

# Handbok för *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 mbcr-kit



Version 1



Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup>  
och SmartCycler<sup>®</sup>-instrument



670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Tyskland

R2



1072506SV



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

### **QIAGEN skapar standarder inom:**

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

Vårt uppdrag är att göra det möjligt för dig att uppnå utomordentliga framgångar och genombrott. Det finns mer information på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Innehåll

<b>Avsedd användning</b>	<b>5</b>
<b>Sammanfattning och förklaring</b>	<b>5</b>
<b>Princip för proceduren</b>	<b>6</b>
<b>Material som medföljer</b>	<b>8</b>
Kitinnehåll	8
<b>Material som behövs men inte medföljer</b>	<b>9</b>
<b>Varningar och försiktighet</b>	<b>10</b>
Allmänna försiktighetsåtgärder	10
<b>Förvaring och hantering av reagens</b>	<b>11</b>
<b>Procedur</b>	<b>13</b>
Beredning av prov-RNA	13
Protokoll	
■ Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription	13
■ qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor	16
■ qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS och LightCycler 480-instrument	20
■ qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument	25
■ qPCR på SmartCycler-instrumentet	29
<b>Tolkning av resultat</b>	<b>32</b>
Dataanalysprincip	32
Resultat	33
Felsökningshandbok	35
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>38</b>
<b>Begränsningar</b>	<b>39</b>
<b>Prestandaegenskaper</b>	<b>39</b>
Icke-kliniska studier	39
Kliniska studier	42
<b>Litteraturhänvisningar</b>	<b>45</b>
<b>Symboler</b>	<b>46</b>
<b>Kontaktinformation</b>	<b>47</b>



## Avsedd användning

Ipsogen BCR-ABL1 mbcr-kitet är avsett för kvantifieringen av BCR-ABL p190-transkript i benmärg eller i prov på perifert blod från patienter med Ph-positiv akut lymfoblastisk leukemi (ALL) som tidigare har fått diagnos på bildande av fusionsgenen (FG) BCR-ABL mbcr. Resultaten som erhållits är avsedda att övervaka effekten av behandlingar hos patienter som genomgår terapi, och för uppföljning av MRD (minimal residual disease) för att övervaka sjukdomsåterfall.

## Sammanfattning och förklaring

Philadelphia (Ph)-kromosomen är den mest frekventa karyotypiska avvikelser hos vuxna med ALL. Den förekommer hos 20–30 % av vuxna patienter med ALL, och incidensen ökar till mer än 50 % hos patienter som är över 50 år.

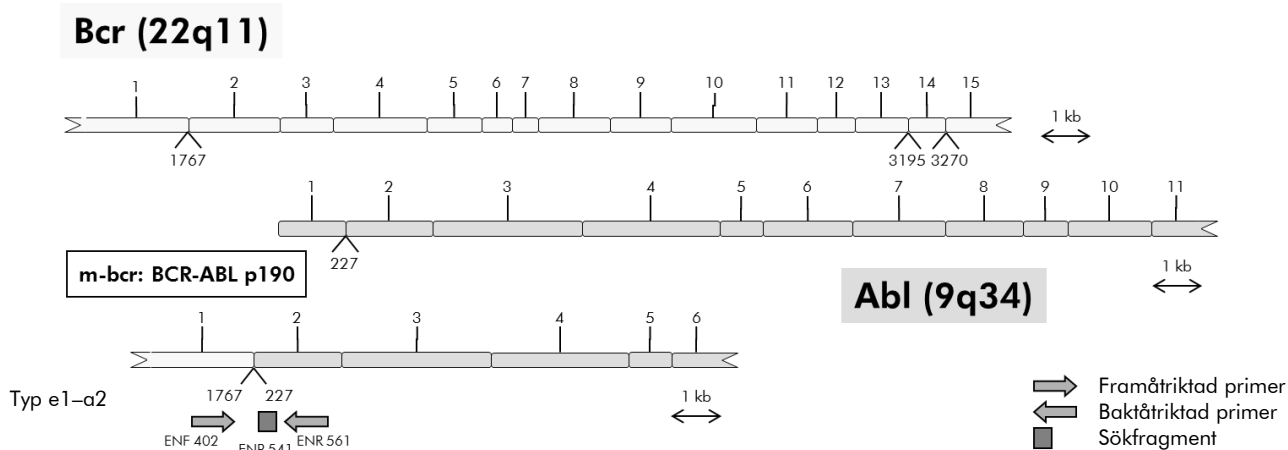
I den här translokationen sitter ABL-protoonkogenens 3'-segment på kromosom 9 intill BCR-genens 5'-segment på kromosom 22. BCR-ABL FG är resultatet av Ph-kromosomen och är ett konstitutivt aktivt tyrosinkinasprotein.

Brytpunkter hos ABL-genen förekommer vanligtvis i det första intronet.

Brytpunkter hos BCR-genen förekommer vanligtvis i en av följande tre regioner: en 5,8 kD-region som sträcker sig mellan exon 12–16 som kallas "major breakpoint cluster region" (Mbc), en 55 kb-sekvens i det första intronet, som kallas "minor breakpoint cluster region" (mbcr), och regionen som kallas "micro breakpoint cluster region" ( $\mu$ -bcr).

Brytpunkter uppstår i mbcr-sammanslagat exon 1 (e1) med ABL-genens andra exon (a2), vilket leder till ett mindre fusionstranskript, e1a2, som kodar ett 190 kDa (p190) chimärt protein (figur 1). P190 BCR-ABL-proteinet finns endast i Ph+ ALL medan p210 BCR-ABL-proteinet är vanligt hos 20–40 % av patienter med Ph+ ALL och nästan alla patienter med Ph+ kronisk myeloisk leukemi (KML).

Alla former av BCR-ABL-fusionsproteiner visar en ökad och avreglerad tyrosinkinasaktivitet, och p190-formen har visats ha större transformerande potential än p210. Dessutom verkar detta chimära protein avreglera de normala cytokinberoende signaltransduktionsvägarna, vilket leder till hämningen av apoptos eller tillväxtfaktorberoende tillväxt.



**Figur 1. Schematiskt diagram över BCR-ABL mbcr FG-transkriptet täckt av qPCR-primers- och sökfragmentuppsättningen: ENF402–ENP541–ENR561.** Numret under primers och sökfragment avser deras nukleotidposition i det normala gentranskriptet.

Behandlingen av Ph+ ALL-patienter har optimerats genom introduktionen av tyrosinkinashämmare, som förbättrade patienternas överlevnad signifikant (se referens 1 för en översikt). För dessa patienter är övervakning av MRD nödvändig. Den nuvarande metoden att mäta MRD-nivån innebär att man använder en Realtids kvantitativ polymeraskedjereaktion (qPCR), varigenom BCR-ABL-transkriptnummer relateras till transkriptnummer hos en kontrollgen. Ipsogen BCR-ABL1 mbcr-kitet baseras på denna teknik.

