



# Mentype® AMLplex<sup>QS</sup>

## Manuál

Bio **type**®  
Diagnostic GmbH

Novinka v detekci chromozomálních aberací spojených s akutní myeloidní leukémií

In-Vitro-Diagnostics



25  
100  
400



AMLGA<sub>v3cz</sub>



45-31220-0xxx\*



Batch Code



Biotype Diagnostic GmbH  
Moritzburger Weg 67  
D-01109 Dresden  
Germany

\*xxx definuje velikost balení

Vyrobeno v Německu

Biotype Diagnostic GmbH vyvíjí, vyrábí a prodává vlastní detekční kity Mentype® založené na metodě PCR. Naše produkty umožňují zákazníkům rychlou a spolehlivou metodu testování pro profesionální medicínskou diagnostiku.

Naše testovací kity Mentype® garantují nejvyšší standard kvality pro klinický výzkum a diagnostiku.

Pro veškeré informace a dotazy k Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification kitu nás, prosím, kontaktujte nebo navštivte [www.biotype.de/en/home.html](http://www.biotype.de/en/home.html)

## Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup> PCR amplifikační kit

### Popis produktu

Zjišťování specifických chromozomálních aberací má vysokou prognostickou hodnotu téměř pro všechny typy akutních leukémií. Molekulárně biologický průkaz chromozomálních aberací (translokací) představuje významnou součást diagnostiky leukémií. Detekce specifických translokací umožňuje subtypovou-klasifikaci leukemických onemocnění a poskytuje základní informaci o rizicích v režimu léčby pacientů.

Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup> umožňuje detekci nejčastějších chromozomálních aberací pozorovaných u akutní myeloidní leukémie (AML) a představuje jednoduchý, rutinní a spolehlivý screeningový test.

Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup> obsahuje optimalizované reagentie pro detekci s vysokým rozlišením u jedenácti transkriptů fúzních genů (AML1-ETO, BCR-ABL, CALM-AF10, CBFβ-MYH11, DEK-CAN, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-ELL, MLL-PTD, NPM1-MLF1 a PML-RARA) a 34 transkriptů jejich variant (Tabulka 1).

Test se provádí fragmentační analýzou pomocí kapilární gelové elektroforézy. Jeden primer pro každý transkript je fluorescenčně značen 6-FAM, BTG, BTY.

Kit obsahuje interní PCR-kontrolu (Quality Sensor "QS-Control") a cDNA kontrolu ("ABL-Control"), které poskytují užitečné informace o účinnosti PCR reakce, kvalitě použité cDNA matrice, a přítomnosti inhibitorů PCR.

Kit Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup> byl ověřena a zhodnocen s přístroji GeneAmp® 9700 Silver Termocykler, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometrs T1, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer s polymerem POP4® a ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer s polymerem POP4™ a POP7™. Vývoj, výroba a distribuce Biotype® výrobků je certifikován podle DIN EN ISO 13485.

## 1. Popis kitu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup>

Tabulka 1. Detekované chromosomální aberace a varianty

<b>Fúzní gen</b>	<b>Chromosomální aberace</b>	<b>Varianta</b>
AML1-ETO	t(8;21) (q22; q22)	-
BCR-ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3
CALM-AF10	t(10;11) (p13;q14)	AF10_240-CALM_1987 AF10_240-CALM_2092
CBFB-MYH11	inv(16) (p13;q22)	Type A Type B Type C Type D Type E Type F Type G Type H Type I Type J
DEK-CAN	t(6;9) (p23;q34)	-
MLL-AF6	t(6;11) (q27;q23)	-
MLL-AF9	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)
MLL-ELL	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3
MLL-PTD	Parciální tandemová duplikace	e9e3 e10e3 e11e3
NPM1-MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	-
PML-RARA	t(15;17) (q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)

Tabulka 2. Kontrolní reakce v kitu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup>

<b>Kontrola</b>	<b>Funkce</b>
Interní PCR-kontrola (QS-Control)	Kontroluje kvalitu PCR reakce
cDNA-kontrola (ABL-Control)	Kontroluje kvalitu vstupní cDNA matrice

## Složení kitu

Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup> PCR amplifikační kit (100 reakcí)

Nuclease-free water	3,0 ml
Reakcion mix <b>A</b>	500 µl
Primer mix	250 µl
Multi Taq2 DNA polymerase	40 µl
Control cDNA KASUMI-1 (500 ng/µl)	10 µl
DNA Size standard 550 (BTO)	50 µl
Allelic ladder	25 µl

## Objednací údaje

Mentype® <b>AMLplex</b> <sup>QS</sup>	25 reakcí	kat. číslo: 45-31220-0025
Mentype® <b>AMLplex</b> <sup>QS</sup>	100 reakcí	kat. číslo: 45-31220-0100
Mentype® <b>AMLplex</b> <sup>QS</sup>	400 reakcí	kat. číslo: 45-31220-0400

## Skladování

Skladuje všechny komponenty při -20°C, zabraňte opakovanému rozmrazování a zmrazování. Primer mix a allelic ladder musí být chráněny před světlem. Vzorky DNA a post-PCR reagentie (allelic ladder a DNA size standard) mohou být skladovány odděleně od PCR reagentií. Expirace je uvedena na obalu kitu.

## Navíc požadované reagentie

Reagentie, které jsou nutné pro použití kitu, ale nejsou jeho součástí.

Reagentie	Dodavatel	Kat. číslo
Hi-Di™ Formamide, 25 ml	Life Technologies Corporation	4311320
Matrix Standards BT5 pro kalibraci single-capillary genetického analyzátoru ABI 310 (5x25 µl)	BioType Diagnostic GmbH	00-10411-0025
Matrix Standards BT5 pro kalibraci multi-capillary genetických analyzátorů ABI 3130 (25 µl)	BioType Diagnostic GmbH	00-10421-0025
Matrix Standards BT5 pro kalibraci multi-capillary genetických analyzátorů ABI 3130 (50 µl)	BioType Diagnostic GmbH	00-10421-0050

## Varování a bezpečnostní pokyny

PCR amplifikační kit obsahuje následující potenciálně rizikové chemikálie:

Složka kitu	Chemikálie	Riziko
Reaction mix	Sodium azide NaN <sub>3</sub>	toxický při požití, produkuje toxické plyny při kontaktu s kyselinami.

