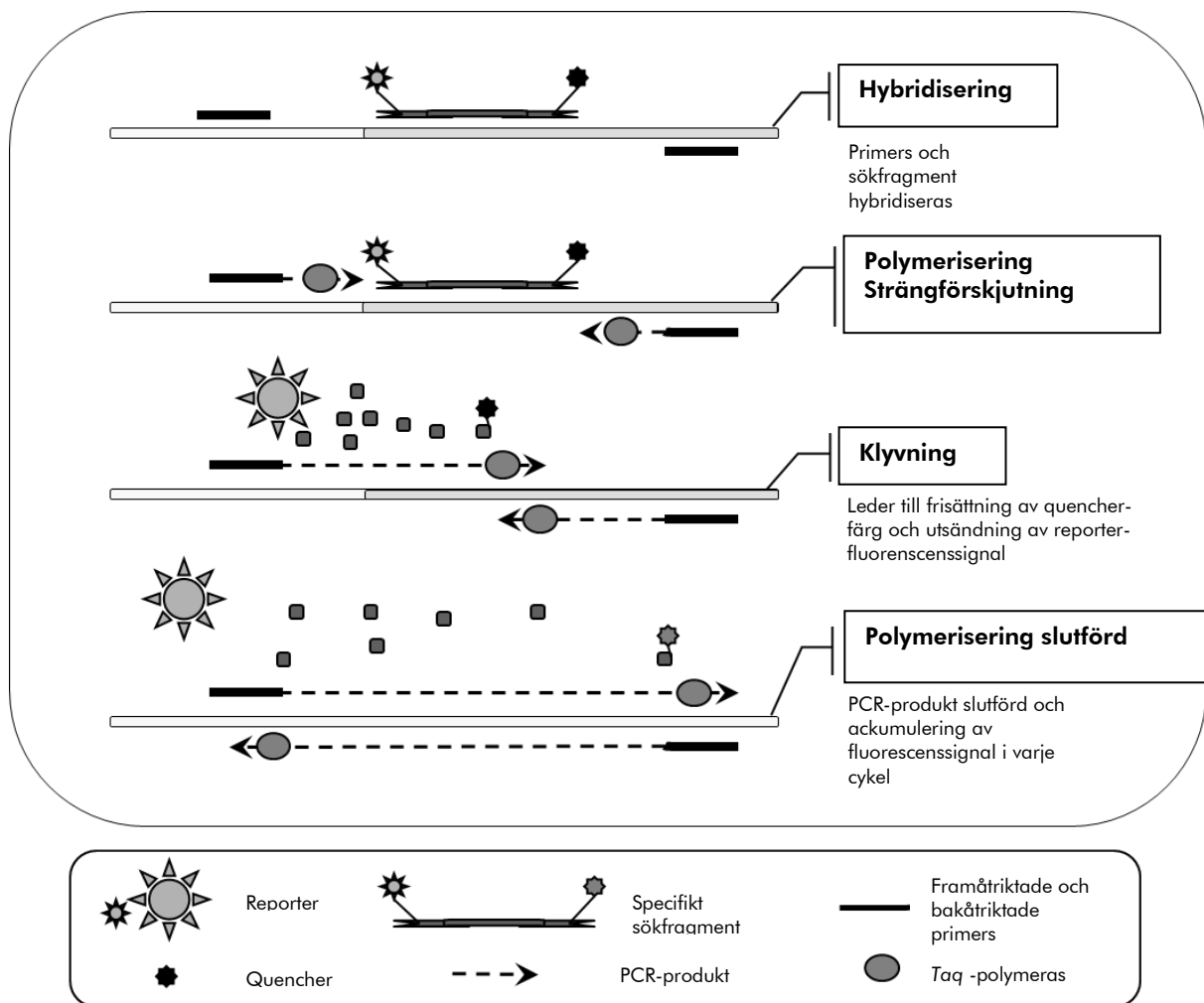


Figur 2. Schematiskt diagram för BCR-ABL MbcR FG-transkriptet som täcks av qPCR-primers och sökfragmentuppsättningen: ENF501-ENP541-ENR561. Siffran under primers och sökfragment avser deras nukleotidposition i det normala gentranskriptet.

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

Ökningen av fluorescenssignal detekteras endast om målsekvensen är komplementär till sökfragmentet och alltså amplifieras under PCR. På grund av

dessa krav sker ingen detektering av icke-specifik amplifiering. Ökningen av fluorescens är alltså direkt proportionell till målampliceringen under PCR.



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

Material som medföljer

Kitinnehåll

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Kit		(24)
Katalognr		670123
Antal reaktioner		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) (10^3 kopior/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) (10^4 kopior/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) (10^5 kopior/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL Mbcr-fusionsgen) (10^1 kopior/5 μ l)	F1-BCR-ABL Mbcr	50 μ l
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL Mbcr-fusionsgen) (10^2 kopior/5 μ l)	F2-BCR-ABL Mbcr	50 μ l
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL Mbcr-fusionsgen) (10^3 kopior/5 μ l)	F3-BCR-ABL Mbcr	50 μ l
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL Mbcr-fusionsgen) (10^5 kopior/5 μ l)	F4-BCR-ABL Mbcr	50 μ l
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL Mbcr-fusionsgen) (10^6 kopior/5 μ l)	F5-BCR-ABL Mbcr	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL* (Primers och sökfragmentblandning ABL)	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcr Fusion Gene [†] (Primers och sökfragmentblandning för BCR-ABL Mbcr-fusionsgen)	PPF-Mbcr 25x	110 μ l
ipsogen BCR-ABL Mbcr Kit Handbook (engelska)		1

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

[†] Blandning av specifika bakåtriktade och framåtriktade primers för BCR-ABL Mbcr-fusionsgenen plus ett specifikt FAM-TAMRA-sökfragment.