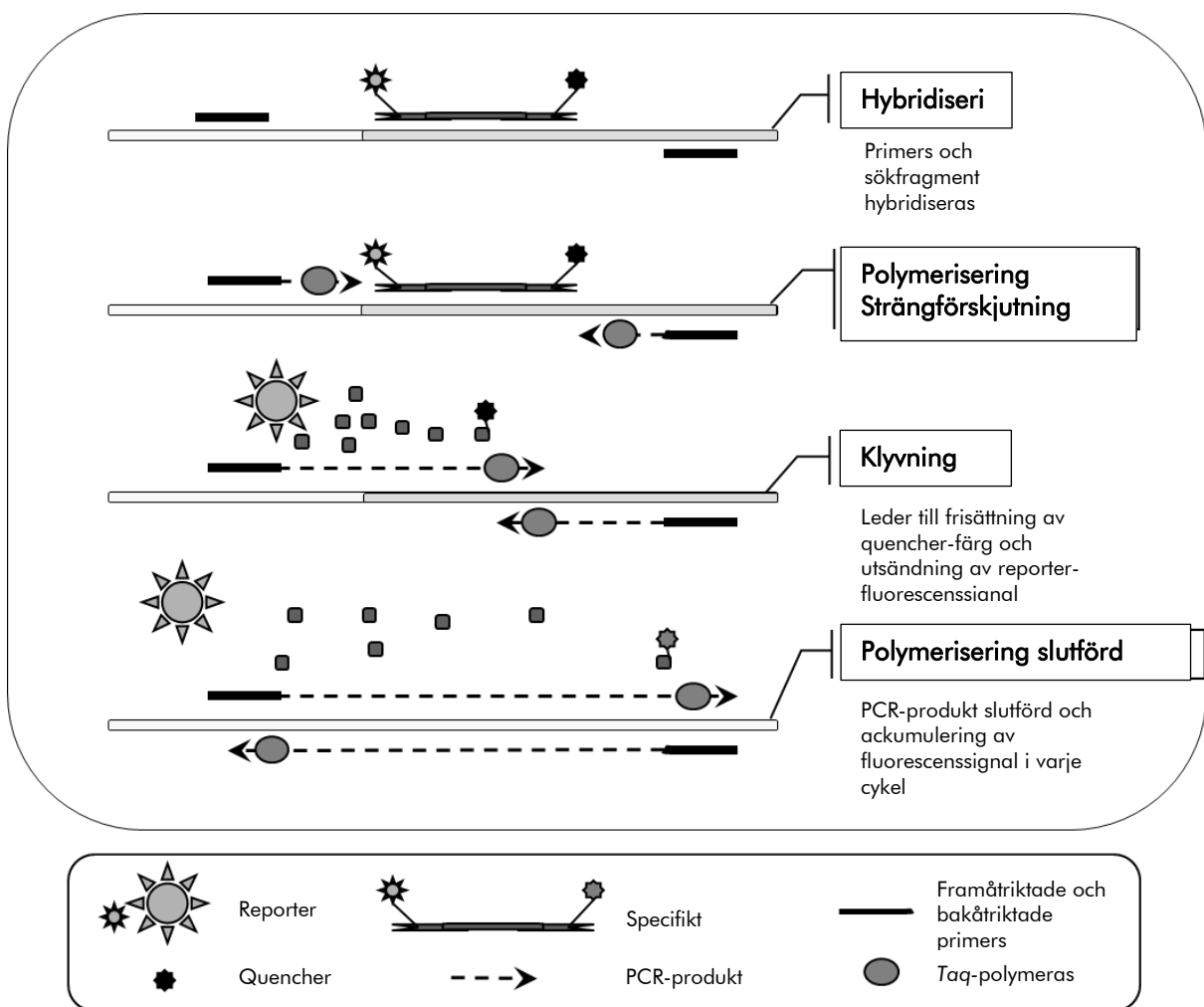
## Princip för proceduren

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

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

Under PCR, om det intressanta målet förekommer, hybridiseras sökfragmentet specifikt mellan ställena för den framåtriktade och bakåtriktade primern. DNA-polymerasets 5'→3'-exonukleasaktivitet gör att sökfragmentet klyvs mellan reporter och quencher, men endast om sökfragmentet hybridiseras till målet. Sökfragmenten förskjuts sedan från målet, och polymeriseringen av strängen fortsätter. Sökfragmentets 3'-ände är blockerad för att förhindra att sökfragmentet förlängs under PCR (figur 2). Denna process sker i varje cykel och stör inte den exponentiella ackumuleringen av produkt.

Ökningen av fluorescenssignal detekteras endast om målsekvensen är komplementär till sökfragmentet och alltså amplifieras under PCR. På grund av dessa krav sker ingen detektering av icke-specifik amplifiering. Ökningen av fluorescens är alltså direkt proportionell till målamplicifieringen under PCR.



**Figur 2. Reaktionsprincip.** Totalt RNA transkriberas omvänt, och det framställda cDNA:t amplifieras med PCR med hjälp av ett par specifika primers och ett specifikt internt dubbelfärg-sökfragment (FAM™-TAMRA™). Sökfragmentet binds till amplikonet under varje hybridiseringssteg för PCR. När Taq DNA-polymeras förlängs från primern som är bunden till amplikonet, förskjuter den 5'-ändan av sökfragmentet, vilket sedan bryts ned av 5'→3'-exonukleasaktiviteten hos Taq-DNA-polymeraset. Klyvning fortsätter tills det återstående sökfragmentet smälter bort från amplikonet. Denna process frisätter fluoroforen och quenchern i lösning, vilket skiljer dem åt spatialt och leder till en ökad fluorescens från FAM och en minskad fluorescens från TAMRA.

# Material som medföljer

## Kitinnehåll

<b>ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalognr</b>		<b>670023</b>
<b>Antal reaktioner</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) ( $10^3$ kopior/5 $\mu$ l)	C1-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) ( $10^4$ kopior/5 $\mu$ l)	C2-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) ( $10^5$ kopior/5 $\mu$ l)	C3-ABL	50 $\mu$ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL mbc-fusionsgen) ( $10^1$ kopior/5 $\mu$ l)	F1-BCR-ABL e1a2 mbc	50 $\mu$ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL mbc-fusionsgen) ( $10^2$ kopior/5 $\mu$ l)	F2-BCR-ABL e1a2 mbc	50 $\mu$ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL mbc-fusionsgen) ( $10^3$ kopior/5 $\mu$ l)	F3-BCR-ABL e1a2 mbc	50 $\mu$ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL mbc-fusionsgen) ( $10^5$ kopior/5 $\mu$ l)	F4-BCR-ABL e1a2 mbc	50 $\mu$ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för BCR-ABL mbc-fusionsgen) ( $10^6$ kopior/5 $\mu$ l)	F5-BCR-ABL e1a2 mbc	50 $\mu$ l
Primers and Probe Mix ABL* (Primers och sökfragmentblandning ABL*)	PPC-ABL 25x	90 $\mu$ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene <sup>†</sup> (Primers och sökfragmentblandning för BCR-ABL mbc-fusionsgen)	PPF-mbc 25x	110 $\mu$ l
ipsogen <i>BCR-ABL1 mbc Kit Handbook</i> (engelska)		1

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

<sup>†</sup> Blandning av specifika bakåtriktade och framåtriktade primers för BCR-ABL mbc-fusionsgenen plus ett specifikt FAM-TAMRA-sökfragment.



