

# Håndbok for *ipsogen*<sup>®</sup> WT1 ProfileQuant<sup>®</sup>-settet (ELN\*)



Versjon 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostikk

For bruk med Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT SDS,  
Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 sanntids PCR-system og  
LightCycler<sup>®</sup>-instrumenter



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1072503NO

**ELN** LeukemiaNet<sup>®</sup>  
European



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi og gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og -tjenester sikrer suksess fra prøve til resultat.

### **QIAGEN setter standardene innen:**

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Vårt mål er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Du finner mer informasjon på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Innhold

<b>Bruksområde</b>	<b>4</b>
<b>Sammendrag og forklaring</b>	<b>4</b>
<b>Prinsippene for prosedyren</b>	<b>5</b>
<b>Medfølgende materialer</b>	<b>8</b>
Settets innhold	8
<b>Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger</b>	<b>9</b>
<b>Advarsler og forholdsregler</b>	<b>10</b>
Generelle forholdsregler	10
<b>Håndtering og oppbevaring av reagensen</b>	<b>11</b>
<b>Prosedyre</b>	<b>12</b>
Klargjøring av prøve-RNA	12
Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon	12
Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor- Gene Q 5plex HRM-instrumenter med 72-glassrotor	15
Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og LightCycler 480-instrument	19
Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2-instrument	24
<b>Tolkning av resultater</b>	<b>28</b>
Prinsipp for dataanalysering	28
Resultater	29
Feilsøkingsveiledning	30
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>34</b>
<b>Begrensninger</b>	<b>34</b>
<b>Ytelseegenskaper</b>	<b>34</b>
Ikke-kliniske studier	34
Kliniske studier	36
<b>Referanser</b>	<b>39</b>
<b>Symboler</b>	<b>40</b>
<b>Kontaktinformasjon</b>	<b>41</b>
<b>Bestillingsinformasjon</b>	<b>42</b>

## Bruksområde

*ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet er beregnet på kvantifisering av Wilms' tumor (WT)-gentranskripsjoner i totalt RNA isolert fra pasienter med akutt myeloid leukemi (AML). Resultatene som oppnås er beregnet på å bidra til overvåkning av tidlig behandlingsrespons og for minimal restsykdom (MRD).

## Sammendrag og forklaring

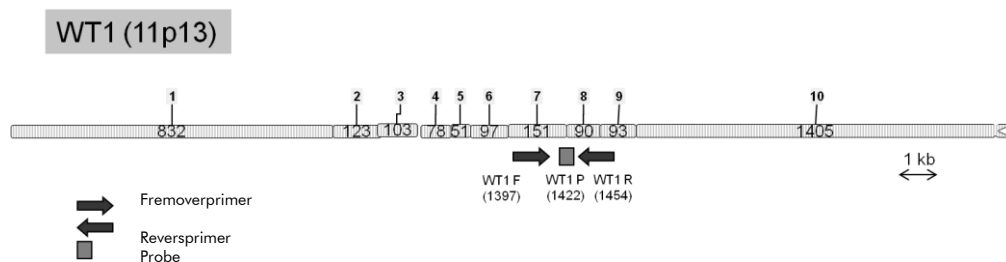
Gjeldende behandlingsprotokoller for akutt myeloid leukemi (AML) er basert på prognostiske faktorer, som bidrar til å stratifisere behandlingen (1, 2). Sentrale prognostiske faktorer som er identifisert så langt inkluderer egenskaper før behandlingen, for eksempel alder og antall hvite blodceller (WBC) samt pasientkaryotype og forekomst av spesifikke genomiske mutasjoner som FLT3 og NPM1 (3, 4). Den morfologiske responsen på induksjonskjemoterapi gir en ytterligere prediktiv faktor, som er innlemmet i gjeldende risikostatifiseringsplaner brukt til å gi informerte beslutninger om konsolideringsbehandling, spesielt allogent transplantasjon (5). Selv om disse parametrene skjelner mellom pasientgrupper med svært ulike risikoer for tilbakefall, er det et presserende behov for å spesifisere risikostratifisering for mer pålitelig identifisering av pasientene med høyest (eller lavest) sannsynlighet for å dra fordel av en transplantasjon. En rekke studier har fremhevet potensialet til MRD-overvåkning med sanntids kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) for å påvise leukemispesifikke mål, dvs. fusjonsgener (FG)-transkripsjoner som PML-RARA, CBFβ-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) eller mutasjoner i spesifikke gener som NPM1. Dette gjør det mulig å identifisere pasientene med høyest risiko for tilbakefall og indikerer dermed kandidater for tidlig behandlingsintervensjon (6).

Omtrent halvparten av AML-pasienter mangler et egnet leukemispesifikt mål, og det har vært omfattende interesse i å utvikle alternative metoder som vil gjøre at MRD-overvåkning kan brukes hos en langt større andel av pasientene. En strategi involverer bruk av flowcytometri for å identifisere og overvåke leukemi forbundet med aberrante fenotyper, men selv om denne strategien har et vidt bruksområde, er den teknisk krevende (6). En annen metode involverer bruk av qPCR for å påvise transkripsjoner som er svært overuttrykt i AML-blaster i forhold til normal blod og benmarg, med spesiell fokus på WT1-genet (6).

WT1-genet befinner seg på kromosom 11p13, koder en «sinkfinger»-transkripsjonsfaktor, og ble opprinnelig identifisert for dens rolle i patogenesen til Wilms' tumor (7). WT1 -genet er påvist å uttrykkes sterkt i en rekke hematopoietiske tumorer, herunder AML (7, 8). Selv om mekanismene som fører til overuttrykking av WT1 fremdeles er dårlig forstått, kan dette fenomenet benyttes som en markør som indikerer forekomst, vedvarenhet eller tilbakevending av leukemisk hematopoiese.

## Prinsippene for prosedyren

qPCR-teknikken tillater nøyaktig kvantifisering av PCR-produkter under den eksponensielle fasen av PCR-forsterkningsprosessen. Data fra qPCR kan innehenes 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.

