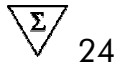


Juli 2016

Håndbok for *ipsogen*[®] BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-sett



Versjon 1



Kvantitativ in vitro-diagnostikk

For bruk med Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI
PRISM[®] og LightCycler[®] instrumenter



REF 670823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3 **MAT** 1072511NO



Sample & Assay Technologies

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**.

Innhold

Bruksområde	5
Sammendrag og forklaring	5
Bakgrunn om KML	5
Sykdomsovervåking	5
Prinsippene for prosedyren	7
Medfølgende materialer	9
Settets innhold	9
Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger	11
Advarsler og forholdsregler	11
Generelle forholdsregler	12
Håndtering og oppbevaring av reagensen	13
Håndtering og oppbevaring av prøver	13
Prosedyre	14
Klargjøring av prøve-RNA	14
Protokoller	
■ Revers transkripsjon	Fehler! Textmarke nicht definiert.
■ q qPCR på Rotor Gene Q MDx 5plex HRM- eller RotorGene Q 5plex HRM-instrumenter med 72-glassrotor	Fehler! Textmarke nicht definiert.
■ PqPCR på Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, ABI PRISM 7900HT SDS og LightCycler 480-instrumenter	Fehler! Textmarke nicht definiert.
■ qPCR på LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tolkning av resultater	31
Prinsipp for dataanalysering	31
Standardkurver og kvalitetskriterier som gjelder rådata	32
Normalisert kopinummer (NCN)	34
IS-konvertering og MRR-rapportering	35
Sammendrag av kvalitetskriterier	36
Feilsøking	36
Kvalitetskontroll	37
Begrensninger	37
Ytelseegenskaper	37

Blankgrense og påvisningsgrense	38
Linearitet	38
Tilsetninger	38
Presisjon	38
Konkordansstudie: ERM-AD623 BCR-ABL1 enkeltplasmidstandard (IRMM) versus ipsogen enkeltplasmidstandard (QIAGEN)	39
Referanser	41
Symboler	42
Kontaktinformasjon	42
Bestillingsinformasjon	43

Bruksområde

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-settet er beregnet på kvantifisering av BCR-ABL p210 b2a2- eller b3a2-transkripsjon i benmarg eller prøver av perifert blod ved akutt lymfoblastisk leukemi (ALL) eller kronisk myelogen leukemi (KML) tidligere diagnostisert med en BCR-ABL Mbcr-fusjons-gen (FG)-hendelse. Testen er beregnet på å evaluere nivået av molekylær respons; resultater kan brukes for oppfølging av minimal restsykdom.

Sammendrag og forklaring

Bakgrunn om KML

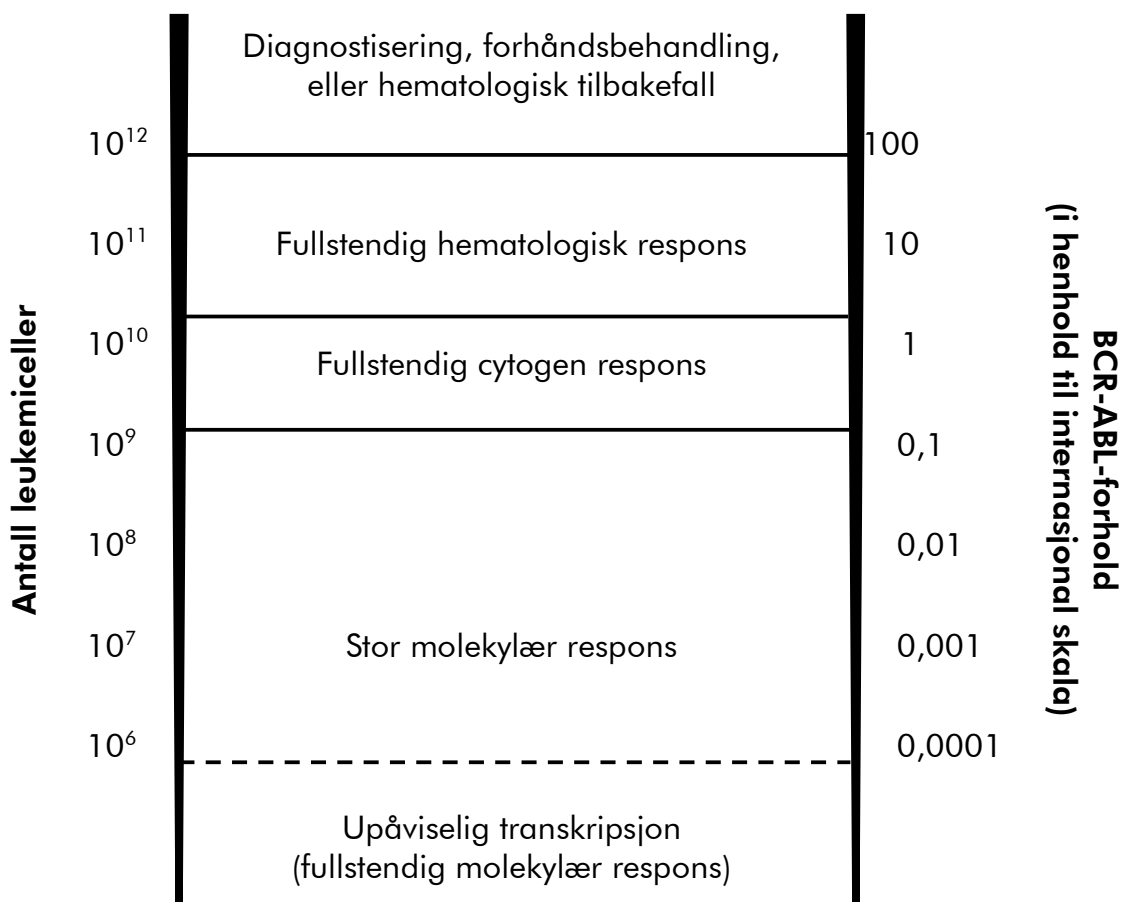
KML tilhører gruppen av myeloproliferative neoplasmer og er i >90% av tilfeller karakterisert av tilstedeværelsen av Philadelphia-kromosomet (Ph CHR5).

Dette kromosomet er produktet av en resiprok translokasjon mellom de lange armene av kromosom 9 og 22, t(9;22), BCR (Breakpoint Cluster Region) plassert på kromosom 22 og c-ABL-onkogenet fra kromosom 9. Tilsvarende fusjons-gen, BCR-ABL, transkriberes til et 8,5 kb mRNA, med de 2 «junction» (overgang)-variantene b2a2 (40% av tilfeller) og b3a2 (55% av tilfeller). Det koder et kimerisk protein, p210, med forhøyet tyrosinkinaseaktivitet. b2a3- og b3a3-transkripsjon representerer under 5% av tilfeller. Et Ph-kromosom kan også påvises hos 35% av voksne ALL-pasienter.

Årlig forekomst av KML er ca. 1–2 pr. 100 000, og KML utgjør 20% av leukemier hos voksne. Det karakteriseres klinisk av et overskudd av myeloidceller som differensieres og fungerer normalt. Pasienter med KML diagnostiseres i 90–95% av tilfeller i den kroniske eller stabile fasen av sykdommen. Historisk gikk pasienter inn i en akselerert fase i løpet av 4 til 6 år som førte til blastkrise og akutt leukemi, hvilket alltid er fatalt. Innføringen av imatinib og, mer nylig, andregenerasjons tyrosinkinasehemmere (TKI), endret dramatisk det naturlige sykdomsforløpet: de fleste pasienter forblir nå i remisjon og berettiger langvarig oppfølging og sykdomsovervåking.

Sykdomsovervåking

Målet med KML-behandling er så langt å oppnå 100% overlevelse og Ph-kromosomnegativitet. Sykdomsovervåking er derfor et viktig verktøy for å vurdere behandlingsrespons og påvise tidlig tilbakefall for hver enkelt pasient. Under TKI-behandling utvikles pasienter som regel fra hematologiske til cytogene, deretter molekylær remisjon, hvilket tilsvarer reduserte antall leukemiceller og BCR-ABL-transkripsjoner som angitt i figur 1 nedenfor.



Figur 1. Tilpasset fra referanse 1.

