

November 2017

Håndbok for *ipsogen*[®]

PML-RARA bcr1-sett



Versjon 1

Kvantitativ in vitro-diagnostikk

For bruk med Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS,
Applied Biosystems[®] 7500 sanntids PCR-system, LightCycler[®]-
og SmartCycler[®]-instrumenter

IVD

CE

REF

672123

QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1,

40724 Hilden

TYSKLAND



R5 **MAT**

1108718NO

Innhold

Bruksområde.....	5
Sammendrag og forklaring.....	5
Prinsippene for prosedyren.....	8
Medfølgende materialer.....	11
Innhold i settet.....	11
Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger.....	12
Advarsler og forholdsregler.....	13
Generelle forholdsregler.....	14
Håndtering og oppbevaring av reagensen.....	15
Prosedyre.....	16
Klargjøring av prøve-RNA.....	16
Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon.....	16
Protokoll: qPCR på Rotor Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter med 72-glassrotor.....	19
Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 og 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrument.....	23
Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2 og 2.0-instrumenter.....	28
Protokoll: qPCR på SmartCycler-instrumentet.....	32
Tolkning av resultater.....	36
Prinsipp for dataanalysering.....	36
Resultater.....	37

Feilsøkningsveiledning.....	40
Kvalitetskontroll	43
Begrensninger	43
Ytelsesegenskaper	44
Ikke-kliniske studier	44
Kliniske studier.....	47
Referanser	52
Symboler	53
Bestillingsinformasjon.....	54

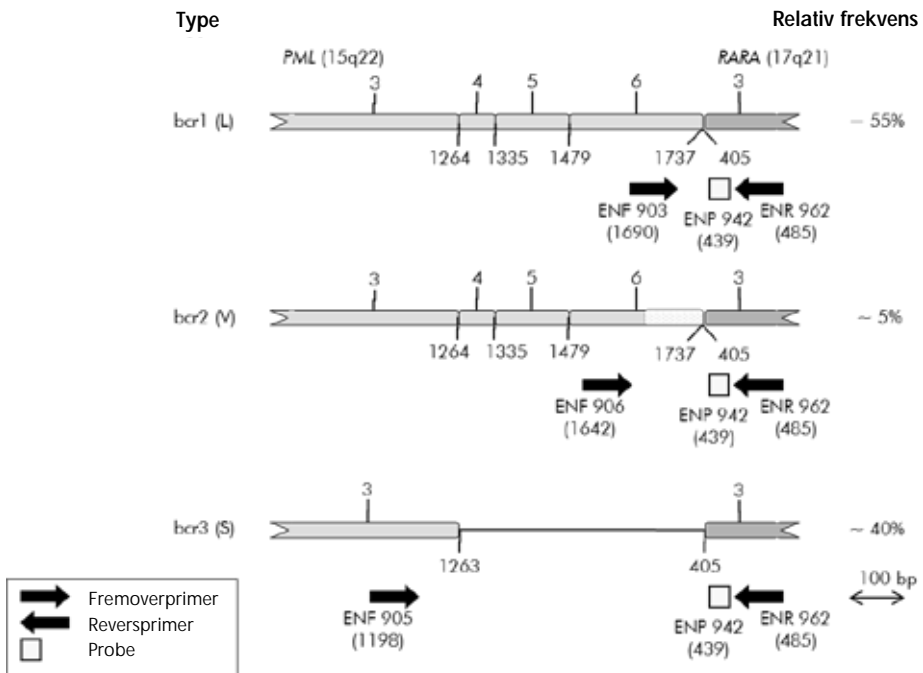
Bruksområde

ipsogen PML-RARA bcr1-settet er beregnet på kvantifisering av PML-RARA type bcr1-fusjonstranskripter i benmarg eller perifere blodprøver i en undergruppe av pasienter med akutt myelogen leukemi (AML) diagnostisert med MR-cytomorfologi og t(15;17)(q22;q21)-translokasjon, med et brytningspunkt i PML intron 6. De oppnådde resultatene skal brukes som et hjelpemiddel for å overvåke effekten av behandlingen hos pasienter som gjennomgår behandling, og for oppfølging av minimal restsykdom (MRD for å overvåke tilbakefall av sykdommen).

Sammendrag og forklaring

PML-RARA-fusjonsgen (FG)-transkriptene, som er det molekulære resultatet av t(15;17)(q22;q21)-translokasjonen, er forbundet med størsteparten av tilfeller av akutt progranulocytteleukemi (APL) (>90 %), et distinkt AML-undersett med M3-cytomorfologi som utgjør 10–15 % av alle tilfeller av AML. Den balanserte resiproke translokasjonen t(15;17) gjør at promyelocytteleukemi (PML)-genet slås sammen med retinoilsyrereseptor-alfa (RARA) for å generere PML-RARA-fusjonsproteinet. Det kimeriske PLM-RARA-proteinet er en transkripsjonsrepressor. Dets uttrykk er forbundet med nedsatt myeloid differensiering, grunnet økt affinitet for det nukleære repressorproteinkomplekset (NcoR), endring av kromatinstruktur av histondeacetylase (HDAC) og hemming av transkripsjon. Behandling med all-trans-retinoinsyre (ATRA) er svært effektivt ved APL, og fungerer som et differensieringsmiddel ved å fremme frisetting av NCoR/HDAC-komplekset og slik gjenopprette normal transkripsjon.

RARA-brytningspunkter oppstår alltid i intron 2. Avhengig av plasseringen av brytningspunkter i PML-området, intron 6, ekson 6 og intron 3, kan de respektive PML-RARA-transkripsjonsundertyperne kalt lange (L eller bcr1), variable (V eller bcr2) og korte (S eller bcr3), dannes (figur 1). Disse transkripsjonsundertyperne representerer henholdsvis 55 %, 5 % og 40 % av tilfellene.



Figur 1. Skjematiske tegning av PML-RARA FG-transkripsjonen dekt av EAC qPCR-primerne og probesettet. For type bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. For type bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. For type bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962. Tallet under primerne og proben viser til deres nukleotidposisjon i den normale gentranskripsjonen. Relativ frekvens viser til andelen av hver type FG-transkripsjoner blant PML-RARA-varianter.

Kombinert behandling med antrasyklinbasert kjemoterapi og ATRA er svært vellykket ved APL, og gir langsiktige remisjoner og sannsynlig helbredelse hos opptil 70 % av nylig diagnostiserte pasienter. Tilbakefall og lave overlevelsesserater observeres imidlertid fremdeles hos 15–25 % av pasienter. Påvisningen av det unike PML-RARA-fusjonsgenet ved bruk av konvensjonell kvalitativ revers transkripsjon-polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) er brukt i stor utstrekning til hurtig diagnostisering og forutsigelse av behandlingsrespons. Denne teknikken har imidlertid sine ulemper, og har relativt lav sensitivitet.

Kvantifisering av PML-RARA-kopinumner ved bruk av kvantitativ PCR (qPCR) i sanntid innebærer en rekke fordeler. Det er en svært følsom og reproducerbar teknikk som også muliggjør en kinetisk evaluering. Analysen av den prognostiske verdien av en veletablert standardisert qPCR-protokoll (EAC-program) hos APL-pasienter under ulike behandlingsfaser har indikert at denne metoden er et robust alternativ for å evaluere MRD, og at risikostratifisering for tilbakefall kan fastslås basert på normalisert PML-RARA-kopinumner. Under analyse etter konsolidering er en positiv qPCR-analyse en sterk prediktor for påfølgende hematologisk tilbakefall. Under vedlikeholdsbehandling og etter avsluttet behandling er en positiv qPCR-test forbundet med høyere risiko for tilbakefall og kortere overlevelse. Risikostratifiseringen for tilbakefall basert på kvantifisering av normalisert PML-RARA-kopinumner (NCN) deler pasienter inn i 3 grupper: de med høy risiko for tilbakefall, de med medium risiko, og de med lav risiko for tilbakefall (1). PML-RARA-overvåkning ved bruk av følsom påvisning av transkripsjonen anses som en vesenlig del av den totale behandlingsstrategien ved APL (se referanse 2 og 3 for mer informasjon), mens behandlingstypen og -intensiteten er modulert hos pasienter med ulik risiko for tilbakefall under oppfølging.