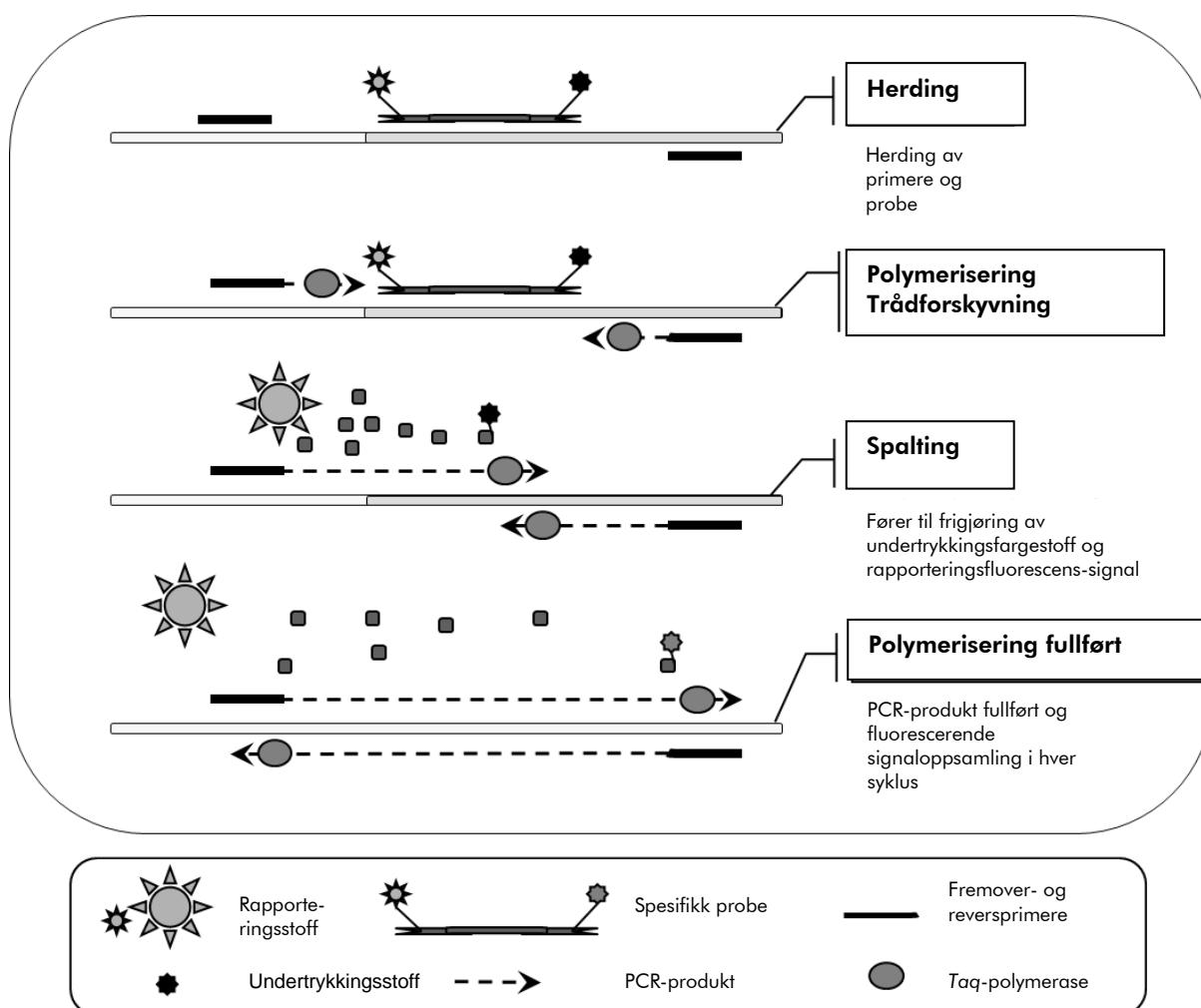


**Figur 1. Sjematisk diagram av WT1-transkripsjon dekt av ELN qPCR primere og probesett: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R.** Tallet under primerne og proben viser til deres nukleotidposisjon i den normale gentranskripsjonen. Ekson 5 kan alternativt spleises.

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'→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'→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.

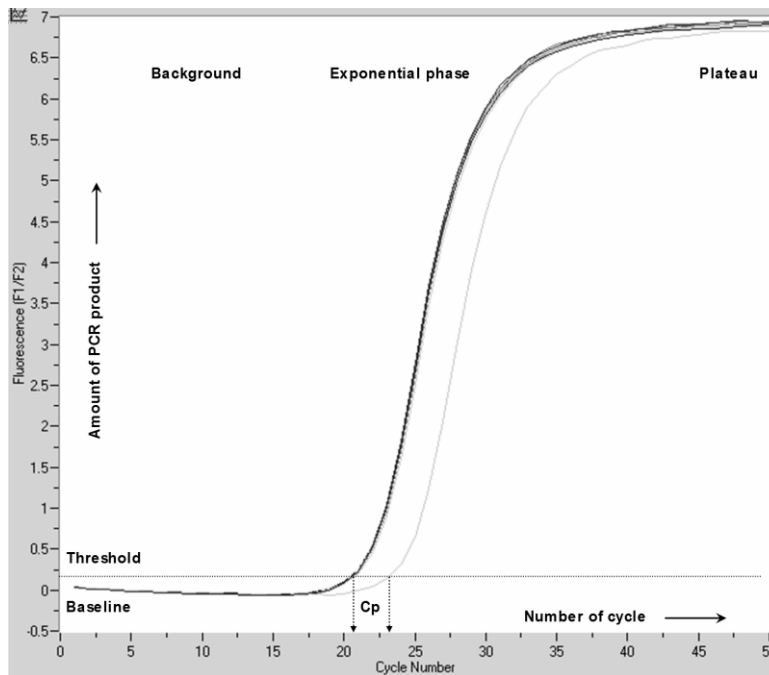


**Figur 2. Reaksjonsprinsipp.** Totalt RNA er reverstranskribert, og det genererte cDNA forsterkes med PCR ved bruk av et par spesifikke primere og en spesifikk intern probe med dobbelt fargestoff (FAM™ –TAMRA™). Proben bindes til amplikonet under hvert herdingstrinn i PCR. Når Taq utvides fra primeren bundet til amplikonet, forskyver det 5'-enden av proben, som deretter brytes ned av 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til Taq DNA-polymerase. Spaltingen forsetter til den gjenværende proben smelter av amplikonet. 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.

Når fluorescens plottes mot syklusnummer, vises oppsamlingen av PCR-produkt i figur 3. Denne forsterkningskurven består henholdsvis av en tidlig bakgrunnsfase (under instrumentets påvisningsnivå), en eksponensiell fase (eller logaritmisk fase) og et platå. Den mest nøyaktige kvantitative bestemmelsen kan kun utføres i løpet av den eksponensielle fasen. Den første syklusen der instrumentet kan skjelne at den forsterkningsgenererte fluorescensen er over bakgrunnssignalet, kalles terskelsyklusen ( $C_T$ ) eller krysspunktet ( $C_P$ ). Ved å velge terskelen i den logaritmisk-lineære fasen, er det mulig å beregne den faktiske mengden initielle startmolekyler siden fluorescensintensiteten er direkte proporsjonal med mengden PCR-produkt i den eksponensielle fasen.

Under platåfasen inntreffer ingen signifikant økning av mengden PCR-produkt. Dette skyldes hovedsakelig uttømming av PCR-komponenter og ny herding av

PCR-produkttråder forårsaket av den høye konsentrasjonen av sluttprodukter, hvilket forhindrer ytterligere primerherding.