Standardmetoden for å anslå tumorbyrden hos KML-pasienter er konvensjonell cytogen analyse (G-bånding) på benmarg (BM)-metafaser. Cytogen respons er vurdert på minst 20 margmetafaser. Nivået av cytogen respons er anslått ut fra prosentandelen av Ph-kromosompositive metafaser (se tabell 1, referanse 2). Denne vurderingen avhenger imidlertid av laboratorieytelser og har lav følsomhet, ved 5% når 20 metafaser analyseres.

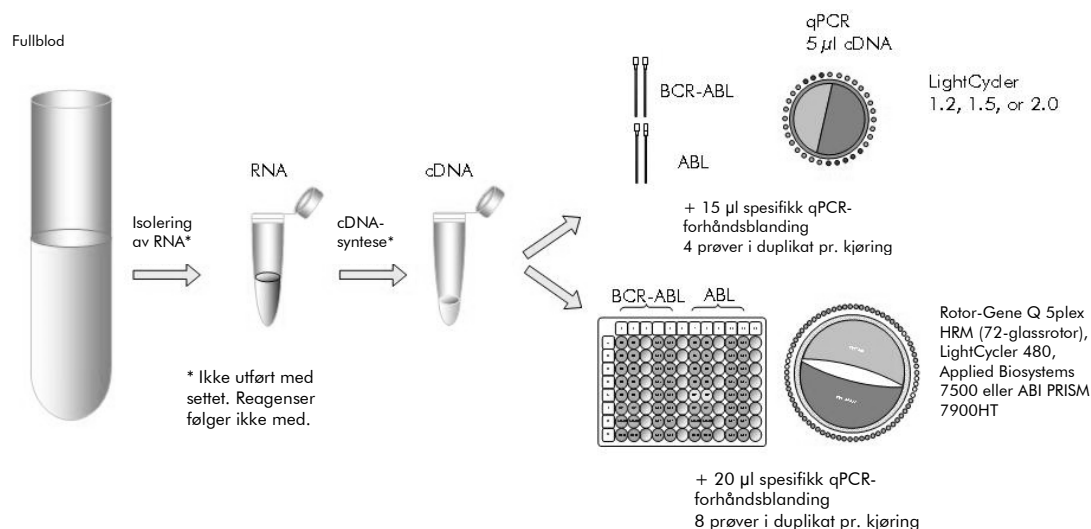
Sanntids kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) som kvantifiserer BCR-ABL Mbc mRNA på prøver av perifert blod (PB), er nå en del av sykdomsovervåkningsmetodene for KML-behandling. Den er mindre invasiv enn konvensjonell benmargsmetafasecytogenetikk, og mer følsom.

Anbefalinger for KML-sykdomsovervåking er også nylig oppdatert for å innføre nye kliniske bevis fra kliniske studier samt forbedrede målsetninger og verktøy for sykdomsovervåking. De nyligste anbefalingene vedrørende definisjon av respons og overvåking av pasienter på imatinib kommer fra ELN-ekspertene (2).

Fra et teknisk ståsted har internasjonale eksperter gjort en innsats for å harmonisere BCR-ABL Mbc-testing og -rapportering (3–5). I tillegg er et

referansepanel validert nylig under veiledning av WHO, for å muliggjøre en enkel standardisering av BCR-ABL-kvantifisering (6).

Prinsippene for prosedyren



Figur 2. RNA-isolasjon, cDNA-syntese og qPCR.

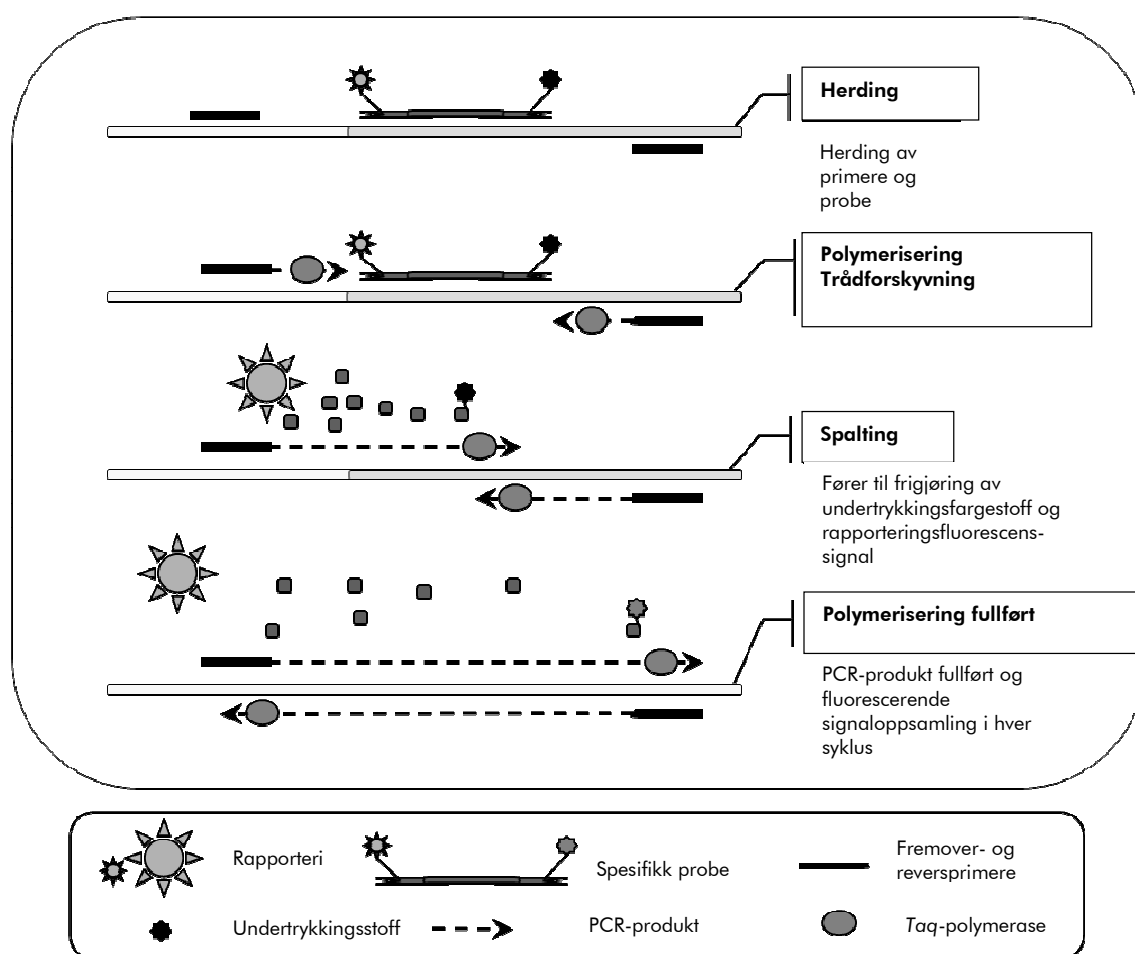
qPCR tillater nøyaktig kvantifisering av PCR-produkter under den eksponensielle fasen av PCR-forsterkningsprosessen. Kvantitative PCR-data kan innhentes raskt, uten behandling etter PCR, med sanntids påvisning av fluorescerende signaler under og/eller etter PCR-sykling, hvilket drastisk reduserer faren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

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

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 3. 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 fortsetter 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.

Medfølgende materialer

Settets innhold

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit		(24)
Katalognr.		670823
Antall reaksjoner		24
Revers transkripsjon		
Reverse Transcriptase (Revers transkriptase)		36 µl
5x RT Buffer for reverse transcription (5x RT-buffer for revers transkripsjon)		180 µl
dNTP Mix (dNTP-blanding)*		72 µl
Random Primer (Tilfeldig primer) [†]		190 µl
RNase Inhibitor (RNase-hemmer)		18 µl
DTT [‡]		45 µl
Kalibrering		
Høy positiv RNA-kontroll		10 µl x 3
IS-MMR-kalibrator		10 µl x 3
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardfortynning for MbcR- og ABL-enkeltplasmid) (10 ¹ kopier/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR og ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardfortynning for MbcR- og ABL-enkeltplasmid) (10 ² kopier/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardfortynning for MbcR- og ABL-enkeltplasmid) (10 ³ kopier/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardfortynning for MbcR- og ABL-enkeltplasmid) (10 ⁴ kopier/5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardfortynning for MbcR- og ABL-enkeltplasmid) (10 ⁵ kopier/5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl

Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardfortynning for Mbcr- og ABL-enkeltplasmid) (10^6 kopier/5 μ l))	SP6-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 μ l
---	------------------------	------------

* Deoksynukleotider 10 mM hver.