Standardisering og validering av MRD-kvantifiseringsmetoden har blitt etablert i et multisenterprosjekt utført av EAC og publisert i 2003 (4, 5). *ipsogen* PML-RARA bcr1-settet er basert på denne teknikken.

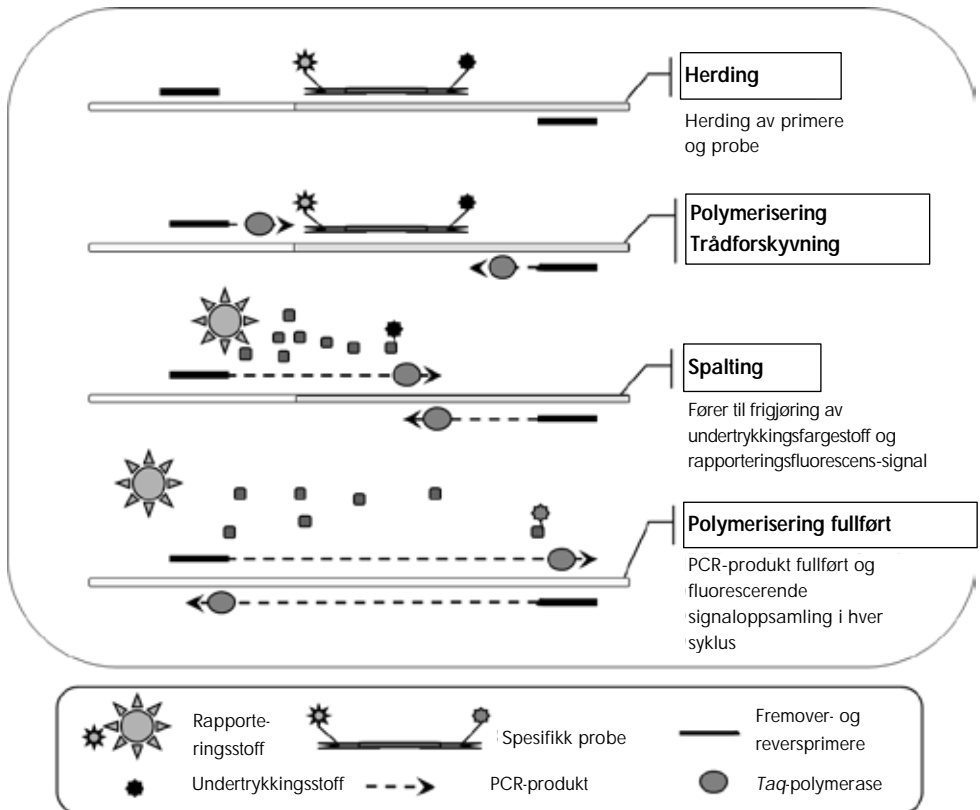
Prinsippene for prosedyren

qPCR-teknikken tillater nøyaktig kvantifisering av PCR-produkter under den eksponensielle fasen av PCR-forsterkningsprosessen. I tillegg kan data fra qPCR innhentes raskt, uten behandling etter PCR, med sanntids påvisning av fluorescerende signaler under og/eller etter PCR-sykling, hvilket drastisk reduserer faren for kontaminering av PCR-produktet. For øyeblikket finnes 3 hovedtyper qPCR-metoder: qPCR-analyse med SYBR® grønt I-fargestoff, qPCR-analyse ved bruk av hydrolyseprober og qPCR-analyse ved bruk av hybridiseringsprober.

Denne analysen benytter qPCR-hydrolyseprinsippet med oligonukleotid med dobbelt fargestoff. Under PCR hybridiseres «fremover»- og «revers»-primere til en spesifikk sekvens. Et oligonukleotid med dobbelt fargestoff inngår i samme blanding. Denne proben, som består av et oligonukleotid merket med et 5' rapporteringsfargestoff og et nedstrøms, 3' undertrykkingsfargestoff (quencher), hybridiseres til en målsekvens i PCR-produktet. qPCR-analyse med hydrolyseprober benytter 5' à 3'-eksonukleaseaktiviteten til *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymerase. Når proben er intakt, fører rapporteringsfargestoffets nærhet til undertrykkingsfargestoffet til suppressert rapporteringsfluorescens, hovedsakelig med Förster-energioverføring.

Under PCR tilkobles proben spesifikt mellom fremover- og reversprimerstedene hvis det aktuelle målet er tilstede. 5' à 3'-eksonukleaseaktiviteten til DNA-polymerase spalter kun proben mellom rapporteringsstoffet og undertrykkingsstoffet hvis proben hybridiseres til målet. Probefragmentene forskyves deretter fra målet, og polymerisering av tråden fortsetter. 3'-enden av proben er blokkert for å forhindre forlengelse av proben under PCR (figur 2). Denne prosessen oppstår i hver syklus og forstyrrer ikke den eksponensielle oppsamlingen av produktet.

Økningen i fluorescenssignal påvises kun hvis målsekvensen komplementerer proben og dermed forsterkes under PCR. På grunn av disse kravene påvises ikke ikke-spesifikk forsterkning. Økningen i fluorescens er derfor direkte proporsjonal med målforsterkningen under PCR.



Figur 2. Reaksjonsprinsipp. Totalt RNA er reverstranskribert, og det genererte cDNA forsterkes med PCR ved bruk av et par spesifikke primere og en spesifikk intern probe med dobbelt fargestoff (FAM™–TAMRA™). Proben bindes til ampliconet under hvert herdingstrinn i PCR. Når *Taq* utvides fra primeren bundet til ampliconet, forskyver det 5'-enden av proben, som deretter brytes ned av 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til *Taq* DNA-polymerase. Spaltingen fortsetter til den gjenværende proben smelter av ampliconet. Denne prosessen frigjør fluorofor og undertrykkingsstoff i løsningen, hvilket separerer dem spatielt og fører til en økning av fluorescens fra FAM og en reduksjon av fluorescens fra TAMRA.

Medfølgende materialer

Innhold i settet

<i>ipsogen PML-RARA bcr1</i>-sett		(24)
Katalognr.		672123
Antall reaksjoner		24
Komponent	Navn	Mengde
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardfortynning for ABL-kontrollgen) (10^3 kopier/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardfortynning for ABL-kontrollgen) (10^4 kopier/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardfortynning for ABL-kontrollgen) (10^5 kopier/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardfortynning for PML-RARA bcr1-fusjonsgen) (10^1 kopier/5 μ l)	F1-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardfortynning for PML-RARA bcr1-fusjonsgen) (10^2 kopier/5 μ l)	F2-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardfortynning for PML-RARA bcr1-fusjonsgen) (10^3 kopier/5 μ l)	F3-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardfortynning for PML-RARA bcr1-fusjonsgen) (10^5 kopier/5 μ l)	F4-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardfortynning for PML-RARA bcr1-fusjonsgen) (10^6 kopier/5 μ l)	F5-PML-RARA bcr1	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL (Primere og probeblanding ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (Primere og probeblanding PML-RARA bcr1-fusjonsgen) [†]	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 μ l
<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit Handbook</i> (engelsk)		1

* Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for ABL-kontrollgenet samt en spesifikk FAM-TAMRA-probe.

[†] Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for PML-RARA bcr1-fusjonsgenet samt en spesifikk FAM-TAMRA-probe.

Merk: Roter og sentrifuger standardfortynningene og primerne og probeblandningene før bruk.

Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på det aktuelle sikkerhetsdatabladet (HMS), som kan skaffes fra produktleverandøren.