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

## Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

### Reagenser

- Nukleasfritt vatten av PCR-grad
- Reagens för omvänd transkription: Det validerade reagentet är Superscript® II (eller Superscript) Reverse Transcriptase (omvänt transkriptas), innefattar 5x förstasträngsbuffert, 100 mM DTT (Life Technologies, kat.nr 18064-022)
- RNas-hämmare: Det validerade reagentet är RNaseOUT™ (Life Technologies, kat.nr 10777-019)
- Uppsättningar med dNTPs, PCR-grad
- Random (slumpmässig) hexamer
- MgCl<sub>2</sub>
- Buffert och Taq DNA-polymeras: De validerade reagenserna är TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat.nr 4304437) och LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat.nr 04535286001)

### Förbrukningsartiklar

- Nukleasfria, aerosolresistent, sterila PCR-pipettspetsar med hydrofoba filter
- 0,5 ml eller 0,2 ml RNas- och DNas-fria PCR-rör
- Is

### Utrustning

- Mikroliterpipett\* avsedd för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1.000 µl)
- Bänkcentrifug\* med rotor för 0,2 ml/0,5 ml reaktionsrör (som kan uppnå 10.000 varv/minut)

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

- Realtids-PCR-instrument:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller annat Rotor-Gene-instrument; LightCycler 1.2, 2.0 eller 480; ABI PRISM 7000, 7700 eller 7900HT SDS; eller SmartCycler; och tillhörande specifikt material
- Termocykel\* eller vattenbad\* (för steget med omvänd transkription)

### **Kompletterande reagenser**

- *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit (kat. nr 670091), bestående av cellinjer med negativt, högt och lågt positivt uttryck av BCR-ABL mbc-fusionsgenen för den kvalitativa valideringen av RNA-extraheringen och den omvända transkriptionen

## **Varningar och försiktighet**

För in vitro-diagnostisk användning

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

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

## **Allmänna försiktighetsåtgärder**

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

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

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

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

Var mycket försiktig för att förhindra:

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

Därför rekommenderar vi följande:

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

## Förvaring och hantering av reagens

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

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

Dessa förvaringsvillkor gäller både öppnade och oöppnade komponenter. Komponenter som förvaras under andra villkor än de som anges på etiketterna

fungerar eventuellt inte på rätt sätt och detta kan påverka analysresultaten negativt.

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

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

## Procedur

### Beredning av prov-RNA

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

### Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription

#### Saker som ska utföras före start

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

#### Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Inkubera 1 µg RNA (1–4 µl) i 10 minuter vid 70 °C och kyl omedelbart på is i 5 minuter.**
3. **Centrifugera kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret). Förvara sedan på is.**
4. **Bered nedanstående RT-blandning enligt antalet prover som ska behandlas (tabell 1).**

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

**Tabell 1. Beredning av RT-blandning**

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

- 5. Pipettera 16  $\mu\text{l}$  RT-blandning i varje PCR-rör. Tillsätt sedan 1–4  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) RNA (från steg 3) och justera volymen till 20  $\mu\text{l}$  med nukleasfritt vatten av PCR-grad (se tabell 2).**

**Tabell 2. Beredning av omvänd transkriptionsreaktion**

Komponent	Volym ( $\mu\text{l}$ )
RT-blandning	16
Uppvärmrt prov-RNA (1 $\mu\text{g}$ )	1–4
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	0–3
Slutlig volym	20

6. Blanda väl och centrifugera kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut), för att samla upp vätskan i botten på röret.
7. Inkubera vid 20 °C i 10 minuter.
8. Inkubera vid 42 °C i en termocykel i 45 minuter och sedan omedelbart vid 99 °C i 3 minuter.
9. Kyl på is (för att stoppa reaktionen) i 5 minuter.
10. Centrifugera kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret. Förvara sedan på is.
11. Späd det slutliga cDNA:t med 30 µl nukleasfritt vatten av PCR-grad så att den slutliga volymen är 50 µl.
12. Utför PCR enligt nedanstående protokoll, enligt ditt qPCR-instrument.

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

När detta instrument används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 3.

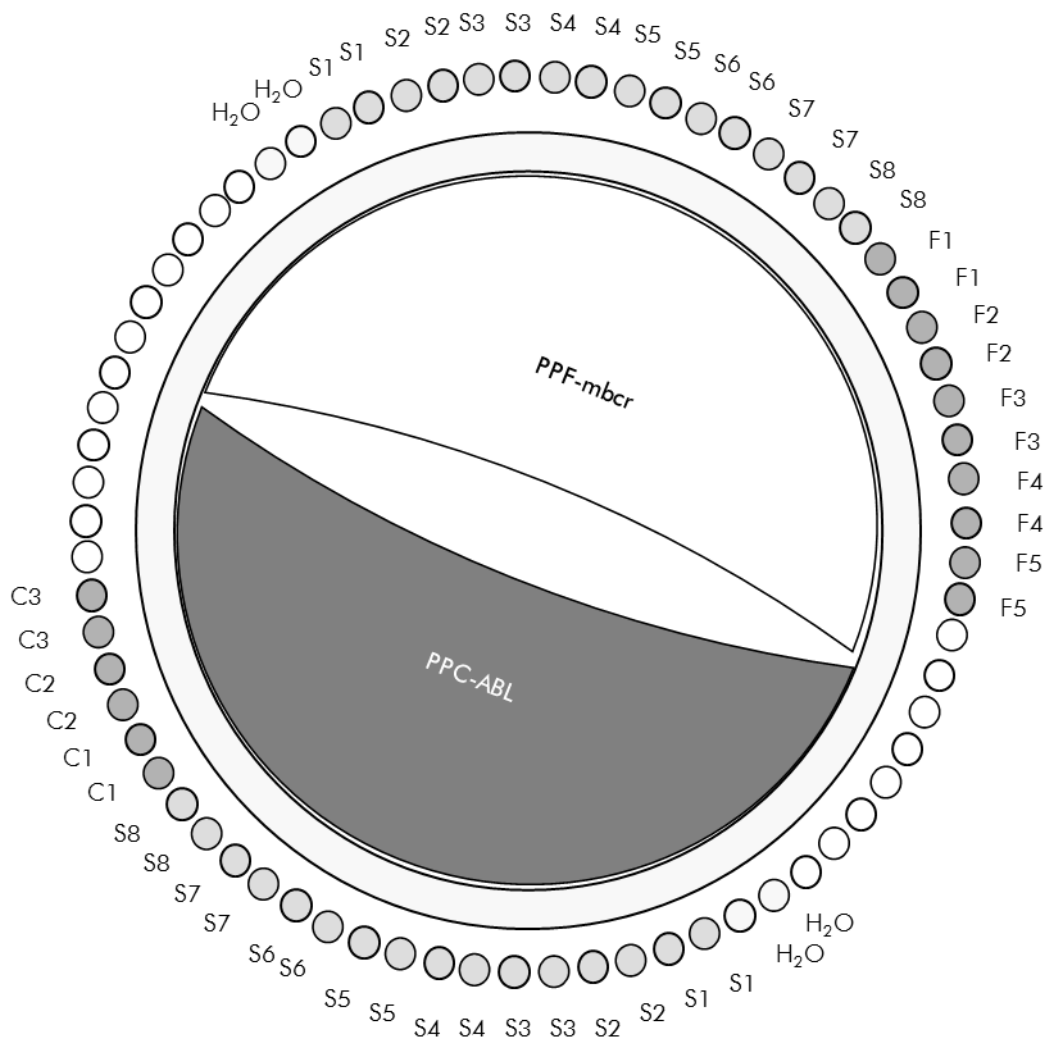
**Tabell 3. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor**

