



## t(15;17) oligomix Alert kit

### Nachweis von PML-RARA bcr1, bcr2 und bcr3 cDNA

REF BANG12-02



#### INHALT

ANWENDUNGSGBIET	Seite 1
KITBESCHREIBUNG	Seite 1
MERKMALE DES KITS	Seite 2
ANDEREN PRODUKTEN ERFORDERLICH	Seite 2
IM KIT ENTHALTENES MATERIAL	Seite 3
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES, NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL	Seite 3
HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	Seite 3
PROBENMATERIAL UND KONTROLLEN	Seite 5
VERFAHREN	Seite 5
LITERATUR	Seite 9
PROBLEMLÖSUNGEN	Seite 10
ERKLÄRUNG DER SYMBOLE	Seite 12

#### ANWENDUNGSGBIET

Der Kit «t(15;17) oligomix Alert kit» wird für den **Nachweis der cDNA der Translokation PML-RARA, t(15;17), Varianten bcr1, bcr2 und bcr3** im Reaktionsprodukt der reversen Transkription aus Gesamt-RNA verwendet, die aus Proben von peripherem EDTA-Blut, EDTA-Knochenmarkblut und Leukozytensuspensionen extrahiert wurde.

Der cDNA-Nachweis der Translokation PML-RARA mit einem Amplifikationstest kann für die diagnostische Feststellung oder Überwachung der Präsenzzeit dieses Rearrangements eingesetzt werden, das in nahezu allen Fällen der akuten Promyelozytenleukämie (LAP) festgestellt wird.

#### KITBESCHREIBUNG

Der Kit enthält die Reaktionsmischungen **OligoMIX bcr1** für die erste und zweite Amplifikation von PML-RARA Varianten bcr1 und Variante bcr2, die Reaktionsmischungen **OligoMIX bcr3** für die erste und zweite Amplifikation von PML-RARA Variante bcr3 und die Reaktionsmischungen **OligoMIX RARA** für die Kontrollamplifikation RARA, bereits **gebrauchsfertig in «Monotest» Reaktionsgefäßen voraliquotiert**.

#### t(15;17) oligomix Alert kit

##### Nachweis von PML-RARA bcr1, bcr2 und bcr3 cDNA

REF

BANG12-02

- Das Verfahren sieht drei Gruppen von Amplifikationsreaktionen vor:
- zwei aufeinander folgende spezifische Amplifikationsreaktionen (nested) für die Translokation PML-RARA Variante bcr1 und Variante bcr2;
  - zwei aufeinander folgende spezifische Amplifikationsreaktionen (nested) für die Translokation PML-RARA Variante bcr3;
  - eine single Amplifikationsreaktion für die Transkription des Gens RARA, das als Eignungskontrolle der Probe verwendet wird.

Die Amplifikationsreaktionen gehen vom Reaktionsprodukt der reversen Transkription aus, das aus dem RNA-Extrakt aus den Testproben gewonnen wurde. Das Auftreten der spezifischen Produkte in der zweiten Amplifikationsreaktion zeigt an, dass die cDNA der Translokation PML-RARA im Reaktionsprodukt der reversen Transkription vorhanden ist. Das Auftreten des spezifischen Produkts der Kontrollamplifikation zeigt an, dass cDNA des Gens RARA im Reaktionsprodukt der reversen Transkription vorhanden und die Probe damit geeignet ist.

#### MERKMALE DES KITS

Die **Sensitivität der Reaktion** ermöglicht den Nachweis von ca. **10 Molekülen der Ziel-DNA (d.h. etwa zehn cDNA der Translokation PML-RARA)** in 5 µL Reaktionsprodukt der reversen Transkription, die dem «Monotest» Reaktionsgefäß hinzugefügt werden.

**Hinweis:** Wenn man 10x10<sup>6</sup> Leukozyten mit dem Kit «EXTRAzol» (siehe folgenden Abschnitt zu den Ergänzungskits) extrahiert und die reverse Transkription mit dem Kit «RT - Kit plus» (siehe folgenden Abschnitt zu den Ergänzungskits) durchführt, beträgt die Sensitivität der Methode ca. 250 cDNA/1x10<sup>6</sup> Leukozyten.