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

Material som behövs men inte medföljer

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

Reagenser

Nukleasfritt vatten av PCR-grad

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

Förbrukningsartiklar

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

Utrustning

- Mikroliterpipett* avsedd för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Bänkcentrifug* med rotor för 0,2 ml/0,5 ml reaktionsrör (som kan uppnå 10 000 varv/minut)
- Realtids-PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller annat Rotor-Gene-instrument; LightCycler 1.2, 2.0 eller 480; ABI PRISM 7000, 7700 eller 7900HT SDS; eller SmartCycler-instrument; och tillhörande specifikt material

* Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer.

- Termocykel* eller vattenbad* (för steget med omvänd transkription)

Kompletterande reagenser

- ipsogen BCR-ABL1 Mbc Controls Kit (kontrollkit för ipsogen BCR-ABL1 Mbc) (kat. nr 670191), bestående av cellinjer med negativt, högt och lågt positivt uttryck av BCR-ABL Mbc-fusionsgenen för den kvalitativa valideringen av RNA-extraheringen och den omvända transkriptionen

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Det finns mer information i de relevanta säkerhetsdatablad (SDS). Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut SDS:er för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

Allmänna försiktighetsåtgärder

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

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

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

* Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer.

Var mycket försiktig för att förhindra:

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

Därför rekommenderar vi följande:

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

Förvaring och hantering av reagens

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

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

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

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

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

Procedur

Beredning av prov-RNA

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

Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription

Saker som ska utföras före start

- Bered dNTP:er, 10 mM i varje. Förvaras vid –20 °C i aliquoter.

Procedur

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

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

Tabell 2. Beredning av RT-blandning

Komponent	Volym per prov (μl)	Slutlig koncentration
Förstasträngsbuffert (medföljer Superscript II omvänt transkriptas), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP:er (10 mM i varje, ska beredas i förväg och förvaras vid -20 °C i alikvoter)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, medföljer Superscript II omvänt transkriptas)	2,0	10 mM
RNas-hämmare (40 E/ μl)	0,5	1 E/ μl
Random (slumpmässig) hexamer (100 μM)	5,0	25 μM
SuperScript II eller SuperScript III omvänt transkriptas (200 E/ μl)	0,5	5 E/ μl
Uppvärt RNA-prov (tillsätts i steg 5)	1,0–4,0	50 ng/ μl
Nukleasfritt vatten av PCR-grad (tillsätts i steg 5)	0,0–3,0	–
Slutlig volym	20,0	–

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

Tabell 3. Beredning av omvänd transkriptionsreaktion

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

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

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

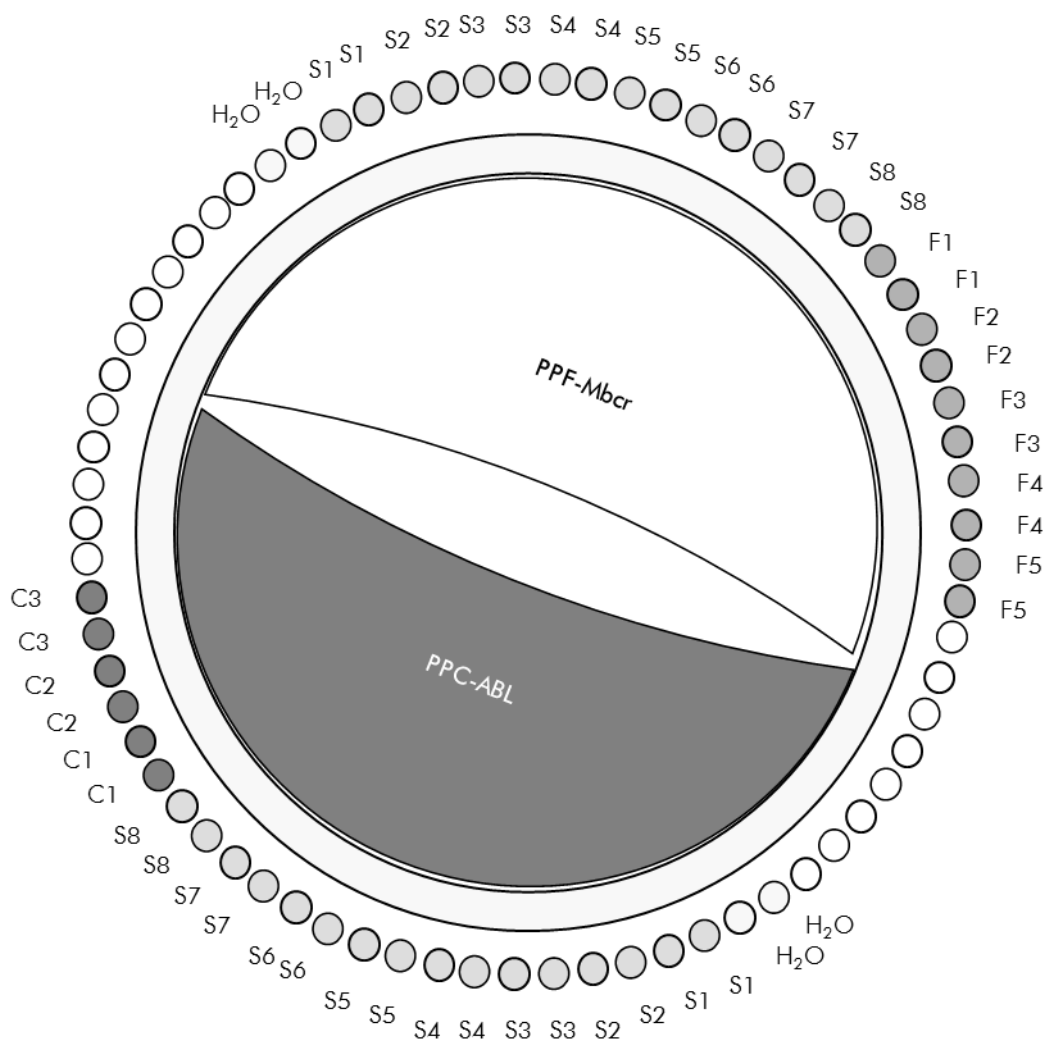
När detta instrument används rekommenderar vi att mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 4.