Pass på at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

Reagenser

- | Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet
- | Reagenser for revers transkripsjon: De validerte reagensene er Superscript® II (eller Superscript) revers transkriptase, inkluderer 5x ledetrådbuffer, 100 mM DTT (Life Technologies, kat.nr. 18064-022)
- | RNase-hemmer: Den validerte reagensen er RNaseOUT™ (Life Technologies, kat.nr. 10777-019)
- | Sett av dNTP-er, PCR-kvalitet
- | Tilfeldig heksamer
- | MgCl₂
- | Buffer og Taq DNA-polymerase: Validerte reagenser er TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat.nr. 4304437) og LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat.nr. 04535286001)

Forbruksvarer

- I Nukleasefrie aerosolresistente sterile PCR-pipettespisser med hydrofobe filtre
- I 0,5 ml eller 0,2 ml RNase- og DNase-frie PCR-glass
- I Is

Utstyr

- I Mikroliterpipette* dedikert til PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- I Benksentrifuge* med rotor for 0,2 ml/0,5 ml reaksjonsglass (med en maksimumshastighet på 13 000/14 000 rpm)
- I Sanntids PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller andre Rotor-Gene Q-instrumenter; LightCycler 1.2, 2.0 eller 480; ABI PRISM 7000, 7700 eller 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system; eller SmartCycler; og assosiert spesifikt materiale
- I Termisk sykler* eller vannbad* (revers transkripsjon-trinn)

Komplementære reagenser

- I *ipsogen* PML-RARA bcr1-kontrollsett (kat.nr. 672091) er kun til forskningsbruk, består av cellelinjer med negativt, høyt og lavt positivt uttrykk av PML-RARA bcr1-fusjonsgenet, og er for kvalitativ validering av RNA-ekstraksjon og revers transkripsjon

Advarsler og forholdsregler

For bruk i forbindelse med in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på det aktuelle sikkerhetsdatabladet (HMS). Disse er

tilgjengelige online i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety. Her kan du finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Kast prøve- og analyseavfall i henhold til de lokale sikkerhetsforskriftene.

Generelle forholdsregler

Bruk av qPCR-tester forutsetter god laboratoriepraksis, herunder vedlikehold av utstyr, som er dedikert til molekylær biologi og overholder relevante bestemmelser og standarder.

Dette settet er beregnet på bruk i forbindelse med in vitro-diagnostikk. Reagenser og instruksjoner i dette settet er validert for optimal ytelse. Ytterligere fortykning av reagensene eller endring av inkubasjonstider og temperaturer kan føre til feilaktige eller uoverensstemmende data. PPC- og PPF-reagenser kan endres hvis de eksponeres for lys. Alle reagenser er formulert spesifikt for bruk med denne testen. For å oppnå optimal testytelse må det ikke foretas erstatninger.

Bestemmelse av transkripsjonsnivåer ved bruk av qPCR krever både revers transkripsjon av mRNA og forsterkning av generert cDNA ved bruk av PCR. Hele analyseprosedyren må derfor utføres under RNase-/DNase-frie forhold.

Utvis ekstrem forsiktighet for å unngå:

- I RNase/DNase-kontaminering, som kan forårsake nedbrytning av templat-mRNA og generert cDNA
- I mRNA- eller PCR-overføringskontaminering som fører til falskt positive signaler

Vi anbefaler derfor følgende.

- I Bruk nukleasefritt laboratoriestyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonshetteglass) og hansker når du utfører analysen.
- I Bruk nye aerosolresistente pipettespisser for alle pipetteringstrinn for å unngå krysskontaminering av prøvene og reagensene.
- I Klargjør en forhånds-PCR-masterblanding med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.) i et dedikert område der ingen DNA-matriser (cDNA, DNA-plasmid) innføres. Tilsett templat i en separat sone (helst i et eget rom) med spesifikke materialer (pipetter, spisser osv.).
- I Håndter standardfortynningene (C1–3 og F1–5) i et eget rom.

Håndtering og oppbevaring av reagensen

Settene transporteres på tørris og må oppbevares ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ved mottak.

- I Minimer eksponering for lys for primere og probeblandinger (PPC- og PPF-glass).
- I Bland og sentrifuger glassene varsomt før anbrudd.
- I Oppbevar alle settkomponenter i originalbeholderne.

Disse oppbevaringsforholdene gjelder både åpne og uåpne komponenter. Komponenter som oppbevares under andre forhold enn de angitt på etikettene vil kanskje ikke fungere riktig og kan ha en negativ innvirkning på analyseresultatene.

Utløpsdatoer for hver reagens er angitt på de enkelte komponentetikettene. Under riktige oppbevaringsforhold ivaretas produktets ytelse frem til utløpsdatoen trykt på etiketten.

Det er ingenting som tyder på at dette produktet er ustabil. Positive og negative kontroller skal imidlertid kjøres samtidig med ukjente prøver.

Prosedyre

Klargjøring av prøve-RNA

RNA-klargjøring fra pasientprøver (blod eller benmarg) må ha blitt utført med en validert prosedyre. Kvaliteten til analysen avhenger i stor grad på kvaliteten av tilsatt RNA. Vi anbefaler derfor å kvalifisere rensed RNA med agarose**-gelelektroforese eller ved bruk av Agilent® Bioanalyzer® før analysering.

Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon

Ting som skal gjøres før oppstart

- I Klargjør dNTPs, 10 mM hver. Oppbevar ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i aliquoter.
- I Klargjør tilfeldig heksamer, 100 μM . Oppbevar ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i aliquoter.
- I Klargjør MgCl_2 , 50 mM. Oppbevar ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i aliquoter.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Inkuber 1 μg RNA (1–4 μl) i 10 minutter ved $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ og kjøøl ned på is omgående i 5 minutter.
3. Sentrifuger raskt (ca. 10 sekunder, 10 000 rpm) for å samle opp væsken i bunnen av glasset. Oppbevar deretter på is.
4. Klargjør følgende RT-blanding i samsvar med antallet prøver som behandles (tabell 1).

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier.

Tabell 1. Klargjøring av RT-blanding

Komponent	Volum pr. prøve (µl)	Sluttkonsentrasjon
Ledetrådbuffer (følger med Superscript II revers transkriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTPs (10 mM hver, som skal klargjøres på forhånd og oppbevares ved -20 °C i alikvoter)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, følger med Superscript II revers transkriptase)	2,0	10 mM
RNase-hemmer (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
RNase-hemmer (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Tilfeldig heksamer (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II eller Superscript revers transkriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Oppvarmet RNA-prøve (skal tilsettes i trinn 5)	1,0–4,0	50 ng/µl
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet (skal tilsettes i trinn 5)	0,0–3,0	–
Sluttvolum	20,0	–

5. Pipetter 16 µl RT-blanding i hvert PCR-glass. Tilsett deretter 1–4 µl (1 µg) RNA (fra trinn 3), og juster volumet til 20 µl med nukleasefritt vann av PCR-kvalitet (se tabell 2).

Tabell 2. Klargjøring av revers transkripsjonsreaksjon

Komponent	Volum (µl)
RT-blanding	16
Oppvarmet prøve-RNA (1 µg)	1–4
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	0–3
Sluttvolum	20

6. Bland godt og sentrifuger raskt (ca. 10 sekunder, 10 000 rpm) for å samle opp væsken nede i glasset.
7. Inkuber ved 20 °C i 10 minutter.
8. Inkuber ved 42 °C på en termisk sykler i 45 minutter, deretter omgående ved 99 °C i 3 minutter.
9. Kjøl ned på is (for å stanse reaksjonen) i 5 minutter.
10. Sentrifuger raskt (ca. 10 sekunder, 10 000 rpm) for å samle opp væsken i bunnen av glasset. Oppbevar deretter på is.
11. Fortynn slutt-cDNAet med 30 µl nukleasefritt vann av PCR-kvalitet slik at sluttvolumet blir 50 µl.
12. Utfør PCR i samsvar med følgende protokoller, i samsvar med ditt qPCR-instrument.