**Figur 3. Fluorescensinnhenting under sykling og etterfølgende forsterkningsfaser.**

Den mest direkte og nøyaktige metoden for å analysere kvantitative data er å bruke en standardkurve som er klargjort fra en fortynningsserie av kontrolltemplat med kjent konsentrasjon. Dette er kjent som en «standardkurve» eller «absolutt» kvantifisering. Etter forsterkning av den standard fortynningsserien genereres standardkurven ved å plote loggen for det initielle templatkopinummet mot generert  $C_p$  for hver fortynning. Plotting av disse punktene genererer en standardkurve. Bruk av ligningen for denne standardkurven gjør det mulig å kvantifisere bestemmelsen av prøvenes initielle kopinummet.

WT1 ProfileQuant-settet (ELN) inkluderer spesifikke plasmider og primere og probeblandinger for WT1 og ABL. Disse komponentene er validert sammen i forbindelse med en samarbeidsstudie ledet av en gruppe eksperter fra forbundet European LeukemiaNet. Analysen som tidligere ble utgitt av Van Dijk med kolleger presterte konsekvent bedre enn de andre analysene, og er mindre utsatt for mutasjoner i AML grunnet konfigurasjonen (9). Den ble derfor valgt som ELN WT1-analysen. *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet er basert på denne teknikken. I dette settet forsterkes en endogen kontroll (ABL-transkripsjon) fra prøven i tillegg til WT1-transkripsjonen. Standard seriefortynninger av kontroll og WT1 cDNA skaffes tilveie og de genererte standardkurvene gjør det mulig å beregne kopinummet for WT1-transkripsjoner og ABL nøyaktig i hver prøve.

# Medfølgende materialer

## Settets innhold

<b>ipsogen WT1 ProfileQuant Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalognr.</b>		<b>676923</b>
<b>Antall reaksjoner</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardfortynning for ABL-kontrollgen) (10 <sup>3</sup> kopier/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardfortynning for ABL-kontrollgen) (10 <sup>4</sup> kopier/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardfortynning for ABL-kontrollgen) (10 <sup>5</sup> kopier/5 µl)	C3-ABL	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardfortynning for WT1-profilgen) (10 <sup>1</sup> kopier/5 µl)	P1-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardfortynning for WT1-profilgen) (10 <sup>2</sup> kopier/5 µl)	P2-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardfortynning for WT1-profilgen) (10 <sup>3</sup> kopier/5 µl)	P3-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardfortynning for WT1-profilgen) (10 <sup>6</sup> kopier/5 µl)	P5-WT1	50 µl
Primers and Probe Mix ABL* (Primere og probeblending ABL)	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix PPP-WT1 <sup>†</sup> (Primere og probeblending PPP-WT1 (ELN))	PPP-WT1 (ELN) 25x	110 µl
ipsogen WT1 ProfileQuant Kit Handbook (engelsk)		1

\* Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for ABL-kontrollgenet (Control Gene – CG) samt en spesifikk FAM–TAMRA-probe.

<sup>†</sup> Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for WT1 (ekson 1-2)-genet samt en spesifikk FAM–TAMRA-probe.



**Merk:** Roter og sentrifuger standardfortynningene og primerne og probeblandingene 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.

### 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
- MgCl<sub>2</sub>
- 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

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

### Utstyr

- Mikroliterpipette dedikert til PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Benksentrifuge med rotor for 0,2 ml/0,5 ml reaksjonsglass og en maksimumshastighet på 13 000–14 000 rpm
- Sanntids PCR-instrument: Rotor-Gene Q 5plex HRM® eller annen Rotor
- Termisk sykler eller vannbad (revers transkripsjon-trinn)

**Merk:** Pass på at den termiske syklere eller vannbadet er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

## 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](http://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-ABL- og PP-WT1-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:

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

Vi anbefaler derfor følgende.

- Bruk nukleasefritt laboratorieutstyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonshetteglass) og hansker når du utfører analysen.
- Bruk nye aerosolresistente pipettespisser for alle pipetteringstrinn for å unngå krysskontaminering av prøvene og reagensene.

- 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.).
- Håndter standardfortynningene (C1–3 og P1–5) 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.

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

Disse oppbevaringsforholdene gjelder både åpnede og uåpnede 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

- Klargjør dNTPs, 10 mM hver. Oppbevar ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i alikvoter.
- Klargjør tilfeldig heksamer, 50 mM. Oppbevar ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i alikvoter.
- Klargjør  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM. Oppbevar ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i alikvoter.

#### Prosedyre

1. **Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.**
2. **Inkuber  $1\text{ }\mu\text{g}$  RNA ( $1\text{--}4\text{ }\mu\text{l}$ ) 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 ( $\mu$ l)	Sluttkonsentrasjon
Ledetrådbuffer (følger med Superscript II revers transkriptase), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (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/ $\mu$ l)	0,5	1 U/ $\mu$ l
Tilfeldig heksamer (100 $\mu$ M)	5,0	25 $\mu$ M
Superscript II (200 U/ $\mu$ l)	0,5	5 U/ $\mu$ l
Oppvarmet RNA-prøve (skal tilsettes i trinn 5)	1,0–4,0	50 ng/ $\mu$ l
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet (skal tilsettes i trinn 5)	0,0–3,0	–
Sluttvolum	20,0	–

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

**Tabell 2. Klargjøring av revers transkripsjonsreaksjon**

Komponent	Volum ( $\mu$ l)
RT-blanding	16,0
Oppvarmet prøve-RNA (1 $\mu$ g)	1,0–4,0
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	0,0–3,0
Sluttvolum	20,0

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.

