

Handleiding *ipsogen*[®] BCR-ABL1 Mbc r IS-MMR Kit



Versie 1



Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met instrumenten van Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] en LightCycler[®]



REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DUITSLAND

R3 **MAT** 1072509NL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatievemonster- en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN zet de toon voor :

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek met microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Wij stellen ons ten doel ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken kunt bereiken. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoud

Beoogd gebruik	5
Samenvatting en uitleg	5
Achtergrondinformatie bij CML	5
Controle van de ziekte	6
Uitgangspunt van de procedure	7
Meegeleverde materialen	10
Inhoud van de kit	10
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	11
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	13
Algemene voorzorgsmaatregelen	13
Opslag en verwerking van reagentia	14
Opslag en verwerking van monsters	14
Procedure	15
Bereiding monster-RNA	15
Protocol: Omgekeerde transcriptie met behulp van SuperScript III Reverse Transcriptase	15
Protocol: qPCR in RotorGene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes	18
Protocol: qPCR met het Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem en de ABI PRISM 7900HT SDS- en LightCycler 480-instrumenten	22
Protocol: qPCR met LightCycler 1.2-, 1.5- of 2.0-instrumenten	28
Interpretatie van de resultaten	32
Principe van de gegevensanalyse	32
Standaardcurven en kwaliteitscriteria van toepassing op onbewerkte gegevens	33
Genormaliseerd aantal kopienummers (normalized copy number, NCN)	35
IS-conversie en MMR-rapportage	36
Overzicht van kwaliteitscriteria	37
Problemen oplossen	38
Kwaliteitscontrole	39
Beperkingen	39
Prestatiekenmerken	40

Blancolimiet en detectielimiet	40
Lineariteit	40
Invoer	40
Precisie	41
Concordantiestudie: Standaarden van de enkele plasmide ERM-AD623 BCR-ABL1 versus de enkele plasmide van <i>ipsogen</i> (Q IAGEN).	42
Referenties	44
Symbolen	45
Contactgegevens	45
Bestelgegevens	46

Beoogd gebruik

De *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit is bedoeld voor de kwantificering van BCR-ABL p210 b2a2- of b3a2 -transcripten in beenmerg- of perifere-bloedmonsters van patiënten met acute lymfatische leukemie (ALL) of chronische myeloïde leukemie (CML) die eerder met een BCR-ABL MbcR-fusiegenactiviteit zijn gediagnosticeerd. De test is bedoeld om de mate van moleculaire respons te evalueren; de resultaten kunnen voor de follow-up van minimale restziekte worden gebruikt.

Samenvatting en uitleg

Achtergrondinformatie bij CML

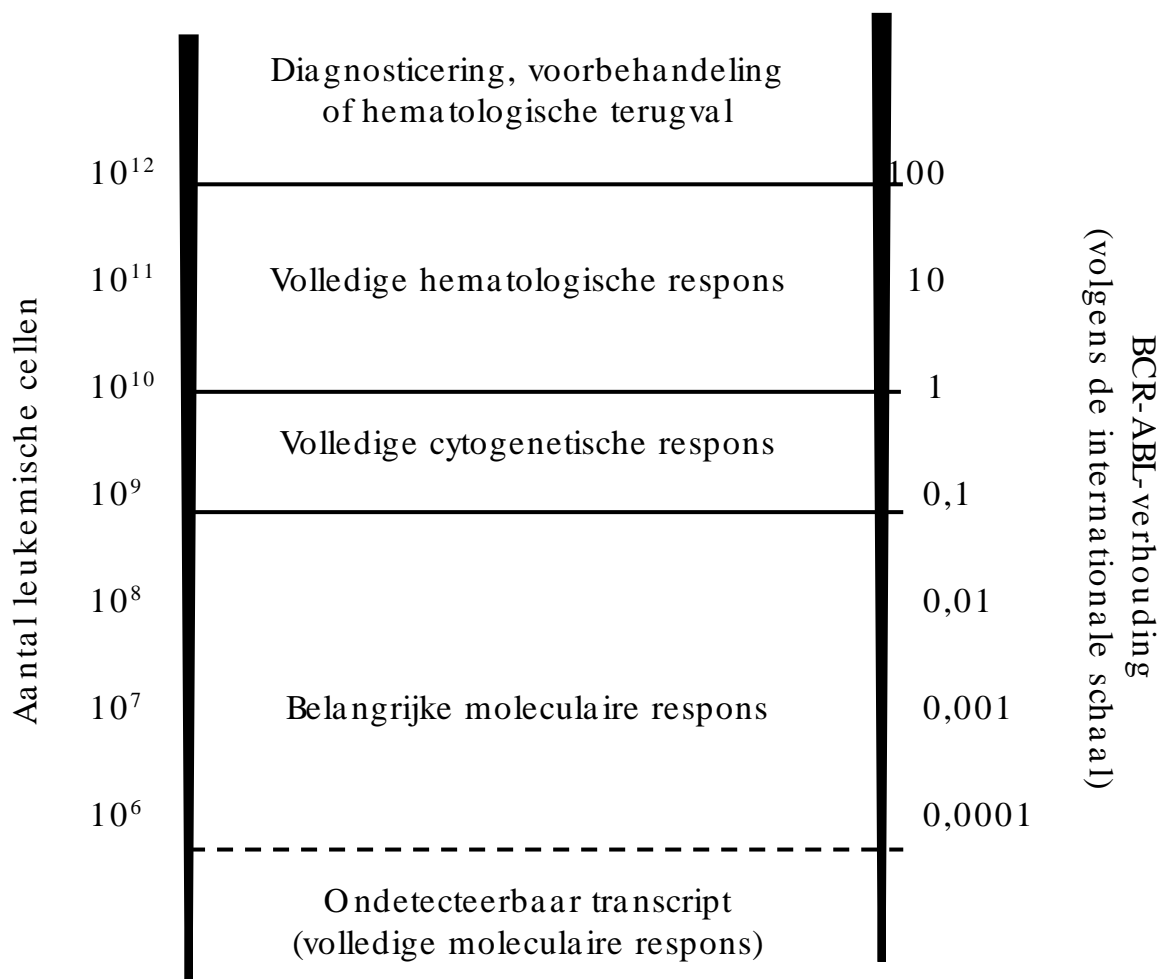
CML hoort bij de groep myeloproliferatieve neoplasma's en wordt in > 90% van de gevallen gekenmerkt door de aanwezigheid van het Philadelphia-chromosoom (Ph-chromosoom).

Dit chromosoom is het product van een reciproque translocatie tussen de lange armen van chromosoom 9 en 22, t(9;22), waarbij het BCR (breakpoint cluster region) zich op chromosoom 22 bevindt en het c-ABL-oncogen op chromosoom 9. Het overeenkomstige fusiegen, BCR-ABL, wordt in mRNA van 8,5 kb getranscribeerd met 2 plaatsvarianten: b2a2 (40% van alle gevallen) en b3a2 (55% van alle gevallen). Het fusiegen codeert voor een chimerisch eiwit, p210, met een verhoogde tyrosine kinaseactiviteit. De transcripten b2a3 en b3a3 komen in minder dan 5% van alle gevallen voor. Een Ph-chromosoom kan ook bij 35% van volwassen ALL-patiënten worden gedetecteerd.

De jaarlijkse incidentie van CML is circa 1-2 per 100.000 mensen. 20% van alle vormen van leukemie bij volwassenen is CML. CML wordt klinisch gekenmerkt door een teveel aan myeloïde cellen die zich differentiëren en die normaal functioneren. In 90-95% van alle gevallen worden CML-patiënten in de chronische of stabiele fase van de ziekte gediagnosticeerd. Vroeger ontwikkelde de ziekte zich in gemiddeld 4 tot 6 jaar tot een versnelde fase die tot blastencrisis en acute leukemie leidde, die altijd fataal is. Dankzij de ontwikkeling van imatinib en, meer recent, de tweede generatie tyrosine-kinaseremmers (tyrosine kinase inhibitors, TKI) is het natuurlijke verloop van de ziekte drastisch veranderd: de meeste patiënten blijven nu in remissie en hebben recht op langdurige follow-up en controle van de ziekte.

Controle van de ziekte

Het doel van CML-therapie is tot op heden het behalen van een overlevingskans van 100% en een Ph-chromosoom-negativiteit. De controle van de ziekte is daarom een essentieel hulpmiddel voor de beoordeling van de respons op de behandeling en de vroege detectie van een terugval voor elke afzonderlijke patiënt. Bij behandeling met TKR's is bij patiënten meestal eerst hematologische, daarna cytogenetische en daarna moleculaire remissie waarneembaar, in overeenstemming met de afname van het aantal leukemiecellen en BCR-ABL-transcripten, zoals weergegeven in afbeelding 1.



Afbeelding 1. Naar bewerking van referentie 1.

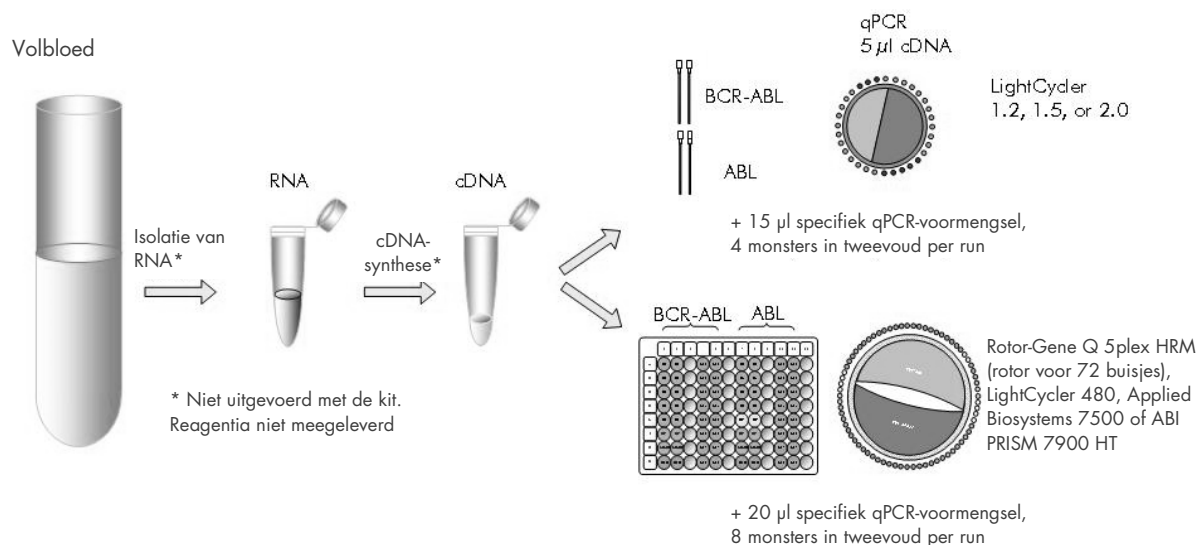
De standaardmethode om de tumorlast bij CML-patiënten in te schatten, is door middel van een conventionele cytogenetische analyse (G-banding) van metafasen in het beenmerg (bone marrow, BM). De cytogenetische respons wordt beoordeeld aan de hand van minstens 20 metafasen in merg. De mate van cytogenetische respons wordt geschat op basis van het percentage Ph-chromosoom-positieve metafasen (zie tabel 1, referentie 2). Deze beoordeling is echter afhankelijk van laboratoriumprestaties en heeft een lage gevoeligheid, namelijk 5%, wanneer er 20 metafasen worden geanalyseerd.

