

# *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit Handbuch



Version 1

**IVD**

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zum Gebrauch mit dem Rotor-Gene<sup>®</sup> Q oder Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> oder LightCycler<sup>®</sup> Thermocyclern

**CE**

**REF** 670723



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

**R3** **MAT** 1072509DE



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

### **QIAGEN setzt Standards in:**

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

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorgesehener Verwendungszweck</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung und Hintergrundinformationen</b>	<b>5</b>
Hintergrundinformationen zu CML	5
Krankheitsüberwachung	6
<b>Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung</b>	<b>7</b>
<b>Mit dem Kit gelieferte Materialien</b>	<b>10</b>
Kit-Inhalt	10
<b>Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien</b>	<b>11</b>
<b>Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>	<b>12</b>
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	13
<b>Lagerung und Handhabung der Reagenzien</b>	<b>14</b>
<b>Handhabung und Lagerung der Proben</b>	<b>14</b>
<b>Verfahren</b>	<b>15</b>
RNA-Isolierung aus der Probe	15
Protokolle	
■ Reverse Transkription mit SuperScript III Reverse Transcriptase	15
■ qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor	18
■ PCR mit Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS oder LightCycler 480 Thermocycler	22
■ qPCR mit LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocycler	28
<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	<b>32</b>
Verfahren der Datenauswertung	32
Standardkurven und auf Rohdaten anzuwendende Qualitätskriterien	33
Normalisierte Kopienzahl (NCN)	35
IS-Umrechnung und MMR-Befundung	36
Zusammenfassung der Qualitätskriterien	37
Hilfe zur Fehlerbehebung	38
<b>Qualitätskontrolle</b>	<b>39</b>
<b>Beschränkungen des Tests</b>	<b>39</b>
<b>Leistungscharakteristik</b>	<b>40</b>

Grenzwert der Leerprobe und Nachweisgrenze	40
Linearität	40
Effekt der Ausgangsmenge	40
Präzision	41
Konkordanzstudie: ERM-AD623 BCR-ABL1-Einzelplasmid (IRMM) im Vergleich zu <i>ipsogen</i> -Einzelplasmid-Standards (QIAGEN)	41
<b>Literatur</b>	<b>43</b>
<b>Symbole</b>	<b>44</b>
<b>Kontaktinformationen</b>	<b>44</b>
<b>Bestellinformationen</b>	<b>45</b>

## Vorgesehener Verwendungszweck

Der *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit ist für die Quantifizierung des Transkripts BCR-ABL p210 b2a2 oder b3a2 in Knochenmarks- oder Blutproben von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) oder chronischer myeloischer Leukämie (CML), bei denen zuvor das BCR-ABL-MbcR-Fusionsgen (FG-Ereignis) diagnostiziert wurde, vorgesehen. Mit diesem Test soll der Grad des molekularen Ansprechens evaluiert werden; die Ergebnisse können für die Verlaufsbeobachtung der minimalen Resterkrankung (MRD = *minimal residual disease*) verwendet werden.

## Zusammenfassung und Hintergrundinformationen

### Hintergrundinformationen zu CML

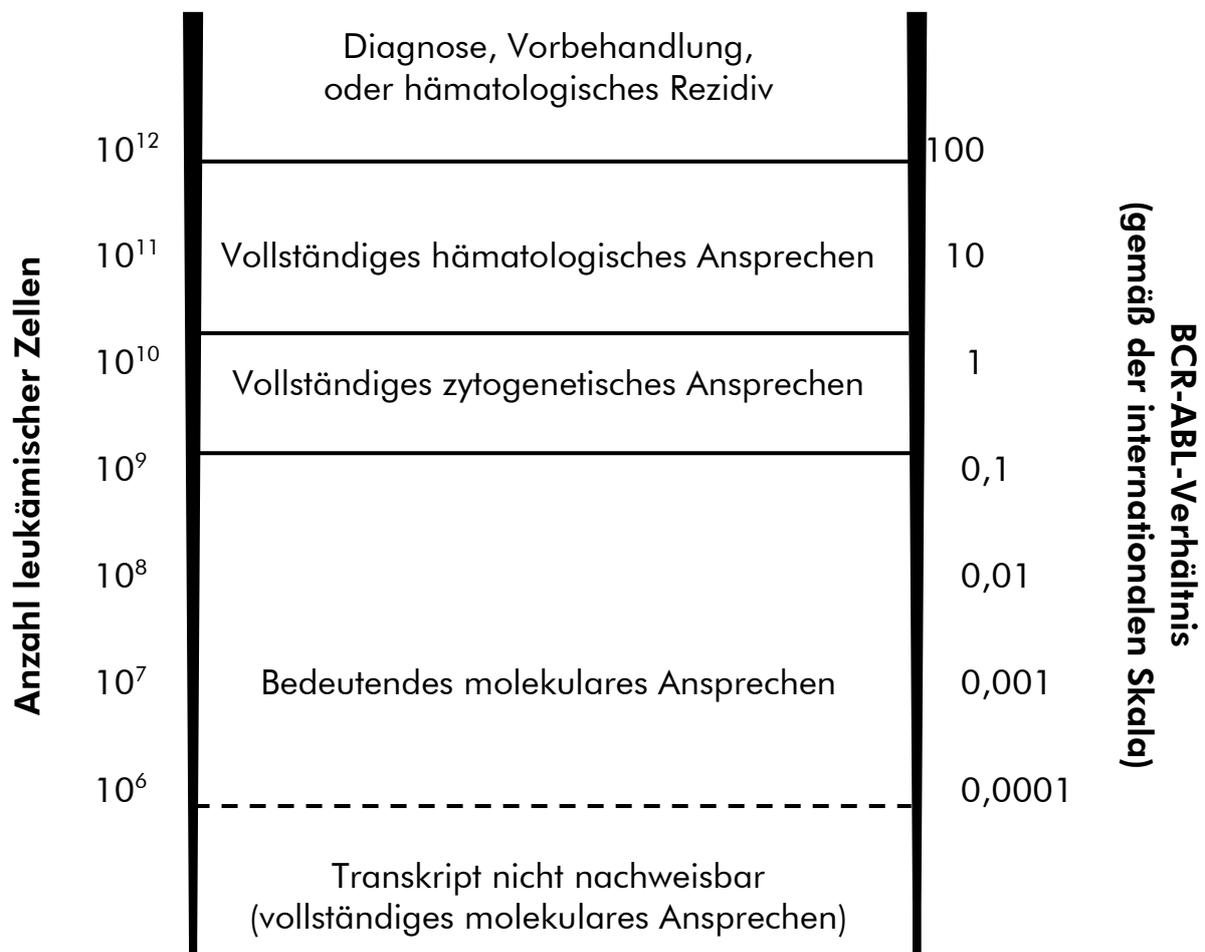
Die CML gehört zur Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien und ist in > 90 % der Fälle durch das Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms (Ph-Chromosom) charakterisiert.

Dieses Chromosom ist das Resultat einer reziproken Translokation, t(9;22), zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22. An dieser Translokation sind der Abschnitt BCR (= Breakpoint Cluster Region) des Chromosoms 22 und das c-ABL-Onkogen des Chromosoms 9 beteiligt. Das entsprechende Fusionsgen, BCR-ABL, wird in eine 8,5 kb große mRNA transkribiert, wobei vor allem zwei Fusionsvarianten vorkommen: b2a2 (40 % der Fälle) und b3a2 (55 % der Fälle). Diese mRNA kodiert für ein chimäres Protein, p210, das eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität aufweist. Zwei weitere Transkripte, b2a3 und b3a3, kommen bei weniger als 5 % der Fälle vor. Ein Ph-Chromosom lässt sich auch bei 35 % der erwachsenen ALL-Patienten nachweisen.

Die jährliche Inzidenz von CML liegt bei 1–2 Neuerkrankungen pro 100.000, und CML macht etwa 20 % aller Leukämien bei Erwachsenen aus. Klinisch ist sie charakterisiert durch einen Überschuss an myeloischen Zellen, die sich hinsichtlich ihrer Differenzierung und Funktion normal verhalten. Bei 90–95 % aller CML-Patienten erfolgt die Diagnosestellung in der chronischen oder stabilen Phase der Krankheit. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es bei den Patienten im Durchschnitt nach 4 bis 6 Jahren zum Übergang in die Akzelerationsphase und schließlich zur sogenannten Blastenkrise und zur akuten Leukämie, die in aller Regel zum Tod führt. Mit der Einführung von Imatinib und, vor Kurzem, den Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) der zweiten Generation hat sich der natürliche Verlauf dieser Erkrankung dramatisch verändert: Die meisten Patienten bleiben nun in Remission und erhalten eine langfristige Versorgung inklusive Überwachung der Krankheit.