Tabell 4. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

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

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

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Varje *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc-kit innehåller tillräckligt med reagenser för att man ska kunna utföra ett 8-provsexperiment 3 gånger med 72-rörsrotorn.



Figur 4. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med ipsogen BCR-ABL1 Mbcr-kitet. F1–5: BCR-ABL Mbcr-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: cDNA-prov; H₂O: vattenkontroll.

Obs! Var noga med att alltid placera ett prov som ska testas i position 1 på rotorn. I annat fall utför instrumentet ingen kalibrering under kalibreringssteget och felaktiga fluorescensdata samlas in.

Fyll alla andra positioner med tomma rör.

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

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 5 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 μ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma blandning av primer och sökfragment (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 5. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	ABL: 24+1 reaktioner (μl)	BCR-ABL Mbcr: 28+1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	25	29	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6.5	162,5	188,5	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	–

3. **Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen per rör.**
4. **Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i det motsvarande röret (total volym 25 μ l).**
5. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
6. **Placera rören i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.**
7. **Programmera Rotor-Gene Q-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 6.**

Tabell 6. Temperaturprofil

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

- 8. För Rotor-Gene Q-instrument väljer du "Slope Correct" (lutning korrekt) för analysen. Vi rekommenderar att tröskeln ställs in på 0,03. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 6.**

Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, och LightCycler 480-instrument

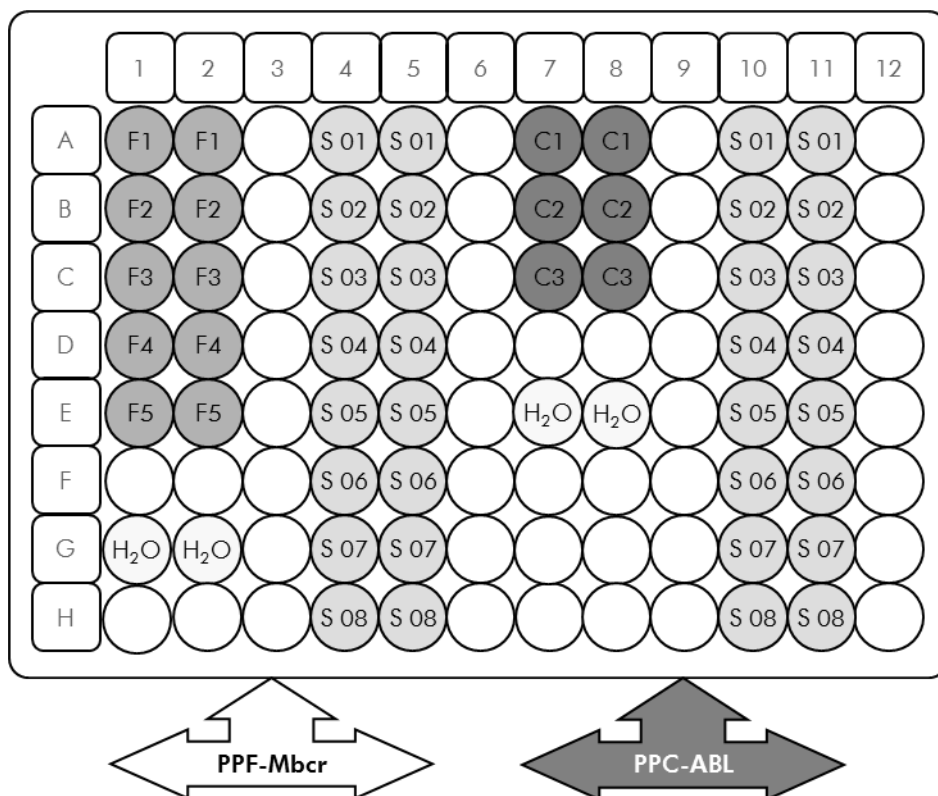
När utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 7.