† Tilfeldig nonamer-oligonukleotid.

‡ Ditiotritol.

Settets innhold, fortsatt

Reagenser for qPCR		
Master Mix for qPCR (Masterblanding for qPCR)	qPCR-blanding 2x	2 x 1275 μ l
Primers and Probe Mix ABL (Primere og probeblanding ABL) [§]	PPC-ABL 25x	110 μ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcr Fusion Gene (Primere og probeblanding BCR-ABL Mbcr-fusjonsgen) [¶]	PPF-Mbcr 25x	110 μ l
ROX™ I fluorescent dye for ABI PRISM instruments (ROX™ I fluorescent fargestoff for ABI PRISM-instrumenter)	ROXI	102 μ l
ROX II fluorescent dye for Applied Biosystems instruments (ROX II fluorecent fargestoff for Applied Biosystems-instrumenter)	ROXII	102 μ l
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet		1400 μ l
ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX Kit Handbook</i> (engelsk)		1

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

[¶] Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for BCR-ABL Mbcr-fusjonsgenet samt en spesifikk FAM-TAMRA-probe.

Merk: Bland forsiktig og sentrifuger raskt rørene med revers transkriptase og masterblanding, standardene (SP 1-SP 6) 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

- Reagenser for RNA-rensing: Validerte reagenser er RNeasy Midi Kit, QIAGEN, kat.nr. 75144; eller TRIzol[®] Reagent, Thermo Fisher Scientific, kat.nr. 15596-018 eller 15596-026
- Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet

Forbruksvarer

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

Utstyr

- Mikroliterpipetter* dedikert for PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Benkesentrifuge* med rotor for 0,2 ml/0,5 ml reaksjonsglass (kan oppnå 10 000 rpm)
- Sanntids PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller annet Rotor-Gene-instrument; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 eller 480; Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system; ABI PRISM 7900HT SDS; og assosiert spesifikt materiale
- Termisk sykler* eller vannbad* (revers transkripsjon-trinn)

Advarsler og forholdsregler

For bruk i forbindelse med in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på det aktuelle sikkerhetsdatabladet (HMS). Disse er tilgjengelige online i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety. Her kan du finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

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

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

Følgende fare- og sikkerhetsutsagn gjelder komponenter i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-settet:

DTT 0.1M RT

Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Oppsøk medisinsk hjelp hvis det oppstår hudirritasjon.

Generelle forholdsregler

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

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

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

Utvis ekstrem forsiktighet for å unngå:

- 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 standardene (SP1–SP6) i et eget rom.

Håndtering og oppbevaring av reagensen

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

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

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

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

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

Håndtering og oppbevaring av prøver

Fullblodprøver skal ikke antikoaguleres med kalium-EDTA og oppbevares ved $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i høyst 5 dager før RNA-ekstraksjon.

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 rensset RNA med agarose*-gelelektroforese, ved bruk av en Agilent® Bioanalyzer®, eller spektrofotometri før analysering.†

Protokoll: Revers transkripsjon

Ting som skal gjøres før oppstart

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

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Bland godt (ikke roter) og sentrifuger raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset). Oppbevar deretter på is.
3. Juster RNA-prøver til $0,1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pipetter $10\text{ }\mu\text{l}$ ($1\text{ }\mu\text{g}$) av hver RNA-prøve i separate, merkede glass. Pipetter $10\text{ }\mu\text{l}$ av den høye positive RNA-kontrollen, $10\text{ }\mu\text{l}$ av IS-MMR-kalibratoren og $10\text{ }\mu\text{l}$ nukleasefritt vann (som en RT-negativ kontroll) i separate, merkede glass, og behandle dem parallelt med RNA-prøvene, som beskrevet nedenfor.
4. Inkuber hver prøve, kontroll og kalibrator ($10\text{ }\mu\text{l}$ hver) i 5 min ved $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ og kjøøl ned på is omgående i 5 min.
5. Sentrifuger raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset). Oppbevar deretter på is.
6. Klargjør følgende RT-blanding i samsvar med antallet prøver, kontroll og kalibrator som behandles (tabell 1).

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

† Optisk tetthet (Optical Density – OD) målt ved 260 og 280 nm: OD på 1,0 ved 260 nm tilsvarer ca. $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ enkelttråd-RNA. Et A_{260}/A_{280} -forhold mellom 1,8 og 2,1 tyder på godt rensset RNA.

Tabell 1. Klargjøring av RT-blanding

Komponent	Volum pr. prøve (µl)	Sluttkonsentrasjon
RT-buffer, 5x (følger med revers transkriptase)	5,0	1x
dNTPs (10 mM hver, som skal klargjøres på forhånd og oppbevares ved -20 °C i alikvoter)	2,0	0,8 mM
Tilfeldig nonamer (100 µM)	5,25	21 µM
RNase-hemmer (40 U/µl)	0,5	0,8 E/µl
Revers transkriptase (200 U/µl)	1,0	8 E/µl
DTT (følger med revers transkriptase)	1,25	–
Oppvarmet RNA-prøve, kontroll eller IS-MMR-kalibrator (skal tilsettes i trinn 7)	10,0	40 ng/µl
Sluttvolum	25,0	–

- 7. Pipetter 15 µl RT-blanding i hvert PCR-glass. Tilsett deretter 10 µl (1 µg) prøve-RNA, kontroll eller kalibrator (fra trinn 4).**
- 8. Bland forsiktig (ikke roter) og sentrifuger raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset).**
- 9. Programmer det termiske sykleren med revers transkripsjon-programmet, som indikert i tabell 2.**

Tabell 2. Temperaturprofil

Revers transkripsjon 1	Temperatur: 25 °C Tid: 10 min
Revers transkripsjon 2	Temperatur: 50 °C Tid: 60 min
Inaktivering	Temperatur: 85 °C Tid: 5 min
Nedkjøling	Temperatur: 4 °C Tid: 5 min

10. Plasser glassene i den termiske syklere, og start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 2.
11. Når programmet er ferdig, må glassene sentrifugeres raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset). Oppbevar glassene på is eller ved –20 °C til qPCR er utført, i henhold til følgende protokoller, i henhold til ditt qPCR-instrument.
Merk: For LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter gir hver RT-klargjøring cDNA til to qPCR-kjøringer.

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

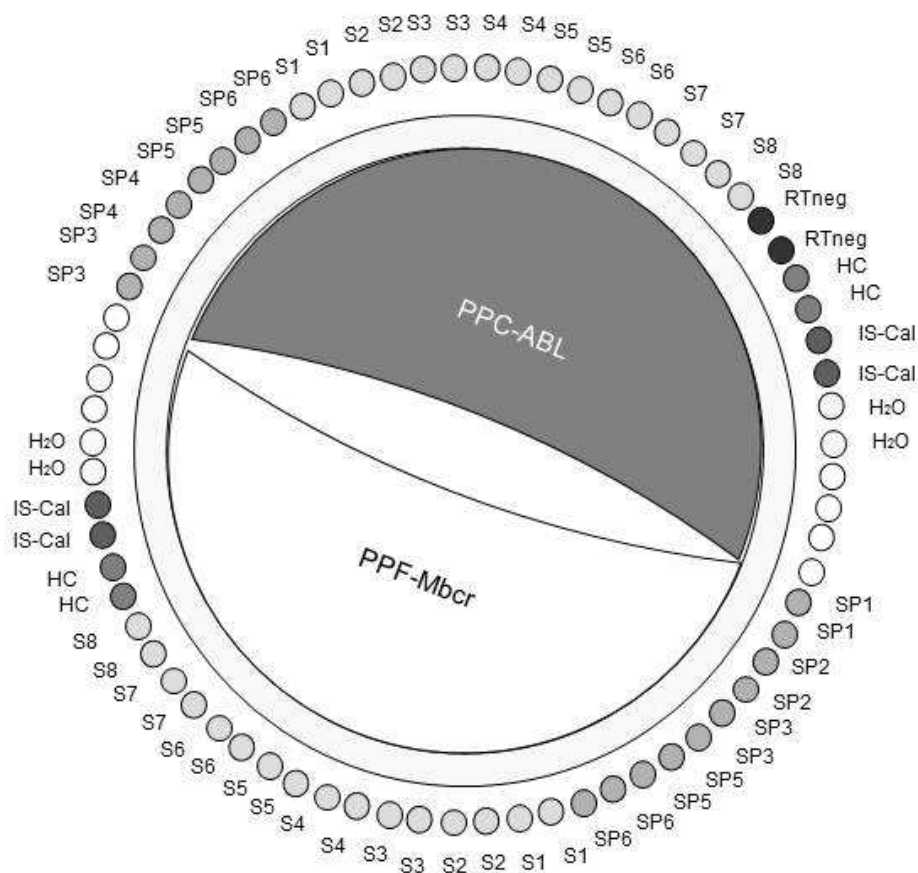
Ved bruk av dette instrumentet anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 3. Settet er beregnet på testing av 8 ulike cDNA-prøver i samme eksperiment 3 ganger.