Protokoll: qPCR på Rotor Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter med 72-glassrotor

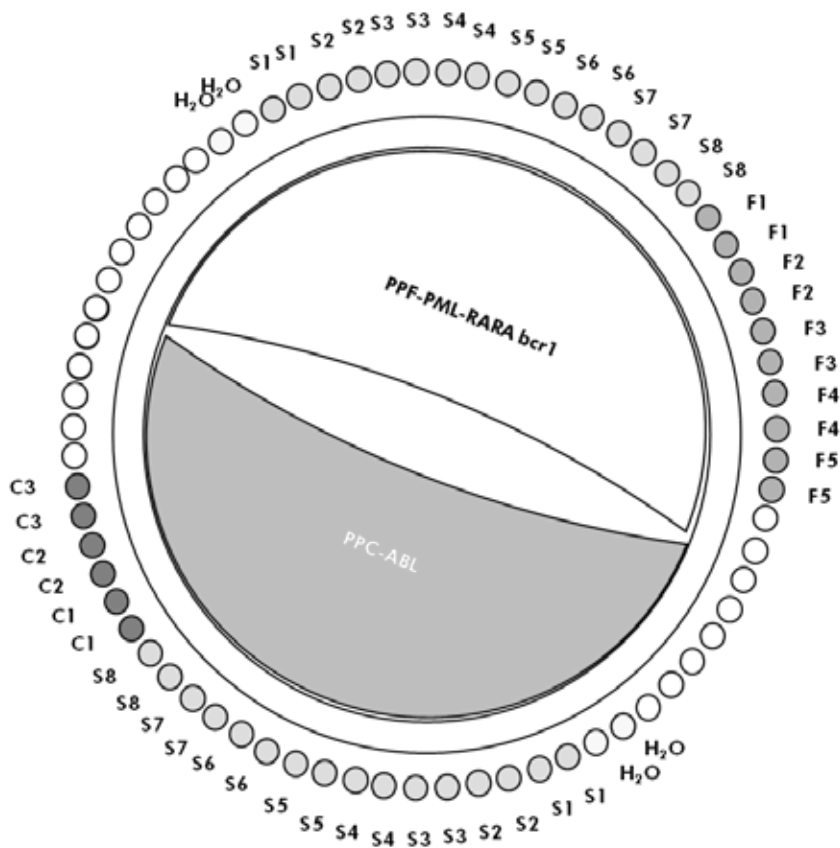
Ved bruk av dette instrumentet anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 3.

Tabell 3. Antall reaksjoner for Rotor-Gene Q-instrumenter med 72-glassrotor

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	2 x 3 reaksjoner (3 fortyninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med PML-RARA bcr1-primere og probeblanding (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
PML-RARA-standard	2 x 5 reaksjoner (5 fortyninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner

Prøvebehandling på Rotor-Gene® Q-instrumenter med 72-glassrotor

Vi anbefaler testing av minst 8 cDNA-prøver i samme eksperiment for å optimere bruken av standardene og primerne og probeblandingene.



Figur 3. Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med *ipsogen* PML-RARA *bcr1*-settet. F1–5: PML-RARA *bcr1*-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: cDNA-prøve; H₂O: vannkontroll.

Merk: Pass på at prøver som skal testes alltid plasseres i posisjon 1 i rotoren. Ellers utfører ikke instrumentet kalibrering under kalibreringstrinnet, og feilaktige fluorescensdata innhentes.

Fyll alle andre posisjoner med tomme glass.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrumenter med 72-glassrotor

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles.

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 4 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 4. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	ABL: 24 + 1 reaksjoner (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reaksjoner (µl)	Sluttkonsen- trasjon
TaqMan Universal PCR masterblanding, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1	25	29	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	162,5	188,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25	25 hver	25 hver	–

3. Dispenser 20 µl av qPCR-forhåndsblendingen pr. glass.
4. Tilsett 5 µl av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 16) i det tilsvarende glasset (totalvolum 25 µl).
5. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.
6. Plasser glassene i den termiske sykleren i samsvar med produsentens anbefalinger.
7. Programmer Rotor-Gene Q-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som indikert i tabell 5.

Tabell 5. Temperaturprofil

Analysemodus	Kvantifisering
Holding	Temperatur: 50 grader Tid: 2 min.
Holding 2	Temperatur: 95 grader Tid: 10 min.
Sykling	50 ganger 95 grader i 15 sek. 60 grader i 1 min. med innhenting av FAM-fluorescens i grønn kanal: Enkel

8. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 5.
9. For Rotor-Gene Q-instrumenter, velg «Slope Correct» (Helningskorreksjon) for analysen. Vi anbefaler å stille inn terskelen ved 0,03.

Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 og 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrument

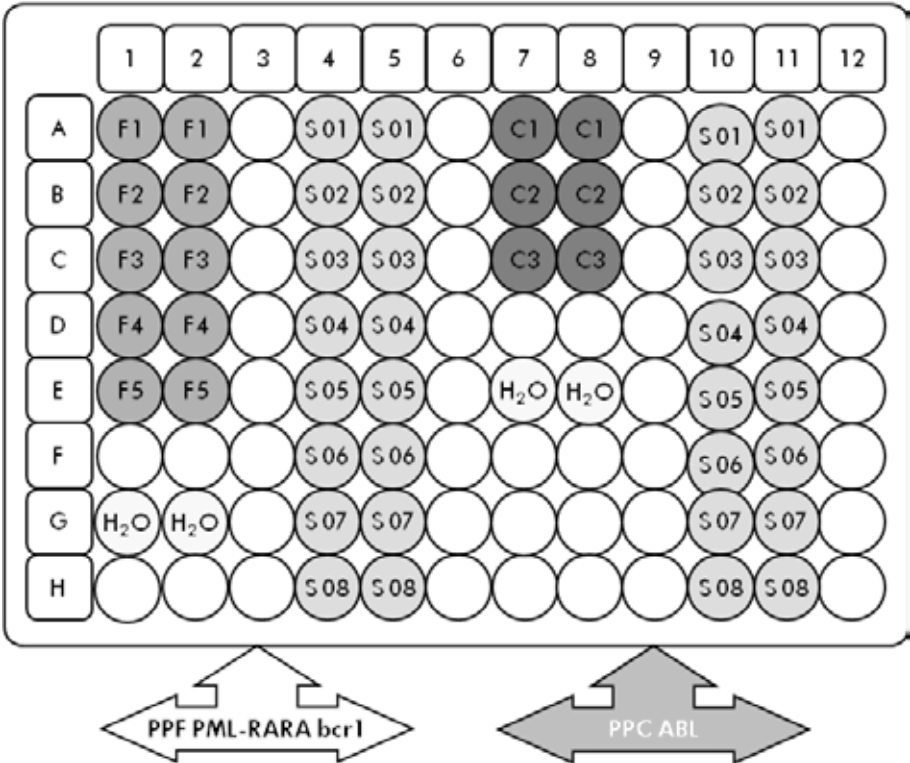
Ved bruk av 96-brønn-plate qPCR-utstyr, anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 6.

Tabell 6. Antall reaksjoner som bruker 96-brønn-plate qPCR-utstyr

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	2 x 3 reaksjoner (3 fortyninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med PML-RARA bcr1-primere og probeblanding (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
PML-RARA bcr1-standard	2 x 5 reaksjoner (5 fortyninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner

Prøvebehandling på ABI PRISM 7000, 7700 og 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrumenter

Vi anbefaler testing av minst 8 cDNA-prøver i samme eksperiment for å optimere bruken av standardene og primerne og probeblandingene. Plateplanen i figur 4 viser et eksempel på et slikt eksperiment.



Figur 4. Anbefalt plateoppsett for ett eksperiment. S: cDNA-prøve; F1–5: PML-RARA bcr1-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: cDNA-prøve; H₂O: vannkontroll.

qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 og 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrumenter

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles.
Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 7 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 7. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	ABL: 24 +1 reaksjoner (µl)	PML-RARA bcr1: 28 +1 reaksjoner (µl)	Sluttkonsentrasjon
TaqMan Universal PCR masterblanding, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1	25	29	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	162,5	188,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25	25 hver	25 hver	–

3. Dispenser 20 µl av qPCR-forhåndsblendingen pr. brønn.
4. Tilsett 5 µl av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 16) i den tilsvarende brønnen (totalvolum 25 µl).
5. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.

6. Lukk platen og sentrifuger raskt (300 x *g*, ca. 10 sekunder).
7. Plasser platen i den termiske sykleren i samsvar med produsentens anbefalinger.
Programmer den termiske sykleren med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 8 for ABI PRISM 7000, 7700 og 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, eller tabell 9 for LightCycler 480-instrumentet.