Mit dem Kit können **25 Reaktionen** inklusive Positiv- und Negativ-Kontrollen durchgeführt werden.

#### ANDEREN PRODUKTEN ERFORDERLICH

**NICHT** in diesem Kit enthalten sind die Reagenzien für die RNA-Extraktion aus den zu testenden Proben, für die reverse RNA-Transkription, für die positive Amplifikationskontrollen und für den Nachweis der amplifizierten DNA. Für diese Analysenschritte werden die folgenden Ergänzungskits von ELITechGroup S.p.A.:

- «EXTRAzol» (Katalognr. EXTR01), Kit für die RNA-Extraktion aus Zellproben.
- «RT - Kit plus» (Katalognr. BRK200), Kit für die reverse RNA-Transkription mit "Random Primer".
- «t(15;17) - Positive Control» (Katalognr. CTRG12), positive Amplifikationskontrolle der Plasmid-DNA.
- «ELECTROPHORESIS 3» (Katalognr. EPH03), Nachweis der amplifizierten DNA mittels Agarosegel-Elektrophorese.

**IM KIT ENTHALTENES MATERIAL**

Komponente	Beschreibung	Menge	Zusammensetzung	Etikettierung
OligoMIX bcr1 für die erste Amplifikation	Amplifikationsmix in <b>BLAUEN</b> 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 90 µL	Externe Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS-HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxy nukleotidtriphosphat-Mix, Vaselinöl	-
OligoMIX bcr3 für die erste Amplifikation	Amplifikationsmix in <b>FARBLOSEN</b> 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 90 µL	Externe Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS-HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxy nukleotidtriphosphat-Mix, Vaselinöl	-
RARA OligoMIX für die Kontrollamplifikation	Amplifikationsmix in <b>GELBEN</b> 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 90 µL	Interne Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS-HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxy nukleotidtriphosphat-Mix, Vaselinöl	-
OligoMIX bcr1 für die zweite Amplifikation	Amplifikationsmix in <b>ROTEN</b> 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 94 µL	Externe Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS-HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxy nukleotidtriphosphat-Mix, Vaselinöl	-
OligoMIX bcr3 für die zweite Amplifikation	Amplifikationsmix in <b>GRÜNEN</b> 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 94 µL	Externe Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS-HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxy nukleotidtriphosphat-Mix, Vaselinöl	-

**ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES, NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL**

- Laminarfluss-Werkbank (Laminarbox).
- Einweghandschuhe aus Latex o.ä.
- Tisch-Mikrozentrifuge (12.000 - 14.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter oder Direktverdrängungs- Dispensierpipetten (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL).
- Steriles bidestilliertes Wasser.
- Thermostabile DNA-Polymerase 2 U/µL (FINNZYMES Kat.-Nr. F-501L).
- Programmierbarer Thermostat (PCR-Thermocycler).

**HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN**

Dieser Kit ist ausschließlich für die *In-vitro-Diagnose* bestimmt.

**Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

Alle biologischen Proben müssen so gehandhabt und entsorgt werden, als ob sie Infektionserreger übertragen könnten. Der direkte Kontakt mit den biologischen Proben ist zu vermeiden. Es dürfen keine Spritzer oder Aerosol erzeugt werden. Material, das mit den biologischen Proben in Kontakt gekommen ist, muss vor der Entsorgung mindestens 30 Minuten lang mit 3%-igem Natriumhypochlorit behandelt oder eine Stunde lang bei 121°C autoklaviert werden.

Alle Reagenzien und im Test verwendeten Materialien müssen so gehandhabt und entsorgt werden, als ob sie Infektionserreger übertragen könnten. Der direkte Kontakt mit den Reagenzien ist zu vermeiden. Es dürfen keine Spritzer oder Aerosol erzeugt werden. Abfälle müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften behandelt und entsorgt werden. Brennbares Einwegmaterial muss verbrannt werden. Flüssige Abfälle, die Säuren oder Basen enthalten, müssen vor der Beseitigung neutralisiert werden.