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

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL) (32 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8 x 2-reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	2 x 4 reaksjoner (SP3, SP4, SP5 og SP6, hver testet i duplikat)
RT negativ kontroll	2 reaksjoner
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med BCR-ABL Mbcr-primere og probeblanding (PPF-Mbcr) (32 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8 x 2-reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	2 x 5 reaksjoner (SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner

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

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



Figur 4. Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-settet. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr- og ABL-standarder; **HC:** Høy cDNA positiv kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **RTneg:** RT negativ kontroll; **S:** cDNA-prøve; **H₂O:** vannkontroll.

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

Fyll alle andre posisjoner med tomme glass.

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

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Roter standardene, PPF-Mbcr- og PPC-ABL-glassene, og sentrifuger raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset).

3. Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles.

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

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

Tabell 4. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	ABL: 32+1 reaksjoner (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reaksjoner (µl)	Slutt-konsentrasjon
qPCR-blanding, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1	33	33	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	214,5	214,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 5)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25	25 hver	25 hver	–

4. Dispenser 20 µl av qPCR-forhåndsblendingen pr. glass.
5. Tilsett 5 µl av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 200 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Revers transkripsjon», side 14) i det tilsvarende glasset (totalvolum 25 µl).
6. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.
7. Plasser glassene i den termiske syklere i samsvar med produsentens anbefalinger.
8. Programmer Rotor-Gene Q-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som indikert i tabell 5.

Tabell 5. Temperaturprofil

Analysemodus	Kvantifisering
Holding 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s
Sykling	50 ganger 95 °C i 5 s 60 °C i 30 sek. med innhenting av FAM-fluorescens i grønn kanal: Enkel
Holding 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min

9. Klikk på **“Gain Optimisation”** (Optimal forsterkning) i dialogboksen **“New Run Wizard”** (Veiviser for ny analyse) for å åpne dialogboksen **“Auto-Gain Optimisation Setup”** (Autooppsett av optimal forsterkning). Angi området for den grønne kanalen fra **“5 Fl”** for **“Min Reading”** (Min. avlesning) til **“10 Fl”** for **“Max Reading”** (Maks. avlesning) og det akseptable forsterkningsområdet fra **-10** til **10**.
10. Kryss av i boksen **“Perform Optimisation Before 1st Acquisition”** (Utfør optimalisering før 1. innhenting) og lukk dialogboksen **“Auto-Gain Optimisation Setup”** (Autooppsett av optimal forsterkning).
11. Start det termiske syklusprogrammet.
12. Velg **“Slope Correct”** (Riktig helning) for analysen. Vi anbefaler å stille inn terskelen på **0,03**.

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

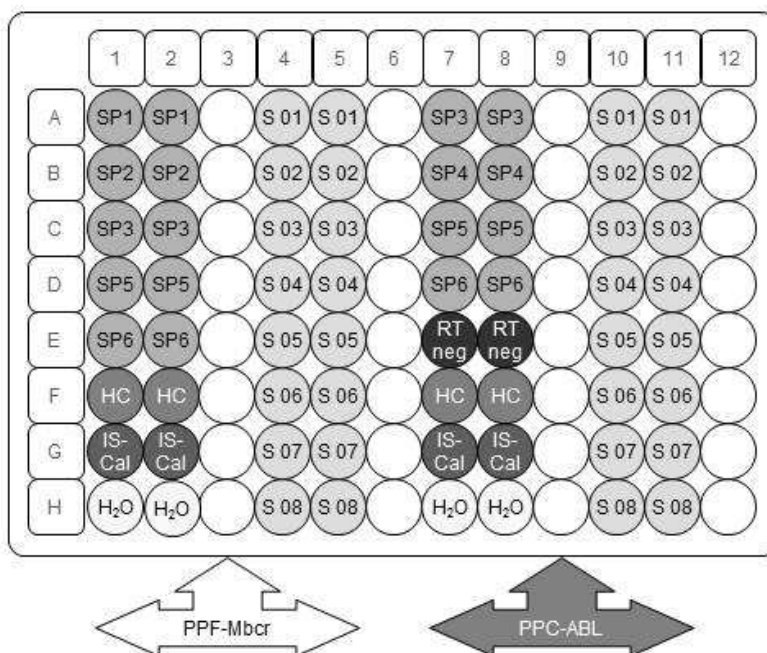
Ved bruk av 96-brønn-plate qPCR-utstyr, anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 6. Settet er beregnet på testing av 8 ulike cDNA-prøver i samme eksperiment 3 ganger.

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

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL) (32 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8 x 2-reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	2 x 4 reaksjoner (SP3, SP4, SP5 og SP6, hver testet i duplikat)
RT negativ kontroll	2 reaksjoner
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med BCR-ABL Mbcr-primere og probeblanding (PPF-Mbcr) (32 reaksjoner)	
8 cDNA-prøver	8 x 2-reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	2 reaksjoner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaksjoner
Enkeltplasmidstandarder	2 x 5 reaksjoner (SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6, hver testet i duplikat)
Vannkontroll	2 reaksjoner

Prøvebehandling på Applied Biosystems, ABI PRISM 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 med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-settet. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr- og ABL-standarder; **HC:** Høy cDNA positiv kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **RTneg:** RT negativ kontroll; **S:** cDNA-prøve; **H₂O:** vannkontroll.

qPCR på Applied Biosystems-, ABI PRISM- eller LightCycler 480-instrumenter

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Roter standardene, PPF-Mbcr- og PPC-ABL-glassene, og sentrifuger raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset).
3. Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles. Ved bruk av 96-brønn-plate qPCR-utstyr, anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat.

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 7 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding for Applied Biosystems- og ABI PRISM-instrumenter, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 µl. Tabell 8 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding for LightCycler 480-instrumentet, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme

primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 7. Klargjøring av qPCR-blanding for Applied Biosystems- og ABI PRISM-instrumenter

Komponent	1 reaksjon (μl)	ABL: 32+1 reaksjoner (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reaksjoner (μl)	Slutt- konsentrasjon
qPCR-blanding, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1	33	33	1x
ROX I-fargestoff, 50x (ABI PRISM 7900HT) eller ROX II-fargestoff, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6	198	198	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 5)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25	25 hver	25 hver	–

Tabell 8. Klargjøring av qPCR-blanding for LightCycler 480

Komponent	1 reaksjon (μl)	ABL: 32+1 reaksjoner (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reaksjoner (μl)	Slutt- konsentrasjon
qPCR- blanding, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primere og probeblanding, 25x	1	33	33	1x
Nukleasefritt vann av PCR- kvalitet	6,5	214,5	214,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 5)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25	25 hver	25 hver	–

4. **Dispenser 20 μ l av qPCR-forhåndsblendingen pr. brønn.**
5. **Tilsett 5 μ l av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 200 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Revers transkripsjon», side 14) i den tilsvarende brønnen (totalvolum 25 μ l).**
6. **Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.**
7. **Lukk platen og sentrifuger raskt (300 x g, ca. 10 s).**
8. **Plasser platen i den termiske syklere i samsvar med produsentens anbefalinger. Programmer den termiske syklere med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 9 for Applied Biosystems- og ABI PRISM-instrumenter, eller tabell 10 for LightCycler 480-instrumentet.**

Tabell 9. Temperaturprofil for Applied Biosystems- og ABI PRISM-instrumenter

Analysemodus	Standardkurve — absolutt kvantifisering
 Holding 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s
Sykling	50 ganger 95 °C i 5 s 60 °C i 30 s med innhenting av FAM-fluorescens: Enkel; undertrykkingsstoff: TAMRA
 Holding 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min