Tabell 8. Temperaturprofil for ABI PRISM 7000, 7700 og 7900HT SDS, og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system

Analysemodus	Standardkurve — absolutt kvantifisering
 Holding	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
 Holding 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
 Sykling	50 ganger 95 °C i 15 sekunder 60 °C i 1 minutt med innhenting av FAM-fluorescerens; undertrykingsstoff: TAMRA

Tabell 9. Temperaturprofil for LightCycler 480-instrument

Analysemodus	Absolutt kvantifisering («Abs Quant»)
Påvisningsformater	Velg «Simple Probe» (Enkeltprobe) i vinduet for påvisningsformat
Holding	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
Holding 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
Sykling	50 ganger 95 °C i 15 sekunder 60 °C for 1 minutt med innhenting av FAM-fluorescens tilsvarende (483–533 nm) for LC-versjon 01 og (465–510 nm) for LC-versjon 02

8. For ABI PRISM 7000, 7700 og 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, følg trinn 8a. For LightCycler 480, følg trinn 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 og 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system: Vi anbefaler en terskelinnstilling på 0,1 som beskrevet i EAC-protokollen i analysetrinnet og en baselineinnstilling mellom syklus 3 og 15. Start syklingsprogrammet, som angitt i tabell 8.
- 8b. LightCycler 480: Vi anbefaler en Fit-punktanalysemodus med bakgrunn ved 2,0 og terskel ved 2,0. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 9.

Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2 og 2.0-instrumenter

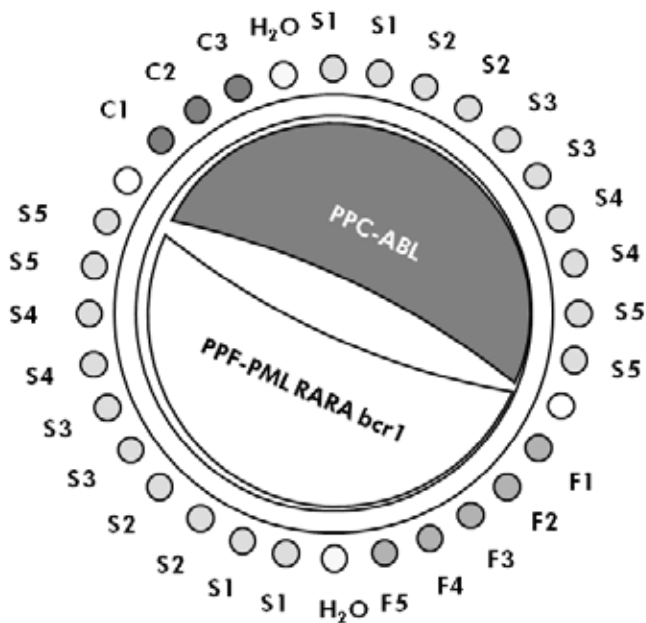
Vi anbefaler å måle prøver i duplikat og kontroller kun én gang med kapillære instrumenter, som angitt i tabell 10.

Tabell 10. Antall reaksjoner for LightCycler 1.2 og 2.0-instrumenter

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	1 x 3 reaksjoner (3 standardfortynninger, testet én gang hver)
Vannkontroll	1 reaksjon
Med PML-RARA bcr1-primere og probeblanding (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
PML-RARA bcr1-standard	1 x 5 reaksjoner (5 standardfortynninger, testet én gang hver)
Vannkontroll	1 reaksjon

Prøvebehandling på LightCycler 1.2 og 2.0-instrumenter

Vi anbefaler testing av minst 5 cDNA-prøver i samme eksperiment for å optimere bruken av standardene og primerne og probeblandingen. Kapillærplanen i figur 5 viser et eksempel på et eksperiment.



Figur 5. Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med *ipsogen* PML-RARA bcr1-settet. F1–5: PML-RARA bc1-standarder; C1–3: ABL-standarder S: ukjent DNA-prøve som skal analyseres; H₂O: vannkontroll.

qPCR på LightCycler 1.2 og 2.0-instrumenter

Merk: På grunn av bestemte teknologiske krav, må LightCycler-eksperimenter utføres ved bruk av spesifikke reagenser. Vi anbefaler å bruke LightCycler TaqMan Master og å følge produsentens instruksjoner for klargjøring av Master Mix 5x.

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles.
Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 11 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 20 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 11. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	ABL: 14 + 1 reaksjoner (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaksjoner (µl)	Sluttkonsentrasjon
Nylig klargjort LightCycler TaqMan masterblanding, 5x	4,0	60	68,0	1x
Primere og probeblanding, 25x	0,8	12	13,6	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	10,2	153	173,4	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	5,0 hver	–
Totalvolum	20,0	20 hver	20,0 hver	–

3. Dispenser 15 µl av qPCR-forhåndsblendingen pr. kapillær.
4. Tilsett 5 µl av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 16) i det tilsvarende glasset (totalvolum 20 µl).

5. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.
6. Plasser kapillærene i adapterne som følger med apparatet, og sentrifuger raskt (700 x g, ca. 10 sekunder).
7. Last kapillærene inn i den termiske syklere i henhold til produsentens anbefalinger.
8. Programmer LightCycler 1.2 eller 2.0-instrumenter med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 12.

Tabell 12. Temperaturprofil

Analysemodus	Kvantifisering
 Holding	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter Stigning: 20
Sykling	50 ganger 95 °C i 10 sekunder; stigning: 20 60 °C i 1 minutt; stigning: 20; med innhenting av FAM-fluorescence: Enkel
 Holding 2	45 °C i 1 minutt; stigning: 20

9. For LightCycler 1.2, følg trinn 9a. For LightCycler 2,0, følg trinn 9b.
 - 9a. LightCycler 1.2: F1/F2 og modusen «2nd derivative analysis» (2. derivative analyse) er anbefalt. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 12.
 - 9b. LightCycler 2.0: Vi anbefaler bruk av automatisert (F''max) analyse på LightCycler 2.0 programvareversjon 4.0 for å oppnå reproducerbare resultater. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 12.

Protokoll: qPCR på SmartCycler-instrumentet

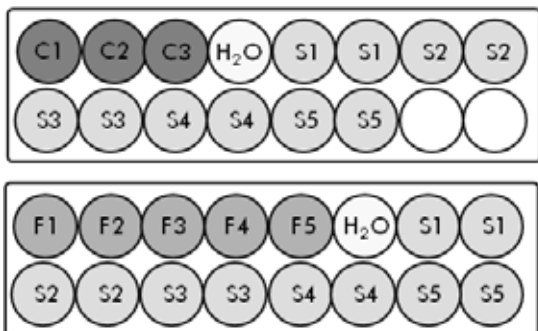
Ved bruk av dette instrumentet anbefaler vi å måle prøver i duplikat og kontroller kun én gang med kapillære instrumenter, som angitt i tabell 13.

Tabell 13. Antall reaksjoner for SmartCycler-instrumentet

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	1 x 3 reaksjoner (3 standardfortynninger, testet én gang hver)
Vannkontroll	1 reaksjon
Med PML-RARA bcr1-primere og probeblanding (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
PML-RARA bcr1-standard	1 x 5 reaksjoner (5 standardfortynninger, testet én gang hver)
Vannkontroll	1 reaksjon

Prøvebehandling på SmartCycler-instrumentet

Vi anbefaler testing av minst 5 cDNA-prøver i samme eksperiment for å optimere bruken av standardene og primerne og probeblandingen. To blokk-planen i figur 6 viser et eksempel.



Alle analysene på den første blokken utføres med PPC-ABL

Alle analysene på denne andre blokken utføres med PPF-PML-RARA bcr1

Figur 6. Anbefalt plateoppsett for ett eksperiment. S: cDNA-prøve; F1–5: PML-RARA bcr1-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: cDNA-prøve; H₂O: vannkontroll.

qPCR på SmartCycler-instrumentet

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles.

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 14 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Andre volum inkluderer for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 14. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	ABL: 14 + 1 reaksjoner (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaksjoner (µl)	Sluttkonsentrasjon
TaqMan Universal PCR masterblanding, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1	15	17	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	97,5	110,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25	25 hver	25 hver	–

- Dispenser 20 µl av qPCR-forhåndsblendingen pr. brønn.
- Tilsett 5 µl av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 16) i det tilsvarende glasset (totalvolum 25 µl).
- Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.
- Last prøvene inn i den termiske syklere i henhold til produsentens anbefalinger.
- Programmer SmartCycler-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som indikert i tabell 15.