Vyžádejte si Material Safety Data Sheets (MSDS) pro všechny produkty BioType®.

Kontaktujte, prosím, výrobce nebo dodavatele pro MSDS všech ostatních reagentií.

### Kontrola kvality

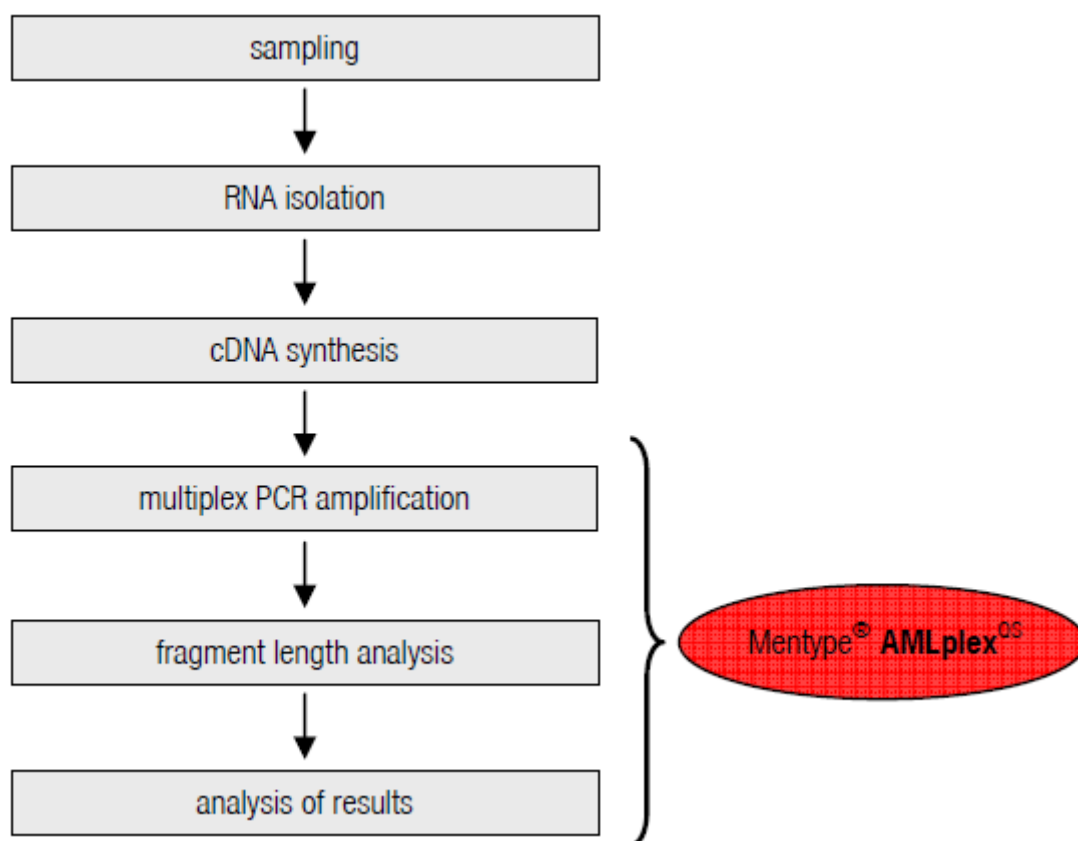
Všechny součásti kitu jsou v Biotype Diagnostic GmbH pod přísnou kontrolou kvality. Kvalita testovacích souprav je trvale sledována, aby byla zajištěna neomezená použitelnost. Prosím kontaktujte nás, pokud máte jakékoliv dotazy týkající se kontroly kvality.

### Ochranné známky a patenty

Mentype® je registrovanou ochrannou známkou společnosti Biotype Diagnostic GmbH. ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® a Applied Biosystems® jsou registrované ochranné známky společnosti Applied Biosystems LLC.

Podle evropského práva je POP-4® registrovanou obchodní známkou společnosti Life Technologies Corporation v USA.

PCR je patentována. Patenty vlastní Hoffmann-La Roche Inc. A F. Hoffmann-La Roche (Roche).



Obrázek 1: Od vzorku k analýze – detekce transkriptů fúzních genů pomocí Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR amplifikačního kitu.

## Protokoly pro amplifikaci, elektroforézu a analýzu

### 2. PCR amplifikace

#### 2.1. Příprava master mixu

Níže uvedená tabulka ukazuje objemy reagensů na 1,0 µl objemu vzorku (cDNA matrice), v celkovém reakčním objemu 25 µl. Počet reakcí, které mají být provedeny se stanoví s přihlédnutím k pozitivní a negativní kontrolní reakce. Doporučujeme přidat jednu nebo dvě reakce navíc pro kompenzaci chyby pipetování.

Všechny reagensie zvortexujte a krátce centrifugujte (cca 10 s) před pipetováním master mixu.

Reagensie	Objem na jednu reakci
Nuclease-free water	16,1 µl
Reaction mix A*	5,0 µl
Primer mix	2,5 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µl)	0,4 µl
<hr/>	<hr/>
CELKEM master mix	24,0 µl

\*obsahuje Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, BSA

Vzhledem k tomu, že analýza kitem Mentype<sup>®</sup> AMLplexQS je většinou závislá na kvalitě a množství použité cDNA, doporučujeme standardizované a již validované metody pro odběr vzorků, izolaci RNA a RNA >cDNA transkripce, např. z publikace Evropa proti rakovině programu (EAC, viz reference 33).