Tabell 10. Temperaturprofil for LightCycler 480-instrument

Analysemodus	Absolutt kvantifisering («Abs Quant»)
Påvisningsformater	Velg «Simple Probe» (Enkeltprobe) i vinduet for påvisningsformat
 Holding 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s
Sykling	50 ganger 95 °C i 5 s 60 °C i 30 s med innhenting av FAM-fluorescens tilsvarende (483–533 nm) for LC-versjon 01 og (465–510 nm) for LC-version 02
 Holding 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min

- 9. For Applied Biosystems 7500 og ABI PRISM 7900HT SDS, følg trinn 9a. For LightCycler 480-instrumentet, følg trinn 9b.**
- 9a. Applied Biosystems og ABI PRISM: Vi anbefaler en terskelinnstilling på 0,1 i analysetrinnet på instrumentet. Start syklingsprogrammet, som angitt i tabell 9.**
- 9b. LightCycler 480-instrument: Vi anbefaler en «Fit point»-analysemodus med bakgrunn ved 2,0 og terskel ved 2,0. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 10.**

Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter

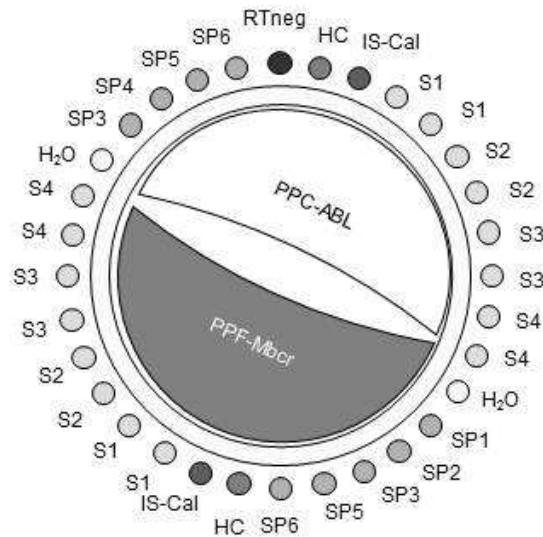
Vi anbefaler å måle prøver i duplikat og kontroller kun én gang med kapillære instrumenter, som angitt i tabell 11. Settet er beregnet på testing av 4 ulike cDNA-prøver i samme eksperiment 6 ganger.

Tabell 11. Antall reaksjoner for LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter

Prøver	Reaksjoner
Med ABL-primere og probeblanding (PPC-ABL) (16 reaksjoner)	
4 cDNA-prøver	4 x 2 reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	1 reaksjon
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	1 reaksjon
Enkeltplasmidstandarder	1 x 4 reaksjoner (SP3, SP4, SP5 og SP6)
RT negativ kontroll	1 reaksjon
Vannkontroll	1 reaksjon
Med BCR-ABL Mbcr-primere og probeblanding (PPF-Mbcr) (16 reaksjoner)	
4 cDNA-prøver	4 x 2 reaksjoner
1 cDNA høy positiv kontroll	1 reaksjon
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	1 reaksjon
Enkeltplasmidstandarder	1 x 5 reaksjoner (SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6)
Vannkontroll	1 reaksjon

Prøvebehandling på LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter

Vi anbefaler testing av minst 4 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 BCR-ABL1 Mbc* IS-MMR DX-settet. SP1–SP6: BCR-ABL Mbc- og ABL-standarder; **HC:** Høy cDNA positiv kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **RTneg:** RT negativ kontroll; **S:** cDNA-prøve; **H₂O:** vannkontroll.

qPCR på LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. **Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.**
2. **Roter standardene, PPF-Mbcr- og PPC-ABL-glassene, og sentrifuger raskt (ca. 10 s, 10 000 rpm for å samle opp væsken i bunnen av glasset).**
3. **Klargjør følgende qPCR-blanding i samsvar med antallet prøver som skal behandles.**

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 12 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet til å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 20 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antall reaksjoner, ved bruk av samme primere og probeblanding (enten PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Andre volum inkluderer for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 12. Klargjøring av qPCR-blanding for LightCycler 1.2-, 1.5- og 2.0-instrumenter

Komponent	1 reaksjon (μl)	ABL: 16+1 reaksjoner (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reaksjoner (μl)	Slutt- konsentrasjon
qPCR- blanding, 2x	10	170	170	1x
Primere og probeblending, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Nukleasefritt vann av PCR- kvalitet	4,2	71,4	71,4	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 5)	5	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	20	20 hver	20 hver	–

4. **Dispenser 15 μ l av qPCR-forhåndsblendingen pr. kapillær.**
5. **Tilsett 5 μ l av RT-produktet (cDNA, tilsvarende 200 ng RNA) oppnådd i revers transkripsjon (se «Protokoll: Revers transkripsjon», side 14) i den tilsvarende kapillæren (totalvolum 20 μ l).**
6. **Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.**
7. **Plasser kapillærene i adapterne som følger med apparatet, og sentrifuger raskt (700 x g, ca. 10 s).**
8. **Last kapillærene inn i den termiske sykleren i henhold til produsentens anbefalinger.**
9. **Programmer LightCycler 1.2-, 1.5- eller 2.0-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 13.**

Tabell 13. Temperaturprofil

Analysemodus	Kvantifisering
Holding 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s Stigning: 20
Sykling	50 ganger 95 °C i 5 s; stigning: 20 60 °C i 30 s; stigning: 20; med innhenting av FAM-fluorescence: Enkel
Holding 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min Stigning: 20

10. For LightCycler 1.2 og 1.5, følg trinn 10a. For LightCycler 2.0, følg trinn 10b.

10a. LightCycler 1.2 og 1.5: F1/F2 og modusen «2nd derivative analysis» (2. derivative analyse) er anbefalt. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 13.

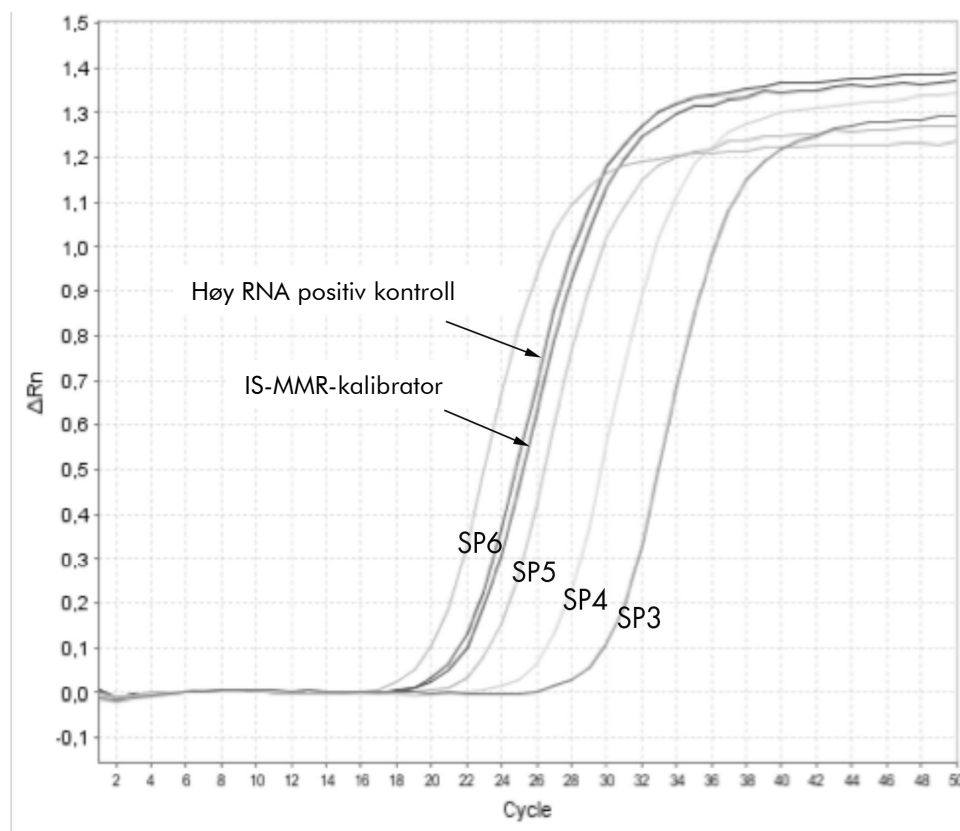
10b. LightCycler 2.0: Vi anbefaler bruk av automatisert (F''max) analyse på LightCycler 2.0 programvareversjon 4.0 for å oppnå reproduerbare resultater. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 13.