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

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

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar.





**Figur 3. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med ipsogen BCR-ABL1 mbcr-kitet. F1–5:** BCR-ABL1 mbcr-standarder; **C1–3:** ABL-standarder; **S:** cDNA-prov; **H<sub>2</sub>O:** vattenkontroll.

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

Fyll alla andra positioner med tomma rör.

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

**Obs!** Utför alla steg på is.

#### Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 4 beskrivs pipetterings-schemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25  $\mu$ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primer och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

**Tabell 4. Beredning av qPCR-blandning**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL mbcr: 28 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Slutlig koncentration</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	25	29	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	162,5	188,5	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 i varje	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	25 i varje	–

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

**Tabell 5. Temperaturprofil**

<b>Analyssätt</b>	Kvantifiering
<b>Håll</b>	Temperatur: 50 grader Tid: 2 min.
<b>Håll 2</b>	Temperatur: 95 grader Tid: 10 min.
<b>Cykling</b>	50 gånger 95 grader i 15 sek. 60 grader i 1 minut med insamling av FAM-fluorescens i kanal Green (grön): Enkel

- 8. För Rotor-Gene Q-instrument väljer du "Slope Correct" (lutning korrekt) för analysen. Vi rekommenderar att tröskeln ställs in på 0,03. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 5.**

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

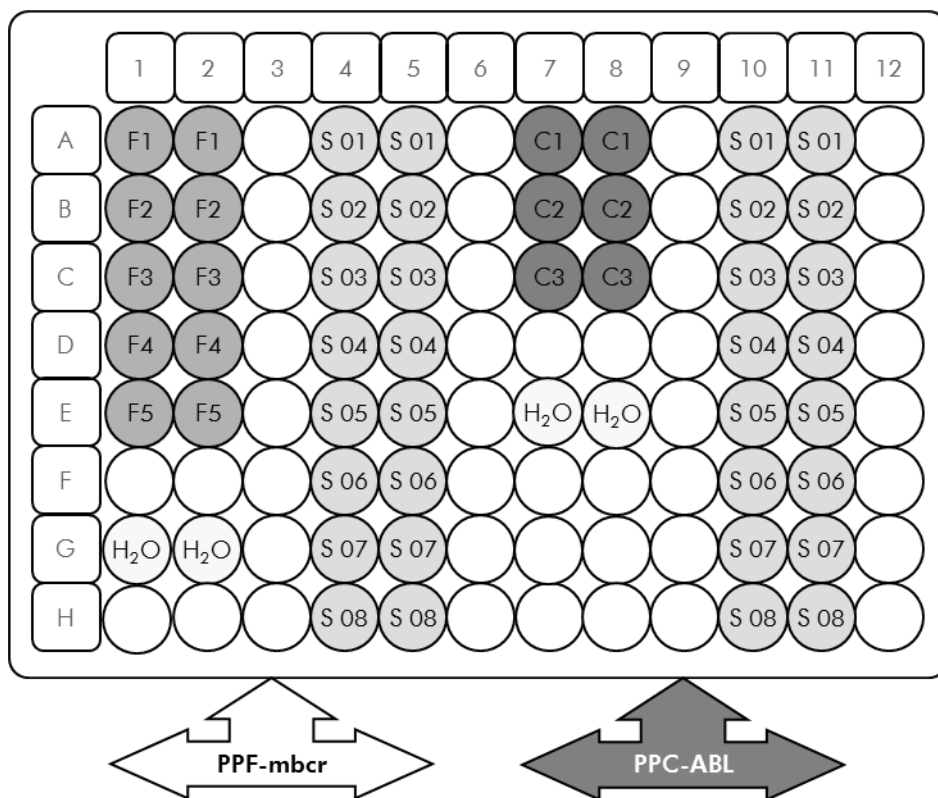
När utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 6.

**Tabell 6. Antal reaktioner med användning av utrustning för qPCR med 96-brunnsplattor**

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

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

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Plattschemat i figur 4 visar ett exempel på ett sådant experiment.



**Figur 4. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment. S:** cDNA-prov; **F1–5:** BCR-ABL mbcr-standarder; **C1–3:** ABL-standarder; **H<sub>2</sub>O:** vattenkontroll.

