

ipsogen[®] BCR-ABL1 mbcR Kit Handbuch



Version 1

IVD

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zum Gebrauch mit Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], LightCycler[®]
oder SmartCycler[®] Thermocyclern



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, 40724 Hilden,
GERMANY

R2

MAT

1072506DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglicht. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

QIAGEN setzt Standards in:

- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen,
- Nukleinsäure- und Protein-Assays,
- microRNA-Forschung und RNAi sowie
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien.

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

Vorgesehener Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Hintergrundinformationen	5
Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung	6
Mit dem Kit gelieferte Materialien	9
Kit-Inhalt	9
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	10
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	11
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	12
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	13
Verfahren	14
RNA-Isolierung aus der Probe	14
Protokolle	
■ Standardisierte reverse Transkription nach EAC-Empfehlung	14
■ qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor	17
■ qPCR mit ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS oder LightCycler 480 Thermocycler	21
■ qPCR mit LightCycler 1.2 oder 2.0 Thermocycler	26
■ qPCR mit dem SmartCycler Thermocycler	30
Interpretation der Ergebnisse	33
Verfahren der Datenauswertung	33
Ergebnisse	34
Hilfe zur Fehlerbehebung	37
Qualitätskontrolle	40
Beschränkungen des Tests	40
Leistungscharakteristik	41
Untersuchung nichtklinischer Proben	41
Untersuchung klinischer Proben	44
Literatur	48
Symbole	49
Kontaktinformationen	49

Vorgesehener Verwendungszweck

Der *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit ist für die Quantifizierung des Transkripts BCR-ABL p190 in Knochenmarks- oder Blutproben von Ph-positiven Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), bei denen zuvor das BCR-ABL-mbc-Fusionsgen (FG-Ereignis) diagnostiziert wurde, vorgesehen. Mithilfe der erhaltenen Ergebnisse soll die Wirksamkeit der Therapie bei behandelten Patienten überwacht und die minimale Resterkrankung (MRD = *minimal residual disease*) verfolgt werden, um auf ein Rezidiv der Krankheit zu kontrollieren.

Zusammenfassung und Hintergrundinformationen

Das Philadelphia-(Ph-)Chromosom ist die häufigste karyotypische Aberration bei Erwachsenen mit ALL. Es tritt bei insgesamt 20–30 % der erwachsenen ALL-Patienten auf, wobei die Inzidenz bei Patienten, die 50 Jahre oder älter sind, auf über 50 % ansteigt.

Bei dieser Aberration wird das 3'-Segment des ABL-Protoonkogens von Chromosom 9 neben das 5'-Segment des BCR-Gens auf Chromosom 22 transloziert. Das resultierende BCR-ABL-Fusionsgen (BCR-ABL-FG) des Ph-Chromosoms kodiert für ein Protein mit konstitutiver Tyrosinkinase-Aktivität.

Bruchstellen im ABL-Gen treten typischerweise im ersten Intron auf. Im BCR-Gen tritt im Allgemeinen in einer der folgenden drei Regionen eine Bruchstelle auf: in einer 5,8 kb großen Region mit der Bezeichnung "Major breakpoint cluster region" (Mbc), die die Exons 12–16 umfasst, in einer 55-kb-Sequenz im ersten Intron mit der Bezeichnung "minor breakpoint cluster region" (mbcr) sowie in einer Region mit der Bezeichnung "micro breakpoint cluster region" (μ -bcr).

Bei einem Bruch im mbcr-Bereich wird das Exon 1 (e1) mit dem zweiten Exon des ABL-Gens (a2) verknüpft, was zu einem kleineren Fusionstranskript, e1a2, führt, das für ein 190 kDa großes chimäres Protein (p190) kodiert (siehe Abb. 1). Das BCR-ABL-Protein p190 ist nur bei Ph-positiver ALL nachweisbar, während das BCR-ABL-Protein p210 bei 20–40 % der Ph-positiven ALL-Patienten und nahezu allen Ph-positiven Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) vorkommt.

Alle Formen der BCR-ABL-Fusionsproteine zeigen eine erhöhte und deregulierte Tyrosinkinase-Aktivität, und für die p190-Variante wurde ein höheres transformierendes Potenzial als für p210 nachgewiesen. Darüber hinaus scheint dieses chimäre Protein die normalen zytokinabhängigen Signaltransduktionswege zu deregulieren, was zu einer Inhibition der Apoptose oder einem Wachstum, das unabhängig von Wachstumsfaktor erfolgt, führt.

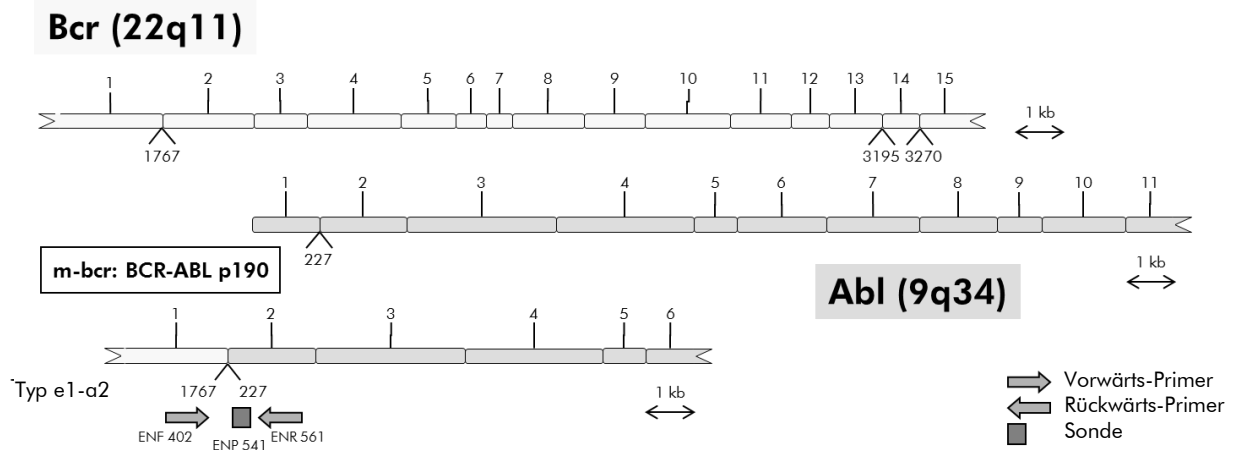


Abbildung 1. Schematische Darstellung des BCR-ABL-mbcr-Fusionsgen-Transkripts, das mit dem Satz der qPCR-Primer- und -Sonden ENF402–ENP541–ENR561 erfasst wird. Die Zahl unter den Primern und Sonden gibt deren jeweilige Nukleotid-Position im normalen Gentranskript an.

Die Therapie bei Ph⁺-ALL-Patienten ist durch die Einführung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) optimiert worden, wodurch das Überleben dieser Patienten signifikant verbessert wurde (siehe den Übersichtsartikel in Referenz 1). Bei diesen Patienten ist eine Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD) erforderlich. Die derzeitige Methodik zur Messung des MRD-Grads beinhaltet die Anwendung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), bei der die Anzahl der BCR-ABL-Transkripte in Relation zur Anzahl der Transkripte eines Kontrollgens gesetzt wird. Der ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit basiert auf dieser Methode.

Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung

Die qPCR ermöglicht die genaue Quantifizierung von PCR-Produkten während der exponentiellen Phase des PCR-Amplifikationsprozesses. Durch die Erfassung der Fluoreszenzsignale in Echtzeit während und/oder im Anschluss an die PCR-Zyklen liegen schnell quantitative PCR-Daten vor, ohne dass eine Weiterverarbeitung nach der PCR notwendig ist, sodass das Risiko einer Kontamination des PCR-Produkts drastisch reduziert ist. Gegenwärtig sind drei Hauptvarianten der qPCR-Methode verfügbar: qPCR-Analyse mit dem Farbstoff SYBR[®] Green I, qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden und qPCR-Analyse mit Hybridisierungssonden.

Dieser qPCR-Assay nutzt das Prinzip der Hydrolyse eines mit zwei Farbstoffen markierten Oligonukleotids. Während der PCR hybridisieren Vorwärts- und Rückwärts-Primer an eine spezifische Sequenz. Ein Zwei-Farbstoff-Oligonukleotid ist in derselben Mischung vorhanden. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, das mit einem 5'-Reporter-Farbstoff und einem 3'-Quencher-Farbstoff markiert ist; sie hybridisiert an eine Zielsequenz (auch Target-Sequenz genannt) im PCR-Produkt. Die qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden nutzt die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Solange

die Sonde intakt ist, führt die Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher-Farbstoff zu einer Unterdrückung der Reporter-Fluoreszenz, primär durch Förster-Resonanzenergietransfer.

Ist die Target-Sequenz vorhanden, lagert sich die Sonde während der PCR spezifisch zwischen der Vorwärts- und Rückwärts-Primerstelle an. Durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde zwischen Reporter und Quencher nur dann gespalten, wenn die Sonde an das Target hybridisiert ist. Die Sondenfragmente lösen sich dann durch Verdrängung von der Target-Sequenz ab und die Polymerisation des Strangs geht weiter. Das 3'-Ende der Sonde ist blockiert, um eine Extension der Sonde während der PCR zu verhindern (siehe Abb. 2). Diese Reaktionsfolge findet bei jedem Zyklus statt und stört die exponentielle Akkumulation des Produkts nicht.

Der Anstieg des Fluoreszenzsignals wird nur detektiert, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und daher während der PCR amplifiziert wird. Aufgrund dieser Anforderungen wird eine unspezifische Amplifikation nicht detektiert. Folglich ist die Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zur Amplifikation der Target-Sequenz im Verlauf der PCR.