Tabell 7. Antal reaktioner med användning av utrustning för qPCR med 96-brunnsplattor

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

Provbehandling på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900 SDS, och LightCycler 480-instrument

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Plattschemat i figur 5 visar ett exempel på ett sådant experiment.



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

qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900 SDS, och LightCycler 480-instrument

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas. Om utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat.**

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 8 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma blandning av primer och sökfragment (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 8. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	ABL: 24+1 reaktioner (μl)	BCR-ABL Mbc: 28+1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	25	29	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	162,5	188,5	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	–

3. **Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen per brunn.**
4. **Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i den motsvarande brunnen (total volym 25 μ l).**
5. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
6. **Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 sekunder).**
7. **Placera plattan i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer. Programmera termocykeln med termocykelprogrammet så som anges i tabell 9 för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, eller tabell 10 för LightCycler 480-instrumentet.**

Tabell 9. Temperaturprofil för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS

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

Tabell 10. Temperaturprofil för LightCycler 480-instrument

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

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

termocykelprogrammet så som anges i tabell 10. Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

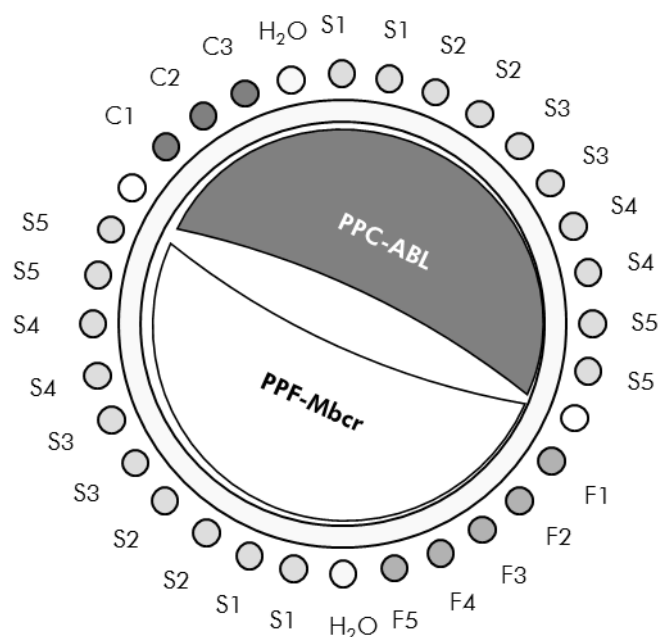
När kapillärinstrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 11.

Tabell 11. Antal reaktioner för LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

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

Provbehandling på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

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



Figur 6. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr-kitet. F1–5: BCR-ABL Mbcr-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: okänt DNA-prov som ska analyseras; H₂O: vattenkontroll.

qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

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

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 12 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 20 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma blandning av primer och sökfragment (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 12. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	ABL: 14+1 reaktioner (μl)	BCR-ABL Mbcr: 16+1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
Färskt beredd LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60	68,0	1x
Primers och sökfragment-blandning, 25x	0,8	12	13,6	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	10,2	153	173,4	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5,0	5,0 vardera	5,0 vardera	–
Total volym	20,0	20 each	20,0 vardera	–

3. **Dispensera 15 μ l av qPCR-pre-mixen per kapillär.**
4. **Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i det motsvarande röret (total volym 20 μ l).**
5. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
6. **Placera kapillärerna i adaptrarna som medföljde apparaten och centrifugera kortvarigt (700 x g, cirka 10 sekunder).**
7. **Ladda kapillärerna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.**
8. **Programmera LightCycler 1.2- eller 2.0-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 13.**

Tabell 13. Temperaturprofil

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

9. För LightCycler 1.2, följ steg 9a. För LightCycler 2.0, följ steg 9b.

9a. LightCycler 1.2: Läget F1/F2 och "2nd derivative analysis" (2:a derivatanalys) rekommenderas. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 13.

9b. LightCycler 2.0: Vi rekommenderar användningen av automatiserad (F''max) analys på LightCycler 2.0 programversion 4.0 för att erhålla reproducerbara resultat. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 13.

Protokoll: qPCR på SmartCycler-instrumentet

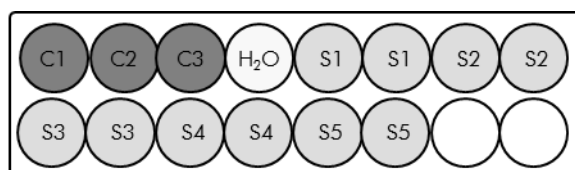
När detta instrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 14.

Tabell 14. Antal reaktioner för SmartCycler-instrumentet

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

Provbehandling på SmartCycler-instrumentet

Vi rekommenderar att minst 5 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Tvåblocksschemat i figur 7 visar ett exempel.



Alla analyserna på det första blocket är utförda med PPC-ABL.



Alla analyserna på det andra blocket är utförda med PPF-Mbc.

Figur 7. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment. S: cDNA-prov; **F1–5:** BCR-ABL Mbc-standarder; **C1–3:** ABL-standarder; **H₂O:** vattenkontroll.

qPCR på SmartCycler-instrumentet

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 15 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 μ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma blandning av primer och sökfragment (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 15. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	ABL: 14+1 reaktioner (μl)	BCR-ABL Mbcr: 16+1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	15	17	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	97,5	110,5	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	–

3. **Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen per brunn.**

4. Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i den motsvarande brunnen (total volym 25 μ l).
5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
6. Ladda proverna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
7. Programmera SmartCycler-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 16.