## Krankheitsüberwachung

Bis heute ist es das Ziel der CML-Therapie, eine Überlebensrate von 100 % mit Ph-Chromosom-negativem Befund zu erreichen. Das Krankheitsmonitoring ist daher ein essenziell wichtiges Instrument, um das Ansprechen auf die Therapie zu bewerten und bei jedem Patienten möglichst frühzeitig ein Rezidiv festzustellen. Unter einer TKI-Therapie kommt es bei Patienten meist von einer hämatologischen zu einer zytogenetischen Remission, und seltener zu einer molekularen Remission – und entsprechend dazu zu einer Abnahme der Zahl der leukämischen Zellen und der BCR-ABL-Transkripte, wie in der folgenden Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1. In Anlehnung an Referenz 1.**

Die Standardmethode zur Bestimmung der Tumorlast bei CML-Patienten besteht in der konventionellen zytogenetischen Analyse (G-Bänderung) von Metaphase-Chromosomen aus dem Knochenmark. Das zytogenetische Ansprechen wird anhand von mindestens 20 Knochenmark-Metaphasepräparaten beurteilt. Der Grad des zytogenetischen Ansprechens wird anhand des Prozentsatzes an Ph-Chromosom-positiven Metaphasepräparaten ermittelt (siehe Tabelle 1 in Referenz 2). Jedoch hängt diese Bestimmung von laborinternen Leistungs-

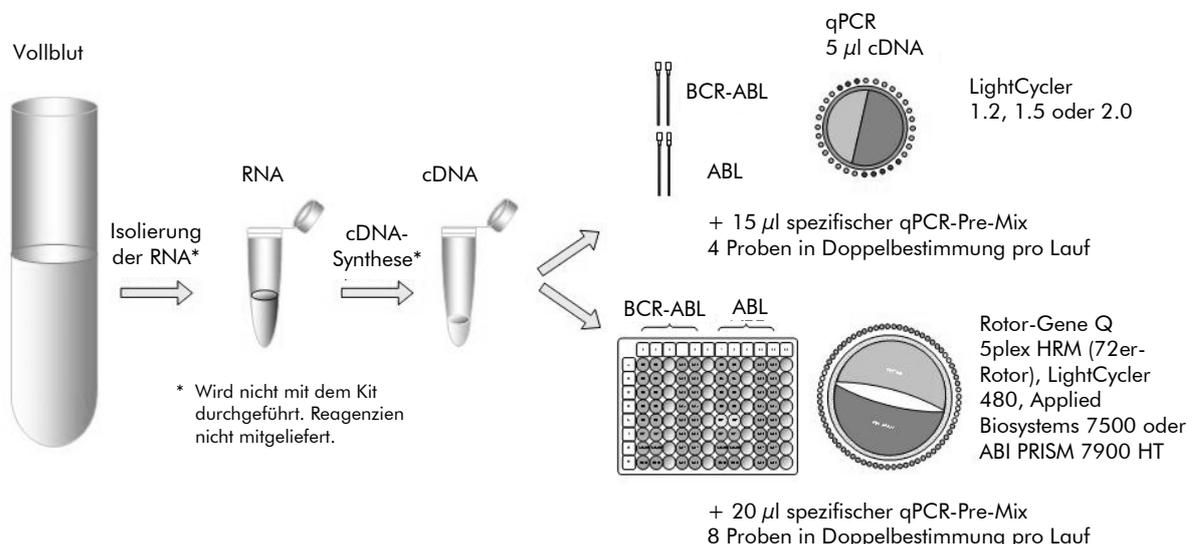
parametern ab; außerdem hat diese Methode eine geringe Sensitivität – sie liegt bei 5 %, wenn 20 Metaphasepräparate analysiert werden.

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (kurz qPCR), bei der die BCR-ABL-Mbcr-mRNA in Proben des peripheren Bluts der Patienten quantitativ bestimmt wird, ist nun eine der Methoden, die im Rahmen des Krankheitsmonitorings bei der Behandlung der CML eingesetzt wird. Sie ist weniger invasiv als die konventionelle Zytogenetik mit Knochenmark-Metaphasepräparaten und dabei wesentlich empfindlicher.

Vor Kurzem wurden auch die Empfehlungen für die CML-Krankheitsüberwachung aktualisiert, um neuere Befunde aus klinischen Studien sowie verbesserte Zielsetzungen und Instrumente der Krankheitsüberwachung zu berücksichtigen. Die jüngsten Empfehlungen zur Definition des Ansprechens und der Überwachung der unter Imatinib stehenden Patienten stammen von den Experten des Europäischen Leukämie-Netzwerks (ELN; siehe Ref. 2).

Unter technischen Gesichtspunkten wurden dabei von den internationalen Experten Anstrengungen unternommen, die BCR-ABL-Mbcr-Testung und -Befundung zu harmonisieren (3–5). Darüber hinaus wurde kürzlich unter der Schirmherrschaft der WHO ein Referenzpanel validiert, das eine einfache Standardisierung der BCR-ABL-Quantifizierung ermöglicht (6).

## Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung



**Abbildung 2. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qPCR.**

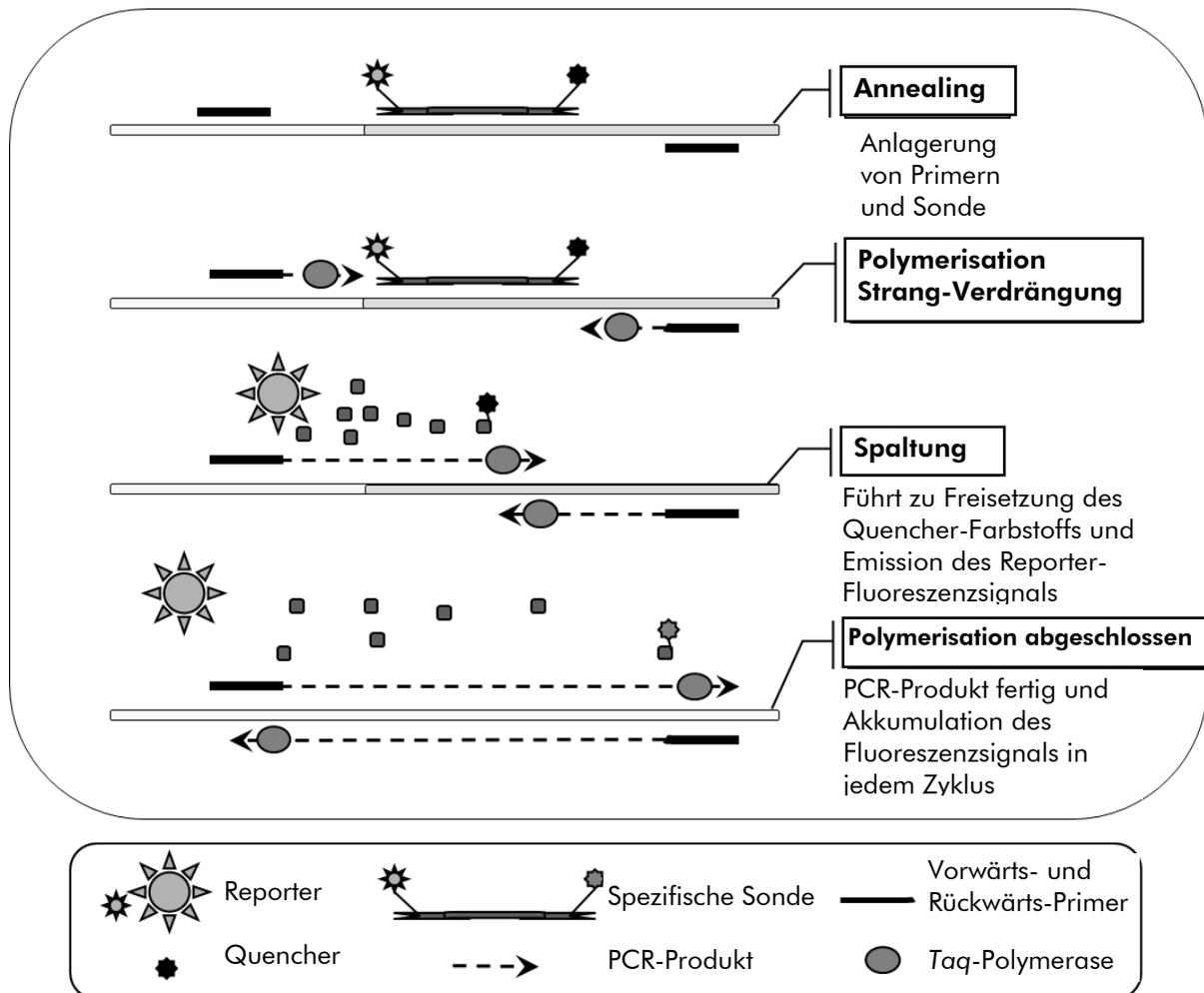
Die qPCR ermöglicht die genaue Quantifizierung von PCR-Produkten während der exponentiellen Phase des PCR-Amplifikationsprozesses. Durch die Erfassung der Fluoreszenzsignale in Echtzeit während und/oder im Anschluss an die PCR-Zyklen liegen schnell quantitative PCR-Daten vor, ohne dass eine Weiterverarbeitung nach der PCR notwendig ist, sodass das Risiko einer Kontamination des PCR-Produkts drastisch reduziert ist. Gegenwärtig sind drei Hauptvarianten der

qPCR-Methode verfügbar: qPCR-Analyse mit dem Farbstoff SYBR® Green I, qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden und qPCR-Analyse mit Hybridisierungssonden.

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

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

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



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

## Mit dem Kit gelieferte Materialien

### Kit-Inhalt

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalog-Nr.</b>		<b>670723</b>
<b>Anzahl Reaktionen</b>		<b>24</b>
High Positive RNA Control (Hoch positive RNA-Kontrolle)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (IS-MMR-Kalibrator)		3 x 10 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standardverdünnung) (10 <sup>1</sup> Kopien/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standardverdünnung) (10 <sup>2</sup> Kopien/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standardverdünnung) (10 <sup>3</sup> Kopien/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standardverdünnung) (10 <sup>4</sup> Kopien/5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standardverdünnung) (10 <sup>5</sup> Kopien/5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standardverdünnung) (10 <sup>6</sup> Kopien/5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL (Primer- und Sonden-Mischung ABL)*	PPC-ABL, 25x	110 µl

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

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalog-Nr.</b>		<b>670723</b>
<b>Anzahl Reaktionen</b>		<b>24</b>
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene (Primer- und Sonden-Mischung BCR-ABL-MbcR- Fusionsgen)*	PPF-MbcR, 25x	110 µl
ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit Handbook (in Englisch)		1

\* Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für das BCR-ABL-MbcR-Fusionsgen plus einer spezifischen FAM-TAMRA-Sonde.