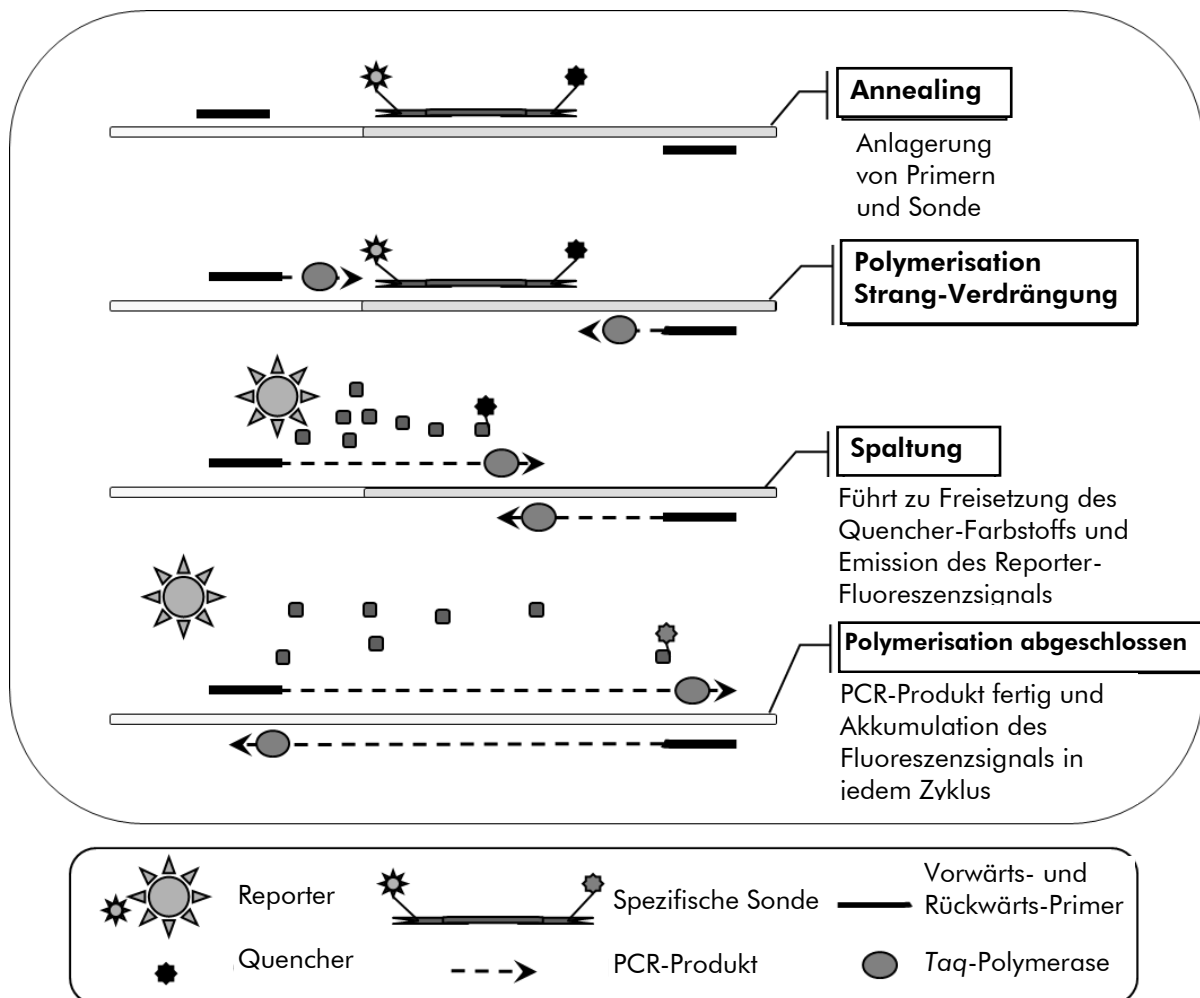


Abbildung 2. Reaktionsprinzip. Die Gesamt-RNA wird revers transkribiert und die so generierte cDNA in einer PCR unter Verwendung eines Paares spezifischer Primer und einer spezifischen, intern mit zwei Farbstoffen (FAM™–TAMRA™) markierten Sonde amplifiziert. Die Sonde bindet bei jedem Annealing-Schritt der PCR an das Amplikon. Wenn die Taq-Polymerase, ausgehend von dem am Amplikon gebundenen Primer, die Strangverlängerung ausführt, verdrängt sie das 5'-Ende der Sonde, das dann durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase abgebaut wird. Die Spaltungsreaktion setzt sich fort, bis die verbliebenen Sondenmoleküle vom Amplikon abdissoziieren. Durch diesen Prozess werden Fluorophor und Quencher in die Lösung freigesetzt, wodurch sie räumlich voneinander getrennt werden und es dadurch zu einer Zunahme der FAM-Fluoreszenz und gleichzeitiger Abnahme der TAMRA-Fluoreszenz kommt.

Mit dem Kit gelieferte Materialien

Kit-Inhalt

ipsogen BCR-ABL1 mbcR Kit		(24)
Katalog-Nr.		670023
Anzahl Reaktionen		24
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ³ copies/5 µl) (ABL-Kontrollgen-Standard-Verdünnung; 10 ³ Kopien/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ⁴ copies/5 µl) (ABL-Kontrollgen-Standard-Verdünnung; 10 ⁴ Kopien/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ⁵ copies/5 µl) (ABL-Kontrollgen-Standard-Verdünnung; 10 ⁵ Kopien/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (10 ¹ copies/5 µl) (BCR-ABL-mbcR-Fusionsgen-Standard-Verdünnung; 10 ¹ Kopien/5 µl)	F1-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 µl
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (10 ² copies/5 µl) (BCR-ABL-mbcR-Fusionsgen-Standard-Verdünnung; 10 ² Kopien/5 µl)	F2-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 µl
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (10 ³ copies/5 µl) (BCR-ABL-mbcR-Fusionsgen-Standard-Verdünnung; 10 ³ Kopien/5 µl)	F3-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 µl
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁵ copies/5 µl) (BCR-ABL-mbcR-Fusionsgen-Standard-Verdünnung; 10 ⁵ Kopien/5 µl)	F4-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 µl
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁶ copies/5 µl) (BCR-ABL-mbcR-Fusionsgen-Standard-Verdünnung; 10 ⁶ Kopien/5 µl)	F5-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 µl

ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit		(24)
Katalog-Nr.		670023
Anzahl Reaktionen		24
Primer- und Sonden-Mischung ABL*	PPC-ABL, 25x	90 µl
Primer- und Sonden-Mischung BCR-ABL- mbcr-Fusionsgen [†]	PPF-mbcr, 25x	110 µl
ipsogen <i>ABL1 BCR-ABL mbcr Kit Handbook</i> (in Englisch)		1

* Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für das ABL-Kontrollgen plus einer spezifischen FAM–TAMRA-Sonde.

† Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für das BCR-ABL-mbcr-Fusionsgen plus einer spezifischen FAM–TAMRA-Sonde.

Hinweis: Zentrifugieren Sie Standard-Verdünnungen und Primer- und Sonden-Mischungen jeweils kurz, bevor Sie sie verwenden.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern (*Material Safety Data Sheets, MSDS*) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reagenzien

- Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)
- Reagenzien für die reverse Transkription: Das validierte Reagenz hierfür ist Superscript[®] II (oder Superscript) Reverse Transcriptase, inklusive 5x-Erststrang-Puffer und 100 mM DTT (von Life Technologies, Kat.-Nr. 18064-022).
- RNase-Inhibitor: Das validierte Reagenz ist RNaseOUT™ (von Life Technologies, Kat.-Nr. 10777-019).
- Satz dNTPs (für PCR-Zwecke geeignet);
- Random-Hexamer
- MgCl₂
- Puffer und Taq-DNA-Polymerase: Als validierte Reagenzien werden der TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2x-PCR-Master-Mix; von Life Technologies, Kat.-Nr. 4304437) und der LightCycler TaqMan Master (5x-PCR-Master-Mix; von Roche, Kat.-Nr. 04535286001) verwendet.

Verbrauchsartikel

- Nukleasefreie, sterile PCR-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern
- RNase- und DNase-freie 0,5-ml- oder 0,2-ml-PCR-Reaktionsgefäße
- Eis

Geräte

- Für PCR reservierte Mikroliter-Pipette* (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 0,2-ml-/0,5-ml-Reaktionsgefäße (erforderliche Drehzahl: 10.000 UpM)
- Real-Time-PCR-Thermocycler:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder anderer Rotor-Gene Thermocycler; LightCycler 1.2, 2.0 oder 480; ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS; oder SmartCycler Thermocycler; sowie gerätespezifisches Zubehörmaterial
- Thermocycler* oder Wasserbad* (für die reverse Transkription)

Ergänzende Reagenzien

- *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit (Kat.-Nr. 670091), bestehend aus Zelllinien mit keiner (= negativ), hoher und schwach positiver Expression des BCR-ABL-mbcR-Fusionsgens zur qualitativen Validierung der RNA-Isolierung und der reversen Transkription

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern entnehmen (*Material Safety Data Sheets*, MSDS). In unserer Online-Sammlung der Material Sicherheits-Datenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige MSDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Entsorgen Sie den bei Probenverarbeitung und PCR-Reaktion angefallenen (Flüssig-)Abfall gemäß den geltenden Sicherheitsbestimmungen.

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft und kalibriert werden.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Quantitative PCR-Tests setzen die Einhaltung der guten Laborpraxis voraus, einschließlich der Wartung der für molekularbiologische Zwecke vorgesehenen Geräte gemäß den anzuwendenden Vorschriften und relevanten Normen.

Dieser Kit ist für in-vitro-diagnostische Anwendungen vorgesehen. Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien und mitgelieferten Anweisungen wurden für optimale Leistung validiert. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien oder die Änderung von Inkubationszeiten oder -temperaturen könnte zu fehlerhaften oder widersprüchlichen Daten führen. Die PPC- und PPF-Reagenzien könnten unter Lichteinfluss chemischen Veränderungen unterliegen. Die Formulierung aller Reagenzien ist spezifisch auf den Gebrauch mit diesem Test abgestimmt. Um die optimale Leistungsfähigkeit des Tests zu erhalten, dürfen keine Reagenzien ausgetauscht werden.