Tolkning av resultater

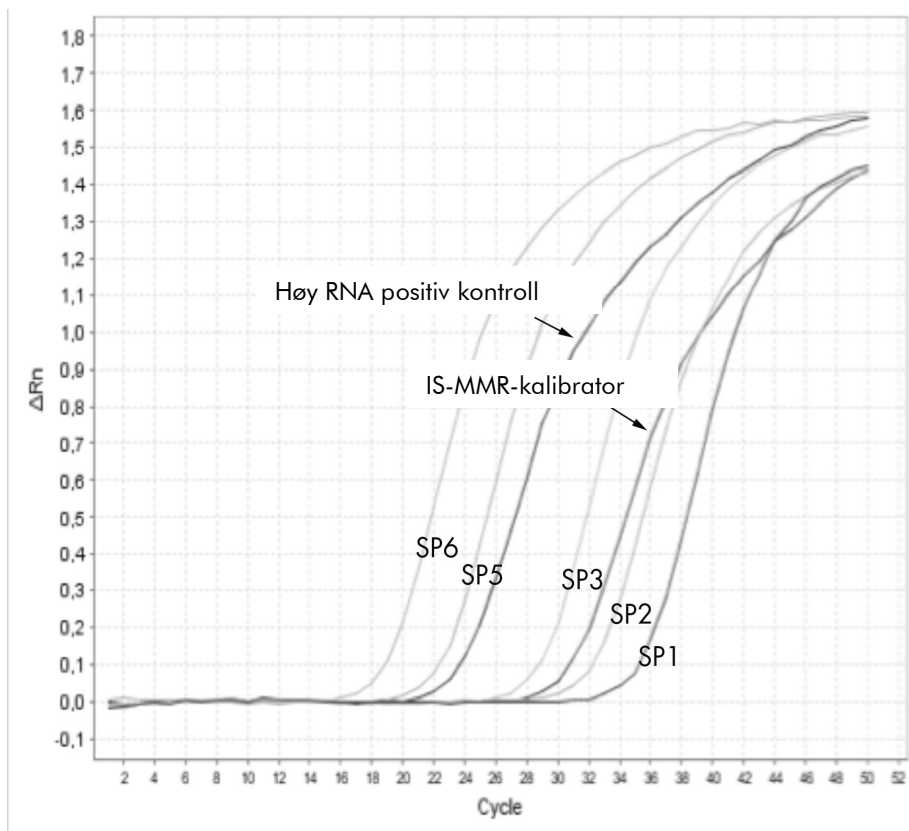
Prinsipp for dataanalyse

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. Ved bruk av standarder med et kjent antall molekyler kan man fastslå en standardkurve og bestemme den nøyaktige mengden av målet som i testprøven. *ipsogen*-standardkurvene er plasmidbaserte. Vi bruker 4 standardfortynninger for ABL og 5 standardfortynninger for Mbc for å sikre nøyaktige standardkurver. Settet inkluderer også en IS-MMR-kalibrator som muliggjør konvertering av resultater til den internasjonale skalaen. Figur 7 og 8 viser eksempler på TaqMan-forsterkningskurver lignende de oppnådd for standarder, IS-MMR-kalibratoren, og den høye positive RNA-kontrollen med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX-settet.



Figur 7. Påvisning av ABL med standardene SP3, SP4, SP5 og SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 og 10^6 kopier/ $5 \mu\text{l}$.



Figur 8. Påvisning av BCR-ABL MbcR med standardene SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopier/ $5 \mu\text{l}$.

Standardkurver og kvalitetskriterier som gjelder rådata

Reproduserbarhet mellom replikater

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

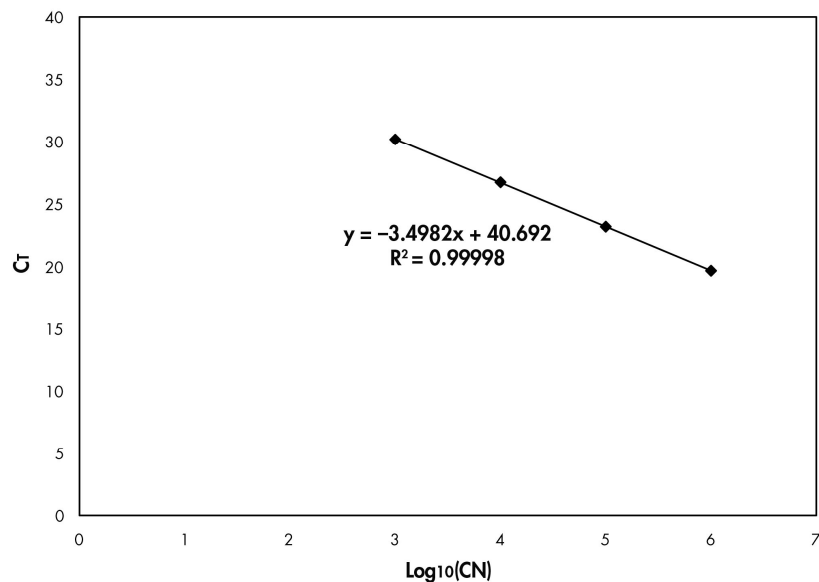
Variasjon innen C_T -verdier mellom replikater er som regel $<1,5$ hvis gjennomsnittlig C_T -verdi av replikatene er <36 (7).

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

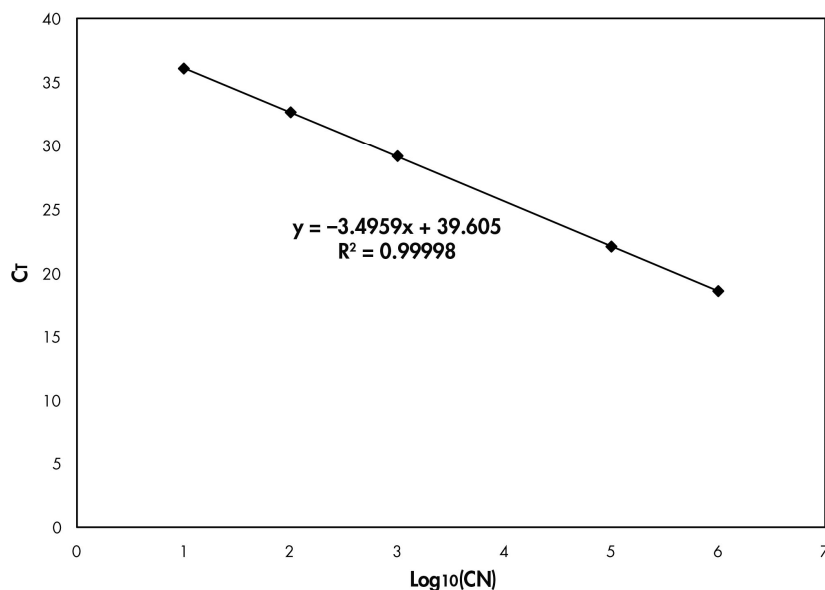
Standardkurver

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

For hvert gen (ABL og BCR-ABL), plottes C_T -råverdier oppnådd på plasmidstandardfortynninger i henhold til loggkopinummeret (3, 4, 5 og 6 for SP3, SP4, SP5 og SP6; 1, 2, 3, 5 og 6 for SP1, SP2, SP3, SP5 og SP6). Figur 9 viser et eksempel på en teoretisk ABL-kurve beregnet på 4 standardfortynninger. Figur 10 viser et eksempel på en teoretisk BCR-ABL MbcR-kurve beregnet på 5 standardfortynninger.



Figur 9. Teoretisk kurve for ABL beregnet fra 4 standardfortynninger. En lineær regresjonskurve ($y = ax + b$) beregnes, 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.



Figur 10. Teoretisk kurve for BCR-ABL beregnet fra 5 standardfortynninger. En lineær regresjonskurve ($y = ax + b$) beregnes, 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 $-3,3$. En helning mellom $-3,0$ og $-3,9$ er akseptabelt så lenge R^2 er $>0,95$ (7). En verdi for $R^2 >0,98$ er imidlertid ønskelig for nøyaktige resultater (3).

Merk: SP1-standardfortynningen (BCR-ABL-plasmid, 10 kopier) må påvises og inkluderes i BCR-ABL-standardkurven.

Kvalitetskontroll på alle ABL-verdier

Dårlig RNA-kvalitet eller problemer under qPCR-trinnene fører til lave ABL-kopinumre (ABL_{CN}). Optimal følsomhet oppnås med prøver som gir $ABL_{CN} \geq 10\,000$ kopier. Dette kriteriet på ABL_{CN} gjelder også for den høye positive RNA-kontrollen og IS-MMR-kalibratoren.