Tabell 15. Temperaturprofil

 Holding 	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
 Holding 2 	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
 Sykling 	50 ganger 95 °C i 15 sekunder 60 °C i 1 minutt med innhenting: Enkel

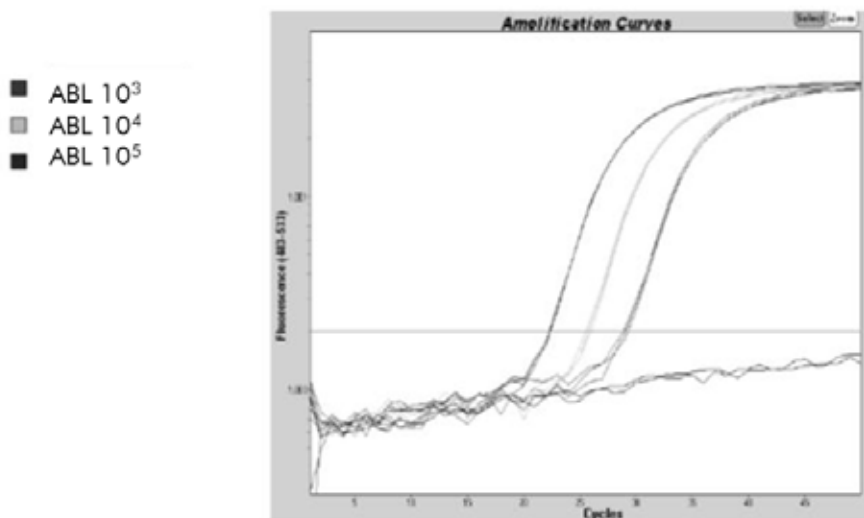
8. Vi anbefaler en terskelinnstilling ved 30. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 15.

Tolkning av resultater

Prinsipp for dataanalyse

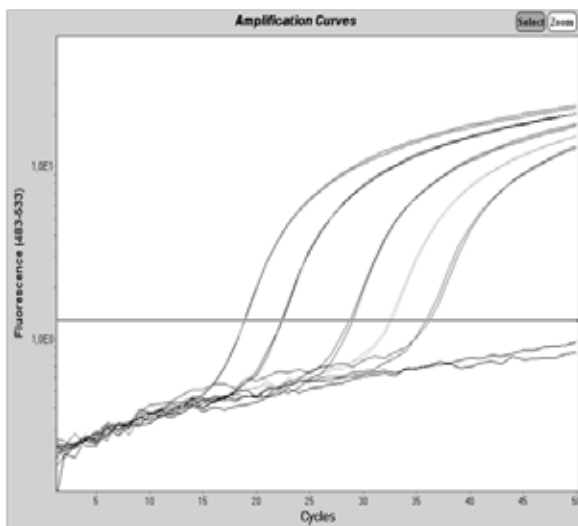
Ved bruk av TaqMan-teknologi kalles antallet PCR-sykluser som kreves for å påvise et signal over terskelen for terskelsyklus (C_T), og er direkte proporsjonalt med mengden av målet som finnes på starten av reaksjonen.

Ved bruk av standarder med et kjent antall molekyler kan man fastslå en standardkurve og bestemme den nøyaktige mengden av målet som i testprøven. *ipsogen*-standardkurvene er plasmidbaserte, vi bruker 3 plasmidstandardfortynninger for ABL-kontrollgenet (CG) og 5 standardfortynninger for fusjonsgenet (PML-RARA bcr1) for å sikre nøyaktige standardkurver. Figur 7 og 8 viser et eksempel på TaqMan-forsterkningskurver oppnådd med *ipsogen* PML-RARA bcr1-settet.



Figur 7. Påvisning av ABL-standarder (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ og 10⁵ kopier/5 µl.

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



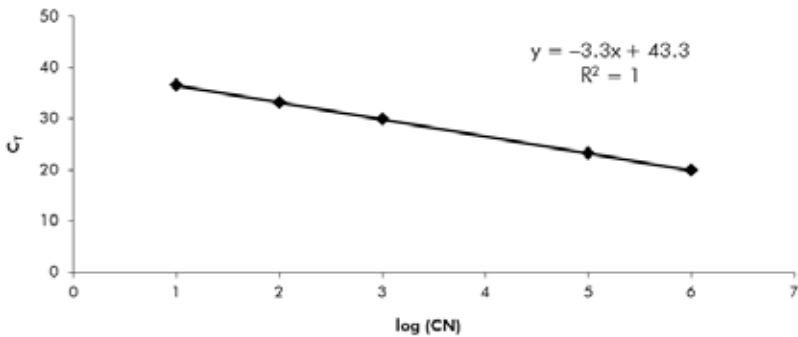
Figur 8. Påvisning av PML-RARA bcr1-standardpåvisning (F1–F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ og 10⁶ kopier/5 μ l.

Resultater

Standardkurve og kvalitetskriterier

Rådata kan limes inn i en Excel[®]-fil for analysering.

For hvert gen (ABL og PML-RARA), plottes C_T-verdier oppnådd fra plasmidstandardfortynninger i henhold til loggkopinummeret (3, 4 og 5 for C1, C2 og C3; 1, 2, 3, 5 og 6 for F1, F2, F3, F4 og F5). Figur 9 viser et eksempel på den teoretiske kurven beregnet på 5 standardfortynninger.



Figur 9. Teoretisk kurve beregnet fra 5 standardfortynninger. En lineær regresjonskurve ($y = ax + b$) beregnes for hvert gen (ABL og PML-RARA), der a er helningen av linjen og b er y-skjæringspunktet, som er y-koordinatet for punktet der linjen krysser y-aksen. Dens ligning og bestemmelseskoeffisient (R^2) er skrevet ut på grafen.

Siden standarder er ti-gangers fortynninger, er den teoretiske helningen av kurven $-3,3$. En helning mellom $-3,0$ og $-3,9$ er akseptabelt så lenge R^2 er $>0,95$ (6). En verdi for $R^2 >0,98$ er imidlertid ønskelig for å oppnå nøyaktige resultater (7).

Normalisert kopinumre (NCN)

ABL-standardkurven skal brukes til å forvandle C_T -råverdier (oppnådd med PPC-ABL) for ukjente prøver til ABL-kopinumre (ABL_{CN}).

PML-RARA-standardkurven skal brukes til å forvandle C_T -råverdier (oppnådd med PPF-PML-RARA) for ukjente prøver til PML-RARA-kopinumre ($PML-RARA_{CN}$).

Forholdet av disse CN-verdiene gir det normaliserte kopinumret (NCN):

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

MRD-verdi

Verdien for minimal restsykdom (MRD) er forholdet mellom normalisert CG-uttrykk av FG i oppfølging $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ og diagnostiske prøver $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

Sensitivitet

Sensitiviteten (SENSv) beregnes ut fra det relative uttrykket av FG ved diagnostisering $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ og CG-uttrykk $(CG_{CN,FUP})$ i oppfølgingsprøven.

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

Kvalitetskontroll på ABL-verdier

Dårlig RNA-kvalitet eller problemer under qPCR-trinnene fører til lav ABL_{CN} . Vi anbefaler å forkaste resultater fra prøver som gir $ABL_{CN} < 1318$ (lavere verdi av 95 % KI fra pasientprøver i EAC-studien, referanse 5).

Reproduserbarhet mellom replikater

Variasjon innen C_T -verdier mellom replikater skal være < 2 , tilsvarende en 4-gangers endring av kopinumrerverdier.

Variasjon innen C_T -verdier mellom replikater er som regel $< 1,5$ hvis gjennomsnittlig C_T -verdi av replikatene er < 36 (6).

Merk: Hver bruker bør måle sin egen reproduserbarhet i laboratoriet sitt.

Vannkontroller

Negative kontroller skal gi null CN.

En positiv vannkontroll skyldes krysskontaminering. Se «Feilsøkingsveiledning» nedenfor for å finne en løsning.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. For mer informasjon kan du rådføre deg med klinisk koordinator eller gå til www.qiagen.com.

Kommentarer og forslag

Negativt resultat for kontrollgenet (ABL) og PML-RARA bcr1 i alle prøvene — standard ok

- | | |
|--|---|
| a) Dårlig RNA-kvalitet | Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091)*) parallelt. |
| b) Feil i revers transkripsjon-trinnet | Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091)*) parallelt. |

Negativt resultat for kontrollgenet (ABL) i prøvene — standard ok

- | | |
|------------------------|---|
| a) Dårlig RNA-kvalitet | Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091)*) parallelt. |
|------------------------|---|

Kommentarer og forslag

-
- b) Feil i revers transkripsjon-trinnet
- Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.
- Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA (*ipsogen* PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091)*) parallelt.