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

**Obs!** Utför alla steg på is.

### Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 7 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25  $\mu$ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primer och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

**Tabell 7. Beredning av qPCR-blandning**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL mbc: 28 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Slutlig koncentration</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	25	29	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	162,5	188,5	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 i varje	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	25 i varje	–

3. **Dispensera 20  $\mu$ l av qPCR-pre-mixen per brunn.**
4. **Tillsätt 5  $\mu$ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i den motsvarande brunnen (total volym 25  $\mu$ l).**
5. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
6. **Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 sekunder).**
7. **Placera plattan i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer. Programmera termocykeln med termocykelprogrammet så som anges i tabell 8 för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS eller tabell 9 för LightCycler 480-instrumentet.**

**Tabell 8. Temperaturprofil för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS**

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

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

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

**8. Följ steg 8a för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS. Följ steg 8b för LightCycler 480-instrumentet.**

**8a. ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS: Vi rekommenderar en tröskelinställning på 0,1 så som beskrivs i EAC-protokollet i analyssteget och en baslinjeinställning mellan cykel 3 och 15. Starta cyklingsprogrammet så som anges i tabell 8.**

**8b. LightCycler 480-instrument: Vi rekommenderar ett Fit point-analyssätt med bakgrund vid 2,0 och tröskel vid 2,0. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 9.**



## Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

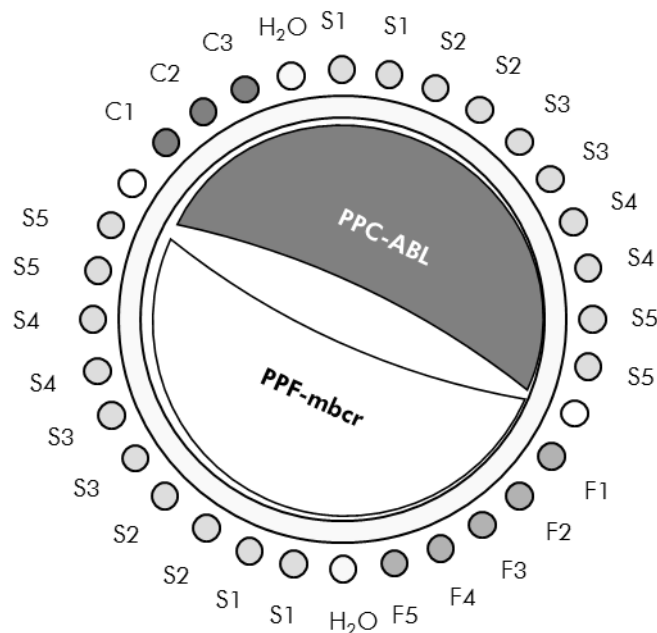
När kapillärinstrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 10.

**Tabell 10. Antal reaktioner för LightCycler 1.2- och 2.0-instrument**

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

### Provbehandling på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

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



**Figur 5. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med ipsogen BCR-ABL1 mbcr-kitet. F1–5:** BCR-ABL mbcr-standarder; **C1–3:** ABL-standarder; **S:** okänt DNA-prov som ska analyseras; **H<sub>2</sub>O:** vattenkontroll.

### qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

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

**Obs!** Utför alla steg på is.

### Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 11 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 20 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

**Tabell 11. Beredning av qPCR-blandning**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 14 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL mbcr: 16 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Slutlig koncentration</b>
Färskt beredd LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60	68,0	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	0,8	12	13,6	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	10,2	153	173,4	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5,0	5 i varje	5,0 i varje	–
Total volym	20,0	20 i varje	20,0 i varje	–

3. **Dispensera 15  $\mu$ l av qPCR-pre-mixen per kapillär.**
4. **Tillsätt 5  $\mu$ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i det motsvarande röret (total volym 20  $\mu$ l).**
5. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
6. **Placera kapillärerna i adaptrarna som medföljde apparaten och centrifugera kortvarigt (700 x g, cirka 10 sekunder).**
7. **Ladda kapillärerna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.**
8. **Programmera LightCycler 1.2- eller 2.0-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 12.**

**Tabell 12. Temperaturprofil**

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

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

**9a. LightCycler 1.2: Läget F1/F2 och "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (2:a derivatanalys) rekommenderas. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 12.**

**9b. LightCycler 2.0: Vi rekommenderar användningen av automatiserad (F''max) analys på LightCycler 2.0 programversion 4.0 för att erhålla reproducerbara resultat. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 12.**

## Protokoll: qPCR på SmartCycler-instrumentet

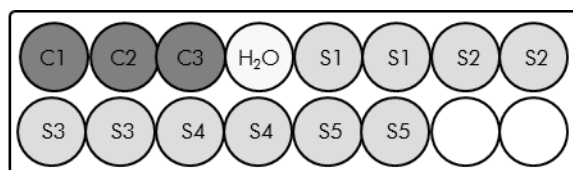
När detta instrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 13.

**Tabell 13. Antal reaktioner för SmartCycler-instrumentet**

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

### Provbehandling på SmartCycler-instrumentet

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



Alla analyser på detta första block utförs med PPC-ABL.



Alla analyser på detta andra block utförs med PPF-mbcr.

**Figur 6. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment. S:** cDNA-prov; **F1–5:** BCR-ABL mbcr-standarder; **C1–3:** ABL-standarder; **H<sub>2</sub>O:** vattenkontroll.

## qPCR på SmartCycler-instrumentet

**Obs!** Utför alla steg på is.

### Procedur

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

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 14 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25  $\mu$ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primer och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

**Tabell 14. Beredning av qPCR-blandning**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 14 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL mbcr: 16 + 1 reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Slutlig koncentration</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	15	17	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	97,5	110,5	–
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 i varje	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	25 i varje	–

3. **Dispensera 20  $\mu$ l av qPCR-pre-mixen per brunn.**

4. Tillsätt 5  $\mu$ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 13) i det motsvarande röret (total volym 25  $\mu$ l).
5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
6. Ladda proverna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
7. Programmera SmartCycler-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 15.

**Tabell 15. Temperaturprofil**

<b>Håll</b>	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minuter
<b>Håll 2</b>	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter
<b>Cykling</b>	50 gånger 95 °C i 15 sekunder 60 °C i 1 minut med insamling: Enkel

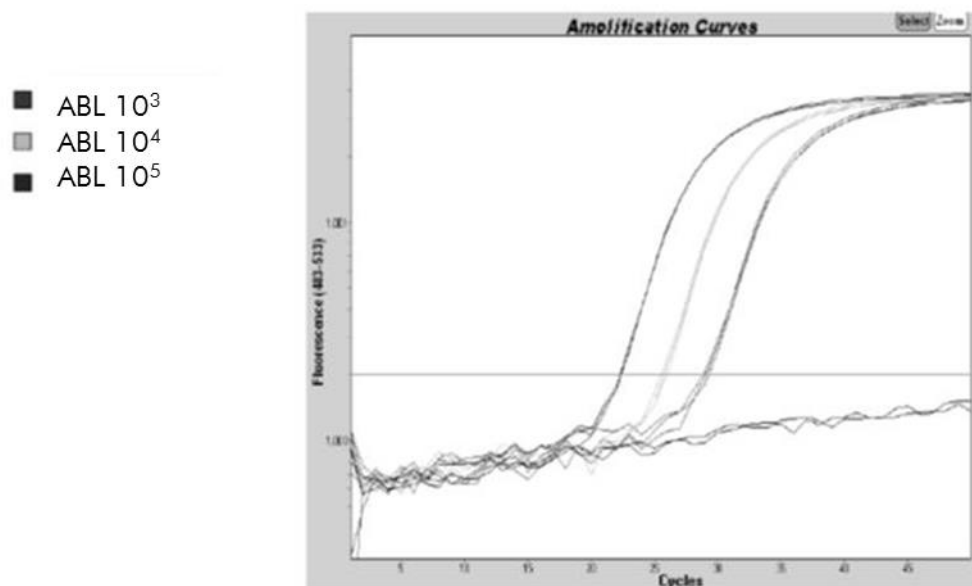
8. Vi rekommenderar en tröskelinställning på 30. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 15.