- Geeignete Schutzkleidung und -handschuhe tragen. Augen und Gesicht sind zu schützen. Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.
- Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetika auftragen.
- Nach der Arbeit mit Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen.
- Überschüssige Reagenzien und Abfälle nach den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Vor dem Test alle Gebrauchsanweisungen zum Kit lesen.
- Bei der Testdurchführung sind die im Kit enthaltenen Anweisungen zu befolgen.
- Das Verfallsdatum des Kits ist einzuhalten.
- Nur die im Kit enthaltenen oder vom Hersteller empfohlenen Reagenzien verwenden.
- Nie Reagenzien verschiedener Chargen gegeneinander austauschen.
- Keine Reagenzien aus Testbestecken anderer Hersteller verwenden.

**Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie**

Die Verfahren der Molekularbiologie wie Extraktion, reverse Transkription, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren erfordern geschultes Personal, um falsche Ergebnisse – bedingt durch den Abbau von Nukleinsäuren in den Proben oder Kontamination der Proben durch Amplifikationsprodukte – zu vermeiden.

Die DNA-Extraktion aus den Proben und die Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen müssen räumlich separat von der Amplifikation und dem Nachweis der Amplifikationsprodukte durchgeführt werden. Ein Amplifikationsprodukt darf nie in den Arbeitsbereich 'Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen' gelangen.

Für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen einerseits und für die Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte andererseits müssen jeweils gesondert Kittel, Handschuhe und Instrumente zur Verfügung stehen. Die Kittel, Handschuhe und Instrumente aus dem Bereich 'Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte' dürfen nie in den Bereich 'Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen' gelangen.

Die Proben dürfen ausschließlich für diese Art von Analyse verwendet werden. Die Proben müssen an einer Laminarfluss-Werkbank gehandhabt werden. Reaktionsgefäße mit verschiedenen Proben dürfen nie gleichzeitig geöffnet werden. Die Pipetten zum Pipettieren der Proben dürfen ausschließlich dafür verwendet werden. Die Pipetten müssen Direktverdrängungs-Dispensierpipetten sein, andernfalls müssen Pipettenspitzen mit Aerosolfilter verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, DNase/RNase-frei sowie DNA/RNA-frei sein.

Die Reagenzien müssen an einer Laminarfluss-Werkbank gehandhabt werden. Die für die Amplifikation erforderlichen Reagenzien müssen so vorbereitet werden, dass sie in einer Sitzung aufgebraucht werden. Die Pipetten zum Pipettieren der Reagenzien dürfen ausschließlich dafür verwendet werden. Die Pipetten müssen Direktverdrängungs-Dispensierpipetten sein, andernfalls müssen Pipettenspitzen mit Aerosolfilter verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, DNase/RNase-frei sowie DNA/RNA-frei sein.

Die Amplifikationsprodukte müssen so gehandhabt werden, dass ihre Verbreitung in die Umgebung weitestgehend begrenzt wird, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Pipetten zum Pipettieren der Amplifikationsprodukte dürfen ausschließlich dafür verwendet werden.

**Spezielle Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Komponenten**

Die Reaktionsgefäße mit OligoMIX für die **erste Amplifikation**, für die **zweite Amplifikation** und die **Kontrollamplifikation** sind Einweggefäße und dürfen daher nur einmal für Amplifikationsreaktionen verwendet werden.

Für OligoMIX für die **erste Amplifikation**, für die **zweite Amplifikation** und die **Kontrollamplifikation** gelten folgende Sicherheitsempfehlungen (S-Sätze):

**S 23-25.** Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. Berührung mit den Augen vermeiden.

**PROBENMATERIAL UND KONTROLLEN**

**Proben**

Dieser Kit muss mit dem Reaktionsprodukt der reversen Transkription (cDNA) von RNA-Extrakten aus biologischen Proben verwendet werden.

Das System der reversen RNA-Transkription muss "Random Primer" als Primer für die Polymerisationsreaktion verwenden.

Wenn biologische Zellproben verwendet werden, zum Beispiel Vollblut, sollte die Gesamtmenge der extrahierten RNA geprüft werden, die in die reverse Transkriptionsreaktion gegeben wird, um zu vermeiden, dass unspezifische Produkte oder mögliche Inhibitionsphänomene in der anschließenden Amplifikationsreaktion auftreten.