Für die Bestimmung der Transkriptkonzentration mittels qPCR ist zum einen die reverse Transkription der mRNA und zum anderen die Amplifikation der generierten cDNA durch PCR erforderlich. Daher muss das Assay-Verfahren unter RNase-/DNase-freien Bedingungen durchgeführt werden.

Gehen Sie äußerst sorgfältig vor, um Folgendes zu vermeiden:

- RNase-/DNase-Kontamination, die einen Abbau der Template-mRNA bzw. der generierten cDNA verursachen könnte
- mRNA- oder PCR-Produkt-Kontaminationen durch Verschleppung, die zu einem falsch-positiven Signal führen könnten

Wir empfehlen daher, folgende Maßnahmen einzuhalten.

- Verwenden Sie nukleasefreie Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) und tragen Sie bei der Durchführung des Assays immer Einmal-Handschuhe.
- Benutzen Sie bei allen Pipettierschritten neue Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere, um eine Kreuzkontamination der Proben und Reagenzien zu vermeiden.
- Setzen Sie den Master-Mix vor der PCR mit dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.) in einem speziell dafür vorgesehenen Laborbereich an, in den keine DNA-Matrizen (cDNA, DNA, Plasmid-DNA) hineingetragen werden. Pipettieren Sie die Template-DNA in einem separaten Laborbereich (vorzugsweise in einem anderen Laborraum) mit speziell dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.).
- Pipettieren Sie die Standard-Verdünnungen (C1 bis C3 und F1 bis F5) in einem separaten Laborraum.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Kits werden auf Trockeneis verschickt und müssen nach Eingang bei -30 °C bis -15 °C gelagert werden.

- Sorgen Sie dafür, dass die Primer- und Sonden-Mischungen (PPC- und PPF-Röhrchen) nicht (bzw. möglichst wenig) dem Licht ausgesetzt werden.
- Schütteln Sie die Röhrchen vorsichtig und zentrifugieren Sie sie kurz vor dem Öffnen.
- Lagern Sie alle Kit-Komponenten in ihren Originalgefäßen/-behältern.

Diese Lagerungsbedingungen gelten sowohl für geöffnete als auch ungeöffnete Komponenten. Komponenten, die nicht unter den auf den Etiketten angegebenen Bedingungen gelagert wurden, könnten in ihrer Funktion beeinträchtigt sein, was sich ungünstig auf die Assay-Ergebnisse auswirken könnte.

Das Haltbarkeitsdatum eines Reagenzes ist jeweils auf dem Etikett der einzelnen Komponente angegeben. Bei Aufbewahrung unter korrekten Lagerungsbedingungen behält das Produkt seine Leistungsfähigkeit bis zu dem Haltbarkeitsdatum, das auf dem Etikett angegeben ist.

Es liegen keine Anhaltspunkte vor, die auf eine Instabilität dieses Produkts hindeuten. Dennoch sollten beim Testen unbekannter Proben immer Positiv- und Negativkontrollen simultan mitgeführt werden.

Verfahren

RNA-Isolierung aus der Probe

Die RNA-Isolierung aus Patientenproben (Blut oder Knochenmark) muss nach einem validierten Verfahren durchgeführt werden. Die Qualität des Assays hängt in starkem Maße von der Qualität der als Ausgangsmaterial verwendeten RNA ab. Wir empfehlen daher, die gereinigte RNA einer Qualitätskontrolle durch Agarosegelelektrophorese* unter Verwendung eines Agilent® Bioanalyzer® zu unterziehen, bevor sie für die Analyse eingesetzt wird.

Protokoll: Standardisierte reverse Transkription nach EAC-Empfehlung

Vor Beginn durchzuführende Arbeiten

- Setzen Sie die dNTP-Lösungen, jeweils 10 mM, an und lagern Sie sie aliquotiert bei -20 °C .

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Inkubieren Sie $1\text{ }\mu\text{g RNA}$ ($1\text{--}4\text{ }\mu\text{l}$) für 10 Minuten bei 70 °C und stellen Sie sie anschließend sofort für 5 Minuten auf Eis.
3. Zentrifugieren Sie kurz (ca. 10 Sekunden bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen. Stellen Sie die Röhren anschließend auf Eis.
4. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden RT-Mix an (siehe Tab. 1).

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille.

Tabelle 1. Ansetzen des RT-Mix

Komponente	Volumen pro Probe (µl)	Endkonzentration
Erststrang-Puffer, 5x (mit Superscript II Reverse Transcriptase geliefert)	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTPs (jeweils 10 mM; vorher ansetzen und bei -20 °C in Aliquots lagern)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, mit Superscript II Reverse Transcriptase geliefert)	2,0	10 mM
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Random-Hexamer (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II oder Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Erhitzte RNA-Probe (Zugabe bei Schritt 5)	1,0–4,0	50 ng/µl
Nukleasefreies Wasser für PCR-Zwecke (Zugabe bei Schritt 5)	0,0–3,0	–
Endvolumen	20,0	–

- 5. Pipettieren Sie 16 µl RT-Mix in jedes PCR-Reaktionsgefäß. Geben Sie dann 1–4 µl (1 µg) RNA (aus Schritt 3) hinzu und füllen Sie mit nukleasefreiem Wasser für PCR-Zwecke auf ein Volumen von 20 µl auf (siehe Tab. 2).**

Tabelle 2. Reaktionsansatz für die reverse Transkription

Komponente	Volumen (µl)
RT-Mix	16
Erhitzte Proben-RNA (1 µg)	1–4
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	0–3
Endvolumen	20

- 6. Mischen Sie gründlich und zentrifugieren Sie kurz (ca. 10 Sekunden bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.**
- 7. Inkubieren Sie für 10 Minuten bei 20 °C.**
- 8. Inkubieren Sie dann für 45 Minuten bei 42 °C in einem Thermocycler und anschließend für 3 Minuten bei 99 °C.**
- 9. Kühlen Sie dann die Ansätze (zum Stoppen der Reaktion) für 5 Minuten auf Eis.**
- 10. Zentrifugieren Sie kurz (ca. 10 Sekunden bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen. Stellen Sie die Reaktionsgefäße anschließend auf Eis.**
- 11. Verdünnen Sie die erhaltene cDNA mit 30 μ l nukleasefreies Wasser für PCR-Zwecke, sodass das Endvolumen 50 μ l beträgt.**
- 12. Führen Sie die PCR nach einem der folgenden Protokolle durch, je nachdem welchen qPCR-Thermocycler Sie verwenden.**

Protokoll: qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor

Bei Verwendung dieses Thermocyclers empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 3 angegeben, durchzuführen.

Tabelle 3. Anzahl an Reaktionen für Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Proben	Reaktionen
Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
ABL-Standard	2 x 3 Reaktionen (3 Verdünnungen; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
Mit BCR-ABL-mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-mbcr)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
mbcr-Standard	2 x 5 Reaktionen (5 Verdünnungen; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

Probenverarbeitung bei Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Wir empfehlen, mindestens 8 cDNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen.

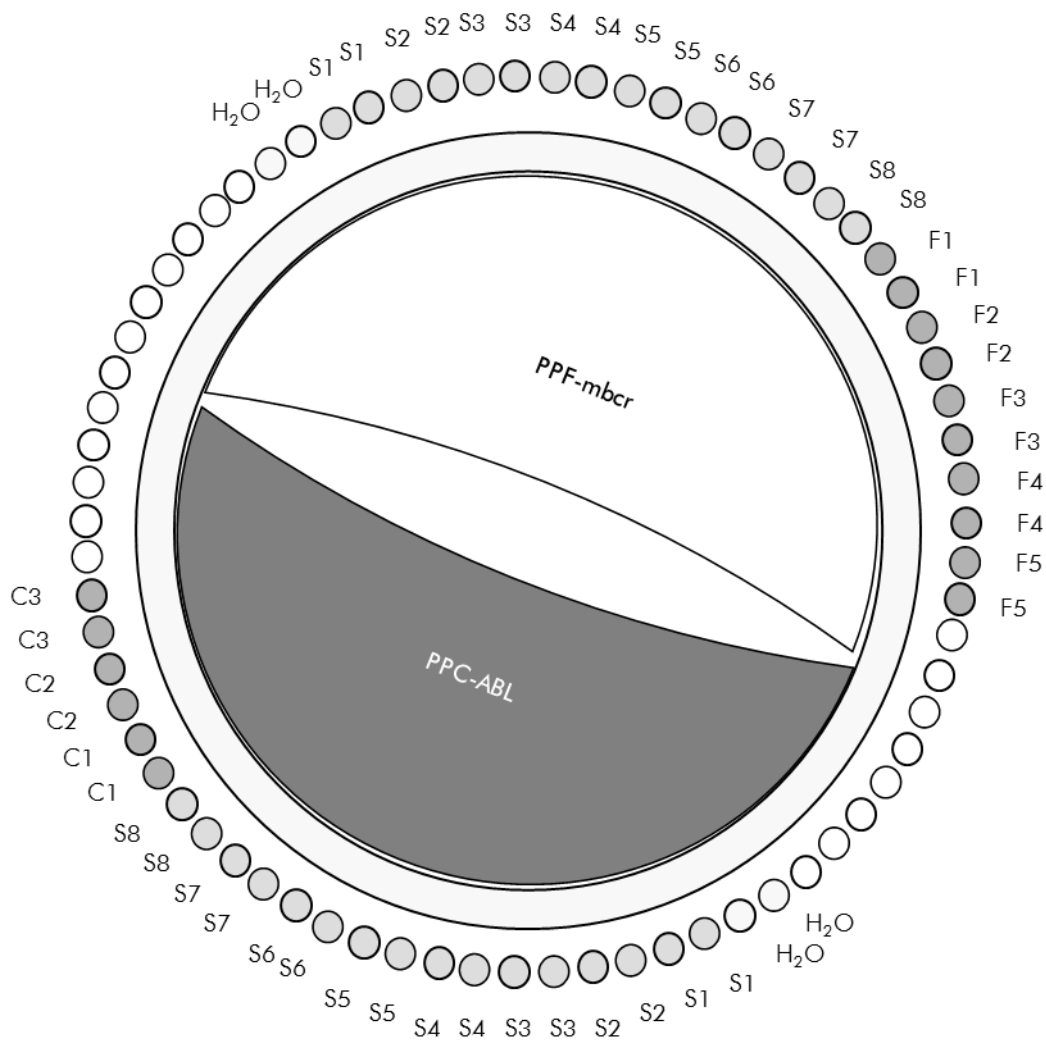


Abbildung 3. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up für jedes Experiment mit dem ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit. F1–F5: BCR-ABL-mbcr-Standards; **C1–C3:** ABL-Standard; **S:** cDNA-Probe; **H₂O:** Wasser-Kontrolle.