## Tolkning av resultat

### Dataanalysprincip

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

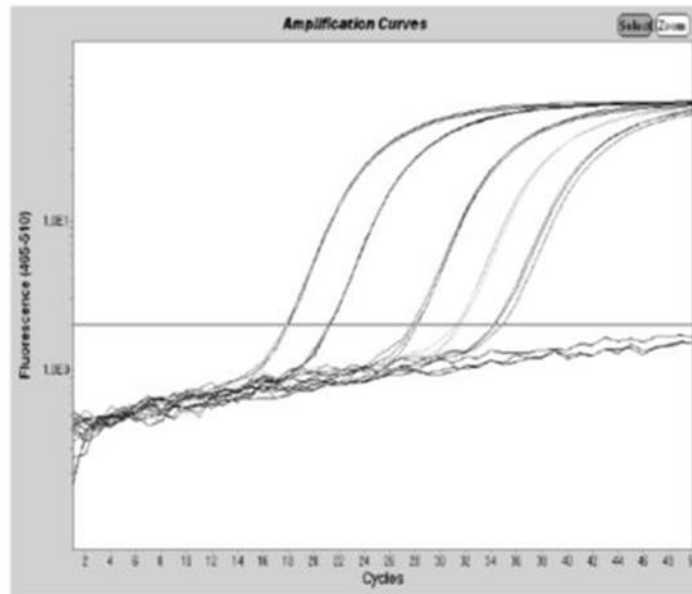
När man använder standarder med ett känt antal molekyler, kan man fastställa en standardkurva och bestämma den exakta mängden mål som finns i testprovet. Standardkurvorna för *ipsogen* är plasmidbaserade; vi använder 3 plasmidstandardspädningar för CG (kontrollgenen), och 5 standardspädningar för FG (fusionsgenen) för att säkert få noggranna standardkurvor. I figur 7 och 8 visas ett exempel på TaqMan-amplifieringskurvor som erhållits med *ipsogen* BCR-ABL mbc-kitet.



**Figur 7. Detektion av ABL-standarder (C1, C2, C3).** 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> och 10<sup>5</sup> kopior/5 µl.



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



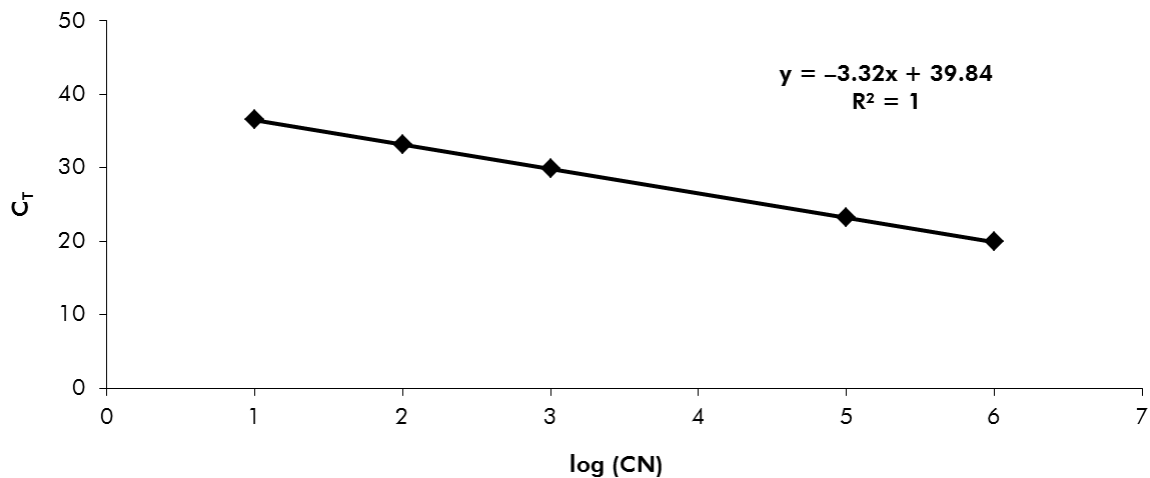
**Figur 8. Detektion av BCR-ABL mbc-standarder (F1–F5).  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  kopior/ $5 \mu\text{l}$ .**

## Resultat

### Standardkurva och kvalitetskriterier

Rådata kan klistras in i en Excel<sup>®</sup>-fil för att analyseras.

För varje gen (ABL och BCR-ABL), ritas råa  $C_T$ -värden in som erhållits från plasmidstandardspädningar i enlighet med log-kopieantalet (3, 4 och 5 för C1, C2 och C3; 1, 2, 3, 5 och 6 för F1, F2, F3, F4 och F5). I figur 9 visas ett exempel på den teoretiska kurvan som beräknats på 5 standardspädningar.



**Figur 9. Teoretisk kurva som beräknats från 5 standardspädningar.** En linjär regressionskurva ( $y = ax + b$ ) beräknas för varje gen (ABL och BCR-ABL), där  $a$  är linjens lutning och  $b$  är  $y$ -skärningspunkten, vilket är  $y$ -koordinaten för den punkt där linjen korsar  $y$ -axeln. Dess ekvation och bestämningskoefficient ( $R^2$ ) är tryckta på grafen.

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

### Normaliserat kopieantal (normalized copy number, NCN)

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

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

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

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

### MRD-värde

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

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

## Känslighet

Känsligheten eller sensitiviteten (SENS<sub>v</sub>) beräknas enligt det relativa uttrycket av FG vid diagnosen (FG<sub>CN</sub>/CG<sub>CN</sub>)<sub>DX</sub> och CG-uttryck (CG<sub>CN,FUP</sub>) i uppföljningsprovet.

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

## Kvalitetskontroll på ABL-värden

Dålig kvalitet för RNA eller problem under qPCR-stegen leder till låga ABL<sub>CN</sub>. Vi rekommenderar att man kasserar resultat från prover som ger ABL<sub>CN</sub> < 1318 (lägre värde för 95 % KI från patientprover i EAC-studien, litteraturhänvisning 4).

## Reproducerbarhet mellan replikat

Variationen i C<sub>T</sub>-värden mellan replikat ska vara < 2, vilket motsvarar en fyrfaldig förändring av kopiaantalvärdena.

Variation i C<sub>T</sub>-värden mellan replikat är generellt < 1,5 om det genomsnittliga C<sub>T</sub>-värdet för replikaten är < 36 (2).

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

## Vattenkontroller

Negativa kontroller ska ge noll CN.