Množství cDNA použité při testu, závisí na koncentraci a kvalitě izolované a použité RNA. U referenčních vzorků získaných z buněčné kultury stačí použít 1 ul cDNA, pokud bylo množství přepisované RNA 1 µg. RT-PCR reakční objem by měl být 20 µl. Množství použité cDNA může být zvýšeno v případě kritických klinických vzorků. Maximální objem. Konečný reakční objem 25 ul doplňte Nuclease free vodou.

Konečný reakční objem 25 ul doplňte Nuclease free vodou.

Primer mix je optimalizován tak, že dostatečně vysoké píky dostaneme po 25 PCR cyklech. Pík ABL-Control nesmí překročit stanovené měřicí rozsah použitého přístroje ABI 310, 3130 aj.

#### Pozitivní kontrola

Naředte kontrolní cDNA KASUMI-1 na 250 ng/µl v dostatečném objemu. Do jednoho PCR master mixu napipetujte místo vzorku cDNA naředěnou pozitivní kontrolu.

#### Negativní kontrola

Použijte Nuclease-free vodu jako negativní kontrolu. Do jednoho PCR master mixu napipetujte místo vzorku cDNA Nuclease-free vodu.

### Vzorek cDNA

Někdy se naměřená hodnota koncentrace cDNA mění v závislosti na metodě kvantifikace. V tomto okamžiku může být nutné upravit optimální cDNA množství.

## 2.2. Parametry PCR amplifikace

Provedte "hot start" PCR s cílem aktivovat Multi Taq2 DNA polymerázu, což zabrání vzniku nespecifických produktů amplifikace.

Počet PCR cyklů závisí na množství aplikovaného cDNA. 25 PCR cyklů je počet opakování pro všechny vzorky. Pro vysoce koncentrované referenční vzorky z buněčných kultury je vhodné snížení na 22 PCR. V případě kritických vzorků, je doporučeno zvýšit počet cyklů PCR na maximálně 28 cyklů. **Vnitřní ABL-Control** může sloužit jako orientační bod pro vyhodnocení optimálního počtu požadovaných cyklů PCR. Optimální velikost píku vnitřní ABL-kontroly by neměla překročit stanovený měřicí rozsah použitého přístroje (např. 500 až 5000 RFU u ABI3130).

Velmi malé množství cDNA může vést k výpadkům a statistickým odchylkám píků. Stále se zvyšující počet cyklů PCR zvyšuje riziko křížové kontaminace způsobené i minimálním množstvím nečistot. Následně se mohou vyjímečně objevit nespecifické amplifikační produkty.

Poznámka: Pro zajištění optimální rovnováhy kitu nastavte ramping thermos cycleru na 4°C/s.

### Standardní postup

Doporučeno pro většinu vzorků cDNA

Teplota	Čas	Počet cyklů
96°C	4 min (hot start pro aktivaci polymerázy)	1
96°C	30 s	
<b>61°C</b>	<b>120 s</b>	<b>25 cyklů</b>
72°C	75 s	
68°C	10 min*	1
10°C	∞	hold

### Volitelný postup



Doporučeno pro pro cDNA pozitivních kontrol z buněčných kultur

Teplota	Čas	Počet cyklů
96°C	4 min (hot start pro aktivaci polymerázy)	1
96°C	30 s	
<b>61°C</b>	<b>120 s</b>	<b>22 cyklů</b>
72°C	75 s	
68°C	10 min*	1
10°C	∞	hold

### Volitelný postup

Doporučeno pro pro kritické cDNA

Teplota	Čas	Počet cyklů
96°C	4 min (hot start pro aktivaci polymerázy)	1
96°C	30 s	
<b>61°C</b>	<b>120 s</b>	<b>28 cyklů</b>
72°C	75 s	
68°C	10 min*	1
10°C	∞	hold

\*pokud se vyskytuje mnoho minus-Adenine píků, lze extenzi protáhnout na 60 minut.

## 3. Elektroforéza na ABI PRISM® 310 Genetický analyzátor

Pro základní instrukce k použití přístroje, vytvoření matrice a vyhodnocení pomocí softwaru GeneScan nebo GeneMapper® ID, použijte příslušné manuály od výrobce. Elektroforéza pomocí softwaru GeneMapper ID-X je popsána níže.

Pro kombinované použití pěti fluorescenčních barev 6-FAM, BTG, BTY, BTR, a BTO lze použít virtuální sadu filtrů. Standardní matice se bude jmenovat BT5.

### Materiál

Kapilára	47 cm/ 50µm (green)
Polymer	POP-4® pro 310 Genetic Analyzer
Pufr	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

### 3.1. Vytvoření matrice

Před použitím kitu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> je nutné vytvořit v přístroji Genetic Analyzer matrici s pěti fluorescenčními barvami 6-FAM, BTG, BTY, BTR a BTO jako filtr G5.

Barva	Matrix standard
Blue (B)	6-FAM
Green (G)	BTG
Yellow (Y)	BTY
Red (R)	BTR
Orange (O)	BTO

Je nutné provést pět elektroforéz, jednu pro každou fluorescenční značku 6-FAM, BTG, BTY, BTR, a BTO, s použitím stejných podmínek matic a souborů vzorků a alelických žebříků.

<b>Matrix-vzorek</b>	<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
Vzorek 1	Hi-Di™ Formamide Matrix standard <b>6-FAM</b>	12,0 µl 1,0 µl
Vzorek 2	Hi-Di™ Formamide Matrix standard <b>BTG</b>	12,0 µl 1,0 µl
Vzorek 3	Hi-Di™ Formamide Matrix standard <b>BTY</b>	12,0 µl 1,0 µl
Vzorek 4	Hi-Di™ Formamide Matrix standard <b>BTR</b>	12,0 µl 1,0 µl
Vzorek 5	Hi-Di™ Formamide Matrix standard <b>BTO</b>	12,0 µl 1,0 µl

Denaturujte při 95°C 3 minuty.