**Merk:** Denne revers transkripsjon-protokollen ble utledet fra «Europe Against Cancer (EAC)»-studiene (10, 11).

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

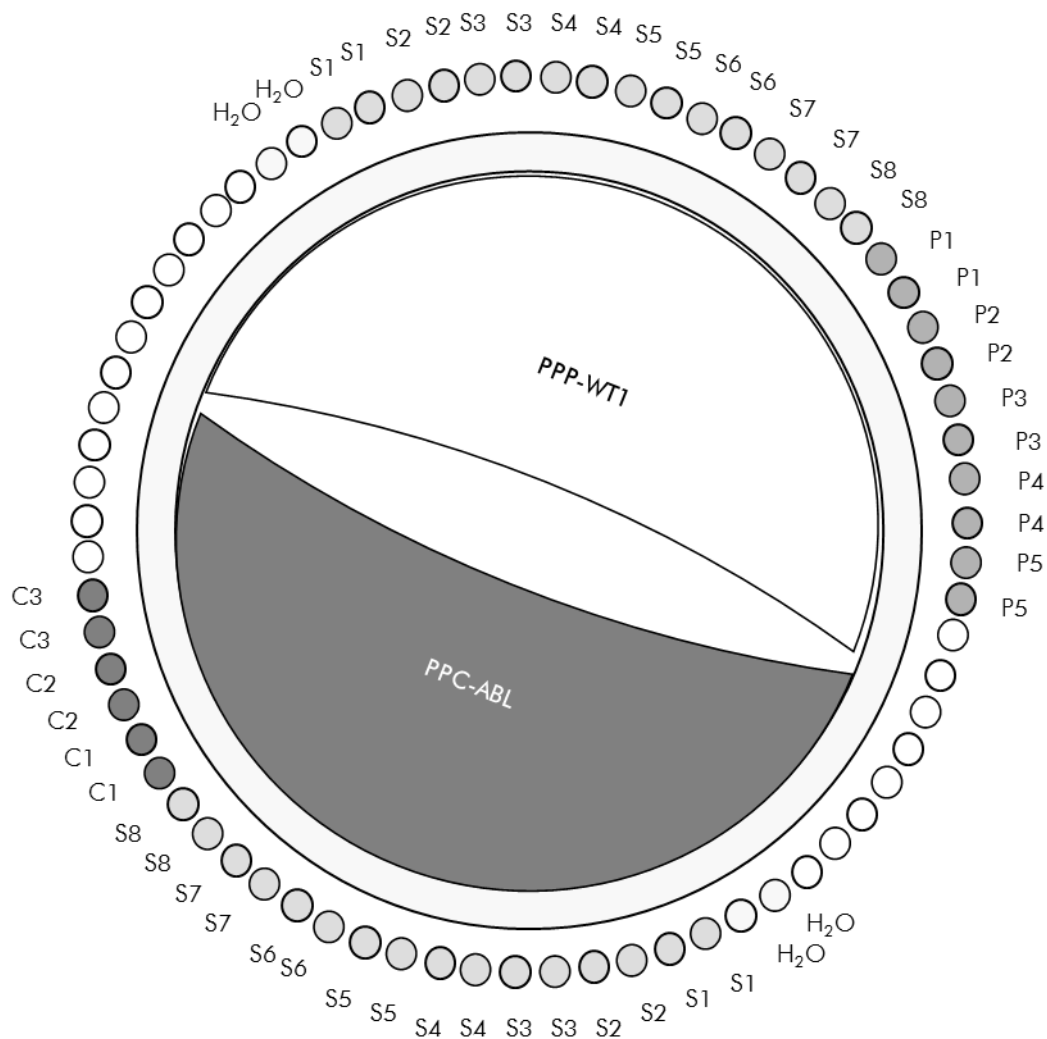
Ved bruk av dette instrumentet anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 3.

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

<b>Prøver</b>	<b>Reaksjoner</b>
<b>Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)</b>	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	2 x 3 reaksjoner (3 fortynninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner
<b>Med WT1-primere og probeblanding (PPP-WT1)</b>	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
WT1-standard	2 x 5 reaksjoner (5 fortynninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner

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

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



**Figur 4. Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet. P1–5: WT1-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: cDNA-prøve; H<sub>2</sub>O: 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 henhold til 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  $\mu$ l. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPP-WT1). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

**Tabell 4. Klargjøring av qPCR-blanding**

Komponent	ABL: 24 + WT1: 28			Sluttkonsentrasjon
	1 reaksjon ( $\mu$ l)	1 reaksjoner ( $\mu$ l)	+1 reaksjoner ( $\mu$ l)	
TaqMan Universal PCR masterblanding, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	162,5	188,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25,0	25 hver	25 hver	–

3. Dispenser 20  $\mu$ l av qPCR-forhåndsblendingen pr. glass.
4. Tilsett 5  $\mu$ l av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 12) i det tilsvarende glasset (totalvolum 25  $\mu$ l).
5. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.
6. Plasser glassene i den termiske syklere i samsvar med produsentens anbefalinger.
7. Programmer Rotor-Gene Q-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som indikert i tabell 5.

**Tabell 5. Temperaturprofil**

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

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

## Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og LightCycler 480-instrument

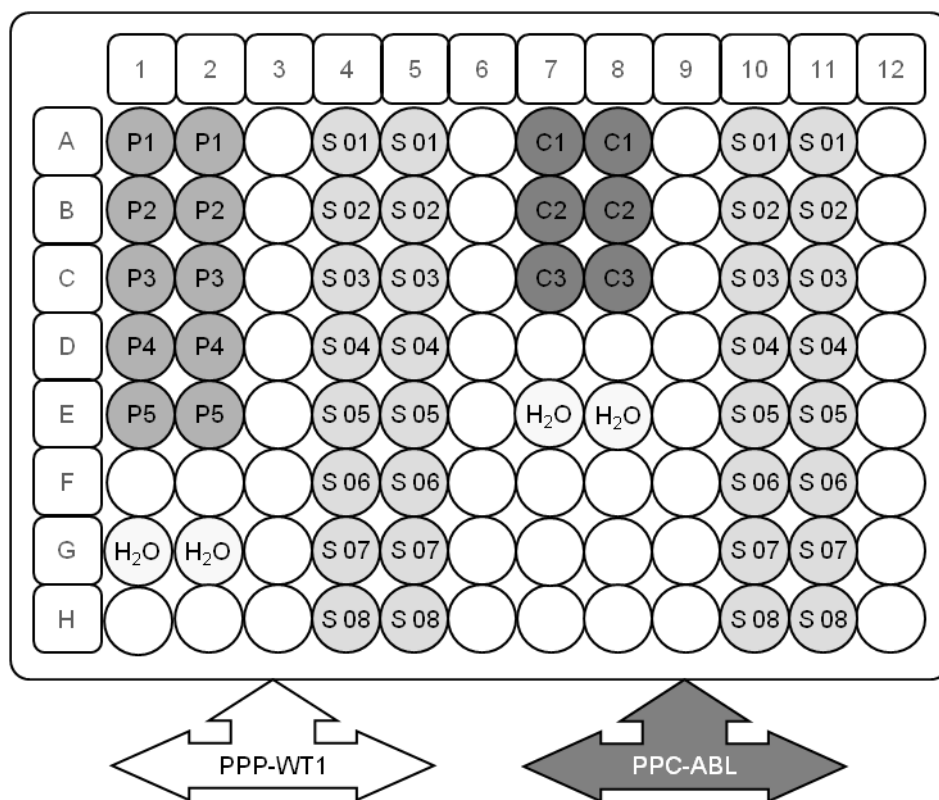
Ved bruk av 96-brønn-plate qPCR-utstyr, anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 6.

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

<b>Prøver</b>	<b>Reaksjoner</b>
<b>Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)</b>	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	2 x 3 reaksjoner (3 fortyninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner
<b>Med WT1-primere og probeblanding (PPP-WT1)</b>	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
WT1-standard	2 x 5 reaksjoner (5 fortyninger, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner

### Prøvebehandling på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time 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 5 viser et eksempel på et slikt eksperiment.



**Figur 5. Anbefalt plateoppsett for ett eksperiment. S:** cDNA-prøve; **P1–5:** WT1-standarder; **C1–3:** ABL-standarder; **H<sub>2</sub>O:** vannkontroll.

## qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time 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 henhold til 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 PPP-WT1). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

**Tabell 7. Klargjøring av qPCR-blanding**

Komponent	ABL: 24 + WT1: 28 +			Sluttkonsentrasjon
	1 reaksjon ( $\mu$ l)	1 reaksjoner ( $\mu$ l)	1 reaksjoner ( $\mu$ l)	
TaqMan Universal PCR masterblanding, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nukleasefritt vann av PCR- kvalitet	6,5	162,5	188,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25,0	25 hver	25 hver	–

3. **Dispenser 20  $\mu$ l av qPCR-forhåndsblandingen pr. brønn.**
4. **Tilsett 5  $\mu$ l av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 12) i den tilsvarende brønnen (totalvolum 25  $\mu$ l).**
5. **Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.**
6. **Lukk platen og sentrifuger raskt (300 x g, ca. 10 seconds).**
7. **Plasser platen i den termiske syklere i samsvar med produsentens anbefalinger. Programmer den termiske syklere med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 8 for ABI PRISM 7900HT SDS eller Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, eller tabell 9 for LightCycler 480-instrumentet.**

**Tabell 8. Temperaturprofil for ABI PRISM 7900HT SDS eller Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

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

**Tabell 9. Temperaturprofil for LightCycler 480-instrument**

<b>Analysemodus</b>	Absolutt kvantifisering ("Abs Quant")
<b>Påvisningsformater</b>	Velg «Simple Probe» (Enkeltprobe) i vinduet for påvisningsformat
<b>Holding</b>	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
<b>Holding 2</b>	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
<b>Sykling</b>	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 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, følg trinn 8a. For LightCycler 480-instrumentet, følg trinn 8b.**

**8a. ABI PRISM 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 point»-analysemodus 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-instrument

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

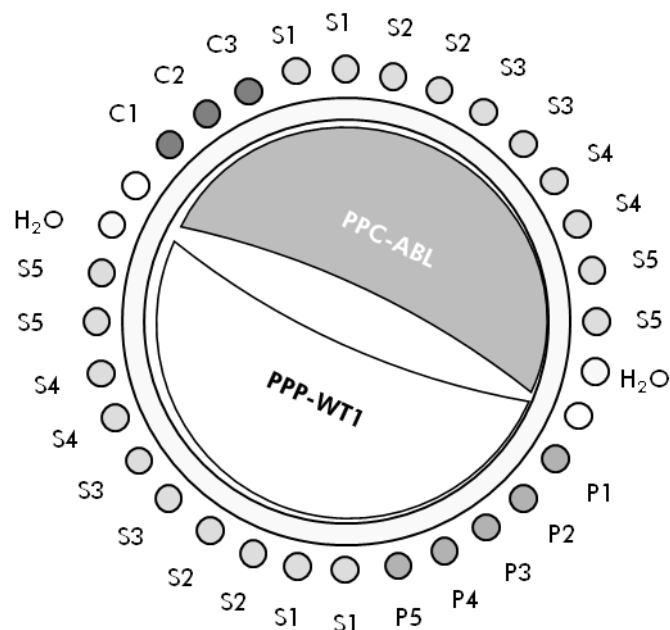
**Tabell 10. Antall reaksjoner for LightCycler 1.2-instrument**

Prøver	Reaksjoner
<b>Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL)</b>	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
ABL-standard	1 x 3 reaksjoner (3 standardfortynninger, testet én gang hver)
Vannkontroll	1 reaksjon
<b>Med WT1-primere og probeblanding (PPP-WT1)</b>	
n cDNA-prøver	n x 2 reaksjoner
WT1-standard	1 x 5 reaksjoner (5 standardfortynninger, testet én gang hver)
Vannkontroll	1 reaksjon

### Prøvebehandling på LightCycler 1.2-instrument

Vi anbefaler testing av 5 cDNA-prøver i samme eksperiment for å optimere bruken av standardene og primerne og probeblandingene. Kapillærplanen i figur 6 viser et eksempel på et eksperiment.





**Figur 6. Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet. P1–5: WT1-standarder; C1–3: ABL-standarder S: ukjent DNA-prøve som skal analyseres; H<sub>2</sub>O: vannkontroll.**

## qPCR på LightCycler 1.2-instrument

**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 henhold til antallet prøver som skal behandles.**

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 11 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet på 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 PPP-WT1).

Andre volum inkluderer for å kompensere for pipetteringsfeil.

**Tabell 11. Klargjøring av qPCR-blanding**

Komponent	ABL: 14 + WT1: 16 +			Sluttkonsentrasjon
	1 reaksjon ( $\mu$ l)	1 reaksjoner ( $\mu$ l)	1 reaksjoner ( $\mu$ l)	
Nylig klargjort LightCycler TaqMan masterblanding, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Primere og probeblanding, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Nukleasefritt vann av PCR- kvalitet	10,2	153,0	173,4	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	20,0	20 hver	20 hver	–

3. **Dispenser 15  $\mu$ l av qPCR-forhåndsblendingen pr. kapillær.**
4. **Tilsett 5  $\mu$ l av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 100 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Anbefalt standardisert EAC revers transkripsjon», side 12) i det tilsvarende glasset (totalvolum 20  $\mu$ l).**
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-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 12.**

**Tabell 12. Temperaturprofil**

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

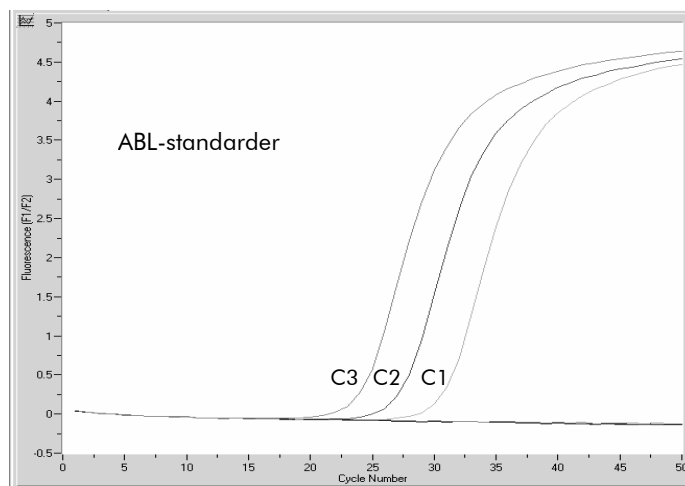
9. For LightCycler 1.2-instrument er F1/F2 og modusen «2<sup>nd</sup> derivative analysis» (2. derivative analyse) anbefalt. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 12.

# Tolkning av resultater

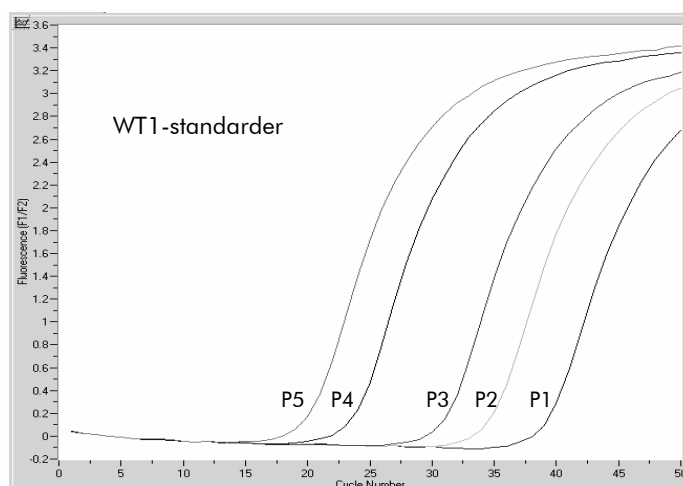
## Prinsipp for dataanalyse

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, og bruker 3 plasmidstandardfortynninger for ABL-kontrollgenet (CG) og 5 standardfortynninger for WT1-genet for å sikre nøyaktige standardkurver. Figur 7 og 8 viser et eksempel på TaqMan-forsterkningskurver oppnådd med *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet.