Standardsignal negativt

- a) Pipetteringsfeil
- Kontroller pipetteringsplanen og oppsettet av reaksjonen.
- Gjenta PCR-kjøringen.
- b) Uegnet oppbevaring av settkomponenter
- Oppbevar *ipsogen* PML-RARA bcr1-settet ved –15 til –30 °C og oppbevar primere og prøveblandinger (PPC og PPF) beskyttet mot lys. Se «Håndtering og oppbevaring av reagensen», side 15.
- Unngå gjentatt frysing og tining.
- Alikvoter reagenser for oppbevaring.

Negative kontroller er positive

- Krysskontaminering
- Skift ut alle essensielle reagenser.
- Gjenta eksperimentet med nye alikvoter av alle reagenser.
- Håndter alltid prøver, settkomponenter og forbruksvarer i samsvar med normalt akseptert praksis for å forhindre overføring av kontaminering.

Manglende signal, selv i standardkontroller

- a) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser
- Kontroller pipetteringsplanen og oppsettet av reaksjonen.
- Gjenta PCR-kjøringen.
- b) Hemmende effekter på prøvematerialet, forårsaket av utilstrekkelig rensing
- Gjenta RNA-klargjøringen.

Kommentarer og forslag

-
- | | |
|--|--|
| c) LightCycler: Feil påvisningskanal valgt | Still kanalinnstillingen til F1/F2 eller 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Ingen datainnhenting programmert | Kontroller syklusprogrammene.
Velg innhentingsmodusen «enkel» på slutten av hvert herdingssegment i PCR-programmet. |

Manglende eller lavt signal i prøver, men ok standardkontroller

- | | |
|--|---|
| a) Dårlig RNA-kvalitet eller lav konsentrasjon | Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091)*) parallelt. |
| b) Feil i revers transkripsjon-trinnet | Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091)*) parallelt. |

Fluorescensintensiteten er for lav

- | | |
|--|---|
| a) Uegnet oppbevaring av settkomponenter | Oppbevar <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-settet ved –15 til –30 °C og oppbevar primere og probeblandinger (PPC og PPF) beskyttet mot lys. Se «Håndtering og oppbevaring av reagensen», side 15.
Unngå gjentatt frysing og tining.
Alikvoter reagenser for oppbevaring. |
| b) Svært lav intiell mengde av mål-RNA | Øk mengden av prøve-RNA.
Merk: Avhengig av valgt metode for RNA-klargjøring, kan det oppstå hemmende effekter. |

LightCycler: Fluorescensintensiteten varierer

- | | |
|---------------------|---|
| a) Pipetteringsfeil | Variabilitet forårsaket av en såkalt «pipetteringsfeil» kan reduseres ved å analysere data i F1/F2 eller 530 nm/640 nm-modus. |
|---------------------|---|

Kommentarer og forslag

-
- | | |
|---|---|
| b) Utstilrekkelig sentrifugering av kapillærene | Den klargjorte PCR-blandingen kan fremdeles befinne seg i det øvre karet av kapillæren, eller en luftboble kan sitte fast i kapillærspissen.

Sentrifuger alltid kapillærer med reaksjonsblandingen, som beskrevet i brukerhåndboken for det relevante apparatet. |
| c) Utsiden av kapillærspissen er skitten | Bruk alltid hansker ved håndtering av kapillærene. |

LightCycler: Feil i standardkurven

Pipetteringsfeil

Variabilitet forårsaket av en såkalt «pipetteringsfeil» kan reduseres ved å analysere data i F1/F2 eller 530 nm/640 nm-modus.

* *ipsogen* PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091, er kun til forskningsbruk. Skal ikke brukes i diagnostikk. Det fremmes ingen krav eller representasjon om å levere informasjon for diagnostisering, forebygging eller behandling av sykdom.

Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av det fullstendige settet er utført på et LightCycler 480-instrument. Dette settet er produsert i henhold til ISO 13485:2003-standarden. Analysesertifikater er tilgjengelige på anmodning fra www.qiagen.com/support/.

Begrensninger

Brukerne må ha opplæring og kjennskap til denne teknologien før bruk av denne enheten. Dette settet skal brukes i samsvar med instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med et validert instrument nevnt i "Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger", side 12.

Alle diagnostiske resultater som genereres må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn. Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, og som ikke dekkes av QIAGEN ytelsesstudier.

Det er viktig å være oppmerksom på utløpsdatoer som er trykket på boksen og etikettene på alle komponenter. Bruk ikke komponenter med utløpt dato.

Merk: Settet er utformet i henhold til studiene fra «Europe Against Cancer» (EAC) (4, 5). Det skal brukes i samsvar med instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med validerte reagenser og instrumenter. Alt bruk som ikke overholder instruksjonene og/eller modifisering av komponentene fører til at QIAGENs ansvar oppheves.

Ytelsesegenskaper

Ikke-kliniske studier

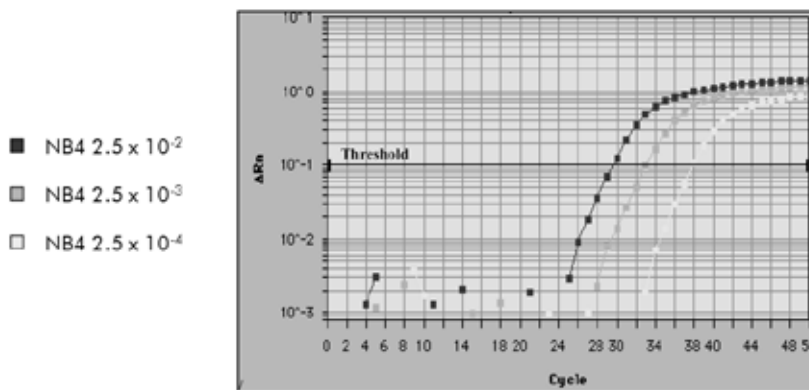
Materialer og metoder

Ytelseevaluering ble utført på en ABI PRISM 7700 SDS, i kombinasjon med reagenser oppført på siden «Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger», side 12. Ekvivalensstudier validerte dens bruk på følgende instrumenter: ABI PRISM 7000 og 7900HT SDS, LightCycler 1.2 og 480, Rotor-Gene 3000 og SmartCycler.

Ikke-kliniske studier ble utført for å fastslå den analytiske ytelsen til *ipsogen* PML-RARA bcr1-settet. Disse ikke-kliniske laboratoriestudiene ble utført på totalt RNA fra NB4-cellelinjen fortynt i en konstant sluttmengde av MV4-11-cellelinjens totale RNA.

For å fastslå analysens repeterbarhet ble 5 ulike konsentrasjoner av totalt RNA for NB4 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg og 0,5 pg) fortynt i totalt RNA for MV4-11, i en konstant total

sluttmengde på 200 ng analysert i 5 replikater pr. kjøring og i 4 ulike kjøring. Prøvene med 5 pg og 0,5 pg NB4-RNA i MV4-11-RNA var for lave til å gi resultater (figur 10).



Figur 10. Forsterkningsplotter med $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng), og $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng) fortyninger av totalt RNA for NB4 i MV4-11-negativt totalt RNA.

Analytiske data

Tabell 16–19 viser inter-assay-analysene med gjennomsnittlig terskelsyklus (C_T), standardavvik (SD), antall prøver (n), variasjonskoeffisient (CV), gjennomsnittlig kopinummer (CN) og gjennomsnittlig normalisert kopinummer (NCN).