Zchladte na 4°C a vložte do přístroje Genetic Analyzer.

Vytvořte **Sample Sheet**, vyberte **5Dyes** a vložte popis vzorků.

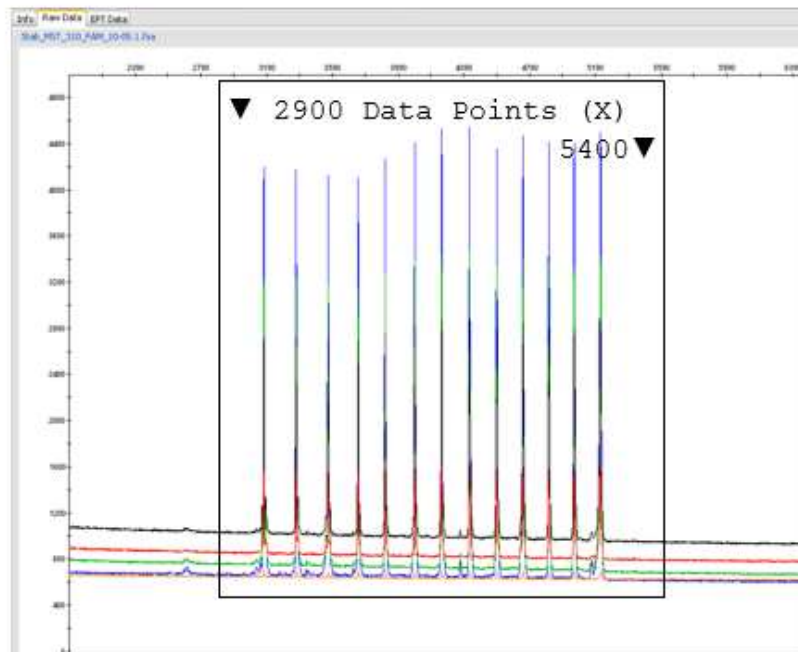
<b>Parametr</b>	<b>Nastavení</b>
Module File	GS STR POP-4 (1 ml) <b>G5</b>
Matrix File	<b>NONE</b>
Size Standard*	<b>NONE</b>
Injection [s]	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run [min]	24

\*Připravte matrix standard vždy **bez DNA Size Standardu (BTO)**.

#### **Analýza matrix vzorků**

- Spusťte software GeneScan
- **File → New → Project** (otevřete složku s výsledky) → **Add Sample Files**
- Vyberte matrix vzorek v sloupci **Sample File**
- **Sample → Raw Data**

- Zkontrolujte, že je baseline rovná. Jak je vidět na obrázku níže, matrice by měla mít pět vrcholů o výškách cca 1000 – 4000 RFU (Y osa) pro každou barvu (matrix sample). Optimální rozsah je 2000 – 4000 RFU.



Obrázek 1. Elektroferogram s raw daty matrix standardu 6-FAM.

- Vyberte rozsah analýzy s plochou baseline a nastříkněte matrix znovu, pokud je to nutné.
- Vyznačte začátek a konce (data points) vybraného rozsahu analýzy, např. začátek (start value) 2900 a konec (end value) 5400.
- Vypočítejte rozdíl, např.  $5400 - 2900 = 2500$  data points.

#### Vytvoření nové matrice

- **Tools → GeneMapper Manager → Matrices → New**
- **Vytvořete název matrice, např. Matrix BT5**
- **Nainportujte vzorky marice pro všechny byrvy (B, G, Y, R, O) (Klikněte na symbol)**



Obrázek 2. Výběr matrice

- Vložte **Start At** hodnotu, např. 2900.
- Vložte vypočítaný rozdíl v **Points**, např. 2500.



Obrázek 3 Nová matrice BT5

- Potvrďte **OK** k výpočtu nové matrice.
- Uložte matrice v matrix složce: **File** → **Save as**, např. Matrix BT5.

### Kontrola Matrice

Zkontrolujte novou matici pomocí následujících vzorků.

- **File → New → Project** (otevřete složku příslušných vzorků) → **Add Sample Files**.
- Vyberte vzorek/vzorky v sloupci **Sample File**.
- **Sample → Install New Matrix** (otevřete složku s maticí a vyberte novou maticí).
- Re-analyzujte vaše vzorky.

Nemělo by docházet k tvorbě pull-up píků mezi barvami (B, G, Y, R, O) u nové matrice.

### 3.2. Příprava vzorků

Reagencie	Objem
Hi-Di™ Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

Připravte 12 µl mixu (formamide + DNA size standard) pro všechny vzorky, přidejte 1 µl PCR produktu (naředte, pokud je to třeba) nebo alelického ladderu

- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Laboratorní teplota může ovlivnit kvalitu analýzy PCR produktů v přístroji. Při příliš nízké teplotě může dojít ke sploštění píků nebo k rozštěpení píků. Dejte pozor, aby okolní podmínky odpovídaly doporučení výrobce pro použitý přístroj. Optimální podmínky uvedené výrobcem jsou >22 °C.

### Intenzity signálů

#### Možnosti zvýšení intenzity signálu:

- Snižte objem DNA Size Standardu 550 (BTO) tak, aby výška píků byla 500 RFU.
- Přečistěte PCR produkty před analýzou.

### 3.3. Nastavení softwaru Data Collection

- Vytvořte **Sample Sheet** s umístěním vzorků

Parametr	Nastavení
Module File	GS STR POP-4 (1 ml) <b>G5</b>
Matrix File	např. Matrix BT5
Size Standard	např. SST-BTO_60-550bp
Injection [s]*	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run [min]**	28

\* Odchýlení od standardního nastavení je možné. Injection time může být v rozmezí 1 až 20 sekund v závislosti na typu vzorku. U referenčních vzorků s velmi vysokou intenzitou signálu může být injection time zkrácen, aby se zabránilo pull-up píkům. U vzorků s nízkým obsahem cDNA nebo u kritických vzorků pacienta lze injection time prodloužit až na 20 s.