Realtime kwantitatieve polymerasekettingreactie (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) waarmee BCR-ABL Mbc r mRNA in monsters van perifeer bloed (PB) wordt gekwantificeerd, maakt nu deel uit van de technieken voor de controle van CML tijdens de behandeling. Deze techniek is minder invasief dan conventionele cytogenetica van metafasen in het beenmerg, en tevens gevoeliger.

De aanbevelingen voor de controle van CML zijn recentelijk bijgewerkt; hier zijn nieuw klinisch bewijs uit klinische onderzoeken evenals de doeleinden van en hulpmiddelen voor een betere controle van de ziekte in opgenomen. De meest recente aanbevelingen over de responsdefinities en de controle van patiënten die met imatinib worden behandeld, zijn afkomstig van de ELN-experts (2).

Vanuit technisch oogpunt hebben internationale experts inspanningen geleverd om tests met en rapporten over BCR-ABL Mbc r te harmoniseren (3-5). Tevens is er recentelijk een referentiepanel gevalideerd die onder toezicht staat van de WGO, zodat de BCR-ABL-kwantificering op eenvoudige wijze kan worden gestandaardiseerd (6).

Uitgangspunt van de procedure



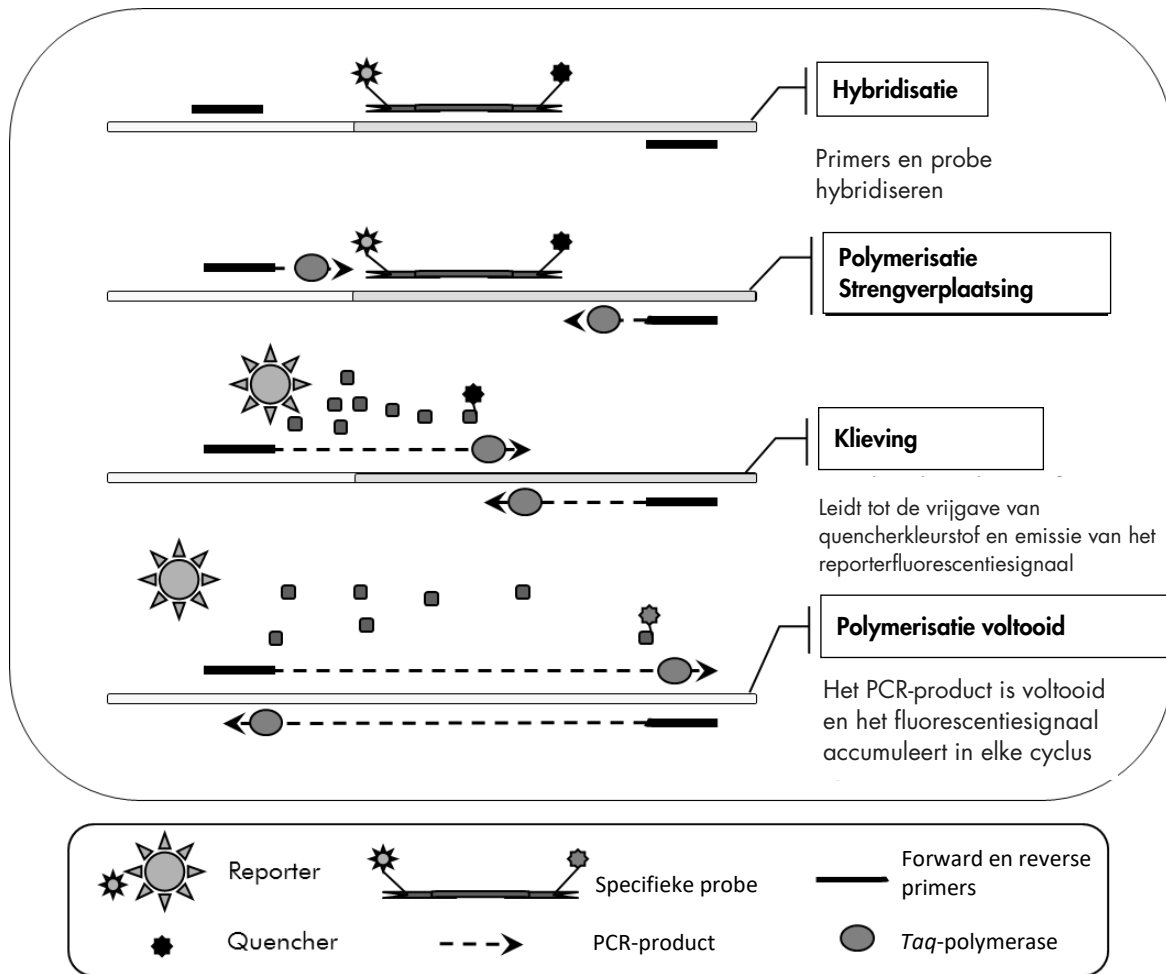
Afbeelding 2. RNA-isolatie, cDNA-synthese en qPCR.

Dankzij qPCR is een nauwkeurige kwantificering van PCR-producten tijdens de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces mogelijk. Er kunnen snel kwantitatieve qPCR-gegevens worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij realtime-detectie van fluorescente signalen tijdens en/of na de PCR-cyclus. Zo wordt het risico op contaminatie van het PCR-product drastisch verminderd. Er zijn momenteel 3 hoofdtypen qPCR-technieken beschikbaar: qPCR-analyse met SYBR® Green I-kleurstof, qPCR-analyse met hydrolyseprobes en qPCR-analyse met hybridisatieprobes.

Bij deze assay wordt het qPCR-principe van oligonucleotidehydrolyse met twee kleurstoffen benut. Gedurende de PCR worden forward en reverse primers gehybridiseerd volgens een specifieke sequentie. Hetzelfde mengsel bevat een oligonucleotide met twee kleurstoffen. Deze probe, die bestaat uit een oligonucleotide dat is gemerkt met een 5'-reporterkleurstof en een downstream 3'-quencher met kleurstof, hybridiseert tot een doelsequentie in het PCR-product. Bij de qPCR-analyse met hydrolyseprobes wordt gebruikgemaakt van de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase van *Thermus aquaticus* (*Taq*). Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterkleurstof ten opzichte van de quencherkleurstof in suppressie van de reporterfluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht.

Als het gewenste doel tijdens de PCR aanwezig is, hybridiseert de probe zich vooral tussen de forward en reverse primer. Door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase wordt de probe alleen tussen de reporter en quencher gespleten als de probe aan het doel hybridiseert. De probefragmenten worden vervolgens verplaatst van het doel en de polymerisatie van de streng gaat verder. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (afbeelding 3). Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet.

De toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is aan de probe en zodoende tijdens de PCR wordt geamplificeerd. Vanwege deze vereisten wordt niet-specifieke amplificatie niet gedetecteerd. De fluorescentietoename is daarom direct evenredig aan de doelamplificatie tijdens de PCR.



Afbeelding 3. Reactieprincipe. Totaal-RNA wordt omgekeerd getranscribeerd en het gegenereerde cDNA wordt met PCR geamplificeerd door middel van een stel specifieke primers en een specifieke interne probe met twee kleurstoffen (FAM™-TAMRA™). De probe bindt zich tijdens elke hybridisatiestap van de PCR aan het amplicon. Zodra de primer zich aan het amplicon heeft gehecht en *Taq* het DNA verlengt, wordt het 5'-uiteinde van de probe verplaatst, dat vervolgens door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de *Taq*-DNA-polymerase degradeert. De klieving gaat door totdat de resterende probe van het amplicon smelt. Bij dit proces worden het fluorofor en de quencher in een oplossing vrijgegeven en ruimtelijk van elkaar gescheiden, hetgeen leidt tot een toegenomen fluorescentie van de FAM-kleurstof en een afgenomen fluorescentie van de TAMRA-kleurstof.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit		(24)
Catalogusnr.		670723
Aantal reacties		24
High Positive RNA Control (Hoogpositieve RNA controle)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (IS-MMR-kalibrator)		3 x 10 µl
Mbcf and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standaardverduunning enkele Mbcf en ABL-plasmide) (10^1 kopieën/5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcf en ABL	35 µl
Mbcf and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standaardverduunning enkele Mbcf- en ABL-plasmide) (10^2 kopieën/5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcf en ABL	35 µl
Mbcf and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standaardverduunning enkele Mbcf- en ABL-plasmide) (10^3 kopieën/5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcf en ABL	70 µl
Mbcf and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standaardverduunning enkele Mbcf- en ABL-plasmide) (10^4 kopieën/5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcf en ABL	35 µl
Mbcf and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standaardverduunning enkele Mbcf- en ABL-plasmide) (10^5 kopieën/5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcf en ABL	70 µl
Mbcf and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standaardverduunning enkele Mbcf- en ABL-plasmide) (10^6 kopieën/5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcf en ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL (Primer-probemengsel ABL)*	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcf Fusion Gene (Primer-probemengsel BCR-ABL Mbcf fusiegen)†	PPF-Mbcf 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> BCRABL1 Mbcf ISMMR Kit Handbook (English) ((Handleiding <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit (Engelstalig))		1

* Mengsel van specifieke reverse en forward primers voor het ABL-controlelegen plus een specifieke FAM-TAMRA-probe.