Tabell 16. Temperaturprofil

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

8. Vi rekommenderar en tröskelinställning på 30. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 16.

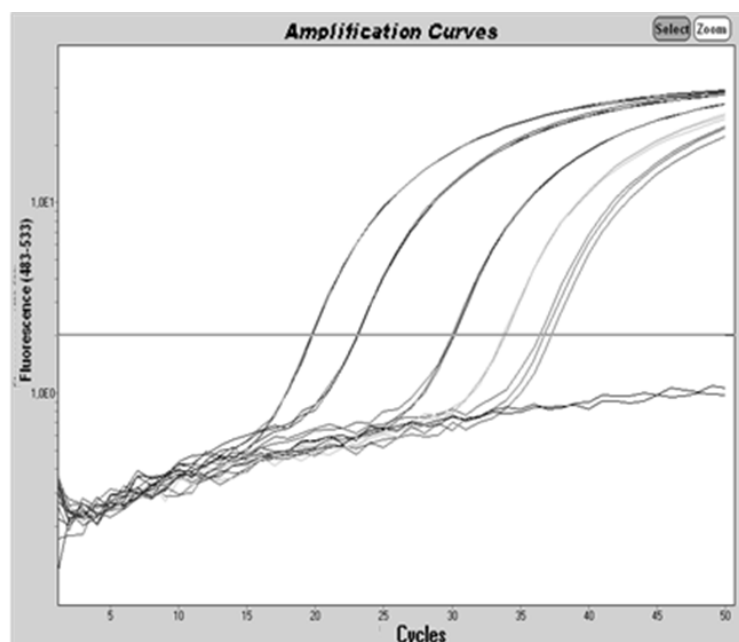
Tolkning av resultat

Dataanalysprincip

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

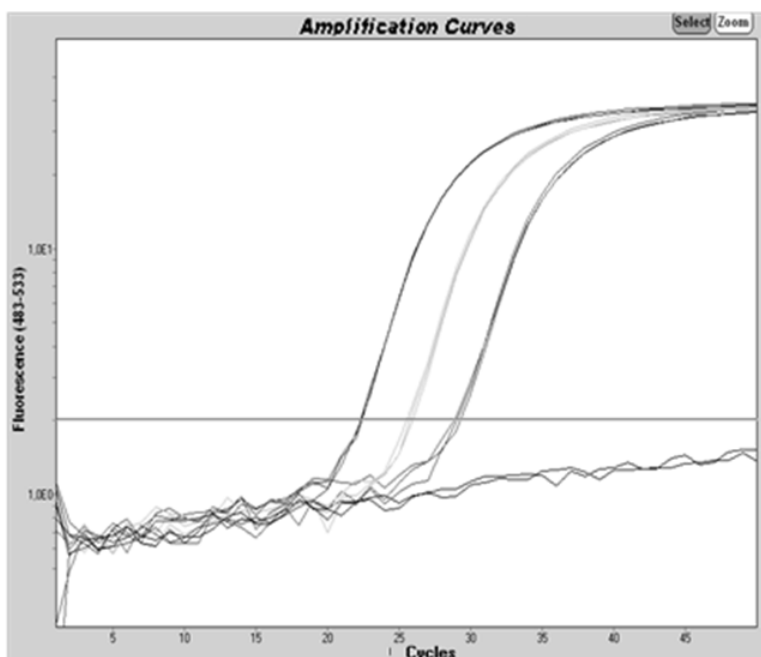
När man använder standarder med ett känt antal molekyler, kan man fastställa en standardkurva och bestämma den exakta mängden mål som finns i testprovet. Standardkurvorna för *ipsogen* är plasmidbaserade; vi använder 3 plasmidstandardspädningar för CG (kontrollgen), och 5 standardspädningar för FG (fusionsgen), för att säkert få noggranna standardkurvor. I figur 8 och 9 visas ett exempel på TaqMan-amplifieringskurvor som erhållits med *ipsogen* BCR-ABL Mbc-kitet.

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



Figur 8. Detektion av BCR-ABL Mbc-standarder (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopior/ $5 \mu\text{l}$.

- ABL 10³
- ABL 10⁴
- ABL 10⁵



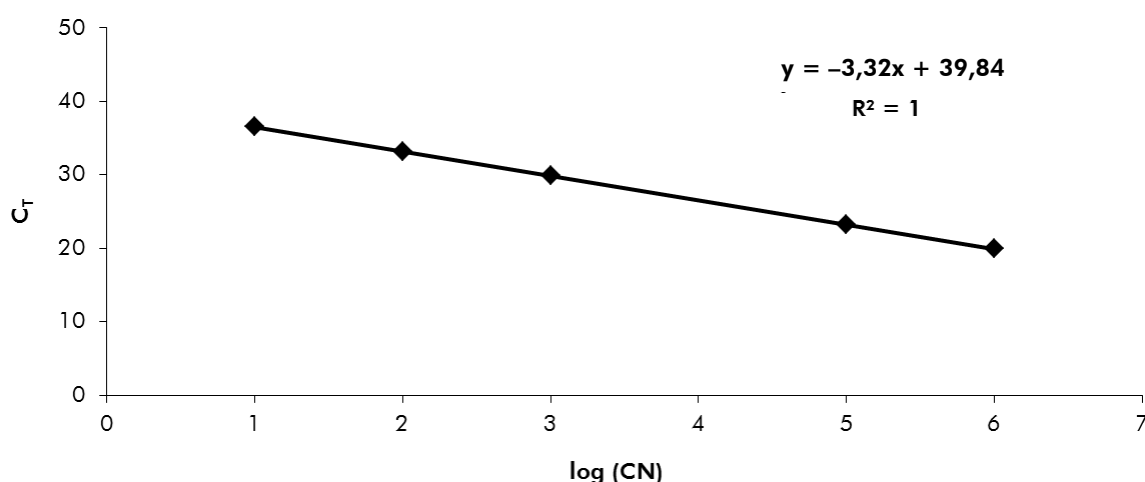
Figur 9. Detektion av ABL-standarder (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ och 10⁵ kopior/5 μ l.