\*\* V závislosti na podmínkách analýzy může být run time kitu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> upraven tak, aby bylo možné analyzovat fragmenty o délce až 550 bp.

### 3.4. Parametry analýzy / metoda analýzy

Doporučené parametry analýzy

Analysis Range	Full range
Data Processing	Baseline: Checked Multicomponent: Checked Smooth Options: Light
Peak Detection	Peak Amplitude Treshold B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 15 pts**
Size Call Range	Min: 60 Max: 550
Size Calling Method	Local Southern Method
Split Peak Correction	None

\* Peak amplitude treshold (cut-off value) odpovídá minimální výšce píku, které budou detekovány softwarem GeneScan nebo GeneMapper® ID. Pro Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> 200 RFU je doporučeno, nebo by měla být stanovena individuálně v laboratoři.

Doporučení: minimální výška píku by měla být 3x vyšší než pozadí baseline.

\*\*Pokud je to nutné, Peak Window Size může minimalizován na 11 pts pro zlepšení detekce píků.

## 4. Elektroforéza na ABI PRISM® 310 Genetický analyzátor

Pro základní instrukce k použití přístroje, vytvoření matrice a vyhodnocení pomocí softwaru Data Collection nebo GeneScan ID, použijte příslušné manuály od výrobce. Tato záložka popisuje použití ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer v kombinaci se softwarem Data Collection verze 1.0.1 a 1.1. Pro systémy se softwarem Data Collection verze 2.0 a 3.0 přejděte k bodu 6.

Systém se 4 kapilárami se jmenuje ABI 3100-Avant a systém s 16 kapilárami se jmenuje ABI 3100.

Pro kombinované použití pěti fluorescenčních barev 6-FAM, BTG, BTY, BTR, a BT0 lze použít virtuální sadu filtrů. Standardní matice se bude jmenovat BT5.

## Materiál

Kapilára\* 36 cm Capillary Array for 3100-Avant/3100

Polymer\* POP-4® pro 3100

Pufr 10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

\*jiná nastavení jsou možná

### 5.1 Spektrální kalibrace / vytvoření matrice

Správná spektrální kalibrace je důležitá pro vyhodnocení vícebarevného systému s ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer a provádí se před provedením fragmentační analýzy. Kalibrační postup vytvoří matici, která se používá pro správné překrytí emise fluorescence spekter barviv.

Spektrální kalibrace zahrnuje následující kroky:

- Připravte a kalibračních spektrálních standardů.
- Naneste standard do 96-jamkové destičky (jeden vzorek na kapiláru).
- Vložte desku do přístroje.
- Proveďte spektrální kalibraci a zkontrolujte matici.

#### Příprava standardu spektrální kalibrace

Příklad pro 4 kapiláry / ABI 3100-Avant

Reagencie	Objem
Hi-Di™ Formamide	60,0 µl
Matrix standard <b>BT5</b>	5,0 µl

- Nadávkujte 12 µl mixu do 96-well destičky, např. do pozic **A1-D1**.
- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Příklad pro 16 kapilár / ABI 3100

Reagencie	Objem
Hi-Di™ Formamide	204,0 µl
Matrix standard <b>BT5</b>	17,0 µl

- Nadávkujte 12 µl mixu do 96-well destičky, např. do pozic **A1-H1 a A2-H2**.
- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

#### Provedení spektrální kalibrace

Za prvé, je třeba soubor s parametry pro DyeSetG5 změnit, jakmile bylo dosaženo úspěšné kalibrace v softwaru Data Collection verze 1.0.1 nebo 1.1.

#### Spektrální parametry

Chcete-li změnit nastavení v souboru parametrů přejděte na následující stránku:

D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection Support Files\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles

- Vyberte **MtxStd{Genescan\_SetG5}** k otevření PAR-file.
- Změňte **Condition Bounds Range** na [1.0; 20.0].
- Vyberte **File → Save As** k uložení parametrů pod novým jménem, např. MtxStd{Genescan\_SetG5\_BT5}.par

Vždy použijte tuto spektrální kalibraci pomocí standardu BT5.

### Plate Editor pro spektrální kalibraci (I)

Parametr	Nastavení
Sample Name	Vložte jméno matrice
Dye Set	G5
Spectral Run Module	<i>Default</i> (např. Spect36_POP4)
Spectral Parameters	MtxStd{Genescan_SetG5_BT5}.par

- Kliknutím na záhlaví sloupce a vyberte celý sloupec, vyberte **File → Fill Down** na zkopírování informací o vybraných vzorcích a potvrďte tlačítkem **OK**.
- Propojte destičku v autosampleru tak, aby se vytvořilo ID destičky a spusťte run.
- Po dokončení runu zkontrolujte v okně **Spectral Calibration**, že všechny kapiláry byly úspěšně zkalibrovány (label **A**). Pokud jsou jednotlivé kapiláry označené **X**, přejděte do ABI PRISM<sup>®</sup> Genetic analyzátor Uživatelské příručky.
- Klikněte na OK pro potvrzení dokončení runu.

### Kontrola matrice

- Vyberete **Tools → Display Spectral Calibration → Dye Set → G5**, abyste si mohli prohlédnout profil spektrální kalibrace pro každou kapiláru.
- Quality value (**Q value**) musí být větší než 0,95 a condition number (**C value**) musí být mezi 1 a 20. Obě hodnoty být v uvedených rozmezích.
- Zkontrolujte, že matrice mají plochou baseline. Musí zde být pět píků s výškami okolo 1000 – 5000 RFU (Y osa) v každém vzorku matrice. Optimální rozmezí je 2000 – 4000 RFU.
- Zkontrolujte novou matici pomocí vzorků. Nesmí se vyskytovat **žádné** pull-up píky mezi barvami (B, G, Y, R, O).
- Pokud kalibrace není úspěšná, zkuste vzorky matrice znovu nastříknout s vyšším Injection time, nebo Injection voltage změněným v Spectral Run Module. Vzorky matrice lze nastříknout až 3x. Případně použijte více matrix standardu pro spektrální kalibraci.