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

## Felsökningshandbok

Denna felsökningshandbok kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För ytterligare information, se även sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Dessutom svarar teamet från QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om antingen informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se "Kontaktinformation", sida 47).

## Kommentarer och förslag

---

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

- a) Dålig RNA-kvalitet                      Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.  
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (höggradig positiv kontroll i *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. nr 670091) parallellt.
- b) Steget för omvänd transkription misslyckas                      Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.  
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. nr 670091) parallellt.

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

- a) Dålig RNA-kvalitet                      Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.  
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. nr 670091) parallellt.
- b) Steget för omvänd transkription misslyckas                      Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.  
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. nr 670091) parallellt.

### Standardsignal negativ

- a) Pipetteringsfel                      Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.  
Upprepa PCR-körningen.
- b) Felaktig förvaring av kitkomponenter                      Förvara *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPC och PPF) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 11.  
Undvik upprepad frysning och tining.  
Alikvotera reagenser för förvaring.

## Kommentarer och förslag

---

### Negativa kontroller är positiva

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

### Ingen signal, även i standardkontroller

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

### Ingen eller låg signal i prover men standardkontroller är utan anmärkning

a) Dålig RNA-kvalitet eller låg koncentration	Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar. Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA ( <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. nr 670091) parallellt.
b) Steget för omvänd transkription misslyckas	Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar. Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA ( <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. nr 670091) parallellt.

## Kommentarer och förslag

---

### Fluorescensintensiteten är för låg

- a) Felaktig förvaring av kitkomponenter      Förvara *ipsogen* BCR-ABL1 mbc-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPC och PPF) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 11.  
Undvik upprepad frysning och tining.  
Alikvotera reagenser för förvaring.
- b) Mycket låg initial mängd av mål-RNA      Öka mängden prov-RNA.  
**Obs!** Beroende på vilken metod som valts för RNA-beredning kan hämmande effekter uppstå.

### LightCycler: Fluorescensintensiteten varierar

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

### LightCycler: Fel i standardkurvan

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

## Kvalitetskontroll

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

## Begränsningar

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

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

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

**Obs!** Kitet har utformats i enlighet med studierna "Europe Against Cancer" (EAC) (4) och överensstämmer med de uppdaterade internationella rekommendationerna (3, 5). Det ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument (se "Material som behövs men inte medföljer", sida 9). Om denna produkt används utanför indikationen och/eller om komponenterna modifieras, upphör ansvarsskyldigheten för QIAGEN.

## Prestandaegenskaper

### Icke-kliniska studier

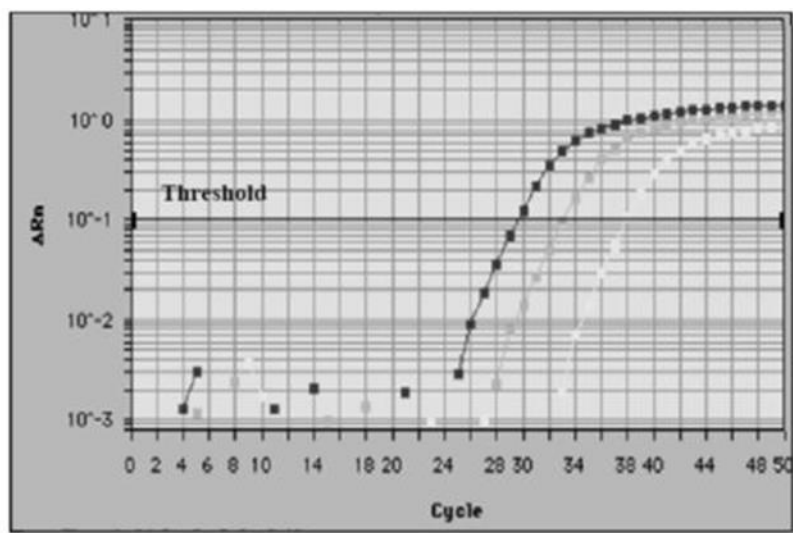
#### Material och metoder

Prestandautvärdering utfördes på ett ABI PRISM 7700 SDS i kombination med reagenser som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 9. Ekvivalensstudier utfördes på följande instrument för att validera dess användning: ABI PRISM 7000 och 7900HT SDS, LightCycler 1.2 och 480, Rotor-Gene 3000 och SmartCycler-instrument (6).

Icke-kliniska studier har utförts för att fastställa den analytiska prestandan för *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr-kitet. Dessa icke-kliniska laboratoriestudier utfördes på totalt RNA från TOM1-cellinjen utspädd i en konstant slutlig mängd av totalt RNA från MV4-11-cellinje.

För att bestämma analysens upprepningsbarhet blev 5 olika koncentrationer av TOM1 totalt RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg och 0,5 pg) utspädda i MV4-11 totalt RNA, i en konstant slutlig total mängd på 1.000 ng, och analyserade i 5 replikat per körning och i 4 olika körningar (figur 10).

- TOM1  $5 \times 10^{-3}$
- TOM1  $5 \times 10^{-4}$
- TOM1  $5 \times 10^{-5}$



**Figur 10. Amplifieringskurvor för  $5 \times 10^{-3}$  (5 ng),  $5 \times 10^{-4}$  (0,5 ng) och  $5 \times 10^{-5}$  (0,05 ng) spädningar av TOM1 totalt RNA i MV4-11-negativt totalt RNA.**

### Analysdata

I tabell 16–19 visas analyserna av jämförelser mellan olika analyser med genomsnittlig tröskelcykel ( $C_T$ ), standardavvikelse (SD), antal prover (n), variationskoefficient (CV), genomsnittligt antal kopior (CN) och genomsnittligt normaliserat antal kopior (NCN).

**Tabell 16. Analys av jämförelse mellan olika analyser – cellinjer mbc och ABL**

Cellinje	Spädning	Genomsnittlig $C_T$	SD	n	CV (%)
mbcr	$5 \times 10^{-3}$ (5 ng/1 $\mu$ g)	29,19	0,26	20	0,88
	$5 \times 10^{-4}$ (0,5 ng/1 $\mu$ g)	33,70	0,48	20	1,47
	$5 \times 10^{-5}$ (0,05 ng/1 $\mu$ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46



**Tabell 17. Analys av jämförelse mellan olika analyser – plasmider**

Gen	Plasmid	Genomsnittlig C <sub>T</sub>	SD	n	CV (%)
mbcr	F1 (10 <sup>1</sup> kopior)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 <sup>2</sup> kopior)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 <sup>3</sup> kopior)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 <sup>5</sup> kopior)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 <sup>6</sup> kopior)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 <sup>3</sup> kopior)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 <sup>4</sup> kopior)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 <sup>5</sup> kopior)	22,53	0,42	12	1,86

**Tabell 18. Analys av jämförelse mellan olika analyser – cellinjer BCR-ABL mbcr och ABL (medel-CN)**

Cellinje	Spädning	Medel- CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 <sup>-3</sup> (5 ng/1 µg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 <sup>-4</sup> (0,5 ng/1 µg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 <sup>-5</sup> (0,05 ng/1 µg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9.459,17	100	42,92

**Tabell 19. Analys av jämförelse mellan olika analyser – cellinje BCR-ABL mbcr (medel-NCN)**

Cellinje	Spädning	Medel-NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	$5 \times 10^{-3}$ (5 ng/1 $\mu$ g)	267,46	93,22	20	34,85
	$5 \times 10^{-4}$ (0,5 ng/1 $\mu$ g)	23,54	7,36	20	31,28
	$5 \times 10^{-5}$ (0,05 ng/1 $\mu$ g)	2,60	2,80	20	107,66

\* Endast för dessa studieresultat anges NCN som  $\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$ .