Die maximale Endkonzentration der Gesamt-RNA in der reversen Transkriptionsreaktion sollte ca. 40 ng/µL betragen. Die Höchstmenge der Gesamt-RNA, die der reversen Transkriptionsreaktion mit 25 µL Endvolumen hinzugefügt werden kann, beträgt ca. 1 µg.

Die RNA-Extraktion aus der Ausgangsprobe muss für die Reaktion der reversen Transkription und die Amplifikationsreaktionen geeignete RNA erbringen.

Es wird empfohlen, mehrere Aliquots von den Proben vorzubereiten und eingefroren aufzubewahren, um wiederholtes Frieren/Tauen zu vermeiden.

**Amplifikationskontrollen**

Es ist absolut notwendig, jeden Lauf zu validieren, indem eine negative und eine positive Kontrolle mitgeführt wird.

Für die Negativkontrolle verwendet man steriles bidestilliertes Wasser (nicht im Kit enthalten), das der Reaktion anstelle der aus der Probe extrahierten cDNA hinzugefügt wird.

Für die Positivkontrolle wird cDNA aus einer bereits getesteten positiven Probe oder die «t(15;17) - Positive Control» verwendet.

**Qualitätskontrollen**

Es wird empfohlen, den gesamten Analyseprozess, Extraktion und Amplifikation in einem Lauf zu validieren, indem man eine negative und eine positive Probe, die bereits getestet sind, oder kalibriertes Referenzmaterial verwendet.

**VERFAHREN**

**Programmierung des Thermocyclers**

Vor dem Beginn des Laufs sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

- Überprüfen, ob der Temperaturblock des programmierbaren Thermostats (Thermocycler, T.C.) kompatibel mit dem Format der im Kit enthaltenen «**Monotest**» Reaktionsgefäße ist (0,2 mL-Reaktionsgefäße);

- Im Handbuch des Cyclers prüfen, wie die Temperaturkontrolle erfolgt;

- Möglichst die **direkte Temperaturkontrolle am Heizblock** auswählen (z.B. beim Thermocycler Hybaid™ oder Eppendorf™): Temperaturkontrollen mittels Reaktionsgefäß-Sonden oder Simulationssoftware sollten nicht verwendet werden;

- Wenn dies nicht möglich ist und bei Thermocyclern Modell GeneAmp PCR System **9600, 2400, 9700** oder **2700** (Applied Biosystems™) die Kontrolle der Temperaturvoreinstellung wählen;

- Am Thermocycler die Parameter des Reaktionszyklus entsprechend den folgenden Tabellen einstellen:

**Programm der ersten Amplifikation**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeitdauer
1 Zyklus	95° C	4 Min.
35 Zyklen	95° C	1 Min.
	65° C	1 Min.
	72° C	1 Min.
1 Zyklus	72° C	5 Min.

**Programm der zweiten Amplifikation**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeitdauer
1 Zyklus	95° C	2 Min.
30 Zyklen	95° C	1 Min.
	65° C	1 Min.
	72° C	1 Min.
1 Zyklus	72° C	5 Min.

**Vorbereitung der ersten Amplifikation**

Vor dem Beginn des Laufs sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

- Die Proben für die Analyse und die Positivkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, und in Eis stellen.

- Jeweils ein **blaues (bcr1) «Monotest» Reaktionsgefäß** für jede Analyseprobe, für die Negativkontrolle und für die Positivkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und in Eis stellen.

- Jeweils ein **farblores (bcr3) «monotest» Reaktionsgefäß** für jede Analyseprobe, für die Negativkontrolle und für die Positivkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und in Eis stellen.

- Jeweils ein **gelbes (Kontrollreaktion RARA) «Monotest» Reaktionsgefäß** für jede Analyseprobe und für die Negativkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und in Eis stellen.

- Die thermostabile DNA-Polymerase 2 U/µL (nicht im Kit enthalten) mit sterilem bidestilliertem Wasser (nicht im Kit enthalten) nach den Angaben in der folgenden Tabelle verdünnen. Man stellt ein verdünntes Enzymvolumen her (Gesamtvolumen), das für alle vorgesehenen Reaktionen (einschließlich Kontrollen) plus eine ausreicht, um eine Sicherheitsspanne zu haben. Das verdünnte Enzym kann **nicht** aufbewahrt werden.