- Pokud všechny kapiláry projdou kalibrací úspěšně, vyberte vždy poslední kalibraci. Aktivace **Dye Set G5** je možné udělat manuálně přes **Tools → Set Active Spectral Calibration**. Přejmenujte kalibrační file pomocí **Set Matrix Name** (např. BT5\_Date of calibration).

## 5.2. Příprava vzorků

Reagencie	Objem
Hi-Di™ Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

Připravte 12 µl mixu (formamide + DNA size standard) pro všechny vzorky, přidejte 1 µl PCR produktu (naředte, pokud je to třeba) nebo alelického ladderu

- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Vzhledem k tomu, že analýza bude probíhat současně na všech kapilárách, je třeba 4 nebo 16 vzorků napipetovaných do destičky multi-kapilárních analyzátorů. Je-li analyzováno méně vzorků prázdné pozice musí být naplněny 12 ul Hi-Di™ Formamide. Spusťte několik alelických ladderů pro zajištění spolehlivých výsledků na multi-kapilárním analyzátoru.

Teplota místnosti může ovlivnit analýzu PCR produktů na multi-kapilárním přístroji. Nízká teplota způsobí, že píky se zakulatí nebo se rozdělí vrcholy píků. Věnujte pozornost tomu, aby okolní podmínky byly v souladu s doporučením výrobce přístroje. Optimální výsledky jsou dosahovány při teplotě místnosti > 22 ° C.

## Intenzity signálů

### Možnosti zvýšení intenzity signálu:

- Snižte objem DNA Size Standardu 550 (BTO) tak, aby výška píků byla 500 RFU.
- Přečištěte PCR produkty před analýzou.

## 5.3. Nastavení softwaru Data Collection

Upravte defaultní run modul pro **Dye Set G5** jednou před prvním runem.

- Vyberte **Modul Editor** a otevřete okno.
- Vyberte příslušný **Run Module** dle následující **GeneScan** tabulky.
- Upravte **Injection Voltage** na 3 kV a **Injection Time** na 10 s.

### Run Module 3kV\_10s\_550bp

Parametr	Nastavení
Run Temperature [°C]	Default
Cap Fill Volume	Default
Maximum Current [A]	Default
Current Tolerance [A]	Default
Run Current [A]	Default

Voltage Tolerance [kV]	Default
Pre Run Voltage [kV]	Default
Pre Run Time [s]	Default
Injection Voltage [kV]	<b>3.0</b>
Injection Time [s]*	<b>10</b>
Run Voltage[kV]	Default
Number of Steps	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time [s]	Default
Run Time [min]**	<b>26</b>

\* Odchýlení od standardního nastavení je možné. Injection time může být v rozmezí 1 až 20 sekund v závislosti na typu vzorku. U referenčních vzorků s velmi vysokou intenzitou signálu může být injection time zkrácen, aby se zabránilo pull-up píkům. U vzorků s nízkým obsahem cDNA nebo u kritických vzorků pacienta lze injection time prodloužit až na 20 s.

\*\* V závislosti na podmínkách analýzy může být run time kitu Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** upraven tak, aby bylo možné analyzovat fragmenty o délce až 550 bp.

- Klikněte na **Save As**, vložte jméno nového modulu (např. 3kV\_10s\_550bp) a potvrďte **OK**.
- Klikněte na **Close** pro opuštění **Run Module Editor**.

### Spuštění runu

- Vložte připravenou 96-well destičku do autosampleru.
- Spusťte ABI PRISM® 3100 Data Collection software.
- V okně **Plate View** klikněte na **New** a otevře se okno Plate Editor.
- Vložte název destičky.
- Vyberte **GeneScan**.
- Vyberte plate type **96-well** a potvrďte **Finish**.

### Plate Editor

Parametr	Nastavení
Sample Name	Vložte jména vzorků
Dyes	0
Color Info	Alelický ladder nebo vzorek
Project Name	např. 3100_Project1
Dye Set	G5
Run Module*	3kV_10s_550bp
Analysis Module 1	DefaultAnalysis.gsp

\*parametry uvedené shora.

- Vyplňte tabulku v okně **Plate Editor** a potvrďte **OK**.
- Kliknutím na záhlaví sloupce a vyberte celý sloupec, vyberte **File → Fill Down** na zkopírování informací o vybraných vzorcích a potvrďte tlačítkem **OK**.
- Propojte destičku v autosampleru tak, aby se vytvořilo ID destičky a spusťte run.

- Po dokončení běhu, zobrazíte data jako **Color Data v Array View** v softwaru 3100 Data Collection nebo v **Analysed Sample Files**, zde:  
D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns

#### 5.4. Parametry analýzy / metoda analýzy

Doporučené parametry analýzy:

Analysis Range	Full range
Data Processing	Baseline: Checked Multicomponent: Checked Smooth Options: Light
Peak Detection	Peak Amplitude Treshold B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 15 pts**
Size Call Range	Min: 60 Max: 550
Size Calling Method	Local Southern Method
Split Peak Correction	None

\* Peak amplitude treshold (cut-off value) odpovídá minimální výšce píku, které budou detekovány softwarem GeneScan nebo GeneMapper® ID. Pro Mentype® AMLplexQS 200 RFU je doporučeno, nebo by měla být stanovena individuálně v laboratoři.

Doporučení: minimální výška píku by měla být 3x vyšší než pozadí baseline.

\*\*Pokud je to nutné, Peak Window Size může minimalizován na 11 pts pro zlepšení detekce píků.