Resultat

Standardkurva och kvalitetskriterier

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

För varje gen (ABL och BCR-ABL), ritas råa C_T-värden in som erhållits från plasmidstandardspädningar i enlighet med log-kopians nummer (3, 4 och 5 för C1, C2 och C3; 1, 2, 3, 5 och 6 för F1, F2, F3, F4 och F5). I figur 10 visas ett exempel på den teoretiska kurvan som beräknats på 5 standardspädningar.



Figur 10. Teoretisk kurva som beräknats från 5 standardspädningar. En linjär regressionskurva ($y = ax + b$) beräknas för varje gen (ABL och BCR-ABL), där a är linjens lutning och b är y -skärningspunkten, vilket är y -koordinaten för den punkt där linjen korsar y -axeln. Dess ekvation och bestämningskoefficient (R^2) är tryckta på grafen.

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

Normaliserat kopieantal (normalized copy number, NCN)

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

Ekvationen för BCR-ABL-standardkurvan ska användas för att omvandla råa C_T -värden (erhållna med PPF-Mbcr) för de okända proven, till BCR-ABL-kopieantal ($BCR-ABL Mbcr_{CN}$).

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

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

MRD-värde

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

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

Känslighet

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

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

Kvalitetskontroll på ABL-värden

Dålig kvalitet för RNA eller problem under qPCR-stegen leder till låga ABL_{CN} . Vi rekommenderar att man kasserar resultat från prover som ger $ABL_{CN} < 4246,2$ (lägre värde för 95 % KI från KML-patientprover i EAC-studien, litteraturhänvisning 8).

Reproducerbarhet mellan replikat

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

Variation i C_T -värden mellan replikat är generellt $<1,5$ om det genomsnittliga C_T -värdet för replikaten är <36 (7).

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

Vattenkontroller

Negativa kontroller ska ge noll CN.

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

Felsökningshandbok

Denna felsökningshandbok kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För ytterligare information, se även sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om antingen informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se "Kontaktinformation", sida 46).

Kommentarer och förslag

Negativt resultat för kontrollgenen (ABL) och BCR-ABL MbcR i alla proverna – acceptabel standard

- a) Dålig RNA-kvalitet Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit [BCR-ABL1 MbcR-kontrollkit], kat. nr 670191) parallellt.
- b) Steget för omvänd transkription misslyckas Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit [BCR-ABL1 MbcR-kontrollkit], kat. nr 670191) parallellt.

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

- a) Dålig RNA-kvalitet Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit [BCR-ABL1 MbcR-kontrollkit], kat. nr 670191) parallellt.
- b) Steget för omvänd transkription misslyckas Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit [BCR-ABL1 MbcR-kontrollkit], kat. nr 670191) parallellt.

Standardsignal negativ

- a) Pipetteringsfel Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen.
- b) Felaktig förvaring av kit-komponenter Förvara *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPC och PPF) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 12.
Undvik upprepad frysning och tining.
Alikvotera reagenser för förvaring.

Kommentarer och förslag

Kommentarer och förslag

Negativa kontroller är positiva

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

Ingen signal, även i standardkontroller

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

Ingen eller låg signal i prover men standardkontroller är utan anmärkning

- | | |
|---|---|
| a) Dålig RNA-kvalitet eller låg koncentration | Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Control Kit [BCR-ABL1 Mbc-kontrollkit], kat. nr 670191) parallellt. |
| b) Steget för omvänd transkription misslyckas | Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Control Kit [BCR-ABL1 Mbc-kontrollkit], kat. nr 670191) parallellt. |

Kommentarer och förslag

Kommentarer och förslag

Fluorescensintensiteten är för låg

- a) Felaktig förvaring av kit-komponenter Förvara *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPC och PPF) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 12.
- Undvik upprepade frysning och tining.
- Alikvotera reagenser för förvaring.
- b) Mycket låg initial mängd av mål-RNA Öka mängden prov-RNA.
- Obs!** Beroende på vilken metod som valts för RNA-beredning kan hämmande effekter uppstå.

LightCycler: Fluorescensintensiteten varierar

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

LightCycler: Fel i standardkurvan

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

Kvalitetskontroll

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

Begränsningar

Användarna måste vara utbildade i och förtrogna med denna teknologi innan produkten används.

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

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

Obs! Kitet har utformats i enlighet med studierna "Europe Against Cancer" (EAC) (8), och överensstämmer med de uppdaterade internationella rekommendationerna (3, 5). Det ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument (se "Material som behövs men inte medföljer", sida 10). Om denna produkt används utanför indikationen och/eller om komponenterna modifieras, upphör ansvarsskyldigheten för QIAGEN.