**Figur 7. Påvisning av ABL-standarder (C1, C2, C3).**  $10^3$ ,  $10^4$  og  $10^5$  kopier/ $5 \mu\text{l}$ .



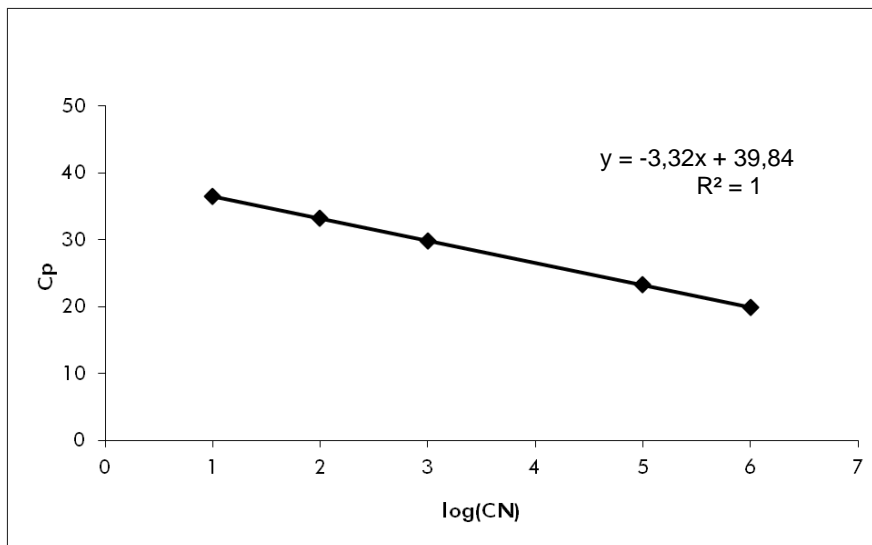
**Figur 8. Påvisning av WT1-standarpåvisning (P1–P5).**  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  kopier/ $5 \mu\text{l}$ .

## Resultater

### Standardkurve og kvalitetskriterier

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

For hvert gen (ABL og WT1), plottes  $C_p$  /  $C_T$ -råverdier oppnådd på plasmidstandardfortynninger i henhold til loggkopinumret (3, 4 og 5 for C1, C2 og C3; 1, 2, 3, 5 og 6 for P1, P2, P3, P4 og P5). 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 WT1), 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 bestemmelseskoefisient ( $R^2$ ) er skrevet ut på grafen.

Siden standarder er 10-gangers fortynninger, er den teoretiske helningen av kurven  $-3,32$ . En helning mellom  $-3,0$  og  $-3,9$  er akseptabelt så lenge  $R^2$  er  $>0,95$  (12). En verdi for  $R^2 >0,98$  er imidlertid ønskelig for å oppnå nøyaktige resultater (13).

### Normalisert kopinumre (NCN)

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

$$\text{Logg}_{10}\text{-prøve } ABL_{CN} = \frac{\text{Gjennomsnittlig ABL } C_p - \text{ABL-standardkurveskjæringspunkt}}{\text{ABL-standardkurvehelning}}$$

WT1-standardkurveligningen skal brukes til å forvandle  $C_p$ -råverdier (oppnådd med PPP-WT1) for ukjente prøver, til WT1-kopinumre ( $WT1_{CN}$ ).

$$\text{Logg}_{10}\text{prøve WT1}_{\text{CN}} = \frac{\text{Gjennomsnittlig WT1 } C_p - \text{WT1-standardskurveskjæringspunkt}}{\text{WT1-standardkurvehelning}}$$

Forholdet av disse CN-verdiene gir det normaliserte kopinummeret (NCN) pr. 10 000 kopier av ABL:

$$\text{NCN} = \frac{\text{WT1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$$

### Kvalitetskontroll på ABL-verdier

Dårlig RNA-kvalitet eller problemer under qPCR-trinnene fører til lav  $\text{ABL}_{\text{CN}}$ . Vi anbefaler å forkaste resultater fra prøver som gir  $\text{ABL}_{\text{CN}} < 4246$ .

### Reproduserbarhet mellom replikater

Variasjon innen  $C_p$ -verdier mellom replikater skal være  $< 2$ , tilsvarende en 4-gangers endring av kopinumerverdier.

Variasjon innen  $C_p$ -verdier mellom replikater er som regel  $< 1,5$  hvis gjennomsnittlig  $C_p$ -verdi av replikatene er  $< 36$  (12).

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

### Vannkontroller

Negative kontroller skal gi null CN for både ABL og WT1.

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, se også siden med vanlige spørsmål og svar på vårt tekniske supportsenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Forskerne ved QIAGENS tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og protokollen i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, se «Kontaktinformasjon», side 41).

## Kommentarer og forslag

---

### Negativt resultat for kontrollgenet (ABL) og WT1 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 parallelt.
- b) Feil i revers transkripsjon-trinnet      Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.  
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA 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 parallelt.
- b) Feil i revers transkripsjon-trinnet      Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter.  
Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA parallelt.

### Standardsignal negativt

- a) Pipetteringsfeil      Kontroller pipetteringsplanen og oppsettet av reaksjonen.  
Gjenta PCR-kjøringen.
- b) Uegnet oppbevaring av settkomponenter      Oppbevar *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet ved  $-15$  til  $-30$  °C og oppbevar primere og probeblandinger (PPC og PPP) beskyttet mot lys. Se «Håndtering og oppbevaring av reagensen», side 11.  
Unngå gjentatt frysing og tining.  
Alikvoter reagenser for oppbevaring.

## Kommentarer og forslag

---

### 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.
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 parallelt.
b) Feil i revers transkripsjon-trinnet	Kontroller alltid RNA-kvaliteten og -konsentrasjonen før du starter. Kjør en positiv kontroll for cellelinje-RNA parallelt.



## Kommentarer og forslag

---

### Fluorescensintensiteten er for lav

- a) Uegnet oppbevaring av settkomponenter      Oppbevar *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet ved –15 til –30 °C og oppbevar primere og probeblandinger (PPC og PPP) beskyttet mot lys. Se «Håndtering og oppbevaring av reagensen», side 11.  
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.
- b) Utilstrekkelig 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.

## 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/](http://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 9.