### 5. Elektroforéza na ABI PRISM® 3130/3130xl Genetický analyzátor

Pro základní instrukce k použití přístroje, spektrální kalibrace nebo použití softwaru ABI PRISM® Data Collection verze 3.0 a GeneMapper® ID/ID-X použijte příslušné manuály od výrobce.

System se 4 kapilárami se jmenuje ABI 3130 a systém s 16 kapilárami se jmenuje ABI 3130xl.

Pro kombinované použití pěti fluorescenčních barev 6-FAM, BTG, BTY, BTR, a BT0 lze použít virtuální sadu filtrů **Any5Dye**. Standardní matice se bude jmenovat BT5.

#### Materiál

Kapilára*	36 cm Capillary Array for 3130/3130xl
Polymer*	POP-4® pro 3130
Pufr	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

\*jiná nastavení jsou možná

### 5.1. Spektrální kalibrace / vytvoření matrice

Správná spektrální kalibrace je důležitá pro vyhodnocení vícebarevného systému s ABI PRISM<sup>®</sup> 3130/3130xl Genetic Analyzer a provádí se před provedením fragmentační analýzy. Kalibrační postup vytvoří matici, která se používá pro správné překrytí emise fluorescence spekter barviv.

Spektrální kalibrace zahrnuje následující kroky:

- Připravte a kalibračních spektrálních standardů.
- Naneste standard do 96-jamkové destičky (jeden vzorek na kapiláru).
- Vytvořte protokol pro spektrální kalibraci (Protocol Manager)
- Definujte destičku v Plate Editor (Plate Maneger)
- Provedte spektrální kalibraci a zkontrolujte matici.

#### Příprava standardu spektrální kalibrace

Příklad pro 4 kapiláry / ABI 3130

Reagencie	Objem
Hi-Di <sup>™</sup> Formamide	60,0 µl
Matrix standard <b>BT5</b>	5,0 µl

- Nadávkujte 12 µl mixu do 96-well destičky, např. do pozic **A1-D1**.
- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Příklad pro 16 kapilár / ABI 3130xl

Reagencie	Objem
Hi-Di <sup>™</sup> Formamide	204,0 µl
Matrix standard <b>BT5</b>	17,0 µl

- Nadávkujte 12 µl mixu do 96-well destičky, např. do pozic **A1-H1 a A2-H2**.
- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

#### Provedení spektrální kalibrace

- Vložte 96-well destičku do autosampleru.
- V **Protocol Manager** klikněte na **New** v **Instrument Protocol** a otevře se Vám okno **Protocol Editor**.

#### Instrument Protocol pro spektrální kalibraci

<b>Protocol Editor</b>	<b>Nastavení</b>
Name	User (např. Spectral36_POP4_BT5)
Type	SPECTRAL
DyeSet	<b>Any5Dye</b>
Polymer*	User (např. POP4)
Array Length*	User (např. 36cm)
Chemistry	Matrix standard
Run Module*	Default (např. Spect36_POP4_1)

\* Závisí na typu polymeru a délce kapiláry, kterou používáte.

- Klikněte na **OK** pro opuštění okna **Protocol Editor**.
- V **Plate Manager** v softwaru Data Collection, klikněte na **New**, čímž otevřete okno **New Plate Dialog**.

### Plate Editor pro spektrální kalibraci (I)

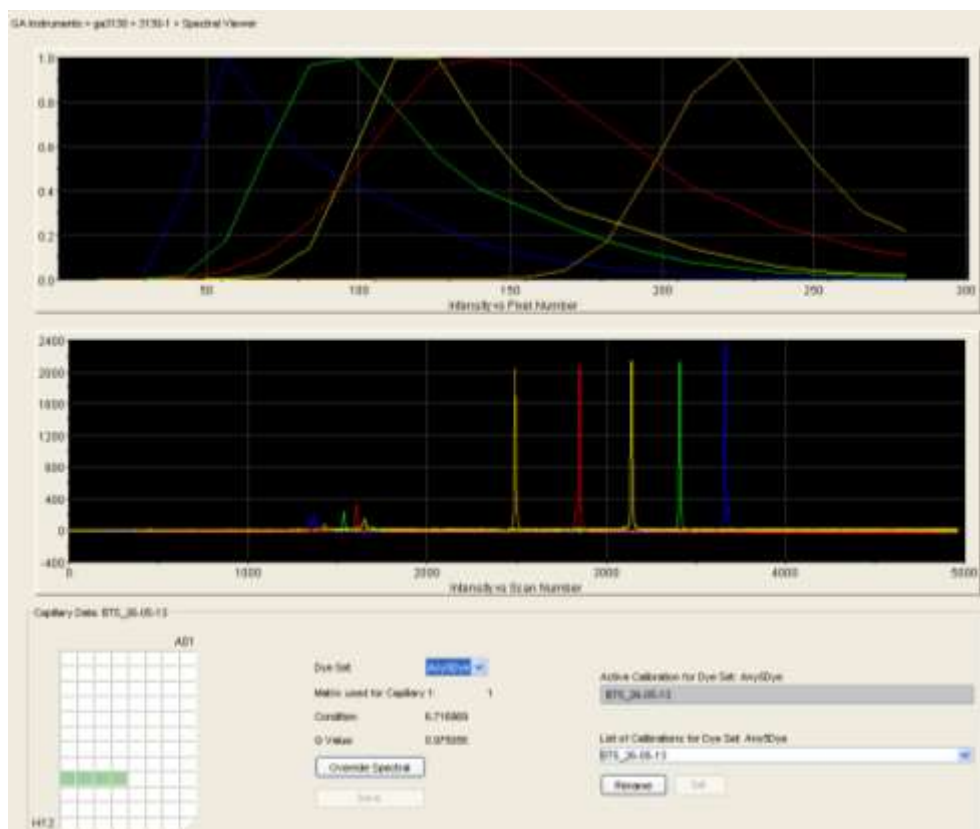
<b>Parametr</b>	<b>Nastavení</b>
Name	Vložte jméno matrice (např. Spectral_BT5_date)
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-well
Owner Name/Operator Name	...