RT negativ og vannkontroller

Ingen templatkontroller (NTC) for PCR-trinnet (vannkontroll) og revers transkripsjon-trinnet (RT negativ kontroll) skal gi null CN for både ABL og BCR-ABL Mbc. Et positivt resultat for disse NTC-ene indikerer krysskontaminering under revers transkripsjon og/eller qPCR.

Normalisert kopinummer (NCN)

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

BCR-ABL-standardkurven skal brukes til å forvandle C_T -råverdier (oppnådd med PPF-Mbc) for ukjente prøver til BCR-ABL-kopinummer ($BCR-ABL_{Mbc_{CN}}$).

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

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

Beregn NCN-resultatet for den høye positive RNA-kontrollen (NCN_{HC}), ISMMR-kalibratoren (NCN_{kal}) og hver prøve ($NCN_{prøve}$).

Høy positiv RNA-kontroll og IS-MMR-kalibrator

Disse kontrollene muliggjør overvåking av revers transkripsjon- og forsterkningstrinnene for ABL og BCR-ABL Mbc under transkripsjonskvantifisering.

Kvalitetskontroll på NCN_{kal} -resultat

Merk: NCN-resultatet oppnådd for IS-MMR-kalibratoren, testet med *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR DX-settet i kombinasjon med validerte reagenser og instrumenter (se «Medfølgende materialer», side 9, og «Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger», side 11), må være innenfor intervallet 0,05–0,3. Ellers kan ikke NCN-verdier konverteres til den internasjonale skalaen. I tillegg må hele eksperimentet forkastes hvis den høye positive RNA-kontrollen ikke er påvist.

IS-konvertering og MRR-rapportering

Merk: Før tolking må du se verdien angitt på ISS-MMR-kalibratorglassetiketten eller på analysesertifikatet som følger med settet.

Bruk NCN-resultatet fra den eksperimentelle IS-MMR-kalibratoren (NCN_{kal}), og dens tilordnede verdi (IS-Cal-verdi) angitt i analysesertifikatet, for å beregne det normaliserte kopinummet på den internasjonale skalaen ($IS-NCN_{prøve}$).

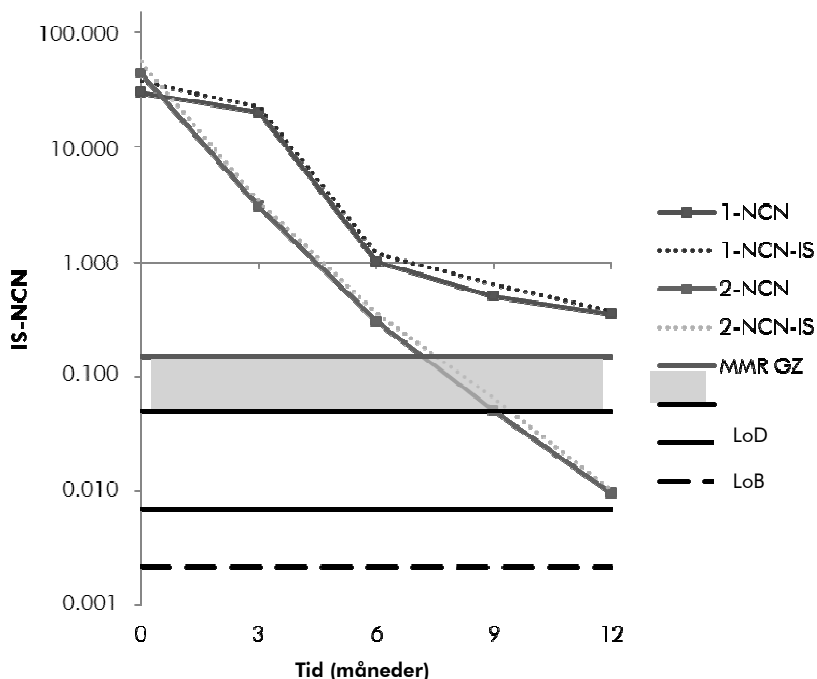
$$IS-NCN_{prøve} = \frac{NCN_{prøve} \times IS-Cal-verdi}{NCN_{kal}}$$

Bestem MMR-status for hver prøve i henhold til følgende kriterier.

- **$IS-NCN_{prøve} \leq 0,05$** : Stor molekylær respons
- **$0,05 < IS-NCN_{prøve} < 0,15$** : Gråsonsone rundt MMR-cuttoff, ubestemmelig resultat
- **$IS-NCN_{prøve} \geq 0,15$** : Ingen stor molekylær respons

$IS-NCN_{HC}$ -resultatet (NCN på den internasjonale skalaen for den høye positive RNA-kontrollen) skal ikke gi noen stor molekylær respons.

Figur 11 viser et eksempel på pasientovervåkning ved bruk av NCN- og $IS-NCN$ -resultater.



Figur 11. Overvåkningskurver for pasient MMR-status med ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-settet. NCN: normalisert kopinummet; NCN-IS: normalisert kopinummet internasjonale skala; MMR GZ: MMR-gråsonsone (GZ) ubestemmelig resultat; LoD: påvisningsgrense; LoB: bakgrunnsnivå.

Sammendrag av kvalitetskriterier

Tabell 14 oppsummerer de forskjellige kvalitetskriteriene og tilknyttede verdier eller resultater.

Tabell 14. Sammendrag av kvalitetskriterier

Kriterier	Akseptable verdier/resultater
Variasjoner innen C_T -verdier mellom replikater	$\leq 2 C_T$ hvis gjennomsnittlig C_T -verdi > 36 $\leq 1,5 C_T$ hvis gjennomsnittlig C_T -verdi ≤ 36
Helning for standardkurver	Mellom $-3,0$ og $-3,9$
R^2 for standardkurver	Minst $> 0,95$ bedre hvis $> 0,98$
SP1-standardfortynning (BCR-ABL 10 kopier plasmid)	Må påvises og inkluderes i standardkurven
Kvalitetskontroll på ABL_{CN} -verdi for pasientprøver, høy positiv RNA-kontroll og IS-MMR-kalibrator	$ABL_{CN} > 10\,000$ kopier av ABL for å nå optimal følsomhet
PCR (vann) og revers transkripsjon (RT-negative)-kontroller	For hver $ABL_{CN} = 0$ og $M_{bcr_{CN}} = 0$
NCN oppnådd for IS-MMR-kalibrator (NCN_{kal})	Må være innenfor intervallet $0,05-0,3$
Høy positiv RNA-kontroll	Må påvises
NCN oppnådd for den høye positive RNA-kontrollen konverterte til den internasjonale skalaen (IS- NCN_{HC})	Status: Ingen stor molekylær respons

Feilsøking

For mer informasjon, se siden med vanlige spørsmål og svar på vårt tekniske supportcenter: 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 42).

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet. Analysesertifikater er tilgjengelige på forespørsel på www.qiagen.com/support.

Begrensninger

Brukerne må ha opplæring og kjennskap til denne teknologien før bruk av denne enheten.

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

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

Merk: Settet er utformet i henhold til studiene fra «Europe Against Cancer» (EAC) (8, 9), og samsvarer med de oppdaterte internasjonale anbefalingene. Settet inneholder en IS-MMR-kalibrator, standardisert til den internasjonale skalaen, som muliggjør konvertering av NCN-resultater til den internasjonale skalaen og rapportering av MMR (Major Molecular Response – stor molekylær respons)-status.

Hvert parti av IS-MMR-kalibratoren har en tilordnet verdi utledet direkte fra en kalibrering i forhold til NIBSC WHO-sertifisert primært referansemateriale (internasjonalt genetisk referansepanel for kvantifisering av BCR-ABL-translokasjon ved bruk av RQ-PCR (1. I.S.), ref. 09/138).

Et analysesertifikat som angir den tilordnede verdien for IS-MMR-kalibratoren følger med hvert sett.

Settet skal brukes i samsvar med instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med validerte reagenser og instrumenter (se «Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger», side 11). All bruk som ikke overholder instruksjonene og/eller modifisering av komponentene fører til at QIAGENs ansvar oppheves.

Ytelsesegenskaper

Merk: Ytelsesegenskaper ble fastslått ved bruk av Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-systemet i kombinasjon med *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR-settet

og validerte tilleggsreagenser (se «Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger», side 11).