**Hinweis:** Schütteln Sie die Röhren mit den Standard- (SP1 bis SP6) und Primer-Lösungen und den Sonden-Mischungen vorsichtig und zentrifugieren Sie sie kurz, bevor Sie mit der Testdurchführung beginnen.

## Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

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

### Reagenzien

- Reagenzien zur RNA-Aufreinigung: Als validierte Reagenzien werden das RNeasy® Midi Kit (von QIAGEN, Kat.-Nr. 75144) oder TRIzol® Reagenz (von Thermo Fisher Scientific Inc., Kat.-Nr. 15596018 oder 15596026) verwendet.
- Nukleasefreies Wasser (PCR-Qualität)
- Puffer und Taq-DNA-Polymerase: Als validierte Reagenzien werden die *Premix Ex Taq™* DNA-Polymerase (Perfect Real Time) (von TaKaRa, Kat.-Nr. RR039A) und die *Premix Ex Taq* DNA-Polymerase (Probe qPCR) (von TaKaRa, Kat.-Nr. RR390A) verwendet, jeweils inklusive des 2x-Taq-DNA-Polymerase-Master-Mix und der ROX™ Referenzfarbstoffe.
- Reagenzien für die reverse Transkription: Validierte Reagenzien/Kits hierfür sind das *ipsogen* RT Kit, inklusive reverse Transkriptase, 5x-RT-Puffer, 100 mM DTT, RNase-Inhibitor, Zufallsprimer (auch Random-Primer) und dNTPs (von QIAGEN, Kat.-Nr. 679923); oder SuperScript® III Reverse

Transcriptase, inklusive reverse Transkriptase, 5×-Erststrang-Puffer und 100 mM DTT (von Thermo Fisher Scientific Inc., Kat.-Nr. 18080044).

- Bei Verwendung von Superscript III werden zusätzlich folgende Reagenzien benötigt:
  - RNase-Inhibitor: das validierte Reagenz ist RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (von Thermo Fisher Scientific Inc., Kat.-Nr. 10777019)
  - Satz dNTPs (für PCR-Zwecke geeignet)
  - Random-Nonamer

### Verbrauchsartikel

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

### Geräte

- Für PCR reservierte Mikroliter-Pipetten\* (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Tischzentrifuge\* mit Rotor für 0,2-ml-/0,5-ml-Reaktionsgefäße (erforderliche Drehzahl: 10.000 UpM)
- Real-Time-PCR-Thermocycler:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder anderer Rotor-Gene Thermocycler; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 oder 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS; sowie gerätespezifisches Zubehörmaterial
- Thermocycler\* oder Wasserbad\* (für die reverse Transkription)

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

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

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

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

## Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

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

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

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

Gehen Sie äußerst sorgfältig vor, um Folgendes zu vermeiden:

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

Wir empfehlen daher, folgende Maßnahmen einzuhalten.

- Verwenden Sie nukleasefreie Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) und tragen Sie bei der Durchführung des Assays immer Einmal-Handschuhe.
- Benutzen Sie bei allen Pipettierschritten neue Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere, um eine Kreuzkontamination der Proben und Reagenzien zu vermeiden.
- Setzen Sie den Master-Mix vor der PCR mit dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.) in einem speziell dafür vorgesehenen Laborbereich an, in den keine DNA-Matrizen (cDNA, DNA, Plasmid-DNA) hineingetragen werden. Pipettieren Sie die Template-DNA in einem separaten Laborbereich (vorzugsweise in einem anderen Laborraum) mit speziell dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.).
- Pipettieren Sie die Standards (SP1 bis SP6) in einem separaten Laborraum.

## Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Kits werden auf Trockeneis verschickt und müssen nach Eingang bei  $-30\text{ °C}$  bis  $-15\text{ °C}$  gelagert werden.

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

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

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

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

## Handhabung und Lagerung der Proben

Vollblutproben sollten, mit Kalium-EDTA als Antikoagulans versetzt, bei  $2-8\text{ °C}$  und vor der RNA-Extraktion für maximal 5 Tage gelagert werden.

# Verfahren

## RNA-Isolierung aus der Probe

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

## Protokoll: Reverse Transkription mit SuperScript III Reverse Transcriptase

Dieses Protokoll ist für die reverse Transkription unter Verwendung der SuperScript III Reverse Transcriptase vorgesehen. Wenn Sie den *ipsogen* RT Kit verwenden, verwenden Sie bitte das Protokoll im *ipsogen RT Kit Handbuch*.

### Vor Beginn durchzuführende Arbeiten

- Setzen Sie die dNTP-Lösungen, jeweils 10 mM, an und lagern Sie sie aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Schütteln Sie die Reagenzien-Röhrchen gut (nicht auf einem Vortex!) und zentrifugieren Sie sie kurz (ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen. Stellen Sie die Röhrchen anschließend auf Eis.
3. Stellen Sie die Konzentration der RNA-Proben auf  $0,1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ein. Pipettieren Sie jeweils  $10\text{ }\mu\text{l}$  ( $1\text{ }\mu\text{g}$ ) RNA-Probe in separate beschriftete Reaktionsgefäße. Pipettieren Sie dann  $10\text{ }\mu\text{l}$  der hoch positiven RNA-Kontrolle,  $10\text{ }\mu\text{l}$  des IS-MMR-Kalibrators und  $10\text{ }\mu\text{l}$  nuklease-freies Wasser (als eine Negativkontrolle für die RT) in separate beschriftete Reaktionsgefäße und verarbeiten Sie sie parallel zu den RNA-Proben, wie im Folgenden beschrieben.

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

† Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm: Eine OD von 1,0 bei 260 nm ist äquivalent zu ca.  $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  (bei einzelsträngiger RNA). Ein  $A_{260}/A_{280}$ -Absorptionsverhältnis zwischen 1,8 und 2,1 entspricht einer RNA von hohem Reinheitsgrad.

4. Inkubieren Sie jede Probe, Kontrolle und Kalibratorlösung (jeweils 10  $\mu$ l) für 5 min bei 65 °C und stellen Sie sie sofort danach für 5 min auf Eis.
5. Zentrifugieren Sie kurz (ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen. Stellen Sie die Gefäße anschließend auf Eis.
6. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben, Kontrollen und Kalibratoren folgenden RT-Mix an (siehe Tab. 1).

**Tabelle 1. Ansetzen des RT-Mix**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen pro Probe (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Endkonzentration</b>
Erststrang-Puffer, 5x (mit SuperScript III Reverse Transcriptase geliefert)	5,0	1x
dNTPs (jeweils 10 mM; vorher ansetzen und bei -20 °C in Aliquots lagern)	2,0	0,8 mM
Random-Nonamer (100 $\mu$ M)	5,25	21 $\mu$ M
RNaseOUT (40 U/ $\mu$ l)	0,5	0,8 U/ $\mu$ l
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l)	1,0	8 U/ $\mu$ l
DTT (mit SuperScript III Reverse Transcriptase geliefert)	1,25	–
Erhitzte RNA-Probe, Kontrolle oder IS-MMR-Kalibrator (Zugabe bei Schritt 7)	10,0	40 ng/ $\mu$ l
Endvolumen	25,0	–

7. Pipettieren Sie 15  $\mu$ l RT-Mix in jedes PCR-Reaktionsgefäß. Geben Sie dann 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g) Proben-RNA, Kontrolle bzw. Kalibrator (aus Schritt 4) hinzu.
8. Mischen Sie vorsichtig (nicht auf einem Vortex!) und zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße kurz (ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.
9. Programmieren Sie den Thermocycler mit dem Programm für die reverse Transkription, wie in Tabelle 2 angegeben.

**Tabelle 2. Temperaturprogramm für reverse Transkription**

<b>Reverse Transkription 1</b>	Temperatur: 25 °C Zeit: 10 min
<b>Reverse Transkription 2</b>	Temperatur: 50 °C Zeit: 60 min
<b>Inaktivierung</b>	Temperatur: 85 °C Zeit: 5 min
<b>Abkühlung</b>	Temperatur: 4 °C Zeit: 5 min

**10. Stellen Sie die Reaktionsgefäße in den Thermocycler und starten Sie das in Tabelle 2 angegebene Temperaturprogramm.**

**11. Zentrifugieren Sie nach Programmende alle Reaktionsgefäße kurz (ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen. Stellen Sie alle Reaktionsgefäße auf Eis oder in einen Gefrierschrank bei -20 °C, bis die qPCR nach einem der folgenden Protokolle, das für den von Ihnen verwendeten qPCR-Thermocycler vorgesehen ist, durchgeführt wird.**

**Hinweis:** Beim LightCycler 1.2, 1.5 und 2.0 Thermocycler ergibt jede RT-Reaktion cDNA für zwei qPCR-Läufe.

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

Bei Verwendung dieses Thermocyclers empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 3 angegeben, durchzuführen. Der Kit ist für die dreifache Testung von 8 verschiedenen cDNA-Proben im selben Experiment vorgesehen.