Prestandaegenskaper

Icke-kliniska studier

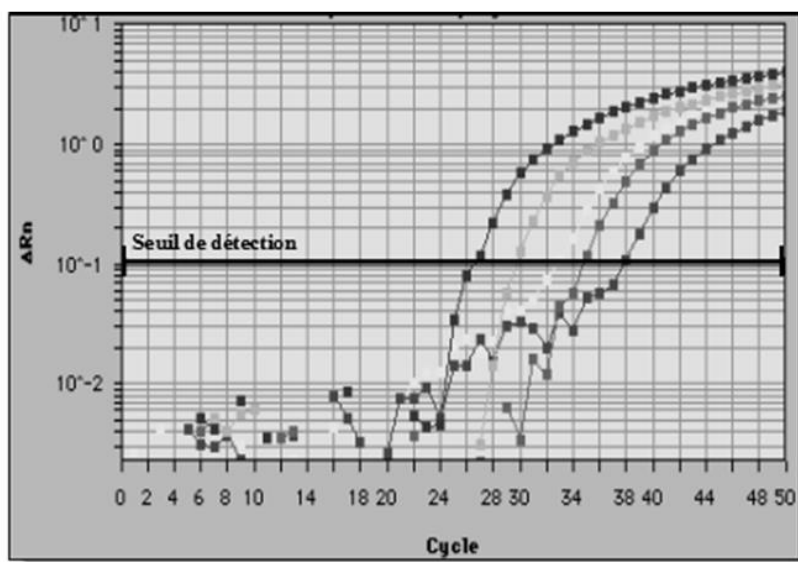
Material och metoder

Prestandautvärdering utfördes på ett ABI PRISM 7700 SDS i kombination med reagenser som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 10. Ekvivalensstudier utfördes på följande instrument för att validera dess användning: ABI PRISM 7000 och 7900HT SDS, LightCycler 1.2- och 480-instrument, Rotor-Gene 3000 och SmartCycler-instrument (9).

Icke-kliniska studier har utförts för att fastställa den analytiska prestandan för *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr-kitet. Dessa icke-kliniska laboratoriestudier utfördes på totalt RNA från K562-cellinje utspädd i en konstant slutlig mängd av totalt RNA från MV4-11-cellinje.

För att bestämma analysens upprepbarhet blev 5 olika koncentrationer av K562 totalt RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg och 0,5 pg) utspädd i MV4-11 totalt RNA, i en konstant slutlig total mängd på 200 ng, analyserade i 5 replikat per körning och i 4 olika körningar (figur 11).

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



Figur 11. Amplifieringskurvor för $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng), $2,5 \times 10^{-5}$ (0,005 ng) och $2,5 \times 10^{-6}$ (0,0005 ng) spädningar av K562 totalt RNA i MV4-11-negativt totalt RNA.

Analysdata

I tabell 17–20 visas analyserna av jämförelser mellan olika analyser med genomsnittlig tröskelcykel (C_T), standardavvikelse (SD), antal prover (n), variationskoefficient (CV), genomsnittligt antal kopior (CN) och genomsnittligt normaliserat antal kopior (NCN).

Tabell 17. Analys av jämförelse mellan olika analyser – cellinjer BCR-ABL Mbcr och ABL

Cellinje	Spädning	Medel- C_T	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	32,62	0,62	20	1,91
ABL	–	23,59	0,20	95	0,83

Tabell 18. Analys av jämförelse mellan olika analyser – plasmider

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

Tabell 19. Analys av jämfördelse mellan olika analyser – cellinjer BCR-ABL Mbcr och ABL (medel-CN)

Cellinje	Spädning	Medel- CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	4134,27	2512,40	20	60,77
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL	–	33.831,51	13.637,7	94	40,31

Tabell 20. Analys av jämförelser mellan olika analyser – cellinje BCR-ABL MbcR (medel-NCN)

Cellinje	Spädning	Medel-NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL MbcR	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

* Endast för dessa studieresultat anges NCN som $\frac{MbcR_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$.

Kliniska studier

Prestandautvärdering utfördes på ett ABI PRISM 7700 SDS i kombination med reagenser som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 10. Ekvivalensstudier utfördes på följande instrument för att validera dess användning: ABI PRISM 7000 och 7900HT SDS, LightCycler 1.2- och 480-instrument, Rotor-Gene 3000 och SmartCycler-instrument (9).

En grupp med 26 laboratorier, i 10 europeiska länder, som deltog i en gemensam aktion med Europe Against Cancer (EAC), använde plasmider som tillhandahållits av IPSOGEN för att fastställa ett standardiserat protokoll för qPCR-analys av de viktigaste leukemiassocierade fusionsgenerna i den kliniska miljön. BCR-ABL p210-transkriptet var en av fusionsgenerna (FG) som ingick i studien. Här presenteras en sammanfattning av denna valideringsstudie; de fullständiga resultaten har publicerats (8, 10).

Reproducerbarhet mellan olika laboratorier för CG- och FG-plasmidstandarder

Elva laboratorier utförde ett reproducerbarhetsexperiment mellan olika laboratorier för att bedöma variabiliteten i mätningen av CG- och FG-plasmidstandardspädningarna. Spädningar utfördes i duplikat på varje laboratorium. I tabell 21 rapporteras genomsnitt, standardavvikelse och CV (%) för varje spädning.