† Mengsel van een bepaalde reverse en forward primer voor het BCR-ABL Mbcf-fusiegen plus een FAM-TAMRA-specifieke probe.

Opmerking : Meng de standaarden (SP1-SP6) ende primer-probemengsels voorzichtig en centrifugeer ze kortdurend voor gebruik.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (safety data sheets, SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Reagentia

- Reagentia voor RNA-zuivering: De gevalideerde reagentia zijn RNeasy® Midi Kit (Q IAGEN, cat.nr. 75144) of TRIzol®-reagens (Thermo Fisher Scientific Inc, cat.nr. 15596018 of 15596026)
- Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit
- Buffer en *Taq*DNA-polymerase: De gevalideerde reagentia zijn *Premix Ex Taq*™ DNA-polymerase (Perfect Real Time) (Ta Ka Ra, cat.nr. RR039A) en *Premix Ex Taq* DNA-polymerase (probe-qPCR) (Ta Ka Ra, cat.nr. RR390A). Beide bevatten 2x *Taq*-DNA-polymerasemastermengsel en RO X™ referentiekleurstoffen.
- Reagentia voor omgekeerde transcriptie: De gevalideerde reagentia zijn de *ipsogen* RT Kit, waaronder reverse transcriptase, 5x RT-buffer, 100 mM DTT, RNase-remmer, willekeurige primer en dNTP's (Q IAGEN, cat.nr. 679923); of SuperScript® III Reverse Transcriptase, waaronder reverse transcriptase, 5x buffer van eerste streng en 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., cat.nr. 18080044).
- Voor het gebruik van SuperScript III zijn de volgende extra reagentia vereist:
 - RNase-remmer: Het gevalideerde reagens is RNaseOUT™ recombinante ribonucleaseremmer (Thermo Fisher Scientific Inc., cat.nr. 10777019)
 - dNTP's, PCR-kwaliteit
 - Willekeurige nonameer

Verbruiksartikelen

- Nucleasevrije, aerosolbestendige, steriele PCR-pipettips met hydrofoob filter
- PCR-buisjes van 0,5 ml of 0,2 ml zonder RNase en DNase
- Ijs

Apparaat

- Microliterpipetten* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Tafelcentrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 0,2 ml/0,5 ml (die een snelheid van 10.000 tpm kan halen)
- Realtime PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM of ander Rotor-Gene-instrument; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 of 480; Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem; ABI PRISM 7900HT SDS; en de materialen die daarbij horen
- Thermocycler* of waterbad* (voor omgekeerde transcriptie)

* Zorg ervoor dat de instrumenten volgens de aanbevelingen van de fabrikant zijn gecontroleerd en gekalibreerd.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostiek

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen. Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

Gooi monster- en assayafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor de uitvoering van qPCRtesten zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die geschikt zijn voor moleculaire biologie en die voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn gevalideerd voor optimale prestaties. Een verdere verdunning van de reagentia of het hanteren van andere incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve of tegenstrijdige gegevens. PPF en PPF reagentia kunnen veranderen bij blootstelling aan licht. Alle reagentia zijn specifiek samengesteld voor gebruik met deze test. Voor de optimale werking van de test mogen er geen vervangende materialen worden gebruikt.

Voor de bepaling van het transcriptiegehalte met behulp van PCR is zowel de omgekeerde transcriptie van het mRNA als de amplificatie van het gegenereerde cDNA door middel van PCR nodig. Daarom mag tijdens de volledige assayprocedure niets in aanraking komen met RNase of DNase.

Wees zorgvuldig ter voorkoming van:

- RNase/DNase-contaminatie, aangezien een dergelijke contaminatie kan leiden tot degradatie van het template-mRNA en het gegenereerde cDNA
- contaminatie door achtergebleven mRNA- of PCR-materiaal, hetgeen resulteert in een foutpositief signaal

We raden u het volgende aan:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosol-resistente pipettips ter voorkoming van kruiscontaminatie van de monsters en reagentia.
- Bereid een mastermengsel vóór PCR met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips enz.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (cDNA, DNA, plasmiden) kunnen worden geïntroduceerd. Voeg de template toe in een afzonderlijke zone (bij voorkeur in een andere ruimte) met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).
- Verwerk de standaarden (SP1–SP6) in een aparte ruimte.

Opslag en verwerking van reagentia

De kits worden op droog ijs verzonden en moeten na ontvangst bij -30 °C tot -15 °C worden bewaard.

- Stel de primer-probemengsels (PPC- en PPF-buisjes) niet te veel bloot aan licht.
- Meng en centrifugeer de buisjes voorzichtig alvorens ze te openen.
- Bewaar alle kitcomponenten in de originele verpakking.

Deze opslagomstandigheden gelden voor zowel geopende als ongeopende componenten. Componenten die onder andere omstandigheden dan de op de etiketten vermelde omstandigheden worden bewaard, werken mogelijk niet naar behoren en kunnen de assayresultaten negatief beïnvloeden.

De vervaldatum van de verschillende reagentia staan op de etiketten van de afzonderlijke componenten vermeld. Onder goede opslagomstandigheden blijft het product goed presteren tot aan de vervaldatum die op het etiket staat.

Er zijn geen duidelijke tekenen die op instabiliteit van dit product wijzen. U zou echter positieve en negatieve controles met onbekende specimens gelijktijdig moeten uitvoeren.

Opslag en verwerking van monsters

Volbloedmonsters moeten worden ontdoed met kalium-EDTA en dienen gedurende maximaal 5 dagen voorafgaand aan RNA-extractie worden bewaard bij een temperatuur van 2 °C tot 8 °C.

Procedure

Bereiding monster -RNA

De bereiding van RNA uit een patiëntmonster (bloed of beenmerg) moet aan de hand van een gevalideerde procedure zijn uitgevoerd. De kwaliteit van de assay hangt voor een groot deel af van de kwaliteit van het gebruikte RNA. We adviseren daarom het gezuiverde RNA voorafgaand aan de analyse te kwalificeren door middel van agarosegelelektroforese met behulp van een Agilent® Bioanalyzer® of spectrofotometrie.†

Protocol: Omgekeerde transcriptie met behulp van SuperScript III Reverse Transcriptase

Dit protocol is voor omgekeerde transcriptie met behulp van SuperScript III Reverse Transcriptase. Volg het protocol in de bijbehorende handleiding wanneer u de *ipsogen RT Kit* gebruikt.

Wat u moet doen voor u begint

- dNTP's voorbereiden, 10 mM per stuk. In gelijke delen bewaren bij -20 °C.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Meng de inhoud grondig en centrifugeer kortdurend (circa 10 sec. met 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt). Laat het buisje op ijs liggen.
3. Verdun de RNA-monsters tot 0,1 µg/µl. Breng 10 µl (1 µg) van ieder RNA-monster met een pipet over naar afzonderlijke buisjes met een etiket. Breng 10 µl hoog-positieve RNA-controle, 10 µl IS-MMR-kalibrator en 10 µl nucleasevrij water (als een RT-negatieve controle) met een pipet over naar afzonderlijke buisjes met een etiket en verwerk ze gelijktijdig met de RNA-monsters, zoals hieronder beschreven.
4. Incubeer alle monsters, controles en kalibrators (10 µl per stuk) gedurende 5 minuten bij 65 °C en koel ze daarna onmiddellijk 5 minuten op ijs.

*Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril.

† Optische dichtheid, gemeten bij 260 en 280 nm: Een OD-waarde van 1,0 bij 260 nm is gelijkwaardig aan ongeveer 40 µg/ml enkelstrengs DNA. Een A_{260}/A_{280} -verhouding tussen 1,8 en 2,1 is kenmerkend voor RNA met een hoge zuiverheid.

5. Centrifugeer het buisje kort (circa 10 sec., 10.000 tpm), zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt. Laat het buisje op ijs liggen.
6. Bereid het volgende RT-mengsel op basis van het aantal monsters, controles en kalibrators dat u wilt verwerken (tabel 1).

Tabel 1. Bereiding van het RT-mengsel

Component	Volume per monster (μl)	Uiteindelijke concentratie
Buffer van eerste streng, 5x (wordt meegeleverd met SuperScript III Reverse Transcriptase)	5,0	1x
dNTP's (10 mM per stuk, dient eerder te worden bereid en in gelijke delen bij -20 °C te worden bewaard)	2,0	0,8 mM
Willekeurige nonameer (100 μM)	5,25	21 μM
RNaseOUT (40 U/ μl)	0,5	0,8 U/ μl
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	1,0	8 U/ μl
DTT (wordt meegeleverd met SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Verwarmd(e) RNA-monster, controle of IS-MMR-kalibrator (toe te voegen bij stap 7)	10,0	40 ng/ μl
Uiteindelijk volume	25,0	–

7. Pipetteer 15 μl van het RT-mengsel in elk PCR-buisje. Voeg vervolgens 10 μl (1 μg) monster-RNA, controle of kalibrator toe (uit stap 4).
8. Meng de inhoud voorzichtig (niet schudden) en centrifugeer kortdurend (circa 10 sec. met 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
9. Stel de thermocycler in op het programma voor omgekeerde transcriptie, zoals aangegeven in tabel 2.

Tabel 2. Temperatuurprofiel

Reverse transcription 1 (Omgekeerde transcriptie 1)	Temperatuur: 25°C Tijd: 10 min
Reverse transcription 2 (Omgekeerde transcriptie 2)	Temperatuur: 50°C Tijd: 60 min
Inactivation (Inactivering)	Temperatuur: 85°C Tijd: 5 min
Cooling (Koeling)	Temperatuur: 4°C Tijd: 5 min

10. Plaats de buisjes in de thermocycler en start het thermocyclerprogramma, zoals aangegeven in tabel 2.
11. Wacht tot het programma is afgelopen en centrifugeer de buisjes kort (circa 10 sec. met 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onderin het buisje bevindt). Bewaar de buisjes op ijs of bij -20 °C totdat de qPCR is uitgevoerd in overeenstemming met de hieronder beschreven protocollen die geschikt zijn voor uw qPCR -instrument.
Opmerking : Voor LightCycler 1.2-, 1.5-, en 2.0-instrumenten geldt dat elke RTbereiding voldoende cDNA voor twee qCPRruns oplevert.