Anzahl der Reaktionen	Enzym	Wasser	Gesamtvolumen
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. In jedes **blaue, farblose** und **gelbe «Monotest» Reaktionsgefäß** 5 µL der verdünnten thermostabilen DNA-Polymerase (1U) pipettieren.
2. In jedes **blaue, farblose** und **gelbe «Monotest» Reaktionsgefäß** 5 µL cDNA pipettieren. In der gleichen Weise für die Negativ- und die Positivkontrollen vorgehen.
3. Die **blauen, farblosen** und **gelben «Monotest» Reaktionsgefäße** in den Thermocycler stellen und das Programm für die erste Amplifikationsreaktion starten.

**Vorbereitung der zweiten Amplifikation**

Vor dem Beginn des Laufs sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

- Ebenso viele **rote (bcr1) «Monotest» Reaktionsgefäße** auftauen, wie blaue verwendet wurden, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und auf Eis halten.
- Ebenso viele **grüne (bcr3) «Monotest» Reaktionsgefäße** auftauen, wie farblose verwendet wurden, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und auf Eis halten.
- Das thermostabile DNA-Polymerase-Enzym 2 U/µL (nicht im Kit enthalten) wie vorher beschrieben mit sterilem bidestilliertem Wasser (nicht im Kit enthalten) bis zur Endkonzentration **0,2 U/µL** verdünnen.

- In jedes **rote** und **grüne «Monotest» Reaktionsgefäß 5 µL** der verdünnten thermostabilen DNA Polymerase (1 U) pipettieren.
- In jedes **rote (bcr1) «Monotest» Reaktionsgefäß 1 µL** des Produkts aus der ersten Amplifikation aus dem entsprechenden **blauen (bcr1) «Monotest» Reaktionsgefäß** dazu pipettieren.
- In jedes **grüne (bcr3) «Monotest» Reaktionsgefäß 1 µL** des Produkts aus der ersten Amplifikation aus dem entsprechenden **farblosen (bcr3) «Monotest» Reaktionsgefäß** dazu pipettieren.

**Hinweis:** Das Produkt der ersten Amplifikation kann die folgenden Tests kontaminieren. Halten Sie die überschüssigen Produkte aus der ersten Amplifikation separat und wechseln Sie die Handschuhe am Ende dieses Schrittes.

- Die **roten** und **grünen «Monotest» Reaktionsgefäße** in den Thermocycler stellen und das Programm für die zweite Amplifikationsreaktion starten.

**Hinweis:** Das Reaktionsprodukt kann bei -20°C für maximal einen Monat aufbewahrt werden.

**Nachweis des spezifischen Amplifikationsprodukts**

Das spezifische Produkt der zweiten Amplifikation kann durch elektrophoretische Trennung unter den folgenden Bedingungen nachgewiesen und identifiziert werden:

- man verwendet ein 2%iges Agarosegel mit 1 µg/mL Ethidiumbromid in 1x TBE-Puffer (89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM Dinatrium-EDTA);
- man verwendet ein 4%iges Agarosegel mit 1 µg/mL Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer (40 mM TRIS Base, 20 mM TRIS Acetat, 1 mM Dinatrium-EDTA), analog zu den Produkten der Reihe «ELECTROPHORESIS».

Die **spezifischen Produkte der zweiten bcr1 Amplifikation** haben eine Größe von:  
**214 bp (PML-RARA bcr1)**  
**50 bis 200 bp (PML-RARA bcr2)**

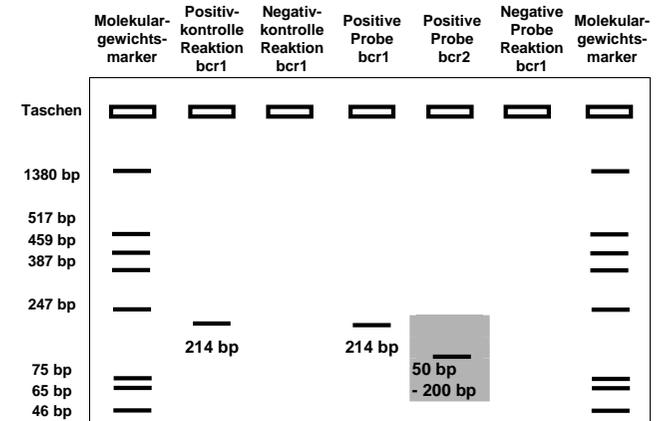
Die **spezifischen Produkte der zweiten bcr3 Amplifikation** haben eine Größe von:  
**289 bp (PML-RARA bcr3)**