Tabell 21. Reproducerbarhet mellan olika laboratorier för CG- och FG-plasmidstandarder

Gen	Spädning	Medelvärde	C _T SD	CV (%)
ABL-kontrollgen	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
BCR-ABL p210-fusionsgen	F1	41,11	2,26	5,50
	F2	37,43	1,51	4,04
	F3	33,76	1,28	3,81
	F4	26,50	1,03	3,90
	F5	22,98	0,97	4,21

Uttrycksvärden för BCR-ABL Mbc_r FG-transkriptet

I tabell 22 och 23 visas uttrycksvärdena för BCR-ABL Mbc_r FG-transkriptet och ABL CG, för K562-cellinje, KML- och ALL-patienter vid diagnosen, samt normala patienter.

Tabell 22. Uttrycksvärden för BCR-ABL Mbc_r FG-transkriptet och ABL CG – C_T-värden

	C _T -värden (95 % intervall)	
	BCR-ABL Mbc _r	ABL
K562-cellinje	20,5	20,7
KML-patientprover		
BM (n = 15)	25,1 (21,5–27,0)	25,2 (20,7–26,8)
PB (n = 14)	23,1 (21,9–25,8)	23,7 (22,6–26,7)
ALL-patientprover		
BM och PB (n = 17)	24,1 (21,5–29,9)	24,0 (21,6–26,4)
Negativa patientprover		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tabell 23. Uttrycksvärden för BCR-ABL Mbc_r FG-transkriptet och ABL CG – CN- och kvotvärden

	CN-värden (95 % intervall)		Kvotvärden (95 % intervall)*
	BCR-ABL Mbc _r	ABL	CN BCR-ABL Mbc _r /CN ABL
KML-patientprover			
BM (n = 15)	8710 (2089–112.202)	10.115,8 (4786,3–37.153,52)	0,86 (0,44–3,02)
PB (n = 14)	17.783 (2042–112.202)	15.237 (4246,2–25.568,3)	1,17 (0,48–4,41)
Negativa patientprover			
BM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

* Resultat uttrycks som enkla BCR-ABL/ABL-kvoter.

ABL C_T-värden skilde sig inte signifikant mellan normala prover och leukemiprover, inte heller mellan provtyper (PB eller BM) eller leukemiprover (ALL, AML, KML).

Falska negativa och falska positiva frekvenser

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

- Positiva kontroller: K562-celler, en cellinje som är välkänd för dess positivitet för BCR-ABL p210-fusionsgenen; patientprover är redan bedömda avseende p210-positivitet
- Negativa kontroller: Negativa RNA-prover, kontroller utan amplifiering (no amplification controls, NAC) av RNA från *E. coli* istället för humant RNA för att kontrollera eventuell PCR-kontaminering, och kontroller utan templat (no template controls, NTC), som innehöll vatten istället för humant RNA

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

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

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

I tabell 24 visas antalet och procenten för falska negativa och falska positiva prover.

Tabell 24. Falska negativa och falska positiva prover

Falsk negativitet		Falsk positivitet	
10^{-3}	10^{-4}	FG-negativ kontroll	NAC/NTC
0% (0/33)	6,1% (2/33)	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)

Litteraturhänvisningar

QIAGEN upprätthåller en stor och uppdaterad databas online med vetenskapliga publiceringar där QIAGEN-produkter används. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelordssökning eller genom att specificera tillämpning, forskningsområde, titel etc.

Om du vill ha en fullständig referenslista kan du besöka QIAGENS referensdatabas online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakta QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Citerade litteraturhänvisningar

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.

6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
9. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
10. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Symboler

Följande symboler kan förekomma på förpackning och märkning:



Innehåller reagenser som räcker för <N> reaktioner



Använd före



Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsningar



Tillverkare



Konsultera bruksanvisningen

Kontaktinformation

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ring 00800-22-44-6000 eller kontakta en av QIAGENS tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (24)	För 24 reaktioner: ABL Control Gene Standards (ABL-kontrollgenstandarder), BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standards (BCR-ABL Mbc-fusionsgenstandarder), Primer and Probe Mix ABL (primer och sökfragmentblandning ABL), Primer and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene (primer och sökfragmentblandning BCR-ABL Mbc-fusionsgen)	670123
Rotor-Gene Q MDx — för IVD-validerad realtids PCR-analys i kliniska applikationer		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cyklar i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-cyklar i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc-kontrollkit) – för kvalitativ validering av RNA-extrahering och omvänd transkription av BCR-ABL Mbc-fusionsgenen		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Cellinjer med negativt, högt och lågt positivt uttryck av BCR-ABL Mbc-fusionsgenen	670191

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

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

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

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

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

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

Begränsat licensavtal

Användningen av denna produkt innebär att en köpare eller användare av *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc-kitet samtycker till följande villkor:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc-kitet får endast användas i enlighet med *handboken till ipsogen BCR-ABL Mbc-kitet* och endast i kombination med komponenter som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i kitet, förutom det som beskrivs i *handboken till ipsogen BCR-ABL Mbc-kitet* och ytterligare protokoll som finns tillgängliga på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN frånsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, med ensamrätt.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