Protocol: qPCR in RotorGene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

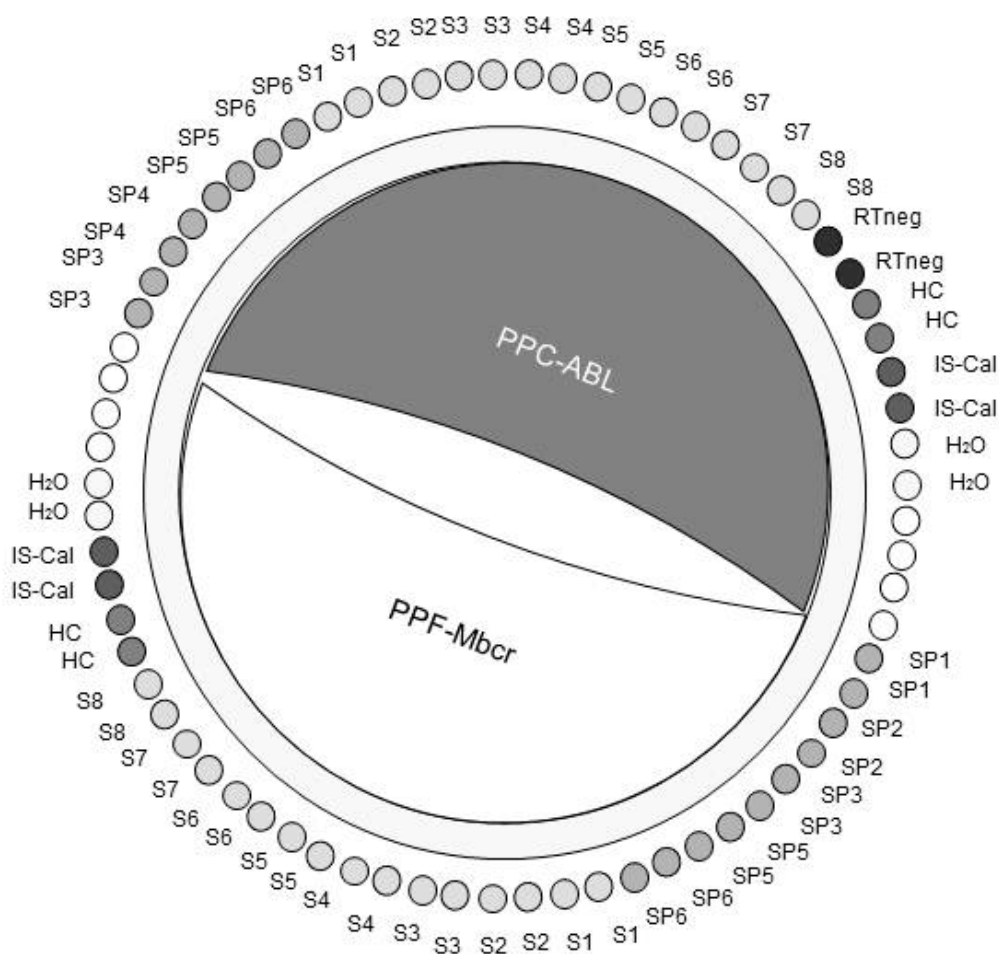
Wanneer u dit instrument gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 3. Met deze kit kunt u acht verschillende cDNA-monsters drie keer in hetzelfde experiment testen.

Tabel 3. Aantal reacties in een Rotor-Gene Q-instrument met rotor voor 72 buisjes

Monsters	Reacties
Met het ABL-primer-probemengsel (PPC-ABL) (32 reacties)	
8 cDNA-monsters	8 x 2 reacties
1 hoog-postitieve cDNA-controle	2 reacties
1 cDNA IS-MMR-ka liberator	2 reacties
Standaarden voor enkele plasmiden	2 x 4 reacties (SP3, SP4, SP5, en SP6, elk tweemaal getest)
Negatieve controle RT	2 reacties
Watercontrole	2 reacties
Met het BCR-ABL Mbcr-primer-probemengsel (PPF-Mbcr) (32 reacties)	
8 cDNA-monsters	8 x 2 reacties
1 hoog-postitieve cDNA-controle	2 reacties
1 cDNA IS-MMR-ka liberator	2 reacties
Standaarden voor enkele plasmiden	2 x 5 reacties (SP1, SP2, SP3, SP5, en SP6, elk tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties

Monsterverwerking in Rotor-Gene Q-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

We raden u aan om ten minste 8 cDNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren. In afbeelding 4 ziet u het rotorschema voor een dergelijk experiment.



Afbeelding 4. Aanbevolen rotorinstelling voor ieder experiment met de *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit. SP1–SP6 BCR-ABL Mbcf en ABL-standaarden; HC: Hoog-positieve cDNA-controle; IS-Cal: IS-MMR-kalibrator; RTneg: RT-negatieve controle; S: cDNA-monster; H₂O: watercontrole.

Opmerking: Let erop dat u altijd een te testen monster in buispositie 1 van de rotor plaatst. Als u dit niet doet, wordt er tijdens de kalibratiestap geen kalibratie uitgevoerd en worden er onjuiste fluorescentiegegevens verkregen.

Plaats lege buisjes in alle andere posities.

qPCR in Rotor-Gene Q-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

Opmerking: Voer alle stappen op ijs uit.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Vortex de standaarden, PPF-Mbcf- en PPC-ABL-buisjes en centrifugeer ze kortdurend (circa 10 sec. met 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).

- Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 4 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPC-ABL of PPF-Mbcr). Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

Tabel 4. Bereiding van het qPCR-mengsel

Component	1 reactie (µl)	ABL: 32 reacties + 1 extra (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32 reacties + 1 extra (µl)	Uiteindelijke concentratie
Voormengsel Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1×
Primer- probemengsel, 25x	1	33	33	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	6,5	214,5	214,5	–
Monster (toe te voegen in stap 5)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	–

- Schenk in elk buisje 20 µl van het qPCR-voormengsel.
- Voeg in een ander gedeelte van het laboratorium en met speciale apparatuur 5 µl van het RT-product (cDNA, vergelijkbaar met 200 ng RNA) dat bij de omgekeerde transcriptie is verkregen (zie 'Protocol: Omgekeerde transcriptie met behulp van SuperScript III Reverse Transcriptase' op pagina 15) aan het betreffende buisje toe (het totale volume is 25 µl).
- Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren.
- Sluit alle buisjes en plaats ze in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

8. Stel het Rotor -Gene Q -instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 5.

Tabel 5. Temperatuurprofiel

Analysemodus	Kwantificatie
Hold 1 (Constant 1)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 s
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 5 sec. 62 °C gedurende 30 sec. met acquisitie van FAM- fluorescentie in kanaal Groen: enkel
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 36 °C Tijd: 1 min

9. Klik in het dialoogvenster 'New Run Wizard' (Nieuwe run instellen) op 'Gain Optimisation' (Optimalisatie versterking) om het dialoogvenster 'Auto -Gain Optimisation Setup' (Instelling optimalisatie automatische versterking) te openen. Stel het bereik voor kanaal Green (groen) in op '5 FI' voor 'Min Reading (Minimumwaarde) en '10 FI' voor 'Max Reading' (Maximum waarde) en stel het toegestane bereik voor Gain (Versterking) in op -10 tot 10.
10. Vink het selectievakje 'Perform Optimisation Before 1st Acquisition' (Optimalisatie uitvoeren voor 1e acquisitie) aan en sluit het dialoogvenster 'Auto -Gain Optimisation Setup' (Instelling optimalisatie automatische versterking).
11. Start het thermocyclerprogramma.
12. Selecteer 'Slope Correct' (Hellingcorrectie) voor de analyse. We raden u aan de drempelwaarde in te stellen op 0,03.

Protocol: qPCR met het Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem en de ABI PRISM 7900HT SDS- en LightCycler 480-instrumenten

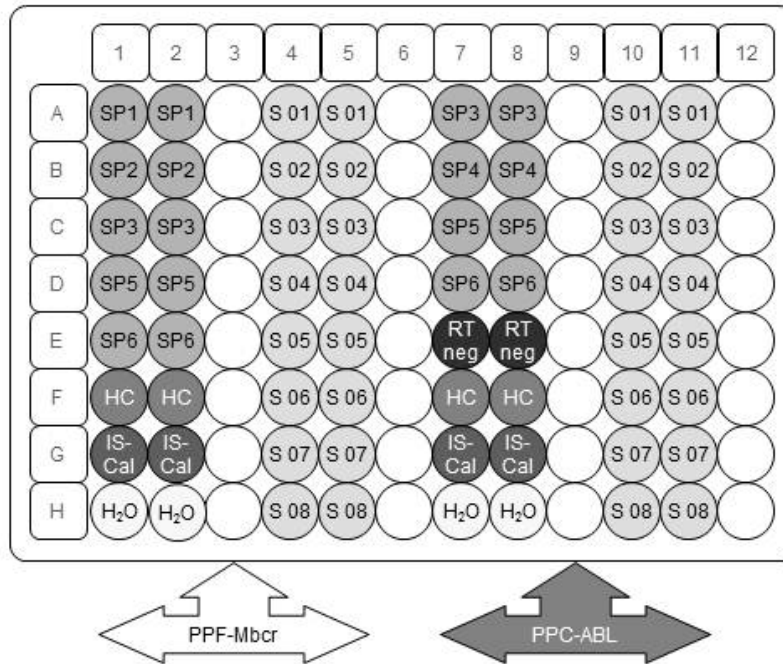
Wanneer u een qPCR-instrument met een plaat voor 96 wells gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 6. Met deze kit kunt u acht verschillende cDNA-monsters drie keer in hetzelfde experiment testen.