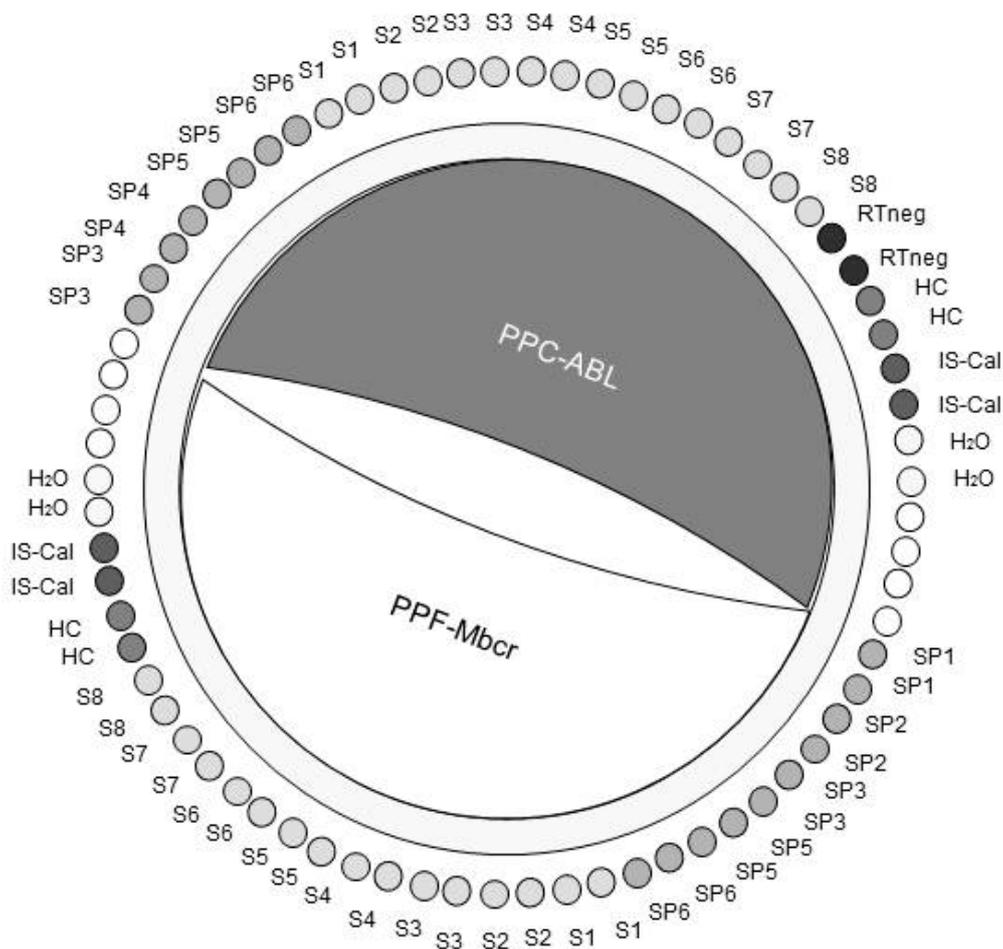
**Tabelle 3. Anzahl an Reaktionen für Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor**

Proben	Reaktionen
<b>Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL) (32 Reaktionen)</b>	
8 cDNA-Proben	8 x 2 Reaktionen
1 hoch positive cDNA-Kontrolle	2 Reaktionen
1 cDNA-IS-MMR-Kalibrator	2 Reaktionen
Einzel-Plasmid-Standards	2 x 4 Reaktionen (SP3, SP4, SP5 und SP6; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
RT-Negativkontrolle	2 Reaktionen
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
<b>Mit BCR-ABL-Mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-Mbcr) (32 Reaktionen)</b>	
8 cDNA-Proben	8 x 2 Reaktionen
1 hoch positive cDNA-Kontrolle	2 Reaktionen
1 cDNA-IS-MMR-Kalibrator	2 Reaktionen
Einzel-Plasmid-Standards	2 x 5 Reaktionen (SP1, SP2, SP3, SP5 und SP6; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

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

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

nutzen. Das Rotor-Schema in Abbildung 4 gibt beispielhaft die Belegung des Rotors bei einem Experiment wieder.



**Abbildung 4. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up für jedes Experiment mit dem ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6:** BCR-ABL-Mbcr- bzw. ABL-Standards; **HC:** Hoch positive cDNA-Kontrolle; **IS-Cal:** IS-MMR-Kalibrator; **RTneg:** RT-Negativkontrolle; **S:** cDNA-Probe; **H<sub>2</sub>O:** Wasser-Kontrolle.

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

Setzen Sie in alle übrigen Positionen ein leeres Reaktionsgefäß ein.

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

**Hinweis:** Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

### Durchführung

#### 1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.

2. **Schütteln Sie alle Standard-, PPF-Mbcr- und PPC-ABL-Röhrchen (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie sie kurz (ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.**
3. **Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

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

**Tabelle 4. Ansetzen des qPCR-Mix**

<b>Komponente</b>	<b>1 Reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 32 + 1 Reaktionen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL-Mbcr: 32 + 1 Reaktionen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Endkonzentration</b>
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	1,0	33,0	33,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	214,5	214,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 5)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

4. **Pipettieren Sie 20  $\mu$ l des qPCR-Mix in jedes Reaktionsgefäß.**
5. **Geben Sie – in einem anderen Laborbereich und unter Verwendung von dafür reservierten Materialien/Geräten – 5  $\mu$ l des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 200 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Reverse Transkription mit SuperScript III Reverse Transcriptase“ auf Seite 15 ff.) in das entsprechende Reaktionsgefäß (Gesamtvolumen 25  $\mu$ l).**
6. **Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**

7. Verschließen Sie die Reaktionsgefäße und setzen Sie sie gemäß den Empfehlungen des Herstellers in den Thermocycler.
8. Programmieren Sie den Rotor-Gene Q Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 5 angegeben.

**Tabelle 5. Temperaturprofil**

<b>Analysemodus</b>	Quantifizierung
<b>Halten 1 ("Hold 1")</b>	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 s
<b>Zykleneinstellungen  („Cycling“)</b>	50 Zyklen 95 °C für 5 s 60 °C für 30 s mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Kanal Grün: Einzel ("Single")
<b>Halten 2 ("Hold 2")</b>	Temperatur: 36 °C Zeit: 1 min

9. Klicken Sie im Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) auf „Gain Optimisation“ (Verstärkungsoptimierung), um das Dialogfeld „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Einrichtung der automatischen Verstärkungsoptimierung) zu öffnen. Stellen Sie für den Bereich des grünen Kanals „Min Reading“ (Min. Messwert) auf „5 FI“, „Max Reading“ (Max. Messwert) auf „10 FI“ und den zulässigen Verstärkungsbereich auf –10 bis 10 ein.
10. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen), und schließen Sie das Dialogfeld „Auto-Gain Optimisation Setup“.
11. Starten Sie das Temperaturzyklusprogramm.  
Aktivieren Sie bei der Analyse die Funktion „Slope Correct“ (Steigung korrigieren). Wir empfehlen, den Schwellenwert („Threshold“) auf 0,03

## Protokoll: qPCR mit Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS oder LightCycler 480 Thermocycler

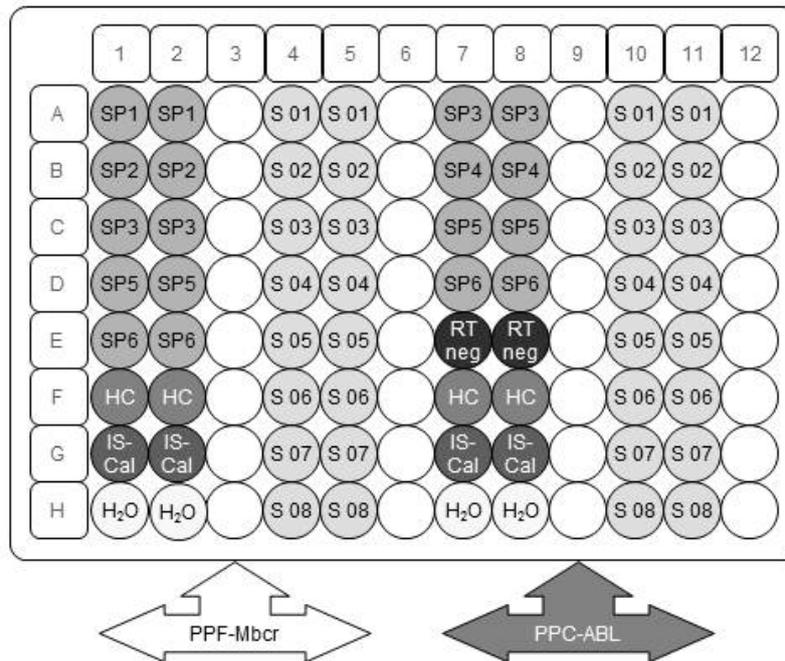
Bei Verwendung eines solchen Thermocyclers für 96-Well-Platten empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 6 angegeben, durchzuführen. Der Kit ist für die dreifache Testung von 8 verschiedenen cDNA-Proben im selben Experiment vorgesehen.

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

Proben	Reaktionen
<b>Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL) (32 Reaktionen)</b>	
8 cDNA-Proben	8 x 2 Reaktionen
1 hoch positive cDNA-Kontrolle	2 Reaktionen
1 cDNA-IS-MMR-Kalibrator	2 Reaktionen
Einzel-Plasmid-Standards	2 x 4 Reaktionen (SP3, SP4, SP5 und SP6; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
RT-Negativkontrolle	2 Reaktionen
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
<b>Mit BCR-ABL-Mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-Mbcr) (32 Reaktionen)</b>	
8 cDNA-Proben	8 x 2 Reaktionen
1 hoch positive cDNA-Kontrolle	2 Reaktionen
1 cDNA-IS-MMR-Kalibrator	2 Reaktionen
Einzel-Plasmid-Standards	2 x 5 Reaktionen (SP1, SP2, SP3, SP5 und SP6; jeweils als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

## Probenverarbeitung bei Applied Biosystems, ABI PRISM oder LightCycler 480 Thermocycler

Wir empfehlen, mindestens 8 cDNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Platten-Schema in Abbildung 5 gibt beispielhaft die Belegung einer Platte bei einem Experiment wieder.



**Abbildung 5. Vorgeschlagenes Platten-Set-up für ein Experiment mit dem ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6:** BCR-ABL-Mbcr- bzw. ABL-Standards; **HC:** Hoch positive cDNA-Kontrolle; **IS-Cal:** IS-MMR-Kalibrator; **RTneg:** RT-Negativkontrolle; **S:** cDNA-Probe; **H<sub>2</sub>O:** Wasser-Kontrolle.