Hinweis: Achten Sie darauf, immer eine zu testende Probe in Position 1 des Rotors zu platzieren. Andernfalls wird der Thermocycler während des Kalibrierungsschritts keine Kalibrierung durchführen und es werden falsche Fluoreszenzsignaldaten erfasst.

Setzen Sie in alle übrigen Positionen ein leeres Reaktionsgefäß ein.

qPCR mit Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 4 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 μl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPC-ABL oder PPF-mbcr) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 4. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	ABL: 24 + 1 Reaktionen (μl)	BCR-ABL- mbcr: 28 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR- Zwecke)	6,5	162,5	188,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

3. Pipettieren Sie 20 μl des qPCR-Mix in jedes Reaktionsgefäß.
4. Geben Sie 5 μl des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 100 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Standardisierte reverse Transkription nach EAC-Empfehlung“ auf Seite 14) in das entsprechende Reaktionsgefäß (Gesamtvolumen 25 μl).
5. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
6. Setzen Sie die Reaktionsgefäße gemäß den Empfehlungen des Herstellers in den Thermocycler.
7. Programmieren Sie den Rotor-Gene Q Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5. Temperaturprofil

Analysemodus	Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 60 °C für 1 Minute mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Kanal Grün: Einzel ("Single")

- 8. Aktivieren Sie bei den Rotor-Gene Q Thermocyclern bei der Analyse die Funktion "Slope Correct" („Steigung korrigieren“). Wir empfehlen, den Schwellenwert ("Threshold") auf 0,03 einzustellen. Starten Sie das in Tabelle 5 angegebene zyklische Temperaturprogramm.**

Protokoll: qPCR mit ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS oder LightCycler 480 Thermocycler

Bei Verwendung eines dieser qPCR-Thermocycler für 96-Well-Platten empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 6 angegeben, durchzuführen.

Tabelle 6. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines qPCR-Thermocyclers für 96-Well-Platten

Proben	Reaktionen
Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
ABL-Standard	2 x 3 Reaktionen (3 Verdünnungen; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
Mit BCR-ABL-mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-mbcr)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
mbcr-Standard	2 x 5 Reaktionen (5 Verdünnungen; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

Probenverarbeitung bei ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900 SDS oder LightCycler 480 Thermocycler

Wir empfehlen, mindestens 8 cDNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Platten-Schema in Abbildung 4 gibt beispielhaft die Belegung einer Platte bei einem Experiment wieder.

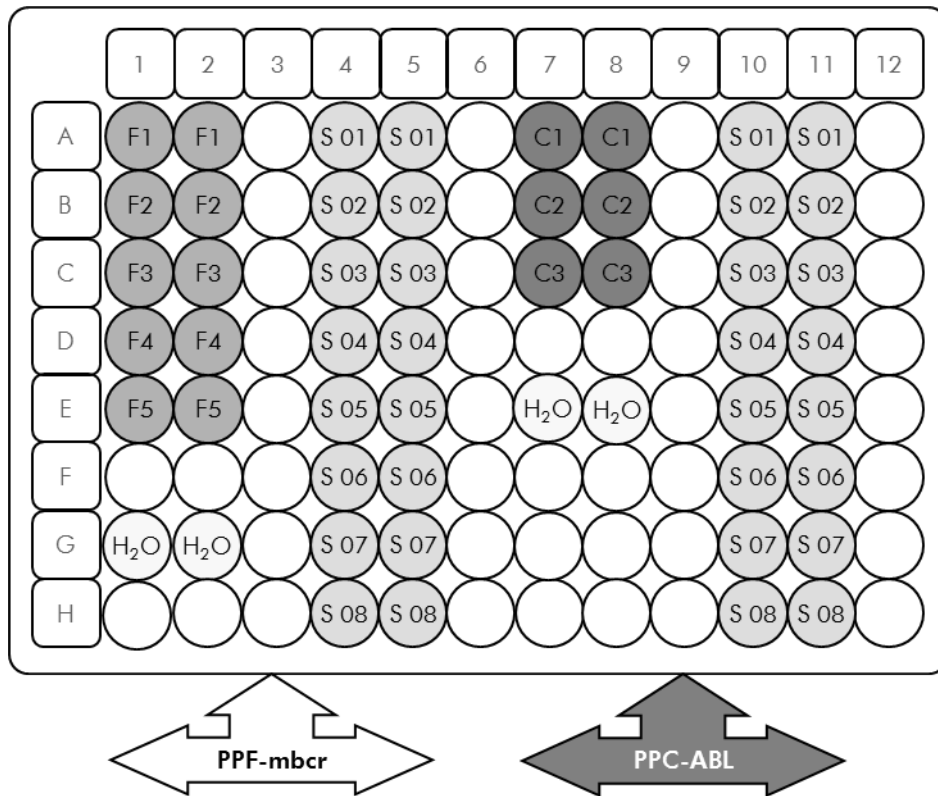


Abbildung 4. Vorgeschlagenes Platten-Set-up für ein Experiment. S: cDNA-Probe; F1–F5: BCR-ABL-mbcr-Standards; C1–C3: ABL-Standards; H₂O: Wasser-Kontrolle.

qPCR mit ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS oder LightCycler 480 Thermocycler

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an. Bei Verwendung eines qPCR-Thermocyclers für 96-Well-Platten empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung durchzuführen.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 7 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPC-ABL oder PPF-mbcr) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 7. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	ABL: 24 + 1 Reaktionen (μl)	BCR-ABL- mbcr: 28 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR- Zwecke)	6,5	162,5	188,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

3. **Pipettieren Sie 20 μ l des qPCR-Pre-Mix in jedes Well.**
4. **Geben Sie 5 μ l des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 100 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Standardisierte reverse Transkription nach EAC-Empfehlung“ auf Seite 14) in das entsprechende Well (Gesamtvolumen 25 μ l).**
5. **Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
6. **Schließen Sie die Platte und zentrifugieren Sie kurz (300 x g, ca. 10 Sekunden).**
7. **Setzen Sie die Platte gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler. Programmieren Sie den Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 8 für den ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS bzw. in Tabelle 9 für den LightCycler 480 Thermocycler angegeben.**

Tabelle 8. Temperaturprofil für den ABI PRISM 7000, 7700 und 7900HT SDS Thermocycler

Analysemodus	Standardkurve – absolute Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 60 °C für 1 Minute; mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz; Quencher: TAMRA

Tabelle 9. Temperaturprofil für den LightCycler 480 Thermocycler

Analysemodus	Absolute Quantifizierung ("Abs Quant")
Detektionsformat	Wählen Sie im "Detection formats"-Fenster („Detektionsformate“) die Option "Simple Probe" („Einfach markierte Sonde“).
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 60 °C für 1 Minute mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Bereich 483–533 nm bei LC-Version 01 bzw. im Bereich 465–510 nm bei LC-Version 02

8. Bei Verwendung eines ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS fahren Sie mit Schritt 8a fort. Bei einem LightCycler 480 Thermocycler fahren Sie mit Schritt 8b fort.

8a. Bei ABI PRISM 7000, 7700 oder 7900HT SDS: Wir empfehlen, beim ABI PRISM SDS einen Schwellenwert von 0,1 beim Analyseschritt

sowie die Basislinie zwischen Zyklus 3 und 15 einzustellen, wie im EAC-Protokoll beschrieben. Starten Sie das in Tabelle 8 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

8b. LightCycler 480: Wir empfehlen, den Fit-Point-Analysemodus mit einem Hintergrundwert von 2,0 und einem Schwellenwert von 2,0 zu verwenden. Starten Sie das in Tabelle 9 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Protokoll: qPCR mit LightCycler 1.2 oder 2.0 Thermocycler

Bei Verwendung eines Kapillar-Thermocyclers empfehlen wir, die Proben in Doppelbestimmung und Kontrollen lediglich in Einfachbestimmung zu testen, wie in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines LightCycler 1.2 oder 2.0 Thermocyclers

Proben	Reaktionen
Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
ABL-Standard	1 x 3 Reaktionen (3 Standard-Verdünnungen; jeweils als Einfachbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion
Mit BCR-ABL-mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-mbcr)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
mbcr-Standard	1 x 5 Reaktionen (5 Standard-Verdünnungen; jeweils als Einfachbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion

Probenverarbeitung bei LightCycler 1.2 oder 2.0 Thermocycler

Wir empfehlen, mindestens 5 cDNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Kapillaren-Schema in Abbildung 5 gibt beispielhaft die Belegung der Kapillaren bei einem Experiment wieder.