Tabel 6. Aantal reacties met qPCR-instrument met plaat voor 96 wells

Monsters	Reacties
Met het ABL-primer-probemengsel (PPC-ABL) (32 reacties)	
8 cDNA-monsters	8 x 2 reacties
1 hoog-postitieve cDNA-controle	2 reacties
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reacties
Standaarden voor enkele plasmiden	2 x 4 reacties (SP3, SP4, SP5, en SP6, elk tweemaal getest)
Negatieve controle RT	2 reacties
Watercontrole	2 reacties
Met het BCR-ABL Mbcr-primer-probemengsel (PPF-Mbcr) (32 reacties)	
8 cDNA-monsters	8 x 2 reacties
1 hoog-postitieve cDNA-controle	2 reacties
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reacties
Standaarden voor enkele plasmiden	2 x 5 reacties (SP1, SP2, SP3, SP5, en SP6, elk tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties

Monsterverwerking met Applied Biosystems-, ABI PRISM- en LightCycler 480-instrumenten

We raden u aan om ten minste 8 cDNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren. In afbeelding 5 ziet u het plaatschema voor een dergelijke proef.



Afbeelding 5. Aanbevolen plaatinstelling voor één experiment met de *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit. SP1–SP6 BCR-ABL Mbcf en ABL-standaarden; HC: Hoog-positieve cDNA-controle; IS-Cal: IS-MMR-kalibrator; RTneg: RT-negatieve controle; S: cDNA-monster; H₂O: watercontrole.

qPCR met Applied Biosystems-, ABI PRISM- of LightCycler 480-instrumenten

Opmerking: Voer alle stappen op ijs uit.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Vortex de standaarden, ROX-, PPF-Mbcr- en PPC-ABL-buisjes en centrifugeer ze kortdurend (circa 10 sec. met 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
3. Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken. Wanneer u een qPCR-instrument met een plaat voor 96 wells gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren. Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 7 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel voor Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. In tabel 8 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel voor het LightCycler 480-instrument, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPC-ABL of PPF-Mbcr). Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

Tabel 7. Bereiding van qPCR-mengsel voor Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten

Bestanddeel	1 reactie (µl)	ABL: 32 reacties + 1 extra (µl)	BCR-ABL Mbc: 32 reacties + 1 extra (µl)	Uiteindelijke concentratie
Voormengsel Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1×
Primer- probemengsel, 25x	1	33	33	1×
RO XI-kleurstof, 50x (ABI PRISM 7900HT) of RO XII- kleurstof, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	6	198	198	–
Monster (toe te voegen in stap 5)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	–

Tabel 8. Bereiden van qPCR -mengsel voor LightCycler 480

Bestanddeel	1 reactie (µl)	ABL: 32 reacties +1 extra (µl)	BCR-ABL Mbc: 32 reacties +1 extra (µl)	Uiteindelijke concentratie
Voormengsel Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- probemengsel, 25x	1	33	33	1x
Nucleasevrij water van PCRkwaliteit	6,5	214,5	214,5	–
Monster (toe te voegen in stap 5)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	–

4. Schenk in elke well 20 µl van het qPCR -voormengsel.
5. Voeg in een ander gedeelte van het laboratorium en met speciale apparatuur 5 µl van het RT -product (cDNA, vergelijkbaar met 200 ng RNA) dat bij de omgekeerde transcriptie is verkregen (zie ' Protocol: Omgekeerde transcriptie met behulp van SuperScript III Reverse Transcriptase ' op pagina 15) aan de betreffende well toe (het totale volume is 25 µl).
6. Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren.
7. Sluit de plaat en centrifugeer kortdurend (300 x g, ongeveer 10 sec.).
8. Plaats de plaat in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Stel de thermocycler in op het thermocyclerprogramma. Zie tabel 9 voor Applied Biosystems - en ABI PRISM-instrumenten of tabel 10 voor het LightCycler 480 -instrument.

Tabel 9. Temperatuurprofiel voor Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten

Analysemodus	Standaardcurve - absolute kwantificering
Hold 1 (Constant 1)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 s
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 5 sec. 60 °C gedurende 30 sec. met acquisitie van FAM-fluorescentie: enkelkanaals; quencher: TAMRA
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 36°C Tijd: 1 min

Tabel 10. Temperatuurprofiel van het LightCycler 480-instrument

Analysemodus	Absolute kwantificering ("Abs Quant")
Detectievormen	Selecteer "Simple Probe" (Enkele probe) in het venster "Detection formats" (Detectievormen)
Hold 1 (Constant 1)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 s
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 5 sec. 60 °C gedurende 30 sec. met acquisitie van FAM-fluorescentie overeenkomend met (483–533 nm) voor LC versie 01 en (465–510 nm) voor LC versie 02
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 36°C Tijd: 1 min

9. Volg stap 9a voor de Applied Biosystems 7500 en ABI PRISM 7900HT SDS Volg stap 9b voor het LightCycler 480 -instrument.
- 9a. Applied Biosystems en ABI PRISM: We raden u aan de drempelwaarde in te stellen op 0,1 in de analysestap op het instrument. Start het in tabel 9 aangegeven cyclusprogramma.
- 9b. LightCycler 480 -instrument: we raden een analysemodus met passende meetpunten aan met een achtergrond op 2,0 en een drempel op 2,0. Start het in tabel 10 aangegeven thermocyclerprogramma.

Protocol: qPCR met LightCycler 1.2-, 1.5- of 2.0-instrumenten

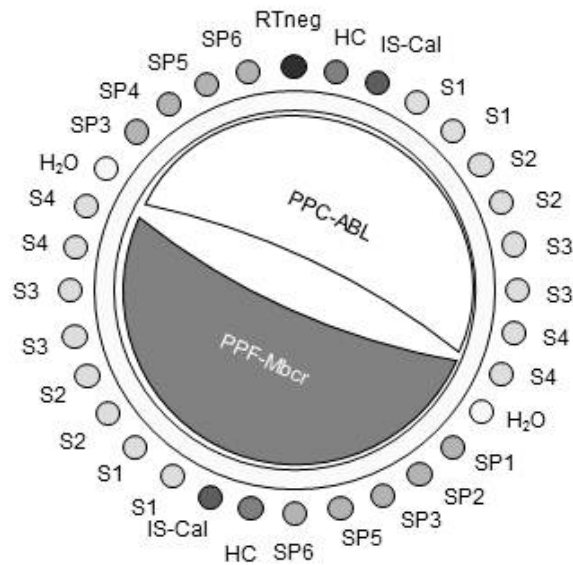
Wanneer u een instrument met capillaire buisjes gebruikt, raden we u aan de monsters tweemaal en de controles eenmaal te meten, zoals vermeld in tabel 11. Met deze kit kunt u vier verschillende cDNA-monsters zes keer in hetzelfde experiment testen.

Tabel 11. Aantal reacties voor LightCycler 1.2-, 1.5- en 2.0-instrumenten

Monsters	Reacties
Met het ABL-primer-probemengsel (PPC-ABL) (16 reacties)	
4 cDNA-monsters	4 x 2 reacties
1 hoog-positieve cDNA-controle	1 reactie
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	1 reactie
Standaarden voor enkele plasmiden	1 x 4 reacties (SP3, SP4, SP5, en SP6)
Negatieve controle RT	1 reactie
Watercontrole	1 reactie
Met het BCR-ABL Mbcr-primer-probemengsel (PPF-Mbcr) (16 reacties)	
4 cDNA-monsters	4 x 2 reacties
1 hoog-positieve cDNA-controle	1 reactie
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	1 reactie
Standaarden voor enkele plasmiden	1 x 5 reacties (SP1, SP2, SP3, SP5, en SP6)
Watercontrole	1 reactie

Monsterverwerking met LightCycler 1.2-, 1.5- en 2.0-instrumenten

We raden u aan om ten minste 4 cDNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren. In afbeelding 6 ziet u het schema van capillaire buisjes voor een dergelijke proef.



Afbeelding 6. Aanbevolen rotorinstelling voor ieder experiment met de *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6 BCR-ABL Mbcr en ABL-standaarden; HC: Hoog-positieve cDNA-controle; IS-Cal: IS-MMR-kalibrator; RTneg: RT-negatieve controle; S: cDNA-monster; H₂O: watercontrole.

qPCR met LightCycler 1.2-, 1.5- en 2.0-instrumenten

Opmerking: Voer alle stappen op ijs uit.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Vortex de standaarden, PPF-Mbcr- en PPC-ABL-buisjes en centrifugeer ze kortdurend (circa 10 sec. met 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
3. Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 12 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 20 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPC-ABL of PPF-Mbcr). Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

Tabel 12. Bereiden van qPCR-mengsel voor LightCycler 1.2-, 1.5- en 2.0-instrumenten

Bestanddeel	1 reactie (µl)	ABL: 16 reacties + 1 extra (µl)	BCR-ABL Mbc: 16 reacties + 1 extra (µl)	Uiteindelijke concentratie
Voormengsel Ex Taq, 2x	10	170	170	1×
Primer- probemengsel, 25x	0,8	13,6	13,6	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	4,2	71,4	71,4	–
Monster (toe te voegen in stap 5)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	20	20 elk	20 elk	–

4. Schenk in elk capillair buisje 15 µl van het qPCR-voormengsel.
5. Voeg in een ander gedeelte van het laboratorium en met speciale apparatuur 5 µl van het RT-product (cDNA, vergelijkbaar met 200 ng RNA) dat bij de omgekeerde transcriptie is verkregen (zie 'Protocol: Omgekeerde transcriptie met behulp van SuperScript III Reverse Transcriptase' op pagina 15) aan de betreffende capillair toe (het totale volume is 20 µl).
6. Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren.
7. Plaats de capillaire buisjes in de adapter die met het instrument is meegeleverd en centrifugeer kort (circa 10 sec. bij 700 x *g*).
8. Plaats de capillaire buisjes in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
9. Stel het LightCycler 1.2 -, 1.5 of 2.0 -instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 13.

Tabel 13. Temperatuurprofiel

Analysemodus	Kwantificering
Hold 1 (Constant 1)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 s Helling: 20
Cycling (Cyclus)	50 keer 95°C gedurende 5 sec; helling: 20 60 °C gedurende 30 sec; helling: 20; met acquisitie van FAMfluorescentie: enkelkanaals
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 36°C Tijd: 1 min Helling: 20

10. Volg stap 10a voor het LightCycler 1.2 en 1.5 -instrument. Volg stap 10b voor het LightCycler 2.0 -instrument.

10a. LightCycler 1.2 en 1.5: u wordt aangeraden de modus F1/F2 en "2nd derivative analysis" (2e afgeleide analyse) te gebruiken. Start het in tabel 13 aangegeven thermocyclerprogramma.