## Kliniska studier

Prestandautvärdering utfördes på ett ABI PRISM 7700 SDS i kombination med reagenser som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 9. Ekvivalensstudier utfördes på följande instrument för att validera dess användning: ABI PRISM 7000 och 7900HT SDS, LightCycler 1.2 och 480, Rotor-Gene 3000 och SmartCycler-instrument (6).

En grupp med 26 laboratorier, i 10 europeiska länder, som deltog i en gemensam aktion med Europe Against Cancer (EAC), använde plasmider som tillhandahållits av IPSOGEN för att fastställa ett standardiserat protokoll för qPCR-analys av de viktigaste leukemiassocierade fusionsgenerna i den kliniska miljön. BCR-ABL p190-transkriptet var en av fusionsgenerna (FG) som ingick i studien. Här presenteras en sammanfattning av denna valideringsstudie; de fullständiga resultaten publicerades 2003 (4, 7).

## Reproducerbarhet mellan olika laboratorier för CG- och FG-plasmidstandarder

Elva laboratorier utförde ett reproducerbarhetsexperiment mellan olika laboratorier för att bedöma variabiliteten i mätningen av CG- och FG-plasmidstandardspädningarna. Spädningar utfördes i duplikat på varje laboratorium. I tabell 20 rapporteras genomsnitt, standardavvikelse och CV (%) för varje spädning.

**Tabell 20. Reproducerbarhet mellan olika laboratorier för CG- och FG-plasmidstandarder**

Gen	Spädning	Medelvärde	C <sub>T</sub> SD	CV (%)
ABL-kontrollgen	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
BCR-ABL mbcr-fusionsgen	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

#### Uttrycksvärden för BCR-ABL mbcr FG-transkriptet

I tabell 21 och 22 visas uttrycksvärdena för BCR-ABL mbcr FG-transkriptet och ABL CG, för TOM1-cellinjen, ALL-patienter vid diagnosen samt för vanliga patienter.

**Tabell 21. Uttrycksvärden för BCR-ABL mbcr FG-transkriptet och ABL CG – C<sub>T</sub>-värden**

	C <sub>T</sub> -värden (95 % intervall)	
	BCR-ABL mbcr	ABL
<b>TOM1-cellinje</b>	22,8	21,8
<b>ALL-patientprover</b>		
BM (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
PB (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
<b>Negativa patientprover</b>		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

**Tabell 22. Uttrycksvärden för BCR-ABL mbcr FG-transkriptet och ABL CG — CN- och NCN-värden**

	CN-värden (95 % intervall)		NCN-värden (95 % intervall)
	BCR-ABL mbcr	ABL	CN BCR-ABL mbcr/CN ABL
<b>ALL-patientprover</b>			
BM (n = 17)	9.550 (1.738–97.724)	11.912 (5.012–70.795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91.201 (1.905– 208.930)	134.896 (4.786–114.815)	0,68 (0,4–1,82)
<b>Negativa patientprover</b>			
BM (n = 26)	–	19.201 (12,922–25,480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

ABL C<sub>T</sub>-värden skilde sig inte signifikant mellan normala prover och leukemiprover, inte heller mellan provtyper (PB eller BM) eller leukemiprover (ALL, AML, CML).

### Falska negativa och falska positiva frekvenser

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

- Positiva kontroller: TOM1-celler, en cellinje som är välkänd för dess positivitet för BCR-ABL p190-fusionsgen; patientprover är redan bedömda avseende p190-positivitet
- Negativa kontroller: Negativa RNA-prover, kontroller utan amplifiering (no amplification controls, NAC) av RNA från *E. coli* istället för humant RNA för att kontrollera eventuell PCR-kontaminering, och kontroller utan templat (no template controls, NTC), som innehöll vatten istället för humant RNA

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

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

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

I tabell 23 visas antalet och procenten för falska negativa och falska positiva prover.

**Tabell 23. Falska negativa och falska positiva prover**

Falsk negativitet		Falsk positivitet	
$10^{-3}$	$10^{-4}$	FG-negativ kontroll	NAC/NTC
0 % (0/54)	4 % (3/75)	4,8 % (6/126)	5,8 % (7/120)

## Litteraturhänvisningar

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

Om du vill ha en fullständig referenslista kan du besöka QIAGEN:s referensdatabas online på [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) eller kontakta QIAGEN:s tekniska serviceavdelning eller din lokala distributör.

### Citerade litteraturhänvisningar

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 435.
2. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations

for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.

6. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
7. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

## Symboler

Nedanstående symboler kan finnas på förpackningar och etiketter:



Innehåller reagenser som räcker för <N> reaktioner



Utgångsdatum



Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen

## Kontaktinformation

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt center för teknisk support på [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), ring 00800-22-44-6000 eller kontakta en av QIAGEN:s tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	För 24 reaktioner: ABL Control Gene Standards (ABL-kontrollgenstandarder), BCR-ABL mbc Fusions Gene Standards (BCR-ABL mbc-fusionsgenstandarder), Primer and Probe Mix ABL (primer och sökfragmentblandning ABL), Primer and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene (primer och sökfragmentblandning BCR-ABL mbc-fusionsgen)	670023
<b>Rotor-Gene Q MDx — för IVD-validerad PCR-analys i realtid i kliniska applikationer</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033
<b><i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit – för kvalitativ validering av RNA-extrahering och omvänd transkription av BCR-ABL mbc-fusionsgenen</b>		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Cellinjer med negativt, högt och lågt positivt uttryck av BCR-ABL mbc-fusionsgenen	670091

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. QIAGEN-kithandböcker och användarhandböcker finns att tillgå på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska serviceavdelning eller från lokal återförsäljare.





Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

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

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

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

Varumärken: QIAGEN<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ABI PRISM<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); SmartCycler<sup>®</sup> (Cepheid).

### Begränsat licensavtal

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

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

För uppdaterade licensvillkor, se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN, med ensamrätt.

---

**www.qiagen.com**

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

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

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

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

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

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