## qPCR mit dem Applied Biosystems, ABI PRISM oder LightCycler 480 Thermocycler

**Hinweis:** Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

### Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Schütteln Sie alle Standard-, ROX-, PPF-Mbcr- und PPC-ABL-Röhrchen (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie sie kurz (ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.
3. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an. Bei Verwendung eines qPCR-

**Thermocyclers für 96-Well-Platten empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung durchzuführen.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 7 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix bei Verwendung eines Applied Biosystems oder ABI PRISM Thermocyclers, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 µl berechnet ist. Die Tabelle 8 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix bei Verwendung eines LightCycler 480 Thermocyclers, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPC-ABL oder PPF-Mbcr) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

**Tabelle 7. Ansetzen des qPCR-Mix für Applied Biosystems oder ABI PRISM Thermocycler**

<b>Komponente</b>	<b>1 Reaktion (µl)</b>	<b>ABL: 32 + 1 Reaktionen (µl)</b>	<b>BCR-ABL- Mbcr: 32 + 1 Reaktionen (µl)</b>	<b>Endkonzentration</b>
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	1,0	33,0	33,0	1x
Farbstoff ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT), oder ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,0	198,0	198,0	–
Probe (Zugabe bei Schritt 5)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

**Tabelle 8. Ansetzen des qPCR-Mix für LightCycler 480 Thermocycler**

<b>Komponente</b>	<b>1 Reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 32 + 1 Reaktionen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL- Mbc: 32 + 1 Reaktionen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Endkonzentration</b>
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	1,0	33,0	33,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	214,5	214,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 5)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

4. **Pipettieren Sie 20  $\mu$ l des qPCR-Pre-Mix in jedes Well.**
5. **Geben Sie – in einem anderen Laborbereich und unter Verwendung von dafür reservierten Materialien/Geräten – 5  $\mu$ l des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 200 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Reverse Transkription mit SuperScript III Reverse Transcriptase“ auf Seite 15 ff.) in das entsprechende Well (Gesamtvolumen 25  $\mu$ l).**
6. **Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
7. **Schließen Sie die Platte und zentrifugieren Sie kurz (300 x g, ca. 10 s).**
8. **Setzen Sie die Platte gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler. Programmieren Sie den Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 9 für den Applied Biosystems oder den ABI PRISM bzw. in Tabelle 10 für den LightCycler 480 Thermocycler angegeben.**

**Tabelle 9. Temperaturprofil für Applied Biosystems und ABI PRISM Thermocycler**

<b>Analysemodus</b>	Standardkurve – absolute Quantifizierung
<b>Halten 1 (“Hold 1”)</b>	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 s
<b>Zykleneinstellungen („Cycling“)</b>	50 Zyklen 95 °C für 5 s 60 °C für 30 s; mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz: Einzel (“Single”); Quencher: TAMRA
<b>Halten 2 (“Hold 2”)</b>	Temperatur: 36 °C Zeit: 1 min

**Tabelle 10. Temperaturprofil für den LightCycler 480 Thermocycler**

<b>Analysemodus</b>	Absolute Quantifizierung (“Abs Quant”)
<b>Detektionsformat („Detection formats“)</b>	Wählen Sie im “Detection formats“-Fenster („Detektionsformate“) die Option “Simple Probe” („Einfach markierte Sonde“).
<b>Halten 1 („Hold 1“)</b>	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 s
<b>Zykleneinstellungen („Cycling“)</b>	50 Zyklen 95 °C für 5 s 60 °C für 30 s mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Bereich 483–533 nm bei LC-Version 01 bzw. im Bereich 465–510 nm bei LC-version 02
<b>Halten 2 (“Hold 2”)</b>	Temperatur: 36 °C Zeit: 1 min

**9. Bei Verwendung eines Applied Biosystems 7500 oder ABI PRISM 7900HT SDS fahren Sie mit Schritt 9a fort. Bei einem LightCycler 480 Thermocycler fahren Sie mit Schritt 9b fort.**

- 9a. Bei Applied Biosystems oder ABI PRISM: Wir empfehlen, beim Analyseschritt einen Schwellenwert von 0,1 am Thermocycler einzustellen. Starten Sie das in Tabelle 9 angegebene zyklische Temperaturprogramm.**
- 9b. LightCycler 480: Wir empfehlen, den Fit-Point-Analysemodus mit einem Hintergrundwert von 2,0 und einem Schwellenwert von 2,0 zu verwenden. Starten Sie das in Tabelle 10 angegebene zyklische Temperaturprogramm.**

## Protokoll: qPCR mit LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocycler

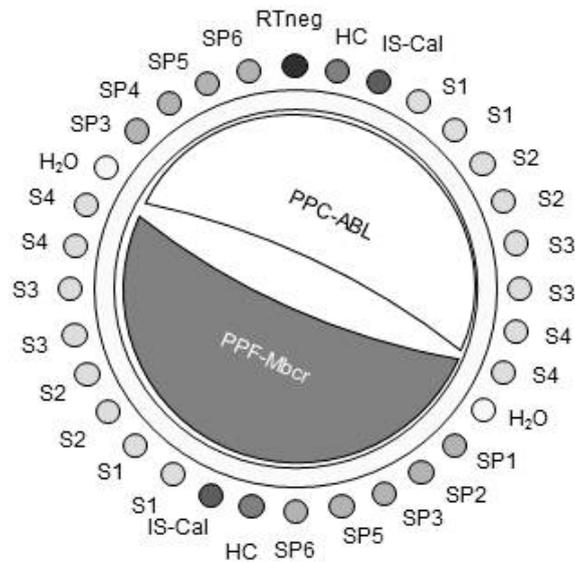
Bei Verwendung eines Kapillar-Thermocyclers empfehlen wir, die Proben in Doppelbestimmung und Kontrollen lediglich in Einfachbestimmung zu testen, wie in Tabelle 11 angegeben. Der Kit ist für die sechsfache Testung von 4 verschiedenen cDNA-Proben im selben Experiment vorgesehen.

**Tabelle 11. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocyclers**

Proben	Reaktionen
<b>Mit ABL-Primer- und -Sonden-Mix (PPC-ABL) (16 Reaktionen)</b>	
4 cDNA-Proben	4 x 2 Reaktionen
1 hoch positive cDNA-Kontrolle	1 Reaktion
1 cDNA-IS-MMR-Kalibrator	1 Reaktion
Einzel-Plasmid-Standards	1 x 4 Reaktionen (SP3, SP4, SP5 und SP6)
RT-Negativkontrolle	1 Reaktion
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion
<b>Mit BCR-ABL-Mbcr-Primer- und -Sonden-Mix (PPF-Mbcr) (16 Reaktionen)</b>	
4 cDNA-Proben	4 x 2 Reaktionen
1 hoch positive cDNA-Kontrolle	1 Reaktion
1 cDNA-IS-MMR-Kalibrator	1 Reaktion
Einzel-Plasmid-Standards	1 x 5 Reaktionen (SP1, SP2, SP3, SP5 und SP6)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion

### Probenverarbeitung bei LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocycler

Wir empfehlen, mindestens 4 cDNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Kapillaren-Schema in Abbildung 6 gibt beispielhaft die Belegung der Kapillaren bei einem Experiment wieder.



**Abbildung 6. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up für jedes Experiment mit dem ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6:** BCR-ABL-Mbcr- bzw. ABL-Standards; **HC:** Hoch positive cDNA-Kontrolle; **IS-Cal:** IS-MMR-Kalibrator; **RTneg:** RT-Negativkontrolle; **S:** cDNA-Probe; **H<sub>2</sub>O:** Wasser-Kontrolle.

## qPCR mit LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocycler

**Hinweis:** Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

### Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Schütteln Sie alle Standard-, PPF-Mbcr- und PPC-ABL-Röhrchen (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie sie kurz (ca. 10 Sekunden bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.
3. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 12 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 20 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPC-ABL oder PPF-Mbcr) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

**Tabelle 12. Ansetzen des qPCR-Mix für LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocycler**

<b>Komponente</b>	<b>1 Reaktion (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 16 + 1 Reaktionen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL- Mbc: 16 + 1 Reaktionen (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Endkonzentration</b>
Premix Ex Taq, 2x	10,0	170,0	170,0	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	4,2	71,4	71,4	–
Probe (Zugabe bei Schritt 5)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	20,0	jeweils 20,0	jeweils 20,0	–

4. **Pipettieren Sie 15  $\mu$ l des qPCR-Pre-Mix in jede Kapillare.**
5. **Geben Sie – in einem anderen Laborbereich und unter Verwendung von dafür reservierten Materialien/Geräten – 5  $\mu$ l des RT-Produkts (cDNA, äquivalent zu 200 ng RNA), das bei der reversen Transkription erhalten wurde (siehe „Protokoll: Reverse Transkription mit SuperScript III Reverse Transcriptase“ auf Seite 15 ff.) in die entsprechende Kapillare (Gesamtvolumen 20  $\mu$ l).**
6. **Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
7. **Setzen Sie die Kapillaren in die mit dem Gerät gelieferten Adapter und zentrifugieren Sie sie kurz (700 x g, ca. 10 s).**
8. **Setzen Sie die Kapillaren gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler ein.**
9. **Programmieren Sie den LightCycler 1.2, 1.5 oder 2.0 Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 13 angegeben.**

**Tabelle 13. Temperaturprofil**

<b>Analysemodus</b>	<b>Quantifizierung</b>
<b>Halten 1 ("Hold 1")</b>	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 s "Ramp": 20
<b>Zykleneinstellungen ("Cycling")</b>	50 Zyklen 95 °C für 5 s; "Ramp": 20 60 °C für 30 s; "Ramp": 20; mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz: Einzel ("Single")
<b>Halten 2 ("Hold 2")</b>	Temperatur: 36 °C Zeit: 1 min "Ramp": 20