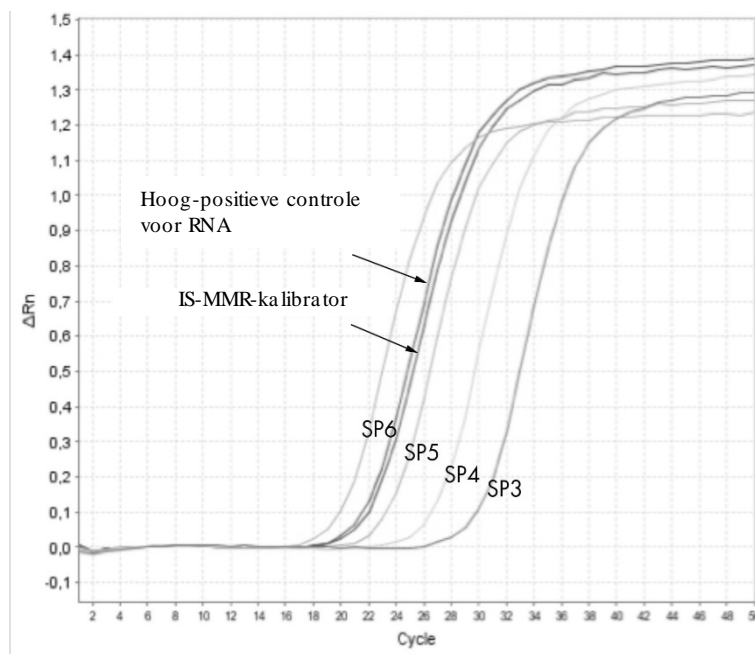
10b. LightCycler 2,0: u wordt aangeraden een automatische analyse (F"max) uit te voeren met LightCycler 2.0-softwareversie 4.0 om reproduceerbare resultaten te verkrijgen. Start het in tabel 13 aangegeven thermocyclerprogramma.

Interpretatie van de resultaten

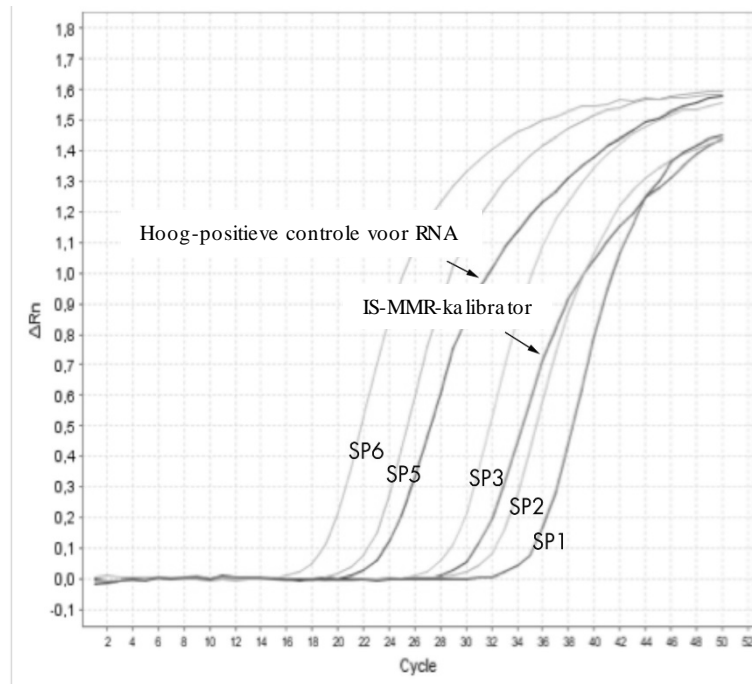
Principe van de gegevensanalyse

Bij de TaqMan[®]-technologie wordt het aantal PCR-cycli dat nodig is om een signaal boven de drempelwaarde te detecteren een drempelcyclus (C_T) genoemd. Dit aantal is direct evenredig aan de doelhoeveelheid die aan het begin van de reactie aanwezig is.

Door een standaard met een bekend aantal moleculen te gebruiken, kan er een standaardcurve worden opgesteld en kan de precieze doelhoeveelheid die in het testmonster aanwezig is, worden bepaald. De *ipsogen*-standaardcurven zijn op basis van plasmiden. We gebruiken vier standaardverduunningen voor ABL en vijf standaardverduunningen voor MbcR om nauwkeurige standaardcurven te verkrijgen. De kit bevat ook een IS-MMR-kalibrator waarmee resultaten kunnen worden geconverteerd naar de internationale schaal. In afbeelding 7 en 8 wordt een voorbeeld weergegeven van TaqMan-amplificatiecurven die zijn verkregen voor standaarden, de IS-MMR-kalibrator en de hoog-positieve RNA-controle met behulp van de *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit.



Afbeelding 7. Detectie van ABL met de standaarden SP3, SP4, SP5 en SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 en 10^6 kopieën/5 μ l.



Afbeelding 8. Detectie van BCR -ABL MbcR met de standaarden SP1, SP2, SP3, SP5 en SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 en 10^6 kopieën/5 μ l.

Standaardcurven en kwaliteitscriteria van toepassing op onbewerkte gegevens

Reproduceerbaarheid tussen replica's

De variatie in de C_T -waarden tussen replica's zou < 2 moeten zijn, wat overeenkomt met een viervoudige verandering in het aantal kopienummers.

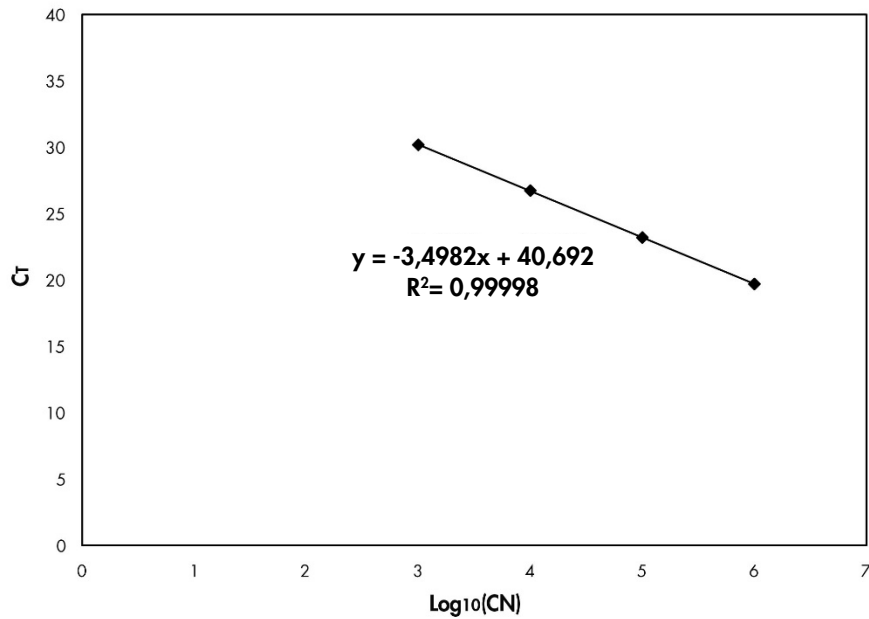
De variatie in de C_T -waarden tussen replica's is meestal $< 1,5$ als de gemiddelde C_T -waarde van de replica's < 36 is (7).

Opmerking: Iedere gebruiker dient de reproduceerbaarheid zelf in zijn eigen laboratorium te meten.

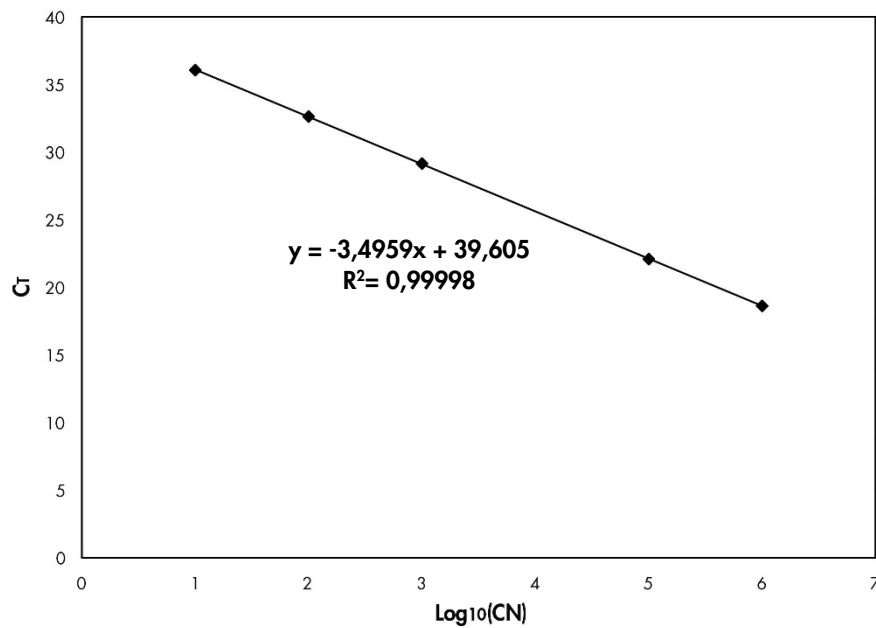
Standaardcurven

Onbewerkte gegevens kunnen voor analyse in een Excel®-bestand worden geplakt.

De onbewerkte C_T -waarden van elk gen (ABL en BCR-ABL) die op basis van standaard plasmideverduningen zijn verkregen, worden overeenkomstig hun logkopienummer in kaart gebracht (3, 4, 5 en 6 voor SP3, SP4, SP5 en SP6; 1, 2, 3, 5 en 6 voor SP1, SP2, SP3, SP5 en SP6). In afbeelding 9 is een voorbeeld van een theoretische ABL-standaardcurve weergegeven die op basis van vier standaardverduningen is berekend. In afbeelding 10 is een voorbeeld van een theoretische BCR-ABL-standaardcurve weergegeven die op basis van vijf standaardverduningen is berekend.