Das **spezifische Produkt der Kontrollamplifikation RARA** hat eine Größe von: **175 bp (RARA)**

**Hinweis:** Das spezifische Amplifikationsprodukt der cDNA der Translokation PML-RARA Variante bcr2 kann bei den verschiedenen positiven Proben verschiedene Größe haben; dies hängt von der Variabilität des Bruchpunkts am Hexon 6 des PML-Gens ab.

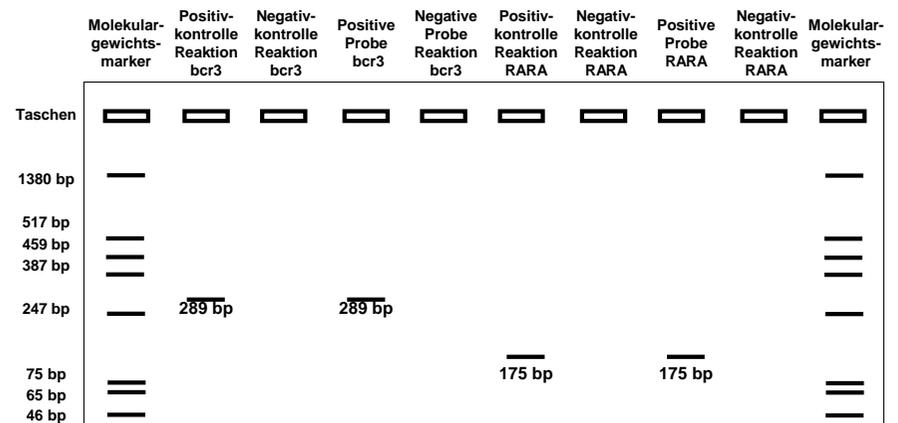
**Hinweis:** Das Produkt der zweiten Amplifikation kann spätere Analysen kontaminieren. Überschüssige Produkte aus der zweiten Amplifikation und der beim Nachweis erzeugte Abfall müssen separiert werden.

Das Beispiel zeigt das Schema eines Elektrophoresegels nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte aus einem PCR-Lauf für die Varianten bcr1 und bcr2, in dem Proben mit verschiedenen elektrophoretischen Profilen analysiert wurden.



**Hinweis:** Das spezifische Amplifikationsprodukt der cDNA der Translokation PML-RARA Variante bcr2 kann bei den verschiedenen positiven Proben eine unterschiedliche Wanderung im Gel zeigen, was von der Variabilität des Bruchpunkts am Hexon 6 des PML-Gens abhängt.

Das Beispiel zeigt das Schema eines Elektrophoresegels nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte aus einem PCR-Lauf für die Variante bcr3 und die Kontrolle RARA, in dem Proben mit verschiedenen elektrophoretischen Profilen analysiert wurden.



Es ist unbedingt notwendig, die Identität des zweiten Amplifikationsprodukts einer Probe zu validieren. Dazu vergleicht man seine Wanderungsstrecke im Gel mit der eines Markers mit bekanntem Molekulargewicht und mit der Wanderung des zweiten Amplifikationsprodukts der Positivkontrolle.

Das eventuelle Vorhandensein von unspezifischen Produkten in anderen Größen als die der spezifischen Produkte der zweiten Amplifikation einer Probe hat für den Nachweis der cDNA der Translokation PML-RARA, Varianten bcr1, bcr2 und bcr3, sowie der cDNA des Gens RARA keinerlei Bedeutung.