**10. Bei Verwendung eines LightCycler 1.2 oder 1.5 fahren Sie mit Schritt 10a fort. Bei einem LightCycler 2.0 Thermocycler fahren Sie mit Schritt 10b fort.**

**10a. Bei LightCycler 1.2 oder 1.5: Es wird empfohlen, den F1/F2 und "2<sup>nd</sup> derivative"-Analysemodus („2. Ableitung“) zu verwenden. Starten Sie das in Tabelle 13 angegebene zyklische Temperaturprogramm.**

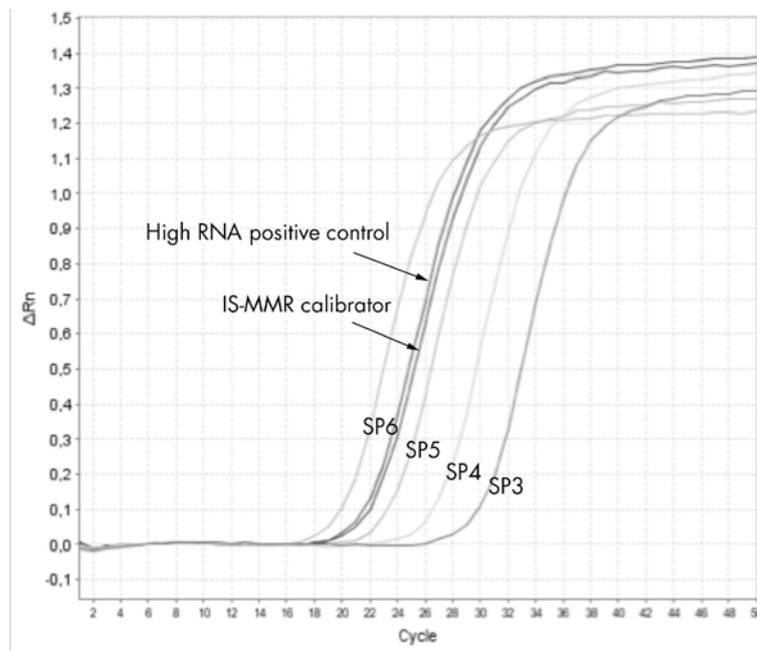
**10b. LightCycler 2.0: Wir empfehlen, beim LightCycler 2.0 mit der Software-Version 4.0 den "Automated (F''max)"-Analysemodus („Automatisiert (F''max)“) zu verwenden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Starten Sie das in Tabelle 13 angegebene zyklische Temperaturprogramm.**

# Interpretation der Ergebnisse

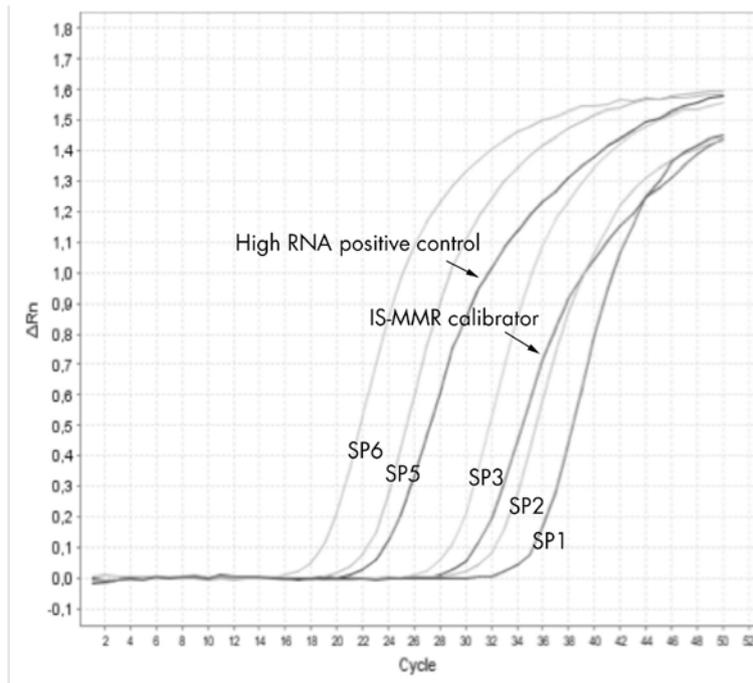
## Verfahren der Datenauswertung

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

Bei Verwendung von Standards mit einer bekannten Anzahl an Molekülen kann eine Standardkurve erstellt und die Target-Menge in der zu testenden Probe präzise bestimmt werden. Die *ipsogen* Standardkurven basieren auf Plasmid-DNA. Um genaue Standardkurven sicherzustellen, verwenden wir vier Standard-Verdünnungen für ABL und fünf Standard-Verdünnungen für Mbc. Der Kit enthält außerdem einen IS-MMR-Kalibrator, der die Umrechnung der Ergebnisse in die internationale Skala ermöglicht. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen Beispiele von TaqMan Amplifikationskurven, die für die Standards, den IS-MMR-Kalibrator und die hoch positive RNA-Kontrolle mit dem *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit erhalten wurden.



**Abbildung 7. Detektion von ABL mit den Standards SP3, SP4, SP5 und SP6** entsprechend  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  Kopien/5  $\mu$ l.



**Abbildung 8. Detektion von BCR-ABL-Mbcr mit den Standards SP1, SP2, SP3, SP5 und SP6** entsprechend  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  und  $10^6$  Kopien/ $5 \mu\text{l}$ .

## Standardkurven und auf Rohdaten anzuwendende Qualitätskriterien

### Reproduzierbarkeit zwischen Wiederholproben

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

Die Variation der  $C_T$ -Werte zwischen den Wiederholproben ist generell  $< 1,5$ , wenn der  $C_T$ -Mittelwert der Replikate  $< 36$  ist (7).

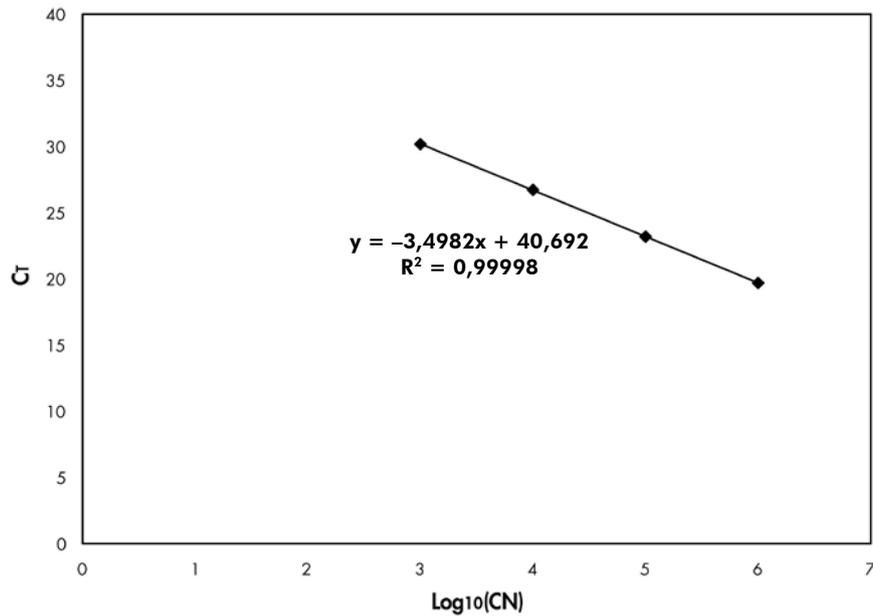
**Hinweis:** Jeder Benutzer sollte seine eigene Reproduzierbarkeit im eigenen Labor bestimmen.

### Standardkurven

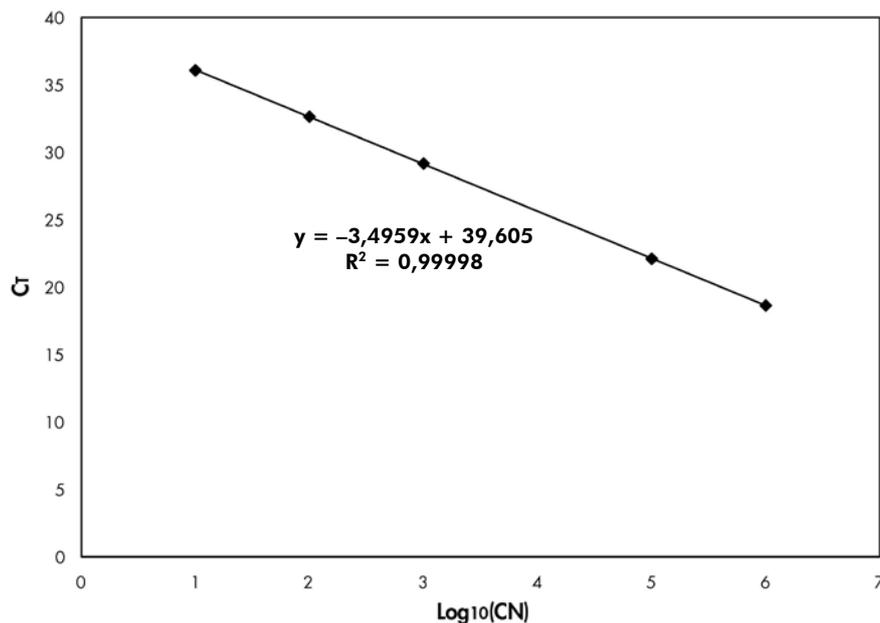
Die Rohdaten können zur Auswertung kopiert und in eine Excel® Datei eingefügt werden.

Für jedes Gen (ABL bzw. BCR-ABL) werden die  $C_T$ -Rohwerte, die für die Plasmid-Standard-Verdünnungen erhalten wurden, entsprechend der logarithmischen Kopienzahl (3, 4, 5 und 6 für SP3, SP4, SP5 und SP6 bzw. 1, 2, 3, 5 und 6 für SP1, SP2, SP3, SP5 und SP6) aufgetragen. In der Abbildung 9 ist ein Beispiel für eine theoretische ABL-Standardkurve wiedergegeben, die anhand der Werte für vier Standard-Verdünnungen berechnet wurde.