Afbeelding 9. Theoretische standaardcurve voor ABL die op basis van 4 standaardverdunningen is berekend. Er wordt een lineaire-regressiecurve ($y = ax + b$) berekend, waarbij a de helling van de lijn is en b de y-asafsnode, het y-coördinaat van het punt waarop de lijn de y-as kruist. De vergelijking en determinatiecoëfficiënt (R^2) van de curve worden op de grafiek weergegeven.



Afbeelding 10. Theoretische standaardcurve voor BCR-ABL die op basis van 5 standaardverdunningen is berekend. Er wordt een lineaire-regressiecurve ($y = ax + b$) berekend, waarbij a de helling van de lijn is en b de y-asafsnode, het y-coördinaat van het punt waarop de lijn de y-as kruist. De vergelijking en determinatiecoëfficiënt (R^2) van de curve worden op de grafiek weergegeven.

Aangezien de standaarden tienvoudige verdunningen zijn, is de theoretische helling van de curve -3,3. Een helling tussen de -3,0 en -3,9 is aanvaardbaar, zolang $R^2 > 0,95$ is (7). Een waarde van $R^2 > 0,98$ is wenselijk voor nauwkeurige resultaten (3).

Opmerking : De SP1-standaardverdunning (BCRABL-plasmide, 10 kopieën) moet worden gedetecteerd en opgenomen in de BCRABL-standaardcurve.

Kwaliteitscontrole van alle ABL -waarden

RNA van slechte kwaliteit of problemen tijdens de qPCR-stappen resulteert in een laag aantal ABL-kopieënnummers (ABL_{CN}). Een optimale gevoeligheid wordt bereikt met monsters die $ABL_{CN} \geq 10.000$ kopieën afgeven. Dit criterium voor ABL_{CN} geldt ook voor de hoog-positieve RNA-controle en IS-MMR-kalibrator.

RT-negatieve en watercontroles

Controle zonder template (no template control, NTC) voor de PCR-stap (watercontrole) en de omgekeerde-transcriptiestap zouden nul CN moeten opleveren voor zowel ABL als BCR-ABL M_{bcr}. Een positief resultaat voor deze NTC's duidt op kruisbesmetting tijdens omgekeerde transcriptie en/of qPCR.

Genormaliseerd aantal kopieënnummers (normalized copy number, NCN)

Gebruik de vergelijking van de ABL-standaardcurve om onbewerkte C_T -waarden (verkregen met PPC-ABL) van de onbekende monsters naar het aantal ABL-kopieënnummers om te zetten (ABL_{CN}).

Gebruik de vergelijking van de BCR-ABL-standaardcurve om onbewerkte C_T -waarden (verkregen met PPF-M_{bcr}) van de onbekende monsters naar het aantal BCR-ABL-kopieënnummers om te zetten ($BCR-ABL_{M_{bcr}CN}$).

De verhouding tussen deze CN-waarden levert het genormaliseerde aantal kopieënnummers (NCN) op:

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

Bereken het NCN-resultaat voor de hoog-positieve RNA-controle (NCN_{HC}), de IS-MMR-kalibrator (NCN_{kal}) en elk monster ($NCN_{monster}$).

Hoog-positieve RNA-controle en IS-MMR-kalibrator

Met deze controles kunt u omgekeerde transcriptie en de amplificatie van ABL en BCR-ABL M_{bcr} controleren tijdens kwantificering van transcript.

Kwaliteitscontrole van het resultaat van NCN_{kal}

Opmerking: De NCN-resultaten die zijn verkregen voor de IS-MMR-kalibrator, getest met de *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit in combinatie met gevalideerde reagentia en instrumenten (zie 'Meegeleverde materialen' op pagina 10, en 'Benodigde maar niet meegeleverde materialen' op pagina 11), moeten binnen het interval 0,05–0,3 vallen. Anders kunnen de NCN-waarden niet worden geconverteerd naar de internationale schaal. Verder moet het gehele experiment worden afgekeurd als de hoog-positieve RNA-controle niet wordt gedetecteerd.

IS-conversie en MMR-rapportage

Opmerking: Zoek voorafgaand aan interpretatie de waarde op die staat vermeld op het etiket van het IS-MMR-kalibratorbuisje of op het analysecertificaat dat bij de kit wordt geleverd.

Gebruik het experimentele NCN-resultaat van de IS-MMR-kalibrator (NCN_{kal}) en de daaraan toegekende waarde (IS-Kal-waarde) die op het analysecertificaat staat vermeld om het genormaliseerde aantal kopieën op de internationale schaal te berekenen (IS- $NCN_{monster}$).

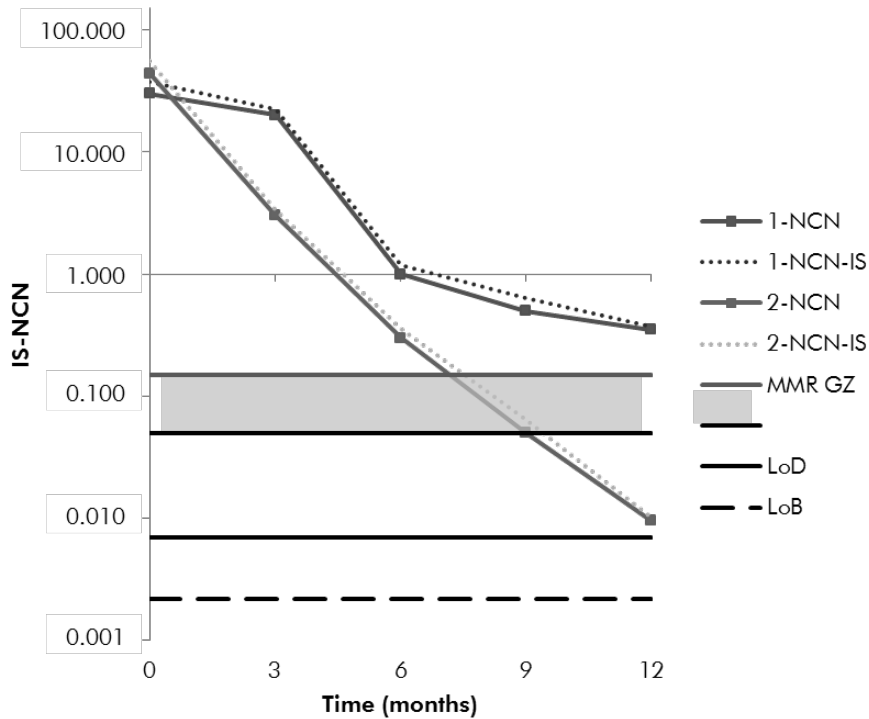
$$IS-NCN_{monster} = \frac{NCN_{monster} \times IS-Kal-waarde}{NCN_{kal}}$$

Bepaal de MMR-status van elk monster volgens de volgende criteria.

- $IS-NCN_{monster} \leq 0,05$: Belangrijke moleculaire respons
- $0,05 < IS-NCN_{monster} < 0,15$: Grijs zone rond de MMR-grenswaarde, onduidelijk resultaat
- $IS-NCN_{monster} \geq 0,15$: Geen belangrijke moleculaire respons

Het IS- NCN_{HC} -resultaat (NCN op de internationale schaal voor de hoog-positieve RNA-controle) zou geen belangrijke moleculaire respons moeten bevatten.

In afbeelding 11 ziet u een voorbeeld van patiëntcontrole met behulp van NCN- en IS-NCN-resultaten.



Afbeelding 11. Curven voor controle van de MMR -status van de patiënt met de *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. NCN : genormaliseerd aantal kopieën; NCN -IS: genormaliseerd aantal kopieën, internationale schaal; MMR GZ: Onduidelijk resultaat grijze MMR-zone (GZ); LoD: detectielimiet; LoB: achtergrondniveau.

Overzicht van kwaliteitscriteria

In tabel 14 ziet u een overzicht van de verschillende kwaliteitscriteria en de bijbehorende waarden of resultaten.

Tabel 14. Overzicht kwaliteitscriteria

Criteria	Acceptabele waarden/resultaten
Variaties in C _T -waarden tussen replica's	≤ 2 C _T als de gemiddelde C _T -waarde > 36 is $\leq 1,5$ C _T als de gemiddelde C _T -waarde ≤ 36 is
Helling voor standaardcurven	Tussen -3,0 en -3,9
R ² voor standaardcurven	Ten minste > 0,95, beter is > 0,98
SP1-standaardverduunning (BCR-ABL-plasmide, 10 kopieën)	Moet worden gedetecteerd en opgenomen in de standaardcurve
Kwaliteitscontrole van de ABL _{CN} -waarde voor patiëntmonsters, hoog-positieve RNA-controle en IS-MMR-kalibrator	ABL _{CN} > 10.000 kopieën van ABL om de optimale gevoeligheid te behalen
Controles voor PCR (water) en omgekeerde transcriptie (RT-negatief)	Voor iedere controle geldt dat ABL _{CN} = 0 en Mbcr _{CN} = 0
NCN verkregen voor IS-MMR-kalibrator (NCN _{kal})	Moet binnen het interval 0,05–0,3 vallen
Hoog-positieve RNA-controle	Moet worden gedetecteerd
NCN dat is verkregen voor de hoog-positieve RNA-controle en is geconverteerd naar de internationale schaal (IS-NCN _{HC})	Status: Geen belangrijke moleculaire respons

Problemen oplossen

Raadpleeg de pagina met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers van de afdeling Technische services van QIAGEN geven graag antwoord op uw vragen over de informatie of protocollen in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (zie 'Contactgegevens' op pagina 45 voor contactgegevens).

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISOgecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij *ipsogen*BCRABL1 MbcrlS-MMR Kits getest aan de hand van vooraf vastgestelde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen. Analysecertificaten zijn op aanvraag verkrijgbaar via www.qiagen.com/support.

Beperkingen

Voordat ze dit apparaat gaan gebruiken, moeten gebruikers worden getraind en vertrouwd raken met deze technologie.

Gegenereerde diagnostische resultaten moeten in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen worden geïnterpreteerd. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden uitgevoerd en die niet in de prestatieonderzoeken van QIAGEN worden behandeld.

Let goed op de vervaldatum op het etiket van de doos en op de etiketten van alle componenten. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken.