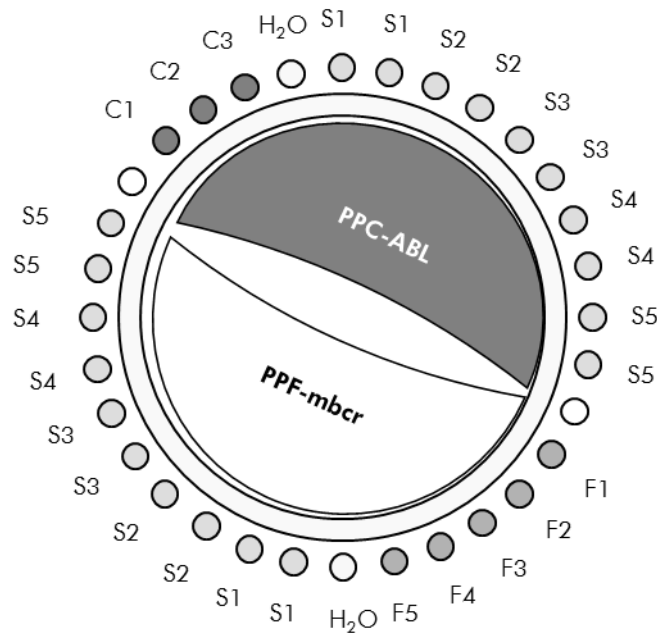


Abbildung 5. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up für jedes Experiment mit dem ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit. F1–F5: BCR-ABL-mbcr-Standards; **C1–C3:** ABL-Standard; **S:** unbekannte, zu analysierende DNA-Probe; **H₂O:** Wasser-Kontrolle.

qPCR mit LightCycler 1.2 oder 2.0 Thermocycler

Hinweis: Wegen der besonderen technologischen Anforderungen müssen Experimente mit einem LightCycler Gerät unter Verwendung spezifischer Reagenzien durchgeführt werden. Wir empfehlen, beim Ansetzen des 5-fach konzentrierten Master-Mix den LightCycler TaqMan Master zu benutzen und dabei die Anweisungen des Herstellers zu befolgen.

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. **Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.**
2. **Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 11 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 20 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPC-ABL oder PPF-mbcr) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 11. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	ABL: 14 + 1 Reaktionen (μl)	BCR-ABL- mbc: 16 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
LightCycler TaqMan Master-Mix, 5x (frisch angesetzt)	4,0	60,0	68,0	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	10,2	153,0	173,4	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	20,0	jeweils 20,0	jeweils 20,0	–

- 3. Pipettieren Sie 15 μ l des qPCR-Pre-Mix in jede Kapillare.**
- 4. Geben Sie 5 μ l des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 100 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Standardisierte reverse Transkription nach EAC-Empfehlung“ auf Seite 14) in die entsprechende Kapillare (Gesamtvolumen 20 μ l).**
- 5. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
- 6. Setzen Sie die Kapillaren in die mit dem Gerät gelieferten Adapter und zentrifugieren Sie sie kurz (700 x g, ca. 10 Sekunden).**
- 7. Setzen Sie die Kapillaren gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler ein.**
- 8. Programmieren Sie den LightCycler 1.2 oder 2.0 Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 12 angegeben.**

Tabelle 12. Temperaturprofil

Analysemodus	Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten "Ramp": 20
Zykleneinstellungen	50 Zyklen 95 °C für 10 Sekunden; "Ramp": 20 60 °C für 1 Minute; "Ramp": 20; mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz: Einzel ("Single")
Halten 2 ("Hold 2")	45 °C für 1 Minute; "Ramp": 20

9. Bei einem LightCycler 1.2 fahren Sie mit Schritt 9a fort. Bei einem LightCycler 2.0 Thermocycler fahren Sie mit Schritt 9b fort.
- 9a. LightCycler 1.2: Es wird empfohlen, den F1/F2 und "2nd derivative"-Analysemodus („2. Ableitung“) zu verwenden. Starten Sie das in Tabelle 12 angegebene zyklische Temperaturprogramm.
- 9b. LightCycler 2.0: Wir empfehlen, beim LightCycler 2.0 mit der Software-Version 4.0 den "Automated (F''max)"-Analysemodus („Automatisiert (F''max)“) zu verwenden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Starten Sie das in Tabelle 12 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Protokoll: qPCR mit dem SmartCycler Thermocycler

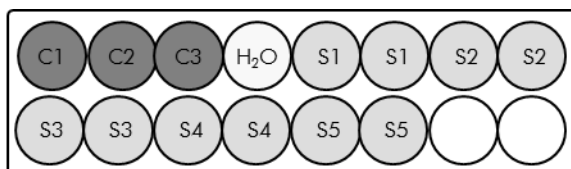
Bei Verwendung dieses Thermocyclers empfehlen wir, die Proben in Doppelbestimmung und Kontrollen lediglich in Einfachbestimmung zu testen, wie in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines SmartCycler Thermocyclers

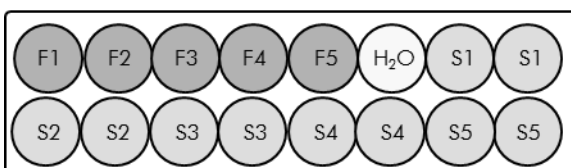
Proben	Reaktionen
Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
ABL-Standard	1 x 3 Reaktionen (3 Standard-Verdünnungen; jeweils als Einfachbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion
Mit BCR-ABL-mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-mbcr)	
n cDNA-Proben	n x 2 Reaktionen
mbcr-Standard	1 x 5 Reaktionen (5 Standard-Verdünnungen; jeweils als Einfachbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion

Probenverarbeitung bei SmartCycler Thermocycler

Wir empfehlen, mindestens 5 cDNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Zwei-Block-Schema in Abbildung 6 gibt ein Beispiel für ein Experiment wieder.



Alle Reaktionsansätze in diesem ersten Block werden mit dem PPC-ABL-Mix durchgeführt.



Alle Reaktionsansätze in diesem zweiten Block werden mit dem PPF-mbcr-Mix durchgeführt.

Abbildung 6. Vorgeschlagenes Platten-Set-up für ein Experiment. S: cDNA-Probe; **F1–F5:** BCR-ABL-mbcr-Standards; **C1–C3:** ABL-Standards; **H₂O:** Wasser-Kontrolle.

qPCR mit dem SmartCycler Thermocycler

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. **Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.**
2. **Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 14 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 μ l berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPC-ABL oder PPF-mbcr) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 14. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	ABL: 14 + 1 Reaktionen (μl)	BCR-ABL- mbcr: 16 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	1,0	15,0	17,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR- Zwecke)	6,5	97,5	110,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

3. **Pipettieren Sie 20 μ l des qPCR-Pre-Mix in jedes Well.**

4. Geben Sie 5 μ l des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 100 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Standardisierte reverse Transkription nach EAC-Empfehlung“ auf Seite 14) in das entsprechende Reaktionsgefäß (Gesamtvolumen 25 μ l).
5. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
6. Setzen Sie die Proben gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler ein.
7. Programmieren Sie den SmartCycler Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15. Temperaturprofil

Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 60 °C für 1 Minute mit Erfassung: Einzel ("Single")

8. Wir empfehlen, einen Schwellenwert von 30 einzustellen. Starten Sie das in Tabelle 15 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Interpretation der Ergebnisse

Verfahren der Datenauswertung

Bei Anwendung der TaqMan Technologie wird die Anzahl der PCR-Zyklen, die erforderlich ist, um ein Signal oberhalb des Schwellenwerts zu detektieren, als Schwellenwert-Zyklus ("Threshold Cycle"; Symbol: C_T) bezeichnet. Dieser Wert ist direkt proportional zur Target-Menge, die zu Beginn der Reaktion vorhanden ist.

Bei Verwendung von Standards mit einer bekannten Anzahl an Molekülen kann eine Standardkurve erstellt und die Target-Menge in der zu testenden Probe präzise bestimmt werden. Die *ipsogen* Standardkurven basieren auf Plasmid-DNA; um genaue Standardkurven sicherzustellen, verwenden wir drei Standard-Verdünnungen für das (ABL-)Kontrollgen und fünf Standard-Verdünnungen für das (mbcr-)Fusionsgen. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen Beispiele von TaqMan Amplifikationskurven, die mit dem *ipsogen* BCR-ABL mbcr Kit erhalten wurden.

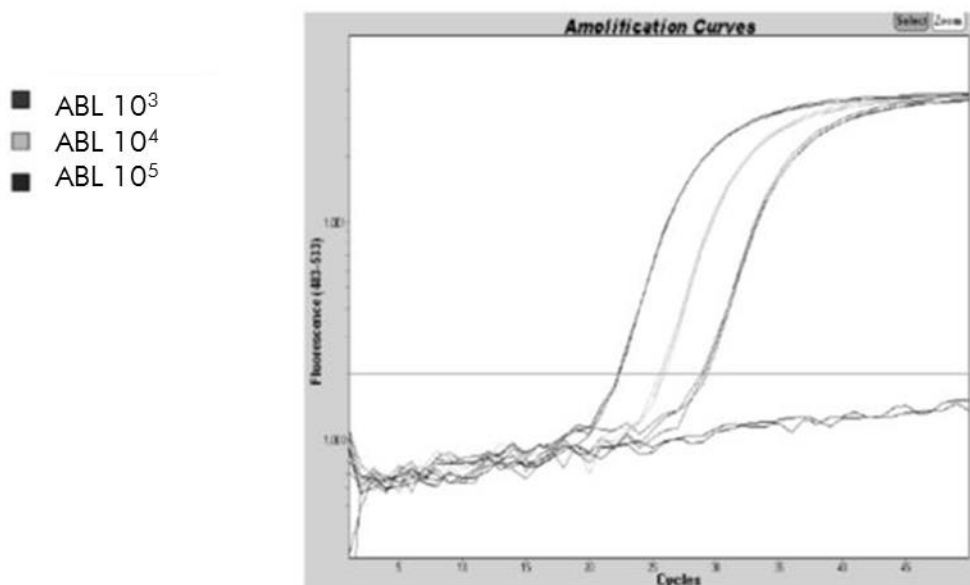


Abbildung 7. Detektion der ABL-Standards (C1, C2, C3) entsprechend 10³, 10⁴ und 10⁵ Kopien/5 μ l.