**Allgemeine Validierung des Amplifikationslaufs**

Die Ergebnisse der negativen und der positiven Kontrollreaktionen werden verwendet, um die Sitzung entsprechend der folgenden Tabelle zu validieren:

Amplifikation der Negativkontrolle	Amplifikation
Spezifisches Produkt NICHT VORHANDEN	Korrekt
Amplifikation der Positive Control	Amplifikation
Spezifisches Produkt VORHANDEN	Korrekt

Wenn das spezifische Amplifikationsprodukt in der negativen Kontrollreaktion vorhanden ist, sind Probleme in der Amplifikationsphase aufgetreten (Kontamination), die zu falschen Positivergebnissen führen können. Der Test muss ab der Amplifikation wiederholt werden.

Wenn das spezifische Amplifikationsprodukt in der positiven Kontrollreaktion nicht vorhanden ist, sind Probleme in der Amplifikationsphase aufgetreten (unwirksame oder keine Amplifikation), die zu falschen Negativergebnissen führen können. Der Test muss ab der Amplifikation wiederholt werden.

**Bewertung der Ergebnisse**

Die Reaktionsergebnisse der Analysenproben werden, wie in der folgenden Tabelle beschrieben, verwendet, um die Präsenz der cDNA der Translokation PML-RARA nachzuweisen.

Amplifikation der Probe	Testergebnis	PML-RARA cDNA
Spezifisches Produkt NICHT VORHANDEN	negativ	NICHT VORHANDEN
Spezifisches Produkt VORHANDEN	positiv	VORHANDEN

Bevor das Ergebnis "cDNA PML-RARA NICHT VORHANDEN" für eine Testprobe definitiv validiert wird, muss das Ergebnis der Kontrollamplifikation für die cDNA des Gens RARA in der Reaktion zu der entsprechenden Probe analysiert werden.

Das Ergebnis, das für die cDNA des Gens RARA erreicht wurde, wird verwendet, um die Eignungskontrolle der Probe (externe Qualitätskontrolle) durchzuführen, wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

Amplifikation der Probe	Testergebnis	RARA cDNA	Probe
Spezifisches Produkt NICHT VORHANDEN	negativ	VORHANDEN	GEEIGNET
Spezifisches Produkt VORHANDEN	positiv	NICHT VORHANDEN	NICHT GEEIGNET

Wenn das Ergebnis der Kontrollamplifikation RARA **negativ** ist, die cDNA des Gens RARA **NICHT VORHANDEN** und die Probe **NICHT GEEIGNET** ist, sind Probleme in der Amplifikationsphase (unwirksame oder keine Amplifikation), in der reversen Transkriptionsphase (unwirksame oder keine reverse Transkription) oder in der Extraktionsphase (keine RNA oder Präsenz von Inhibitoren) aufgetreten. Die Probe ist **falsch negativ** und der Test muss von der Extraktion einer neuen Probe an wiederholt werden.

**LITERATUR**

J.J.M. van Dongen e at. (1999) *Leukemia* 211/99 b 13 (1): 1901 - 1928

**PROBLEMLÖSUNGEN**

**Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der negativen Kontrollreaktion vorhanden**

Mögliche Ursachen	Lösungen
Fehler bei der Dispensierung der cDNA.	Öffnen Sie nur ein Reaktionsgefäß zur gleichen Zeit, vermeiden Sie, den Inhalt austreten zu lassen, wechseln Sie immer die Pipettenspitze
Fehler bei der Dispensierung des Produkts aus der ersten Amplifikation	Öffnen Sie nur ein Reaktionsgefäß zur gleichen Zeit, vermeiden Sie, den Inhalt austreten zu lassen, wechseln Sie immer die Pipettenspitze
Kontamination der für die Sitzung vorbereiteten Reagenzien	Beobachten Sie sorgfältig die Verdünnung und Dispensierung des Enzyms, wechseln Sie immer die Pipettenspitze.
Kontamination des sterilen Wassers für die Enzymverdünnung	Verwenden Sie ein neues Aliquot von sterilem Wasser.
Kontamination des Enzymvorrats	Verwenden Sie ein neues Enzymaliquot.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der PCR	Reinigen Sie Oberflächen und Instrumente mit wasserlöslichen Detergenzien, waschen Sie die Kittel, ersetzen Sie die verwendeten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen.

**Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der positiven Kontrollreaktion nicht vorhanden.**

Mögliche Ursachen	Lösungen
Enzym zu stark verdünnt oder Fehler bei der Dispensierung des Enzyms	Überprüfen Sie die Verdünnungsberechnungen, beobachten Sie aufmerksam die Dispensierung des Enzyms und mischen Sie gut.
Fehler bei der Dispensierung der Positivkontrolle	Beobachten Sie aufmerksam die Dispensierung der Positivkontrolle.
Abbau der Positivkontrolle	Verwenden Sie ein neues Aliquot der Positivkontrolle.
Fehler bei der Einstellung des Temperaturzyklus	Kontrollieren Sie den Temperaturzyklus, der am Thermocycler eingestellt ist.
Fehler bei der Dispensierung des Produkts aus der ersten Amplifikation	Entnehmen Sie das Produkt der ersten Amplifikation vorsichtig und dispensieren es sorgfältig in der zweiten Amplifikation.
Fehler bei der Dispensierung des Produkts der zweiten Amplifikation ins Gel	Laden Sie das Produkt der zweiten Amplifikation vorsichtig ins Gel.

**Unspezifische Amplifikationsprodukte in den Reaktionen der Proben vorhanden.**

Mögliche Ursachen	Lösungen
Enzym zu stark konzentriert	Überprüfen Sie die Berechnungen für die Enzymverdünnung.
Die Vorbereitung der ersten Amplifikationsreaktion dauert zu lange	Halten Sie die Reaktionsgefäße, denen bereits die cDNA zugesetzt wurde, auf Eis, bis sie in den Thermocycler gestellt werden.
Fehler bei der Einstellung des Temperaturzyklus	Kontrollieren Sie den Temperaturzyklus, der am Thermocycler eingestellt ist.
Zu viel cDNA in der Reaktion.	Beurteilen Sie die Konzentration der RNA in der reversen Transkriptionsreaktion. Die Konzentration 40 ng/1 µL (1 µg RNA in einer Reaktion mit abschließenden 25 µL) darf nicht überschritten werden.

Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der ABL-Kontrollreaktion der Proben nicht vorhanden

Mögliche Ursachen	Lösungen
Heparin in der Vollblutprobe.	Die Blutprobe muss EDTA oder Citrat als Antikoagulans enthalten.
Fehler bei der Konservierung der Blutprobe.	Das Blut für die RNA-Extraktion muss innerhalb von wenigen Stunden ab der Abnahme behandelt und darf nie eingefroren werden.
Fehler in der Extraktionsphase.	Extraktionsarbeitsschritte kontrollieren. Extraktion mit gewissenhafter Beachtung der Anweisungen vorbereiten und ausführen.
Abbau der extrahierten Probe.	Die RNA-Extraktion muss mit RNase-freien Materialien und Reagenzien ausgeführt werden. Die extrahierte RNA muss bei -20°C oder -80°C aufbewahrt werden.
Fehler in der Phase der reversen Transkription	Arbeitsschritte bei der reversen Transkription kontrollieren. Die reverse Transkription mit gewissenhafter Beachtung der Anweisungen vorbereiten und ausführen.
Fehler in der Amplifikationsphase.	Siehe Hinweise im Abschnitt: "Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der positiven Kontrollreaktion nicht vorhanden".

**ERKLÄRUNG DER SYMBOLE**



Katalognummer.



Oberer Temperaturgrenzwert.



Chargencode



Zu verwenden bis (letzter Tag des Monats).



*In-vitro*-Diagnostikum.



Entspricht den Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98\79\EG über *In-vitro*-Diagnostika.



Inhalt ausreichend für "N" Tests.



Achtung, lesen Sie die Gebrauchsanleitung.



Hersteller.

Der Kauf des Produktes berechtigt den Käufer zur Amplifikation von Nukleinsäure-Sequenzen im Rahmen der *In-vitro*-Humandiagnostik. Dieses Recht wird nur dann gewährt, wenn dieses Erzeugnis zusammen mit den lizenzierten Produkten für "Positive Control" und Nachweis von ELITechGroup S.p.A. verwendet wird. Mit dem Kauf wird kein allgemeines Patent oder eine andere Lizenz als dieses spezifische Nutzungsrecht übertragen