Tabell 16. Inter- og intra-assay-analyser – cellelinje PML-RARA og ABL

Cellelinje	Fortynning	Inter-assay-analyse			Intra-assay-analyse		
		Gj.sn. C _T	SD	n	CV (%)	Min. CV	Maks. CV
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	–	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

Tabell 17. Inter-assay-analyse – plasmider

Gen	Plasmid	Gj.sn. C _T	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 ¹ kopier)	35,95	0,29	8	0,79
	F2 (10 ² kopier)	32,25	0,59	8	1,84
	F3 (10 ³ kopier)	28,71	0,55	8	1,90
	F4 (10 ⁵ kopier)	22,14	0,49	7	2,23
	F5 (10 ⁶ kopier)	18,64	0,72	8	3,84
ABL	C1 (10 ³ kopier)	28,85	0,76	7	2,62
	C2 (10 ⁴ kopier)	25,25	0,71	8	2,82
	C3 (10 ⁵ kopier)	21,74	0,81	8	3,74

Tabell 18. Inter-assay-analyse – cellelinje PML-RARA bcr1 og ABL (gj.sn. CN)

Cellelinje	Fortynning	Gj.sn. CN	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 µg)	583,95	149,19	20	25,55
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	44,98	12,25	20	27,23
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	4,91	1,55	19	31,52
ABL	–	35 171,47	22 448,3	99	63,83

Tabell 19. Inter-assay-analyse – cellelinje PML-RARA bcr1 (gj.sn. NCN)

Cellelinje	Fortynning	Gj.sn. NCN*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	271,4	150,00	20	55,56
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14
ABL	–	35 171,47	22 448,3	99	63,83

* Utelukkende for disse studieresultatene oppgis NCN som $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$.

Kliniske studier

Ytelseevaluering ble utført på en ABI PRISM 7700 SDS, i kombinasjon med reagenser oppført på siden «Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger», side 12. Ekvivalensstudier validerte dens bruk på følgende instrumenter: ABI PRISM 7000 og 7900HT SDS, LightCycler 1.2 og 480, Rotor-Gene 3000 og SmartCycler.

En gruppe med 26 laboratorier, i 10 europeiske land, organisert i en EAC-overensstemmende handling, brukte plasmider fra *ipsogen* til å etablere en standardisert protokoll for qPCR-analyse av de viktigste leukemiassosierte fusjonsgenene i det kliniske miljøet. PML-RARA bcr1-transkripsjonen var ett av fusjonsgenene (FG) inkludert i studien. Vi presenterer følgende sammendrag av denne valideringsstudien – fullstendige resultater ble publisert i 2003 (3, 4).

Reproduserbarhet mellom laboratorier for CG- og FG-plasmidstandarder

Totalt 11 laboratorier utførte et reproduserbarhetseksperiment mellom laboratorier for å evaluere variasjonen innen målinger av CG- og FG-plasmidstandardfortynninger. Fortynninger ble utført i duplikat ved hver institusjon. Tabell 20 rapporterer gjennomsnittsverdi, standardavvik og CV (%) for hver fortynning.

Tabell 20. Reproduserbarhet mellom laboratorier for CG- og FG-plasmidstandarder

Gen	Fortynning	Gjennomsnitt	C _T SD	CV (%)
ABL-kontrollgen	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
PML-RARA bcr1-fusjonsgen	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

Uttrykksverdier for PML-RARA bcr1 FG-transkripsjon

Tabell 21 og 22 viser uttrykksverdiene for PML-RARA bcr1 FG-transkripsjon og ABL CG, for NB4-cellelinjen, for APL-pasienter ved diagnostisering, og for negative kontrollpasienter.

Tabell 21. Uttrykksverdier for PML-RARA bcr1 FG-transkripsjon og ABL CG – C_T-verdier

	C _T -verdier (95 % område)	
	PML-RARA bcr1	ABL
NB4-cellelinje	24,7	23,7
APL-pasientprøver		
Benmarg (n = 14)	25,6 (23,1–27,5)	24,5 (21,7–28,5)
Perifert blod (n = 9)	25,7 (23,7–29,4)	24,6 (22,0–27,4)
Negative pasientprøver		
Benmarg (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Perifert blod (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

ABL CT-verdier varierte ikke signifikant mellom normale og leukemiske prøver, eller mellom prøvetyper (PB eller BM) eller leukemiprøver fra pasienter diagnostisert med APL.

Tabell 22. Uttrykksverdier for PML-RARA bcr1 FG-transkripsjon og ABL CG – CN- og NCN-verdier

	CN-verdier (95 % område)		NCN-verdier (95 % område)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Pasientprøver			
Benmarg (n = 14)	5129 (1480–25 704)	1538,7 (133,2–46 781,28)	0,30 (0,09–1,82)
Perifert blod (n = 9)	3891 (475–14 454)	1400,76 (50,27–11 274)	0,36 (0,11–0,78)
Negative pasientprøver			
Benmarg (n = 26)	–	19 201 (12 922–25 480)	–
Perifert blod (n = 74)	–	21 136 (17 834–24 437)	–

Falskt positive og falskt negative rater

Falskt positive og falskt negative rater ble beregnet ved bruk av følgende kontroller.

- I Positive kontroller: NB4-celler, en cellelinje godt kjent for dens positivitet for PML-RARA bcr1 FG; pasientprøver allerede evaluert for PML-RARA bcr1-positivitet
- I Negative kontroller: Negative RNA-prøver, ingen forsterkningskontroller (NAC) bestående av *E. coli*-RNA i stedet for humant RNA for å se etter PCR-kontaminasjon, og ingen templatkontroller (NTC), som inneholdt vann i stedet for humant RNA

Forsterkning av RNA-prøver for FG ble utført i triplikat og i duplikat for CG.

En falskt negativ prøve ble definert som en positiv RNA-prøve med under 50 % positive brønner (0/2, 0/3 eller 1/3).

En falskt negativ prøve ble definert som en positiv RNA-prøve med minst 50 % positive brønner (1/2, 2/3 eller 3/3).

Tabell 23 viser antallet og prosentandelen av falskt negative og falskt positive prøver.

Tabell 23. Falskt positive og falskt negative prøver











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

Referanser

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.
5. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:

 <N>	Inneholder nok reagens til <N> reaksjoner
	Brukes innen
	Medisinsk utstyr til in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Partinummer
	Materialnummer (dvs., komponentens dokumentasjon)
	Artikkelnummer
	Temperaturbegrensning
	Produsent
	Se bruksanvisningen

Endringshistorikk for dokument

R5, november 2017

Merknader lagt til om at *ipsogen* PML-RARA bcr1 kontrollsett, kat.nr. 672091, kun er beregnet til bruk ved forskning; mindre skrivefeil rettet opp.

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	For 24 reaksjoner: ABL-kontrollgenstandarder, PML-RARA bcr1-fusjonsgenstandarder, primere og probeblanding ABL, primere og probeblanding PML-RARA bcr1-fusjonsgen	672123
Rotor-Gene Q MDx – for IVD-validert sanntids PCR-analyse i kliniske bruksområder		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Sanntids PCR-sykler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Sanntids PCR-sykler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring	9002033
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollsett – for kvalitativ validering av RNA-ekstraksjon og revers transkripsjon av PML-RARA bcr1-fusjonsgenet		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Cellelinjer med negativt, høyt og lavt positivt uttrykk av PML-RARA bcr1-fusjonsgenet	672091*

* *ipsogen* PML-RARA bcr1-kontrollsett, kat.nr. 672091, er kun til forskningsbruk. Skal ikke brukes i diagnostikk. Det fremmes ingen krav eller representasjon om å levere informasjon for diagnostisering, forebygging eller behandling av sykdom.

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, se den respektive håndboken eller brukerhåndboken for QIAGEN-settet. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller på forespørsel fra QIAGENS tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

Dette produktet er beregnet på bruk i In vitro-diagnostikk. *Ipsogen*-produkter kan ikke videreselges, modifiseres for videresalg eller brukes til å produsere kommersielle produkter uten skriftlig godkjenning fra QIAGEN.

Informasjon i dette dokumentet kan endres uten forvarsel. QIAGEN tar ikke ansvar for noen feil som vises i dette dokumentet. Dette dokumentet anses å være fullstendig og nøyaktig på utgivelsestidspunktet. QIAGEN skal ikke under noen omstendigheter være ansvarlige for utilsiktede, spesielle, multipliserte eller følgeskader i forbindelse med eller som følge av bruk av dette produktet.

Ipsogen-produkter er garantert å oppfylle sine angitte spesifikasjoner. QIAGENS eneste ansvar og kundens eneste godtgjørelse er begrenset til kostnadsfri erstatning av produkter hvis produktene ikke fungerer i samsvar med garantien.

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

Begrenset lisensavtale for *ipsogen* PML-RARA bcr1-settet

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

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

For oppdaterte lisensvilkår, se www.qiagen.com.

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