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

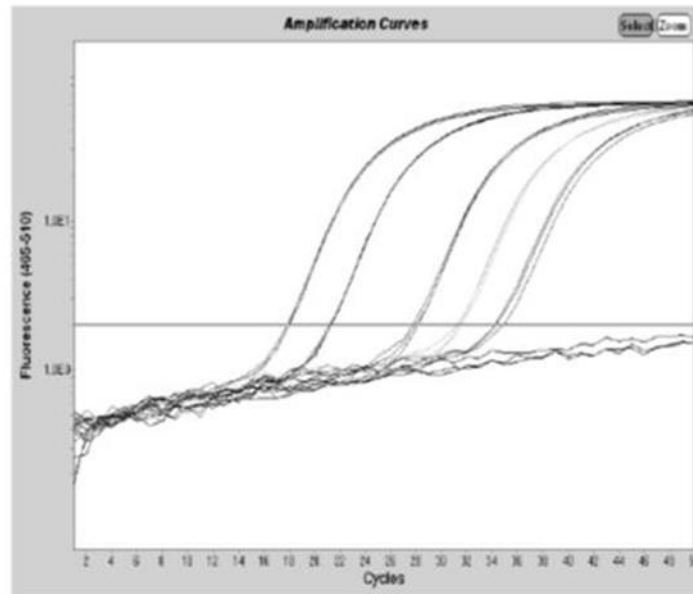


Abbildung 8. Detektion der BCR-ABL-mbcr-Standards (F1–F5) entsprechend 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 und 10^6 Kopien/ $5 \mu\text{l}$.

Ergebnisse

Standardkurve und Qualitätskriterien

Die Rohdaten können zur Auswertung kopiert und in eine Excel® Datei eingefügt werden.

Für jedes Gen (ABL bzw. BCR-ABL) werden die C_T -Rohwerte, die für die Plasmid-Standard-Verdünnungen erhalten wurden, entsprechend der logarithmischen Kopienzahl (3, 4 und 5 für C1, C2 und C3 bzw. 1, 2, 3, 5 und 6 für F1, F2, F3, F4 und F5) aufgetragen. In der Abbildung 9 ist ein Beispiel für die theoretische Standardkurve wiedergegeben, die anhand der Werte für fünf Standard-Verdünnungen berechnet wurde.

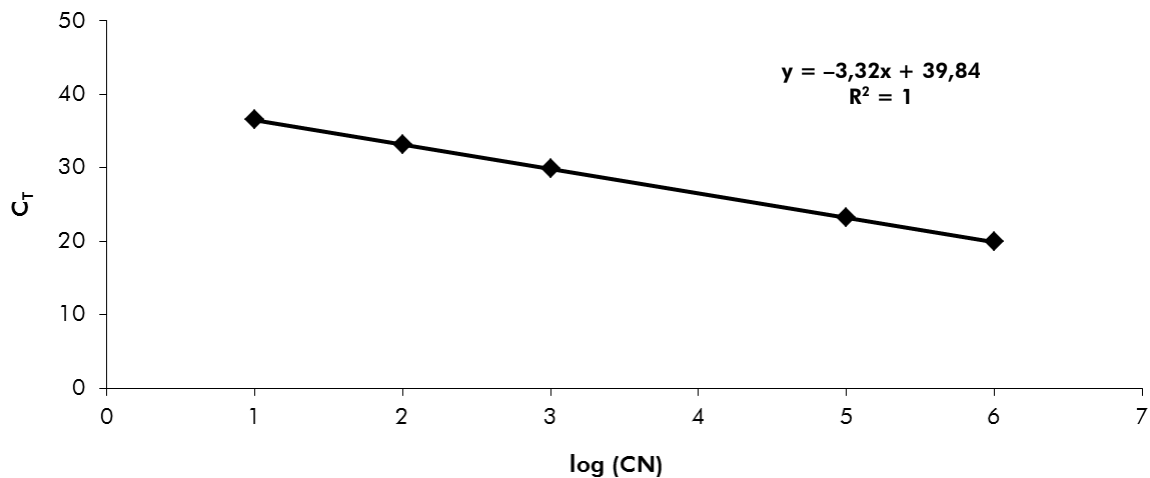


Abbildung 9. Theoretische Kurve, berechnet anhand von fünf Standard-Verdünnungen. Für jedes Gen (ABL bzw. BCR-ABL) wird eine lineare Regressionsgleichung ($y = ax + b$) ermittelt, in der a für die Steigung der Geraden und b für den y -Achsenabschnitt steht, also für die y -Koordinate des Punkts, in dem die Gerade die y -Achse schneidet. Die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) sind im Diagramm wiedergegeben.

Da es sich bei den Standards um 10-fache Verdünnungen handelt, beträgt die theoretische Steigung der Geraden $-3,3$. Eine Steigung zwischen $-3,0$ und $-3,9$ gilt als akzeptabel, solange der Wert $R^2 > 0,95$ ist (2). Für präzise Ergebnisse ist allerdings ein R^2 -Wert von $> 0,98$ wünschenswert (3).

Normalisierte Kopienzahl (NCN)

Die ABL-Standard-Geradengleichung sollte benutzt werden, um die C_T -Rohwerte (mit PPC-ABL erhalten) der unbekannt Proben in die ABL-Kopienzahl (ABL_{CN}) umzurechnen.

Die BCR-ABL-Standard-Geradengleichung sollte benutzt werden, um die C_T -Rohwerte (mit PPF-mbcr erhalten) der unbekannt Proben in die BCR-ABL-Kopienzahl ($BCR-ABL-mbcr_{CN}$) umzurechnen.

Das Verhältnis dieser CN-Werte ergibt die normalisierte Kopienzahl (NCN):

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

MRD-Wert

Der Wert der minimalen Resterkrankung ($MRD = \text{minimal residual disease}$) ist das Verhältnis zwischen der auf das Kontrollgen (CG) normalisierten Expression des Fusionsgens (FG) bei der Nachuntersuchung $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ und den Proben bei der Diagnosestellung $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

$$\text{MRD-Wert} = \frac{(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}}{(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}}$$

Sensitivität

Die Sensitivität (SENS_v) wird berechnet als relative Expression des Fusionsgens bei Diagnose (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} und der Expression des Kontrollgens (CG_{CN,FUP}) in der Nachuntersuchungs-Probe ("Follow-up"-Probe; FUP).

$$\text{Sensitivität (SENS}_v) = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

Qualitätskontrolle der ABL-Werte

Eine geringe Qualität der RNA oder eventuelle Probleme bei den Arbeitsschritten der qPCR führen zu einer niedrigen ABL-Kopienzahl (ABL_{CN}). Wir empfehlen, die Ergebnisse von Proben, die einen ABL_{CN}-Wert von < 1318 (unterer Wert des 95%-KI von Patientenproben bei der EAC-Studie, siehe Referenz 4) ergeben, zu verwerfen.

Reproduzierbarkeit zwischen Wiederholproben

Die Unterschiede in den C_T-Werten zwischen den Wiederholproben (Replikaten) sollten < 2 sein, entsprechend einer Änderung des Werts für die Kopienzahl um das Vierfache.

Die Variation der C_T-Werte zwischen den Wiederholproben ist generell < 1,5, wenn der C_T-Mittelwert der Replikate < 36 ist (2).

Hinweis: Jeder Benutzer sollte seine eigene Reproduzierbarkeit im eigenen Labor bestimmen.

Wasser-Kontrollen

Negativkontrollen sollten eine Kopienzahl (CN) von null ergeben.

Bei einem positiven Testergebnis bei der Wasser-Kontrolle liegt eine Kreuzkontamination vor. Siehe unten, den Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“, um eine Lösung zu finden.

Hilfe zur Fehlerbehebung

Diese Anleitung zur Fehlerbehebung soll Ihnen eine Hilfe geben, falls einmal Probleme auftreten sollten. Weitere Informationen finden Sie auch auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Außerdem beantwortet das Team vom Technischen Service bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und zu den Protokollen in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme, siehe „Kontaktinformationen“ auf Seite 49).

Kommentare und Vorschläge

Negatives Ergebnis für Kontrollgen (ABL) und BCR-ABL-mbcr bei allen Proben – Standard dagegen ist in Ordnung

- | | |
|--|---|
| a) RNA von zu geringer Qualität | Überprüfen Sie immer die RNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.

Führen Sie parallel eine RNA-Positivkontrolle aus Zelllinien (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, Kat.-Nr. 670091) mit. |
| b) Fehlschlagen der reversen Transkription | Überprüfen Sie immer die RNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.

Führen Sie parallel eine RNA-Positivkontrolle aus Zelllinien (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, Kat.-Nr. 670091) mit. |

Negatives Ergebnis für das Kontrollgen (ABL) bei den Proben – Standard dagegen ist in Ordnung

- | | |
|--|---|
| a) RNA von zu geringer Qualität | Überprüfen Sie immer die RNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.

Führen Sie parallel eine RNA-Positivkontrolle aus Zelllinien (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, Kat.-Nr. 670091) mit. |
| b) Fehlschlagen der reversen Transkription | Überprüfen Sie immer die RNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.

Führen Sie parallel eine RNA-Positivkontrolle aus Zelllinien (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, Kat.-Nr. 670091) mit. |

Kommentare und Vorschläge

Signal bei Standard ergibt negatives Ergebnis

- a) Pipettierfehler Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz.
Wiederholen Sie den PCR-Lauf.
- b) Unsachgemäße Lagerung von Kit-Komponenten Lagern Sie den *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit bei -15 °C bis -30 °C und schützen Sie Primer- und Sonden-Mischungen (PPC und PPF) vor Lichteinfluss, siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 13.
Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen.
Aliquotieren Sie die Reagenzien vor der Lagerung.