Blankgrense og påvisningsgrense

Blankgrense (Limit of Blank - LoB) og påvisningsgrense (Limit of Detection – LoD) ble bestemt i henhold til CLSI/NCCLS EP17-A-retningslinjen.

Bakgrunnsnivå (LoB) ble bestemt på negative prøver fra friske donorer (11 prøver, 69 målinger), og ble påvist å tilsvare 0,0022 BCR-ABL Mbcn NCN.

Påvisningsgrense (LoD eller analytisk følsomhet) ble bestemt på kjente lavt positive prøver ($n = 8$, 74 målinger), og ble påvist å tilsvare 0,0069 BCR-ABL Mbcn NCN.

- **NCN \leq LoB:** BCR-ABL Mbcn ikke påvist
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL Mbcn påvist, men ikke kvantifisert
- **NCN \geq LoD:** BCR-ABL Mbcn kvantifisert

Linearitet

Linearitet ble bestemt i henhold til CLSI/NCCLS EP6-A-retningslinjen.

Studien ble utført på blandinger av positivt og negativt RNA ekstrahert fra cellelinjer. Elleve ulike nivåer ble testet i triplikater. Resultatene fra disse prøvene viser at *ipsogen* BCR-ABL Mbcn IS-MMR-analysen er lineær i et område på 0,003 til 65 BCR-ABL Mbcn NCN.

Tilsetninger

Fem ulike RNA-er med forskjellige NCN BCR-ABL Mbcn-nivåer ble valgt for studien. Ulike RNA- og cDNA-mengder ble testet for å evaluere tilsetningens innvirkning på NCN-resultater. Resultater viste at varierende RNA-tilsetning hadde begrenset innvirkning på NCN-resultatene, mens cDNA-tilsetning var en mer følsom faktor hvis det ble brukt mer eller mindre materiale. Tilsetning av 1 μ g RNA og 5 μ l cDNA er derfor anbefalt for å kjøre testen.

Presisjon

Presisjon ble bestemt i henhold til CLSI/NCCLS EP5-A2-retningslinjen.

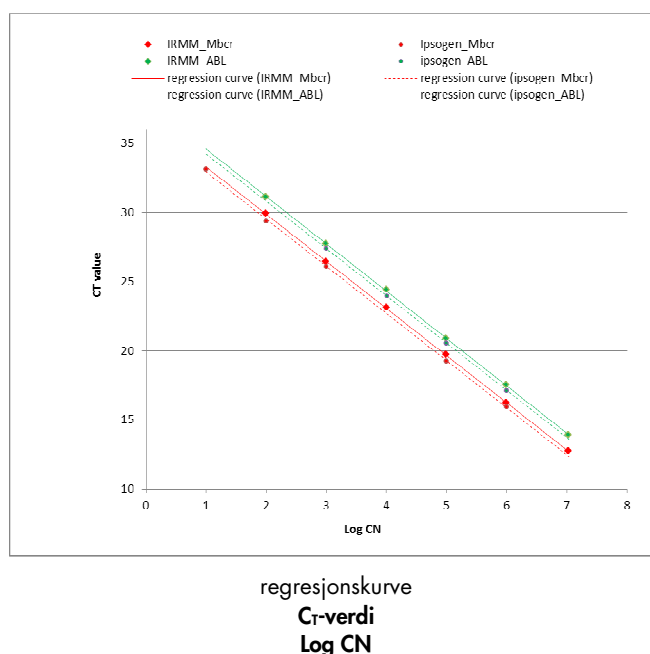
Presisjonsstudien ble utført på 13 ulike prøver testet 42 ganger i duplikater ($n = 84$). Disse prøvene var representative for de ulike nivåene av BCR-ABL Mbcn-ekspressjon i pasientprøver rundt og over MMR-verdien. Den globale variasjonskoeffisienten rundt MMR-verdien ble påvist å tilsvare 25 %.

Konkordansstudie: ERM-AD623 BCR-ABL1 enkeltplasmidstandard (IRMM) versus ipsogen enkeltplasmidstandard (QIAGEN)

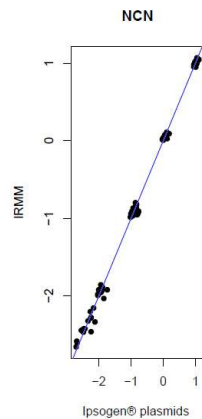
De nyeste arbeidsdefinisjonene for BCR-ABL1 Mbcrl molekylær respons i CML er angitt av ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, som anbefaler bruk av ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmid (IRMM, Belgia): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

For å følge denne anbefalingen utførte QIAGEN en konkordansstudie for å sammenligne *ipsogen* enkeltplasmid til flere mål, brukt i *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcrl IS-MMR-sett (24) CE (kat.nr. 670723) med ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmid (IRMM).

Sammenligningen var basert på BCR-ABL1 Mbcrl/ABL1 med normalisert kopinummerforhold (NCN), og vurdert med begge de to standardenes fortyndinger (*ipsogen* eller ERM-AD623 BCR-ABL1) på kontrollprøver inkludert i *ipsogen*-settene og på sertifisert referansemateriale fra NIBSC: White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.



Figur 12. *ipsogen* og ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmidets standardkurver er justert.



NCN
IRMM
ipsogen®-plasmider

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR-sett.

Figur 13. ERM-AD623 BCR-ABL1 versus *ipsogen* NCN-verdier.

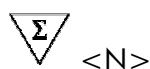
QIAGEN-studien konkluderte at det ikke var noen statistisk forskjell: ERM-AD623 BCR-ABL1 enkeltplasmidstandard og *ipsogen* enkeltplasmidstandard gir ekvivalente resultater.

Referanser

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
9. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:



Inneholder nok reagens til <N> reaksjoner



Brukes innen



Medisinsk utstyr til in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partnummer



Materialnummer



Artikkelnummer



Temperaturbegrensning



Produsent



Se bruksanvisningen

Kontaktinformasjon

For teknisk hjelp og mer informasjon, se vårt tekniske supportsenter på 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).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-sett (24)	For 24 reaksjoner: Revers transkriptase, 5x RT-buffer, dNTP-blanding, tilfeldig primer, RNase-hemmer, DTT, qPCR-masterblanding, Mbcr og ABL enkle plasmidstandarder, høy RNA positiv kontroll, IS-MMR-kalibrator, ROX I fluorescent fargestoff, ROX II fluorescent fargestoff, primere og probeblanding ABL, primere og probeblanding BCR-ABL Mbcr-fusjonsgen	670823
Rotor-Gene Q MDx – for IVD-validert sanntids PCR-analyse i kliniske bruksområder		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Sanntids PCR-sykler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Sanntids PCR-sykler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring	9002033
RNeasy-sett — for rensing av totalt RNA		
RNeasy Mini-sett (50)	For 50 RNA-klargjøringer: 50 RNeasy Mini Spin-kolonner, prøvetakingsglass (1,5 ml og 2 ml), RNase-frie reagenser og bufre	74104
RNeasy Midi-sett (50)	For 50 RNA-klargjøringer: 50 RNeasy Midi Spin-kolonner, prøvetakingsglass (15 ml), RNase-frie reagenser og bufre	75144

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

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

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

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

Dette produktet inneholder SuperScript® III Reverse Transcriptase, som er underlagt en eller flere utgitte amerikanske patenter eller ansøkte amerikanske patentsøknader og ikke-amerikanske motstykker, tilhørende Life Technologies Corporation, og selges under en avtale mellom Life Technologies Corporation og *ipsogen*. Innkjøpsprisen for dette produktet inkluderer begrensede, ikke-overførbare rettigheter under de foregående patentene til å bruke denne mengden av produktet for å utøve påstandene i disse patentene utelukkende for kjøperens tiltak for å måle BCR-ABL p210-transkripsjoner. Ingen andre rettigheter overføres. Dette gjelder også rettigheter til å bruke dette produktet til bruksområder innen rettsmedisin. Du kan få mer informasjon om å erverve rettigheter under patenter tilhørende Life Technologies Corporation ved å kontakte Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-post: Outlicensing@lifetech.com.

Varemerker: QIAGEN®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); TRIZOL® (Molecular Research Center, Inc.).

Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet bekrefter at kjøperen eller brukeren av *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-settet samtykker i følgende betingelser:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-settet kan kun brukes i samsvar med håndboken for *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-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* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-settet samt andre protokoller på 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.

HB-1393-003 © 2013–2016 QIAGEN, med enerett.

www.qiagen.com