Abbildung 10 zeigt ein Beispiel einer theoretischen BCR-ABL-Standardkurve, berechnet auf Basis der Werte für fünf Standard-Verdünnungen.



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



**Abbildung 10. Theoretische Standardkurve für BCR-ABL, berechnet anhand von fünf Standard-Verdünnungen.** Es wird eine lineare Regressionsgleichung ( $y = ax + b$ ) ermittelt, in der  $a$  für die Steigung der Geraden und  $b$  für den  $y$ -Achsenabschnitt steht, also für die  $y$ -Koordinate des Punkts, in dem die Gerade die  $y$ -Achse schneidet. Die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) sind im Diagramm wiedergegeben.

Da es sich bei den Standards um 10-fache Verdünnungen handelt, beträgt die theoretische Steigung der Geraden  $-3,3$ . Eine Steigung zwischen  $-3,0$  und  $-3,9$  gilt als akzeptabel, solange der Wert  $R^2 > 0,95$  ist (7). Für präzise Ergebnisse ist allerdings ein  $R^2$ -Wert von  $> 0,98$  wünschenswert (3).

**Hinweis:** Die SP1-Standard-Verdünnung (BCR-ABL-Plasmid, 10 Kopien) muss bei der Detektionsreaktion mitgeführt bei der Erstellung der BCR-ABL-Standardkurve mitberücksichtigt werden.

### Qualitätskontrolle aller ABL-Werte

Eine geringe Qualität der RNA oder eventuelle Probleme bei den Arbeitsschritten der qPCR führen zu einer niedrigen ABL-Kopienzahl ( $ABL_{CN}$ ). Die optimale Sensitivität wird bei Proben mit einem  $ABL_{CN}$ -Wert von  $\geq 10.000$  Kopien erreicht. Dieses Kriterium bezüglich  $ABL_{CN}$  gilt auch für die hoch positive RNA-Kontrolle und den IS-MMR-Kalibrator.

### RT-Negativkontrolle und Wasser-Kontrolle

Die Kontrollen ohne Template ("No Template Controls", NTCs) – Wasser-Kontrolle beim PCR-Schritt bzw. RT-Negativkontrolle bei der reversen Transkription – sollten eine Kopienzahl (CN) von null ergeben, sowohl für ABL als auch für BCR-ABL-Mbcr. Ein positives Testergebnis für diese NTCs zeigen eine Kreuzkontamination während der reversen Transkription und/oder qPCR an.

### Normalisierte Kopienzahl (NCN)

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

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

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

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

Berechnen Sie das NCN-Ergebnis für jede hoch positive RNA-Kontrolle ( $NCN_{HC}$ ), den IS-MMR-Kalibrator ( $NCN_{cal}$ ) und jede Probe ( $NCN_{Probe}$ ).

### Hoch positive RNA-Kontrolle und IS-MMR-Kalibrator

Diese Kontrollen ermöglichen die Überwachung der reversen Transkription und der Amplifikationsschritte von ABL und BCR-ABL-Mbcr während der Quantifizierung des Transkripts.

## Qualitätskontrolle des $NCN_{cal}$ -Ergebnisses

**Hinweis:** Das NCN-Ergebnis für den IS-MMR-Kalibrator, der mit dem *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit in Kombination mit den validierten Reagenzien und Thermocyclern (siehe „Mit dem Kit gelieferte Materialien“ auf Seite 10 bzw. „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 11) erhalten wurde, muss im Intervall 0,05–0,3 liegen. Andernfalls können die NCN-Werte nicht in die internationale Skala umgerechnet werden. Darüber hinaus ist das gesamte Experiment inakzeptabel, falls die hoch positive RNA-Kontrolle nicht detektiert werden kann.

## IS-Umrechnung und MMR-Befundung

**Hinweis:** Schauen Sie sich vor der Auswertung den Wert an, der auf dem Etikett des IS-MMR-Kalibrator-Röhrchens oder auf dem Analysezertifikat, das mit dem Kit geliefert wird, angegeben ist.

Verwenden Sie das für den IS-MMR-Kalibrator experimentell bestimmte NCN-Ergebnis ( $NCN_{cal}$ ) und den ihm zugewiesenen Wert (IS-Cal-Wert), der in dem Analysezertifikat angegeben ist, um die normalisierte Kopienzahl auf der internationalen Skala ( $IS-NCN_{probe}$ ) zu berechnen.

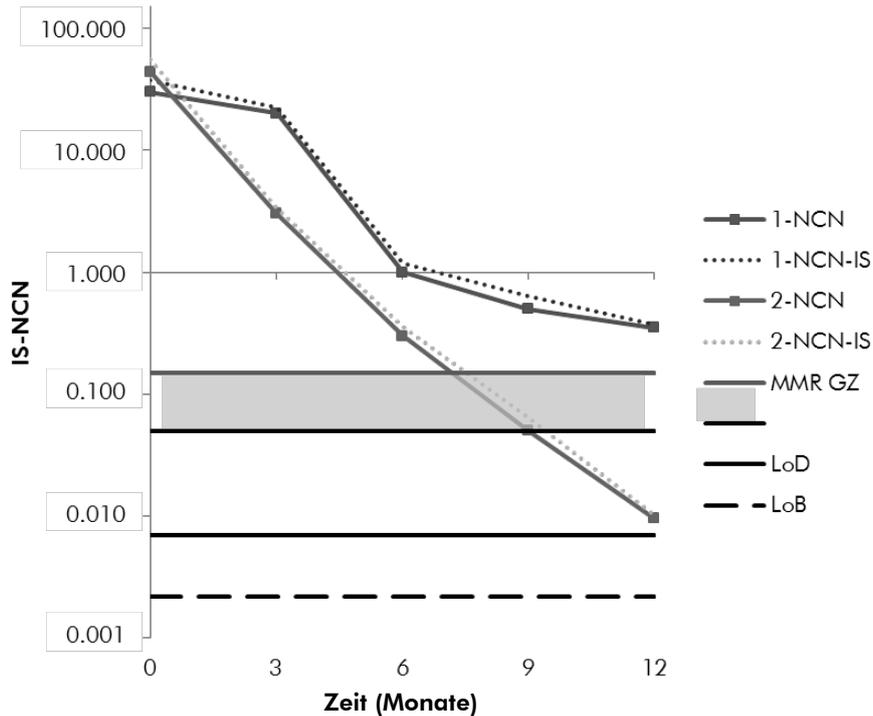
$$IS-NCN_{probe} = \frac{NCN_{probe} \times IS-Cal-Wert}{NCN_{cal}}$$

Bestimmen Sie anhand der folgenden Kriterien den MMR-Status jeder Probe.

- **$IS-NCN_{probe} \leq 0,05$ :** Bedeutendes molekulares Ansprechen
- **$0,05 < IS-NCN_{probe} < 0,15$ :** Grauzone um den MMR-Cut-off-Wert herum; Ergebnis nicht eindeutig
- **$IS-NCN_{probe} \geq 0,15$ :** Kein bedeutendes molekulares Ansprechen

Das  $IS-NCN_{HC}$ -Ergebnis (NCN für die hoch positive RNA-Kontrolle auf der internationalen Skala) sollte kein bedeutendes molekulares Ansprechen ergeben.

In Abbildung 11 ist ein Beispiel für ein Patienten-Monitoring mithilfe der NCN- und  $IS-NCN$ -Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 11. Überwachungskurven für einen Patienten, dessen MMR-Status mit dem ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit bestimmt wurde. NCN: normalisierte Kopienzahl; NCN-IS: normalisierte Kopienzahl auf internationaler Skala; MMR GZ: MMR-Grauzone (GZ), nicht eindeutiges Ergebnis; LoD: Nachweisgrenze ("level of detection"); LoB: Hintergrundwert ("level of blank").**

## Zusammenfassung der Qualitätskriterien

In Tabelle 14 sind die verschiedenen Qualitätskriterien und die zugehörigen Werte oder Ergebnisse zusammengefasst.

**Tabelle 14. Zusammenfassung der Qualitätskriterien**

<b>Kriterien</b>	<b>Akzeptable Werte/Ergebnisse</b>
Unterschiede in den $C_T$ -Werten zwischen Replikaten	$\leq 2 C_T$ , falls $C_T$ -Mittelwert $> 36$ $\leq 1,5 C_T$ , falls $C_T$ -Mittelwert $\leq 36$
Steigung der Standardkurven	Zwischen $-3,0$ und $-3,9$
$R^2$ für Standardkurven	Mindestens $> 0,95$ , besser $> 0,98$
SP1-Standard-Verdünnung (BCR-ABL, 10 Kopien Plasmid)	Muss detektiert werden und bei Standardkurve berücksichtigt sein
Qualitätskontrolle des $ABL_{CN}$ -Werts von Patientenproben, hoch positiver RNA-Kontrolle und dem IS-MMR-Kalibrator	$ABL_{CN} > 10.000$ Kopien ABL, um optimale Sensitivität zu erreichen
PCR-Kontrolle (Wasser) und Kontrolle der reversen Transkription (RT-Negativkontrolle)	Jeweils $ABL_{CN} = 0$ und $Mbcr_{CN} = 0$
NCN für IS-MMR-Kalibrator ( $NCN_{cal}$ )	Muss im Intervall $0,05-0,3$ sein
Hoch positive RNA-Kontrolle	Muss detektiert werden
NCN für die hoch positive RNA-Kontrolle umgerechnet auf die internationale Skala (IS- $NCN_{HC}$ )	Status: Kein bedeutendes molekulares Ansprechen

## Hilfe zur Fehlerbehebung

Weitere Informationen finden Sie auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx).