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 «European LeukemiaNet» (ELN) (10, 11). 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

Linearitetsstudier ble utført på 14 prøver; hver fra en ulik RNA-blanding ekstrahert fra en cellelinje med høy ekspresjon og prøver fra friske donorer med lavt ekspresjonsnivå for WT1-genet. Hver prøve ble testet i triplikat. For NCN lå verdier mellom 2,20 til 3838,11 NCN, og denne studien viste at *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet ga lineære resultater over dette verdiområdet.

#### Presisjon

En presisjonsstudie ble utført på fire prøver; hver tatt fra en ulik blanding av RNA ekstrahert fra cellelinjer med høy og lav WT1-ekspresjon. Disse analysene ble gjentatt opptil 16 ganger for hver prøve. Analytiske data oppsummeres i følgende tabeller.

**Tabell 13. Analytiske data fra presisjonsstudien — plasmider**

	<b>Fortynning</b>	<b>Gj.sn. C<sub>T</sub></b>	<b>σ</b>	<b>n</b>	<b>CV (%)</b>
WT1-plasmider	P1: 10 <sup>1</sup> kopier/5 μl	36,13	0,87	15	2,42
	P2: 10 <sup>2</sup> kopier/5 μl	32,70	0,40	16	1,21
	P3: 10 <sup>3</sup> kopier/5 μl	29,39	0,43	16	1,45
	P4: 10 <sup>5</sup> kopier/5 μl	22,62	0,41	16	1,80
	P5: 10 <sup>6</sup> kopier/5 μl	19,25	0,38	16	1,98
ABL-plasmider	C1: 10 <sup>3</sup> kopier/5 μl	29,59	0,35	16	1,20
	C2: 10 <sup>4</sup> kopier/5 μl	26,11	0,40	15	1,52
	C3: 10 <sup>5</sup> kopier/5 μl	22,77	0,28	16	1,22

**Tabell 14. Analytiske data fra presisjonsstudien — cellelinjer**

	<b>Fortynning</b>	<b>Gj.sn. NCN</b>	<b>σ</b>	<b>n</b>	<b>CV (%)</b>
Fortynning av cellelinje-RNA	10 %	10 472	5598,76	16	53
	1,5 %	1880	747,01	16	40
	0,05 %	86	37,79	16	44
	0,0025 %	3	1,90	16	57

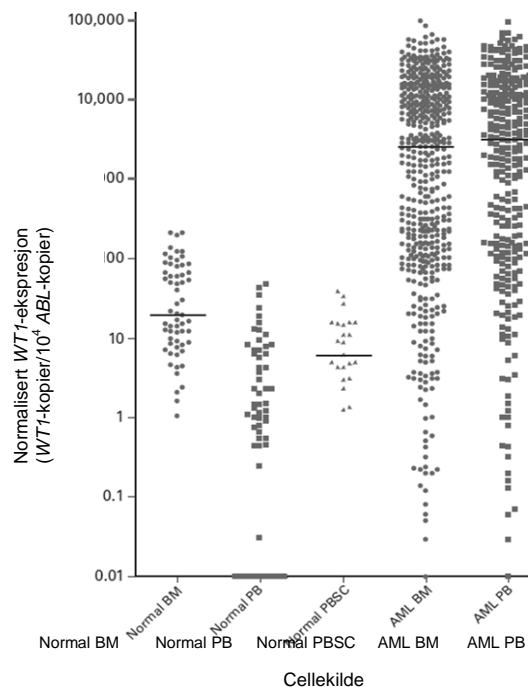
### Blankgrense og påvisningsgrense

Studieutformingen var basert på anbefalinger beskrevet i NCCLS-dokumentet EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. Bakgrunnsnivå eller blankgrense (Limit of Blank – LOB) ble bestemt på normale blodprøver fra friske donorer (4 prøver, 73 målinger). Dette ble påvist å tilsvare 3,66 WT1 NCN.

Deteksjonsgrensen (Limit of Detection – LOD), som indikerer analytisk følsomhet, ble bestemt på prøver med kjent ekspresjon av WT1 oppnådd fra friske donorer og tilsatt celler med høyt nivå av WT1-ekspresjon. Dette sikret at den forventede NCN-verdien var 4 ganger LOB. Totalt 4 prøver og 72 målinger ble utført, og LOD ble påvist å tilsvare 13,08 WT1 NCN.

## Kliniske studier

Siden WT1 uttrykkes i normale hematopoietiske celler, er det avgjørende å fastslå ekspressionsnivået observert i normale kontrollprøver slik at det kan angis en terskel som skjelner mellom gjenværende leukemi og bakgrunnsforsterkning. Analysering av 204 kontrollprøver utledet fra friske frivillige ved bruk av ELN-analysen brukt i *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet bekreftet at svært lav ekspresjon av WT1 observeres i prøver av perifert blod, benmarg og stamceller fra perifert blod. Medianverdier var 19,8 WT1 kopier/ $10^4$  ABL-kopier (område 0–213) i benmarg, 0,01 (område 0,01–47,6) i perifert blod og 6,1 (område 0–39) i stamceller fra perifert blod (se figur 10). Ekspresjon av WT1 i perifert blod var signifikant lavere enn i benmarg ( $p < 0,0001$ ). Basert på disse resultatene ble den øvre normalgrensen angitt som 250 NCN for benmarg og 50 NCN for perifert blod.



**Figur 10. WT1-ekspresjon i prøver fra friske donorer.** Akutt myeloid leukemi (**AML**); benmarg (**BM**); perifert blod (**PB**); stamceller fra perifert blod (**PBSC**). (15)

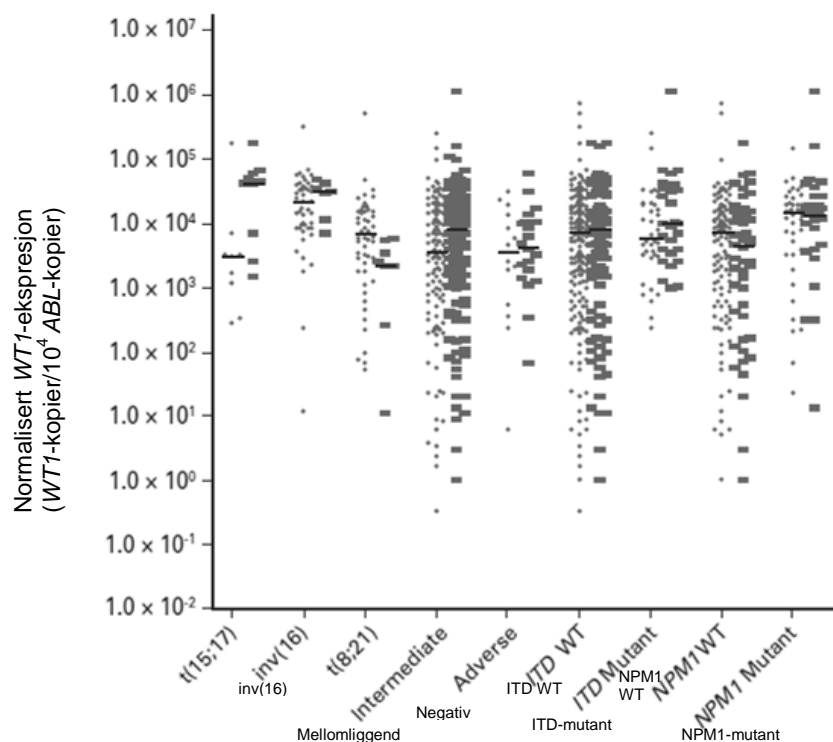
Trykt på nytt med tillatelse fra Cilloni D et al: Sanntids kvantitativ påvisning av polymerasekjedereaksjon ved minimal restsykdom ved bruk av standardisert WT1-analyse for å forbedre risikostratifisering ved akutt myeloid leukemi: En studie fra European LeukemiaNet: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, alle rettigheter forbeholdt.