Negativkontrollen ergeben positives Ergebnis

- Kreuzkontamination Tauschen Sie alle kritischen Reagenzien aus.
Wiederholen Sie das Experiment mit neuen Aliquots sämtlicher Reagenzien.
Handhaben Sie Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsartikel gemäß den allgemein anerkannten Regeln der guten Laborpraxis, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden.

Kein Signal, auch nicht bei Standard-Kontrollen

- a) Pipettierfehler oder Reagenzien vergessen Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz.
Wiederholen Sie den PCR-Lauf.
- b) Inhibitorische Effekte des Probenmaterials, verursacht durch unzureichende Nukleinsäure-Reinigung Wiederholen Sie die RNA-Präparation.
- c) LightCycler: Falscher Detektionskanal gewählt Stellen Sie den Kanal auf F1/F2 oder 530 nm / 640 nm ein.

Kommentare und Vorschläge

- d) LightCycler: Keine Datenerfassung programmiert
- Überprüfen Sie das Zyklenprogramm.
Wählen Sie den Erfassungsmodus "Single" („Einzel“) am Ende jedes Annealing-Schritts des PCR-Programms.

Kein oder schwaches Signal in Proben, während Standard-Kontrollen in Ordnung sind

- a) RNA von zu geringer Qualität oder zu niedriger Konzentration
- Überprüfen Sie immer die RNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.
Führen Sie parallel eine RNA-Positivkontrolle aus Zelllinien (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, Kat.-Nr. 670091) mit.
- b) Fehlschlagen der reversen Transkription
- Überprüfen Sie immer die RNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.
Führen Sie parallel eine RNA-Positivkontrolle aus Zelllinien (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, Kat.-Nr. 670091) mit.

Fluoreszenzintensität zu gering

- a) Unsachgemäße Lagerung von Kit-Komponenten
- Lagern Sie den *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit bei –15 °C bis –30 °C und schützen Sie Primer- und Sonden-Mischungen (PPC und PPF) vor Lichteinfluss, siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 13.
Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen.
Aliquotieren Sie die Reagenzien vor der Lagerung.
- b) Sehr geringe Ausgangsmenge an Target-RNA
- Erhöhen Sie die Menge an Proben-RNA.
Hinweis: Je nach gewählter Methode für die RNA-Präparation können inhibitorische Effekte auftreten.

LightCycler: Fluoreszenzintensität variiert

- a) Pipettierfehler
- Die durch sogenannte „Pipettierfehler“ verursachte Variabilität beim LightCycler kann reduziert werden, indem die Daten im Modus F1/F2 oder 530 nm / 640 nm analysiert werden.

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|---|---|
| b) Unzureichende Zentrifugation der Kapillaren | Der angesetzte PCR-Mix befindet sich noch im oberen Kapillargefäß, oder eine Luftblase ist in der Kapillarenspitze.

Zentrifugieren Sie die mit dem Reaktionsgemisch gefüllten Kapillaren immer, wie im geräte-spezifischen Bedienungshandbuch beschrieben. |
| c) Äußere Oberfläche der Kapillarenspitze verschmutzt | Tragen Sie beim Umgang mit den Kapillaren immer Laborhandschuhe. |

LightCycler: Fehler bei der Standardkurve

- | | |
|-----------------|--|
| Pipettierfehler | Die durch sogenannte „Pipettierfehler“ verursachte Variabilität beim LightCycler kann reduziert werden, indem die Daten im Modus F1/F2 oder 530 nm / 640 nm analysiert werden. |
|-----------------|--|

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle des gesamten Kits wurde mit einem LightCycler 480 Thermocycler durchgeführt. Dieser Kit wird gemäß der ISO-Norm 13485:2003 hergestellt. Analysezertifikate sind auf Anfrage an www.qiagen.com/support/ erhältlich.

Beschränkungen des Tests

Die Anwender müssen in dieser Technologie geschult und mit ihrer Anwendung vertraut sein, bevor Sie dieses Testverfahren anwenden.

Alle mit dem System erhaltenen diagnostischen Ergebnisse dürfen nur im Zusammenhang mit anderen klinischen und/oder labormedizinischen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Leistungscharakteristik des Systems für jede Methode, die im Labor des Anwenders angewendet wird und die durch die QIAGEN Untersuchungen zur Leistungsevaluierung nicht abgedeckt ist, selbst zu validieren.

Achten Sie auf die Haltbarkeitsdaten, die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Verwenden Sie keine Kit-Komponenten, deren Haltbarkeitsdatum abgelaufen ist.

Hinweis: Der Kit wurde gemäß den Studien des "Europe Against Cancer"-Programms (EAC) entwickelt (4, 35) und ist konform mit den aktualisierten internationalen Empfehlungen (3, 5). Er sollte gemäß den Anweisungen in diesem Handbuch und in Kombination mit validierten Reagenzien und Geräten

verwendet werden (siehe „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 10). Bei nicht vorgesehenem Gebrauch (sog. „Off-Label-Use“) dieses Produkts und/oder durch Modifikation seiner Komponenten erlischt jegliche Haftung QIAGENs.

Leistungscharakteristik

Untersuchung nichtklinischer Proben

Material und Methoden

Die Untersuchungen zur Leistungsevaluierung wurden mit einem ABI PRISM 7700 SDS Thermocycler in Kombination mit Reagenzien, die im Abschnitt „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 10 aufgeführt sind, durchgeführt. Durch Äquivalenzstudien wurde der Gebrauch auch mit folgenden Geräten validiert: ABI PRISM 7000 und 7900HT SDS, LightCycler 1.2 und 480 Thermocycler, Rotor-Gene 3000 sowie SmartCycler Thermocycler (6).

Untersuchungen mit nichtklinischen Proben wurden durchgeführt, um die analytische Leistungsfähigkeit des *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kits zu bestimmen. Diese Experimente mit nichtklinischen Proben wurden mit Gesamt-RNA der Zelllinie TOM1, verdünnt in einer konstanten Endmenge Gesamt-RNA der Zelllinie MV4-11, durchgeführt.

Um die Wiederholbarkeit des Assays zu bestimmen, wurden fünf verschiedene Konzentrationen der TOM1-Gesamt-RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg und 0,5 pg) – jeweils verdünnt in MV4-11-Gesamt-RNA – in einer konstanten End-Gesamtmenge von 1000 ng analysiert, und zwar jeweils als Fünffachbestimmung (5 Replikate) pro Lauf und in vier verschiedenen Läufen (siehe Abb. 10).

- TOM1 5×10^{-3}
- TOM1 5×10^{-4}
- TOM1 5×10^{-5}

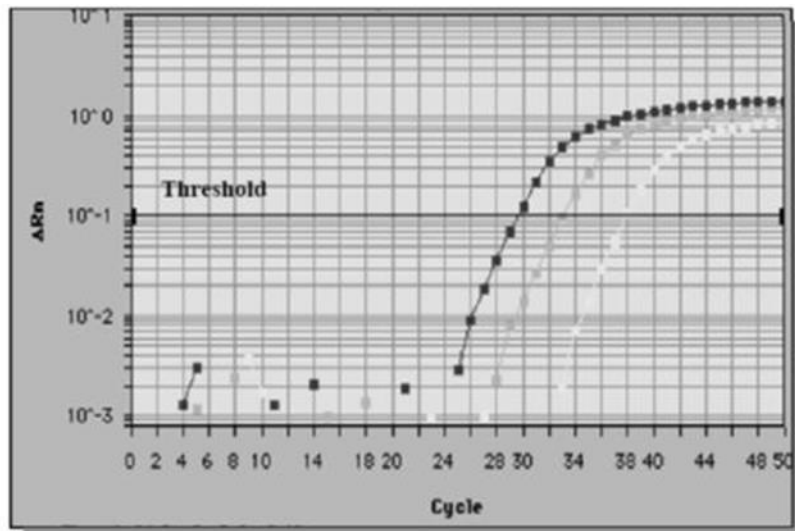


Abbildung 10. Amplifikationsdiagramme von Verdünnungen der TOM1-Gesamt-RNA in negativer MV4-11-Gesamt-RNA entsprechend den folgenden Konzentrationen: 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) und 5×10^{-5} (0,05 ng).

Analytische Daten

In den Tabellen 16 bis 19 sind die Inter-Assay-Analysen mit mittlerem Schwellenwert-Zyklus (C_T -Wert), Standardabweichung (SD), Anzahl Proben (n), Variationskoeffizient (CV), Mittelwert der Kopienzahl (CN) und Mittelwert der normalisierten Kopienzahl (NCN) zusammengefasst.

Tabelle 16. Inter-Assay-Analyse – mbc- und ABL-Zelllinie

Zelllinie	Verdünnung	C_T -Mittelwert	SD	n	CV (%)
mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	29,19	0,26	20	0,88
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	33,70	0,48	20	1,47
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Tabelle 17. Inter-Assay-Analyse – Plasmide

Gen	Plasmid	C _T - Mittelwert	SD	n	CV (%)
mbc _r	F1 (10 ¹ Kopien)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² Kopien)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ Kopien)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ Kopien)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ Kopien)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ Kopien)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ Kopien)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ Kopien)	22,53	0,42	12	1,86

Tabelle 18. Inter-Assay-Analyse – BCR-ABL-mbc_r- und ABL-Zelllinie (CN-Mittelwert)

Zelllinie	Verdünnung	CN- Mittelwert	SD	n	CV (%)
BCR-ABL-mbc _r	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9459,17	100	42,92

Tabelle 19. Inter-Assay-Analyse – BCR-ABL-mbc_r-Zelllinie (NCN-Mittelwert)

Zelllinie	Verdünnung	NCN- Mittelwert*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL- mbc _r	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	267,46	93,22	20	34,85
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	23,54	7,36	20	31,28
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	2,60	2,80	20	107,66

* Nur bei diesen Studienergebnissen wird NCN angegeben als:

$$\frac{\text{BCR-ABL-mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$$

Untersuchung klinischer Proben

Die Untersuchungen zur Leistungsevaluierung wurden mit einem ABI PRISM 7700 SDS Thermocycler in Kombination mit Reagenzien, die im Abschnitt „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 10 aufgeführt sind, durchgeführt. Durch Äquivalenzstudien wurde der Gebrauch auch mit folgenden Geräten validiert: ABI PRISM 7000 und 7900HT SDS, LightCycler 1.2 und 480 Thermocycler, Rotor-Gene 3000 sowie SmartCycler Thermocycler (6).