Opmerking: De kit is samengesteld op basis van de EAC-onderzoeken (Europe Against Cancer) (8, 9) en voldoet aan de meest actuele internationale aanbevelingen. De kit bevat een IS-MMR-kalibrator die is gestandaardiseerd voor de internationale schaal en waarmee NCN-resultaten kunnen worden geconverteerd naar de internationale schaal en de MMR-status (major molecular response, belangrijke moleculaire respons) kan worden gerapporteerd.

Aan iedere partij IS-MMR-kalibrator is een waarde toegekend die rechtstreeks is afgeleid van een kalibratie aan de hand van het NIBSC WHO-gecertificeerde hoofdreferentiemateriaal (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138).

Bij iedere kit wordt een analysecertificaat geleverd waarop de toegekende waarde van de IS-MMR-kalibrator staat vermeld.

De kit dient conform de instructies in deze handleiding en in combinatie met gevalideerde reagentia en instrumenten te worden gebruikt (zie 'Benodigde maar niet meegeleverde materialen' op pagina 11). Bij afwijkend gebruik van dit product en/of aanpassing van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Prestatiekenmerken

Opmerking: De prestatiekenmerken zijn vastgesteld met behulp van het Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem in combinatie met de *ipsogen* BCR-ABL Mbc r IS-MMR Kit en gevalideerde extra reagentia (zie 'Benodigde maar niet meegeleverde materialen' op pagina 11).

Blanco limiet en detectielimiet

De blanco limiet (Limit of blank, LoB) en detectielimiet (limit of detection, LoD) zijn vastgesteld aan de hand van de richtlijn CLSI/NCCLS EP17-A.

Het achtergrondgehalte (LoB) is vastgesteld op basis van negatieve monsters van gezonde donoren (11 monsters, 69 metingen) en bleek gelijk te zijn aan 0,0022 BCR-ABL Mbc r NCN.

De detectielimiet (LoD of analytische gevoeligheid) is vastgesteld op basis van bekende laag-positieve monsters (n = 8, 74 metingen) en bleek gelijk te zijn aan 0,0069 BCR-ABL Mbc r NCN.

- $NCN \leq LoB$: BCR-ABL Mbc r niet gedetecteerd
- $LoB < NCN < LoD$: BCR-ABL Mbc r gedetecteerd, maar niet gekwantificeerd
- $NCN \geq LoD$: BCR-ABL Mbc r gekwantificeerd

Lineariteit

De lineariteit is vastgesteld aan de hand van richtlijn CLSI/NCCLS EP6-A.

Het onderzoek is uitgevoerd bij mengsels van positief en negatief RNA dat is onttrokken uit cellijnen. Er zijn elf verschillende niveaus in drievoud getest. Uit de resultaten die met deze monsters werden verkregen, bleek dat de *ipsogen* BCR-ABL Mbc r IS-MMR-assay binnen een bereik van 0,003 tot 65 BCR-ABL Mbc r NCN lineair is.

Invoer

Voor het onderzoek zijn vijf verschillende RNA's met diverse NCN BCR-ABL Mbc r-niveaus geselecteerd. Er zijn verschillende hoeveelheden RNA en cDNA getest om het effect van de invoer op NCN-resultaten te beoordelen. Uit de resultaten bleek dat de variatie van RNA-invoer een beperkt effect had op NCN-resultaten, terwijl cDNA-invoer een meer gevoelige factor bleek te zijn wanneer er meer of minder materiaal werd gebruikt. Om deze reden wordt een invoer van 1 μ l RNA en 5 μ g cDNA aanbevolen voor het uitvoeren van de test.

Precisie

De precisie is vastgesteld aan de hand van richtlijn CLSI/NCCLS EP~~8~~⁶2.

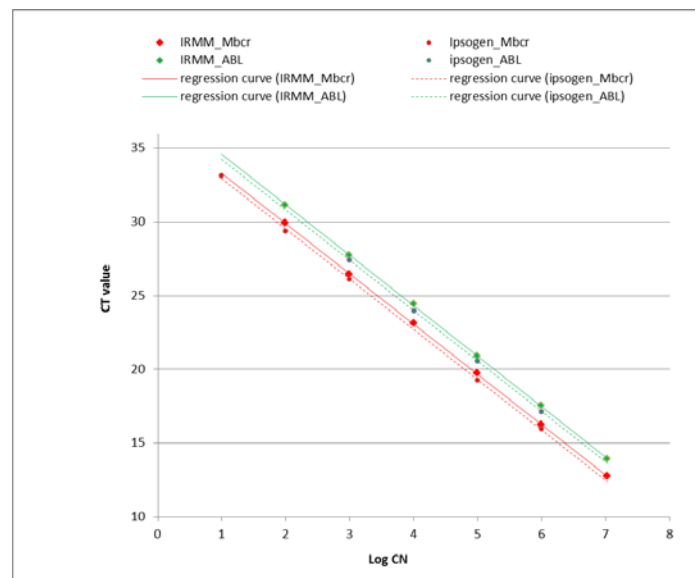
Het precisie-onderzoek is uitgevoerd bij 13 verschillende monsters die 42 keer in tweevoud zijn getest (n = 84). Deze monsters zijn representatief voor de verschillende niveaus van BCRABL Mbcfexpressie in patiëntmonsters rond en boven de MMR-waarde. De globale variatiecoëfficiënt rond de MMR-waarde bleek gelijk te zijn aan 25%.

Concordantiestudie: Standaarden van de enkele plasmide ERM-AD623 BCR-ABL1 versus de enkele plasmide van *ipsogen* (QIAGEN).

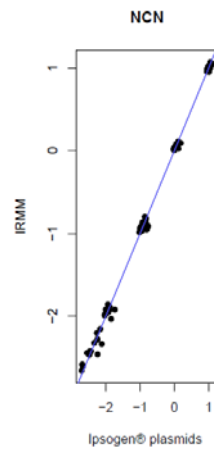
De meest recente werkdefinities van de moleculaire respons van BCR-ABL1-Mbcr in CML zijn geformuleerd door de ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group. Zij adviseren om de plasmide ERMAD623 BCR-ABL1 te gebruiken (IRMM, België): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. 29, 999.

Naar aanleiding van deze aanbeveling voerde QIAGEN een concordantiestudie uit om de veelzijdige enkele plasmide van *ipsogen* die wordt gebruikt in de *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr ISMMR Kit (24) CE (cat.nr. 670723) te vergelijken met de plasmide ERMAD623 BCR-ABL1 (IRMM).

De vergelijking werd gebaseerd op een genormaliseerde verhouding van het aantal kopieën (normalized copy number, NCN) BCR-ABL1 Mbcr/ABL1, en werd beoordeeld door beide standaardverduunningen (*ipsogen* of ERMAD623 BCR-ABL1) te gebruiken bij controlemonsters uit *ipsogen*-kits en goedgekeurd referentiemateriaal afkomstig van het NIBSC; 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.



Afbeelding 12. De standaardcurven van de *ipsogen* - en ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmide zijn uitgelijnd.



ipsogen BCRABL1 Mbc ISMMR Kit

Afbeelding 13. NCN -waarden ERM -AD623 BCR-ABL1 versus *ipsogen*.











Uit de studie van QIAGEN blijkt geen statistisch verschil: de standaarden van de enkele plasmide ERMAD623 BCR-ABL1 en de enkele plasmide van *ipsogen* geven dezelfde gelijkwaardige resultaten.

References

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. 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.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en etiketten staan:

 Σ <N>	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Vervaldatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Global Trade Item Number
	Temperatuurbepering
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/Support. Ook kunt u bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met de afdeling Technical service van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	Voor 24 reacties: Enkelvoudige MbcR- en ABL-plasmidestandaarden, hoogpositieve controle voor RNA, IS-MMR-kalibrator, primer-probemengsel ABL, primer-probemengsel BCR-ABL MbcR-fusiegen	670723
Rotor-Gene Q MDx: voor IVD-gevalideerde, realtime PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime-PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9002033
<i>ipsogen</i> RT Kit — voor omgekeerde transcriptie		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Omgekeerd transcriptase, willekeurige primer, DTT, dNTP, Rnase-remmer, RT-buffer	679923
RNeasy Midi Kit — voor zuivering van totaal -RNA		
RNeasy Midi Kit (50)	Voor 50 RNA-preparaten: 50 RNeasy Midi-spinkolommen, afnamebuisjes (15 ml), Rnasevrije reagentia en buffers	75144

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN Kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De (gebruikers)handleidingen van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen bij de afdeling Technical services van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

Dit product is bedoeld voor in-vitro diagnostiek. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen *ipsogen*-producten niet worden doorverkocht, gemodificeerd voor doorverkoop of gebruikt voor de productie van commerciële producten.

De in dit document gegeven informatie kan zonder kennisgeving worden gewijzigd. QIAGEN aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten in dit document. Dit document is voor zover bekend volledig en accuraat op het moment van publicatie. QIAGEN kan in geen enkel geval aansprakelijk worden gesteld voor incidentele schade, speciale schade, meervoudige schade of gevolgschade in verband met of voortvloeiend uit het gebruik van dit document.

Voor *ipsogen*-producten geldt een garantie voor de vermelde specificaties. De enige verplichting van QIAGEN en de enige verhaalmogelijkheid van de klant is beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, RO X™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™, TRIzol® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); *Premix Ex Taq*™ (Takara Bio, Inc.).

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *ipsogen* BCRABL1 MbcR ISMMR Kit dat hij/zij akkoord gaat met de volgende voorwaarden:

1. De *ipsogen* BCRABL1 MbcR ISMMR Kit mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de handleiding bij de *ipsogen* BCRABL1 MbcR ISMMR Kit in combinatie met de componenten in de kit. QIAGEN verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de handleiding bij de *ipsogen* BCRABL1 MbcR ISMMR Kit in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, gerenoveerd of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die impliciet of expliciet worden genoemd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord geen stappen te ondernemen of niemand anders stappen te laten ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of die deze mogelijk kunnen maken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke rechtshandeling om deze beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/bde componenten ervan af te dwingen.

Raadpleeg www.qiagen.com voor de bijgewerkte licentievoorwaarden.

HB-1362-003 © 2013 -2016 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

www.qiagen.com