Außerdem beantwortet das Team vom Technischen Service bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und zu den Protokollen in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme, siehe „Kontaktinformationen“ auf Seite 44).

## Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet. Analysenzertifikate sind auf Anfrage unter [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support) erhältlich.

## Beschränkungen des Tests

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

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

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

**Hinweis:** Der Kit wurde gemäß den Studien des "Europe Against Cancer"-Programms (EAC) entwickelt (8, 9) und ist konform mit den aktualisierten internationalen Empfehlungen. Der Kit enthält einen auf die internationale Skala standardisierten IS-MMR-Kalibrator, der die Umrechnung der NCN-Ergebnisse auf die internationale Skala und die Status-Befundung des bedeutenden molekularen Ansprechens (MMR = "major molecular response") ermöglicht.

Jeder Charge des IS-MMR-Kalibrators ist ein Wert zugeordnet, der direkt aus einer Kalibrierung mit NIBSC-/WHO-zertifiziertem primärem Referenzmaterial ("International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138") abgeleitet wurde.

Ein Analysezertifikat mit Angabe des zugeordneten Werts für den IS-MMR-Kalibrator gehört zum Lieferumfang jedes Kits.

Der Kit sollte gemäß den Anweisungen in diesem Handbuch und in Kombination mit validierten Reagenzien und Geräten verwendet werden (siehe „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 11). Bei nicht vorgesehenem Gebrauch (sog. „Off-Label-Use“) dieses Produkts und/oder durch Modifikation seiner Komponenten erlischt jegliche Haftung QIAGENS.

## Leistungscharakteristik

**Hinweis:** Die Untersuchungen zur Leistungscharakteristik wurden unter Verwendung eines Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems in Kombination mit dem *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit und weiteren validierten Reagenzien (siehe „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 11) durchgeführt.

## Grenzwert der Leerprobe und Nachweisgrenze

Der Grenzwert der Leerprobe (LoB) und die Nachweisgrenze (LoD) wurden gemäß der CLSI-/NCCLS-Richtlinie EP17-A bestimmt.

Der Hintergrundwert oder Grenzwert der Leerprobe (LoB = “level of blank”) wurde mit negativen Proben, die von gesunden Spendern stammten, bestimmt (11 Proben, 69 Messungen). Der gemessene Wert entsprach einem Äquivalent einer normalisierten Kopienzahl (BCR-ABL-MbcR-NCN) von 0,0022.

Die Nachweisgrenze (LoD = “level of detection”) oder analytische Sensitivität wurde mit bekanntermaßen schwach positiven Proben ermittelt (n = 8; 74 Messungen). Die ermittelte Nachweisgrenze entsprach einem BCR-ABL-MbcR-NCN-Wert von 0,0069.

- **NCN ≤ LoB:** BCR-ABL-MbcR nicht detektiert
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL-MbcR detektiert, aber nicht quantifiziert
- **NCN ≥ LoD:** BCR-ABL-MbcR quantifiziert

## Linearität

Die Linearität wurde gemäß der CLSI-/NCCLS-Richtlinie EP6-A bestimmt.

Diese Untersuchung wurde mit Gemischen aus positiver und negativer RNA, die aus Zelllinien extrahiert worden war, durchgeführt. Elf unterschiedliche Konzentrationen wurden als Dreifachbestimmung getestet. Die bei Analyse dieser Proben erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass der *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Assay im NCN-Bereich von 0,003 bis 65 für BCR-ABL-MbcR linear ist.

## Effekt der Ausgangsmenge

Fünf verschiedene RNAs mit unterschiedlicher normalisierter Kopienzahl (NCN) BCR-ABL-MbcR wurden für diese Untersuchung gewählt. Dabei wurden verschiedene RNA- und cDNA-Mengen getestet, um den Einfluss der Ausgangsmenge auf die NCN-Ergebnisse zu evaluieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die Variation der RNA-Ausgangsmenge einen limitierten Einfluss auf die NCN-Ergebnisse hatte, wohingegen die cDNA-Ausgangsmenge ein empfindlicherer Faktor ist, wenn mehr oder weniger davon als Ausgangsmaterial eingesetzt wird. Als Folge dieser Untersuchung wird eine Ausgangsmenge von 1 µg RNA bzw. 5 µl cDNA für die Testdurchführung empfohlen.

## Präzision

Die Präzision wurde gemäß der CLSI-/NCCLS-Richtlinie EP5-A2 bestimmt.

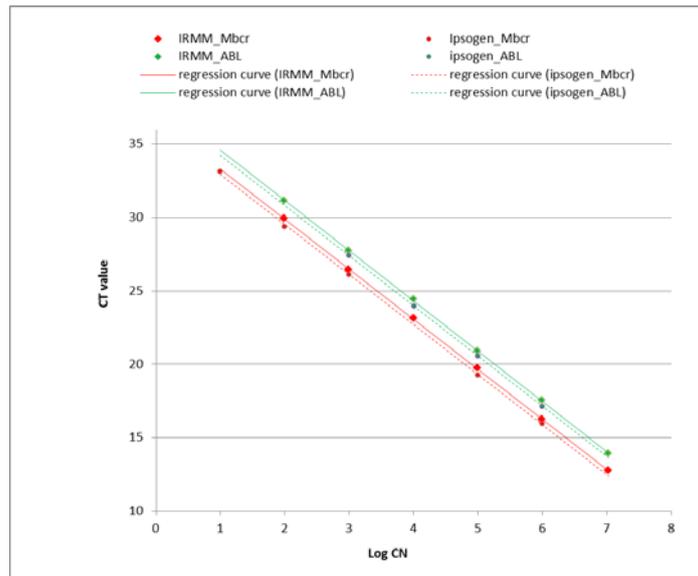
Bei der Untersuchung der Präzision wurden 13 verschiedene Proben insgesamt 42 Mal, jeweils in Doppelbestimmung, getestet (n = 84). Diese Proben waren für die verschiedenen BCR-ABL-Mbcr-Expressionsniveaus in Patientenproben im Bereich des MMR-Werts und darüber repräsentativ. Der globale Variationskoeffizient um den MMR-Wert herum wurde zu 25 % bestimmt.

## Konkordanzstudie: ERM-AD623 BCR-ABL1-Einzelplasmid (IRMM) im Vergleich zu *ipsogen*-Einzelplasmid-Standards (QIAGEN)

Die jüngsten Arbeitsdefinitionen für das molekulare Ansprechen von BCR-ABL1-Mbcr bei CML stammen von der ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group. Diese empfiehlt die Verwendung des Plasmids ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Belgien): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

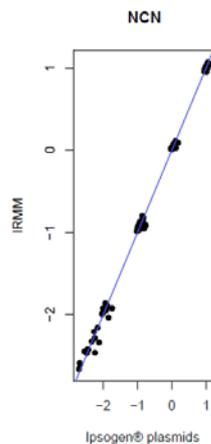
Zur Umsetzung dieser Empfehlung führte QIAGEN eine Konkordanzstudie durch, bei der das *ipsogen*-Einzelplasmid für mehrere Zielsequenzen aus dem *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (24) CE (Katalog-Nr. 670723) mit dem BCR-ABL1-Plasmid ERM-AD623 (IRMM) verglichen wurde.

Der Vergleich beruhte auf dem Mbcr/ABL1-Verhältnis der normalisierten Kopienzahl (NCN) von BCR-ABL1, das mit einer der beiden Standardverdünnungen (*ipsogen* oder ERM-AD623 BCR-ABL1) für die Kontrollproben aus den *ipsogen*-Kits und für zertifiziertes Referenzmaterial vom 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, bestimmt wurde.



Regressionskurve  
 Ct-Wert  
 Log CN

**Abbildung 12. Die Standardkurven des *ipsogen*-Plasmids und des ERM-AD623 BCR-ABL1-Plasmids stimmen überein.**



NCN  
 IRMM  
*ipsogen*®-Plasmide  
*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit.

**Abbildung 13. NCN-Werte von ERM-AD623 BCR-ABL1 im Vergleich zu *ipsogen***

Die QIAGEN-Studie kam zu dem Ergebnis, dass kein statistischer Unterschied vorliegt: Das BCR-ABL1-Einzelploid ERM-AD623 und die *ipsogen*-Einzelploidstandards ergeben vergleichbare Ergebnisse.

## Literatur

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.

## Symbole

Folgende Symbole werden auf der Verpackung und den Etiketten verwendet:



Kit enthält Reagenzien für < N > Reaktionen



Zur Verwendung bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Beachten Sie die Anwendungshinweise

## Kontaktinformationen

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

## Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: MbcR- und ABL-Einzel-Plasmid-Standards, hoch positive RNA-Kontrolle, IS-MMR-Kalibrator, Primer- und Sonden-Mischung für ABL, Primer- und Sonden-Mischung für BCR-ABL-MbcR-Fusionsgen	670723
<b>Rotor-Gene Q MDx – für IVD-validierte Real-Time-PCR-Analysen bei klinisch-diagnostischen Applikationen</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör und 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten; Installation und Unterweisung nicht inbegriffen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten, Installation und Unterweisung	9002033
<b><i>ipsogen</i> RT Kit – für die reverse Transkription</b>		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Reverse Transkriptase, Random-Primer, DTT, dNTP, RNase-Inhibitor, RT-Puffer	679923
<b>RNeasy Kits – für die Isolierung von Gesamt-RNA</b>		
RNeasy Midi Kit (50)	Für 50 RNA-Präparationen: 50 RNeasy Midi-Spinsäulen, 15-ml-Auffanggefäße (Collection Tubes), RNase-freie Reagenzien und Puffer	75144

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

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

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

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

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN-Gruppe); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™, (TRIZO)® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche-Gruppe); Premix Ex Taq™ (Takara Bio, Inc.).

### Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

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

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

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