## Definere WT1-ekspresjon ved bruk av standardisert ELNqPCR-analyse i forbehandling av AML-prøver

For å evaluere anvendeligheten av ELN-analysen benyttet i *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet for å påvise MRD, ble 620 forbehandlingsprøver (238 fra perifert blod og 382 fra benmarg) analysert fra 504 pasienter.

WT1 ble overuttrykt over bakgrunnsnivåer (definert som  $>250$  and  $>50$  WT1-kopier/ $10^4$  ABL-kopier i henholdsvis benmarg og perifert blod) i 86 % og 91 % av diagnostiske AML-prøver av benmarg og perifert blod (også vist i figur 10). Medianverdien av WT1 kopier/ $10^4$  ABL-kopier var 2505, (område  $0-7,5 \times 10^5$ ) i benmarg ( $p < 0,0001$  vs normal benmarg) og 3107 (område  $0-1,13 \times 10^6$ ) i perifert blod ( $p < 0,0001$  vs normalt perifert blod). Det var ingen signifikant forskjell i ekspresjon mellom perifert blod og blodmarg på tvers av kohorten, bekreftet med resultater fra pasienter med sammensatte diagnostiske prøver av perifert blod og benmarg, se Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, figur A3 i vedlegget (15).

Variasjon i normalisert WT1-ekspresjonsnivå ble observert i henhold til cytogenetikk (figur 11,  $p < 0,001$ ), med spesielt høye nivåer i tilfeller med  $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$  (median  $2,31 \times 10^4$ , område  $12-3,14 \times 10^5$ ). Signifikant høyere WT1-nivåer ble også påvist i AML med NPM1-mutasjoner (NPM1-mutant: median  $1,44 \times 10^4$ , område  $0-1,13 \times 10^6$ ; NPM1-villtype: median 6566, område  $0-7,5 \times 10^5$ ,  $p = 0,005$ ).



**Figur 11. Variasjon av WT1-ekspresjon i henhold til cytogenetikk (15).**

Trykt på nytt med tillatelse fra Cilloni D et al: Sanntids kvantitativ påvisning av polymerasekjedereaksjon ved minimal restsykdom ved bruk av standardisert WT1-analyse for å forbedre risikostratifisering ved akutt myeloid leukemi: En studie fra European LeukemiaNet: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201, 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology, alle rettigheter forbeholdt.

Nivået av WT1-ekspresjon som definert av ELN-analyse i 15 tilfeller med mutasjoner i ekson 7 og 9 i WT1-genet var sammenlignbare med de med villtype-WT1 ( $p=0,2$ ). Sekvensanalysering av en serie med 32 tilfeller der ELN-analysen antydte et lavt nivå WT1-transkripsjonssekspresjon ( $<250$  kopier/ $10^4$  ABL-kopier), indikerte imidlertid at dette lave nivået i 3 tilfeller (9,4 %) var assosiert med mutasjoner som forstyrret bindestedet til fremoverprimeren, se Cilloni D et al., J Clin Oncol, figur A4 i vedlegget (15).

## Referanser

QIAGEN opprettholder en stor oppdatert online database med vitenskapelige kunngjøringer om bruk av QIAGEN-produkter. Omfattende søkealternativer gjør at du kan finne de artiklene du har behov for, enten med enkelt nøkkelordsøk eller ved å spesifisere bruksområde, forskningsområde, tittel osv.

For en fullstendig liste over referanser, besøk QIAGENS referansedatabase online på [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp), eller ta kontakt med QIAGENS tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

### Anvendte referanser

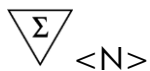
1. Cheson, B.D. et al. (2003) Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4642.
2. Estey, E. and Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* **368**, 1894.
3. Grimwade D. (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 497.
4. Schlenk, R.F. et al (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909.
5. Wheatley, K. et al. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* **107**, 69.
6. Freeman, S.D., Jovanovic, J.V., and Grimwade D. (2008) Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* **4**, 388.
7. Sugiyama, H. (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.* **73**, 177.
8. Liu-Yin, J. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. *Blood* **112**, 259.
9. Van Dijk J.P. et al. (2003) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* **118**, 1027.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. Cilloni, D. et al., American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2007.
15. Cilloni D. et al., Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* **27**, 5195.

## Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:



Inneholder nok reagens til <N> reaksjoner



Brukes innen



Medisinsk utstyr til in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer



Materialnummer



Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensning



Produsent



Se bruksanvisningen



## Kontaktinformasjon

For teknisk hjelp og mer informasjon, se vårt tekniske supportcenter på [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), ring 00800-22-44-6000 eller kontakt en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller besøk [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	For 24 reaksjoner: ABL-kontrollgenstandarder, WT1 (ekson 1-2)-genstandarder, primere og probeblanding ABL, primere og probeblanding PPP-WT1	676923
<b>Rotor-Gene Q MDx — for IVD-validert sanntids PCR-analyse i kliniske bruksområder</b>		
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

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](http://www.qiagen.com) eller på forespørsel fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

Denne siden er tom med hensikt

Denne siden er tom med hensikt

Denne siden er tom med hensikt

Denne siden er tom med hensikt

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<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup>, ProfileQuant<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup>, RNaseOUT<sup>™</sup>, SuperScript<sup>®</sup>, SYBR<sup>®</sup>, TAMRA<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Agilent<sup>®</sup>, Bioanalyzer<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc); Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation); LightCycler<sup>®</sup>, TaqMan<sup>®</sup> (Roche Group).

### Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet bekrefter at kjøperen eller brukeren av *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet samtykker i følgende betingelser:

1. *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet kan kun brukes i samsvar med håndboken for *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet, og kun med komponentene i settet. QIAGEN gir ingen lisens under noe av deres immateriale rettigheter for å bruke eller implementere de vedlagte komponentene i dette settet med komponenter som ikke inngår i dette settet, bortsett fra det som er beskrevet i håndboken for *ipsogen* WT1 ProfileQuant-settet samt andre protokoller på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
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 antydnet, 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](http://www.qiagen.com).

HB-1355-002 © 2013-2015 QIAGEN, alle rettigheter forbeholdt.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