Eine Gruppe von 26 Labors in 10 europäischen Ländern, die im „Europe Against Cancer“-Programm (EAC) organisiert sind, entwickelten unter Verwendung von Plasmiden, die von IPSOGEN zur Verfügung gestellt wurden, ein standardisiertes Protokoll für die qPCR-Analyse der Haupt-Fusionsgene, die mit Leukämie assoziiert sind, in einem klinischen Umfeld. Das BCR-ABL-p190-Transkript war eines der Fusionsgene (FG), das Gegenstand dieser Studie war. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Validierungsstudie kurz zusammengefasst; die vollständigen Ergebnisse wurden 2003 publiziert (4, 7).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit für Kontrollgen- und Fusionsgen-Plasmid-Standards

Elf Labors führten ein Experiment zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit zwischen den Labors durch, um die Variabilität bei der Messung der Kontrollgen-(CG-) und Fusionsgen-(FG-)Plasmid-Standard-Verdünnungen zu beurteilen. Die Verdünnungen wurden in jedem Labor als Doppelbestimmung getestet. Tabelle 20 fasst für jede Verdünnungsstufe die erhaltenen Mittelwerte, Standardabweichungen und CV-Werte (%) zusammen.

Tabelle 20. Inter-Labor-Reproduzierbarkeit für CG- und FG-Plasmid-Standards

Gen	Verdünnung	Mittelwert	SD des	
			C _T	CV (%)
ABL-Kontrollgen	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
BCR-ABL-mbcr-Fusionsgen	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

Werte für die Expression des Fusionsgen-Transkripts BCR-ABL-mbcr

In den Tabellen 21 und 22 sind jeweils die Expressionswerte für das BCR-ABL-mbcr-FG-Transkript und das ABL-Kontrollgen wiedergegeben, und zwar für Proben der TOM1-Zelllinie sowie für Proben von ALL-Patienten bei Diagnosestellung und von normalen Patienten.

Tabelle 21. Werte der Expression des BCR-ABL-mbcr-FG- und des ABL-CG-Transkripts – C_T-Werte

	C _T -Werte (95-%-Bereich)	
	BCR-ABL-mbcr	ABL
TOM1-Zelllinie	22,8	21,8
ALL-Patientenproben		
Knochenmark (KM) (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
Peripheres Blut (PB) (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Negative Patientenproben		
KM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tabelle 22. Werte der Expression des BCR-ABL-mbcr-FG- und des ABL-CG-Transkripts – Kopienzahlen (CN) und Normalisierte Verhältnis-(Ratio-)Werte (NCN)

	CN-Wert (95-%-Bereich)		NCN-Werte (95-%-Bereich)
	BCR-ABL-mbcr	ABL	CN BCR-ABL- mbcr/CN ABL
ALL-Patientenproben			
KM (n = 17)	9550 (1738–97.724)	11.912 (5012–70.795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91.201 (1905–208.930)	134.896 (4786–114.815)	0,68 (0,4–1,82)
Negative Patientenproben			
KM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

Die ABL-C_T-Werte unterschieden sich zwischen den Proben von normalen und den von Leukämie-Patienten nicht signifikant. Auch zwischen verschiedenen Probenarten (peripheres Blut (PB) oder Knochenmark (KM)) bzw. zwischen Proben verschiedener Leukämietypen (ALL, AML, CML) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Raten falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse

Die Raten falsch-negativer und falsch-positiver Proben wurden unter Verwendung der folgenden Kontrollen berechnet.

- Positivkontrollen: TOM1-Zellen – eine Zelllinie, die bekanntermaßen positiv für das BCR-ABL-p190-Fusionsgen ist; außerdem Patientenproben, die bereits positiv auf p190 getestet worden waren
- Negativkontrollen: negative RNA-Proben – Kontrollen ohne Amplifikation (“No Amplification Controls”; NAC), hergestellt aus *E.-coli*-RNA statt Human-RNA, um auf Kontaminationen bei der PCR zu prüfen, sowie Kontrollen ohne Template (“No Template Controls”; NTC), die Wasser statt Human-RNA enthielten

Die Amplifikation von RNA-Proben des Fusionsgens (FG) erfolgte als Dreifachbestimmung, die des Kontrollgens (CG) als Doppelbestimmung.

Eine falsch-negative Probe wurde definiert als eine positive RNA-Probe mit weniger als 50 % positiven Wells (0/2, 0/3 oder 1/3).

Eine falsch-positive Probe wurde definiert als eine negative Probe mit mindestens 50 % positiven Wells (1/2, 2/3 oder 3/3).

In Tabelle 23 sind die Anzahlen und Prozentsätze der falsch-negativen und falsch-positiven Proben zusammengefasst.

Tabelle 23. Falsch-negative und falsch-positive Proben

Falsch-negativ		Falsch-positiv	
10⁻³	10⁻⁴	FG-Negativkontrolle	NAC/NTC
0 % (0/54)	4 % (3/75)	4,8 % (6/126)	5,8 % (7/120)

Literatur

QIAGEN unterhält eine umfangreiche, regelmäßig aktualisierte Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, in denen QIAGEN Produkte verwendet werden. Mehrere Suchoptionen ermöglichen es Ihnen, die Artikel zu finden, die Sie brauchen – entweder mit der einfachen Suche nach Stichwörtern oder durch Eingabe der Applikation, des Forschungsgebiets, des Titels etc.

Eine vollständige Liste der Referenzen finden Sie online in der QIAGEN Referenz-Datenbank unter www.qiagen.com/RefDB/search.asp. Sie können sich auch an den Technischen Service von QIAGEN wenden, um sie anzufordern.

Zitierte Referenzen

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 435.
2. 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.
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. 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.
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. 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.
7. 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.

Symbole

Folgende Symbole werden auf der Verpackung und den Etiketten verwendet:



Kit enthält Reagenzien für < N > Reaktionen



Zur Verwendung bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Beachten Sie die Anwendungshinweise

Kontaktinformationen

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support oder erhalten Sie unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	Für 24 Reaktionen: ABL-Kontrollgen-Standards, BCR-ABL-mbc-Fusionsgen-Standards, Primer- und Sonden-Mix für ABL, Primer- und Sonden-Mix für BCR-ABL-mbc-Fusionsgen	670023
Rotor-Gene Q MDx – für IVD-validierte Real-Time-PCR-Analysen bei klinisch-diagnostischen Applikationen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör und 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten; Installation und Unterweisung nicht inbegriffen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten, Installation und Unterweisung	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit – für die qualitative Validierung der RNA-Isolierung und reversen Transkription des BCR-ABL-mbc-Fusionsgens		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Zelllinien mit keiner (= negativ), hoher und schwach positiver Expression des BCR-ABL-mbc-Fusionsgens	670091

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

Dieses Produkt ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen. *ipsogen* Produkte dürfen weder wiederverkauft noch für den Wiederverkauf modifiziert oder ohne vorherige schriftliche Zustimmung durch QIAGEN zur Herstellung kommerzieller Produkte verwendet werden.

Die in diesem Dokument gemachten Angaben können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. QIAGEN übernimmt keine Verantwortung für Fehler, die möglicherweise in diesem Dokument vorhanden sind. Die Angaben in diesem Dokument zum Zeitpunkt der Veröffentlichung werden als vollständig und richtig erachtet. In keinem Fall haftet QIAGEN für zufällige, besondere, mehrfache oder Folgeschäden, die aus oder in Verbindung mit dem Gebrauch dieses Dokuments entstehen können.

Die Einhaltung der angegebenen Spezifikationen der *ipsogen* Produkte wird zugesichert. QIAGENS einzige Verpflichtung und der ausschließliche Anspruch des Kunden beschränken sich auf den kostenfreien Ersatz von Produkten für den Fall, dass die Produkte nicht die zugesicherte Leistung einhalten.

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

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des *ipsogen* BCR-ABL1 *mbr* Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der *ipsogen* BCR-ABL1 *mbr* Kit darf nur gemäß den Angaben im *ipsogen* BCR-ABL1 *mbr* Kit Handbuch und ausschließlich mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *ipsogen* BCR-ABL1 *mbr* Kit Handbuch und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich genannten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

HB-1357-002 © 2013–2015, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australien ■ techservice-au@qiagen.com

Belgien ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brasilien ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Dänemark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Deutschland ■ techservice-de@qiagen.com

Finnland ■ techservice-nordic@qiagen.com

Frankreich ■ techservice-fr@qiagen.com

Hongkong ■ techservice-hk@qiagen.com

Indien ■ techservice-india@qiagen.com

Irland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italien ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Kanada ■ techservice-ca@qiagen.com

Luxemburg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexiko ■ techservice-mx@qiagen.com

Niederlande ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norwegen ■ techservice-nordic@qiagen.com

Österreich ■ techservice-at@qiagen.com

Schweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Schweiz ■ techservice-ch@qiagen.com

Singapur ■ techservice-sg@qiagen.com

Südkorea ■ techservice-kr@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