- Klikněte na **OK**. Nové okno-tabulka v **Plate Editor** se otevře automaticky.

### Plate Editor pro spektrální kalibraci (II)

<b>Parametr</b>	<b>Nastavení</b>
Sample Name	Vložte jméno matrice
Priority	např. 100
Instrument protocol 1	Spectral36_POP4_BT5 (nastavení je popsáno výše)

- Kliknutím na záhlaví sloupce a vyberte celý sloupec, vyberte **File → Fill Down** na zkopírování informací o vybraných vzorcích a potvrďte tlačítkem **OK**.
- V **Run Scheduler** klikněte na **Find All**, vyberte **Link**, čímž označíte destičku v autosampleru jako nový záznam (pozice A nebo B a spusťte analýzu).



Obrázek 5. Elektroferogram se spektrální kalibrací s matricí BT5 na ABI 3130

### Kontrola matrice

- Quality value (**Q value**) musí být větší než 0,95 a condition number (**C value**) musí být mezi 1 a 20.
- Zkontrolujte, že matrice mají plochou baseline. Musí zde být pět píků s výškami okolo 1000 – 5000 RFU (Y osa) v každém vzorku matrice. Optimální rozmezí je 2000 – 4000 RFU.
- Zkontrolujte novou matici pomocí vzorků. Nesmí se vyskytovat **žádné** pull-up píky mezi barvami (B, G, Y, R, O).
- Pokud kalibrace není úspěšná, zkuste vzorky matrice znovu nastříknout s vyšším Injection time, nebo Injection voltage změněným v Spectral Run Module. Vzorky matrice lze nastříknout až 3x. Případně použijte více matrix standardu pro spektrální kalibraci.
- Pokud všechny kapiláry projdou kalibrací úspěšně, je poslední kalibrace pro Dye Set **Any5Dye** v okně **Spectral Viewer** vybrána automaticky. Přejmenujte kalibrační file pomocí tlačítka **Rename** (např. BT5\_Date of calibration).

## 5.2. Příprava vzorků

**Reagencie**

**Objem**

Hi-Di™ Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

Připravte 12 µl mixu (formamide + DNA size standard) pro všechny vzorky, přidejte 1 µl PCR produktu (naředěte, pokud je to třeba) nebo alelického ladderu

- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Vzhledem k tomu, že analýza bude probíhat současně na všech kapilárách, je třeba 4 nebo 16 vzorků napipetovaných do destičky multi-kapilárních analyzátorů. Je-li analyzováno méně vzorků prázdné pozice musí být naplněny 12 ul Hi-Di™ Formamide. Spusťte několik alelických ladderů pro zajištění spolehlivých výsledků na multi-kapilárním analyzátoru.

Teplota místnosti může ovlivnit analýzu PCR produktů na multi-kapilárním přístroji. Nízká teplota způsobí, že píky se zakulatí nebo se rozdělí vrcholy píků. Věnujte pozornost tomu, aby okolní podmínky byly v souladu s doporučením výrobce přístroje. Optimální výsledky jsou dosahovány při teplotě místnosti > 22 ° C.

### Intenzity signálů

#### Možnosti zvýšení intenzity signálu:

- Snižte objem DNA Size Standardu 550 (BTO) tak, aby výška píků byla 500 RFU.
- Přečistěte PCR produkty před analýzou.

### 5.3. Nastavení softwaru Data Collection

Upravte defaultní Run Modul dle následujících tabulek.

- V softwaru Data Collection v **Modul Editor** klikněte na **New** a otevře se okno **Run Module Editor**.

#### Run Module 3kV\_10s\_550bp

Parametr	Nastavení
Run Temperature [°C]	Default
Cap Fill Volume	Default
Maximum Current [A]	Default
Current Tolerance [A]	Default
Run Current [A]	Default
Voltage Tolerance [kV]	Default
Pre Run Voltage [kV]	Default
Pre Run Time [s]	Default
Injection Voltage [kV]	<b>3.0</b>
Injection Time [s]*	<b>10</b>
Run Voltage[kV]	Default
Number of Steps	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time [s]	Default
Run Time [s]**	<b>1560</b>

\* Odchýlení od standardního nastavení je možné. Injection time může být v rozmezí 1 až 20 sekund v závislosti na typu vzorku. U referenčních vzorků s velmi vysokou intenzitou signálu může být injection time zkrácen, aby se zabránilo pull-up píkům. U vzorků s nízkým obsahem cDNA nebo u kritických vzorků pacienta lze injection time prodloužit až na 20 s.

\*\* V závislosti na podmínkách analýzy může být run time kitu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> upraven tak, aby bylo možné analyzovat fragmenty o délce až 550 bp.

- Klikněte na **Save As**, vložte jméno nového modulu (např. 3kV\_10s\_550bp) a potvrďte **OK**.
- Klikněte na **Close** pro opuštění **Run Module Editor**.

### **Spuštění runu**

- Vložte připravenou 96-well destičku do autosampleru.
- V softwaru Data Collection v **protocol Manager** klikněte na **New** v okně **Instrument Protocol** a otevřete okno **Protocol Editor**.

### **Instrument Protocol**

<b>Protocol editor</b>	<b>Nastavení</b>
Name	např. Run36_POP4_BT5_26min
Type	REGULAR
Run Module*	3kV_10s_550bp
Dye Set	<b>Any5Dye</b>

\*Parametry jsou uvedeny výše.

- Potvrďte **OK**, čímž opustíte **Run Module Editor**.

Před každou analýzou je nezbytné vytvořit a definovat destičku (Plate), jak je popsáno zde:

- V softwaru Data Collection v **Plate Manager** klikněte na **New**, čímž otevřete okno **New Plate Dialog**.

### **Plate Editor (I)**

<b>New Plate Dialog</b>	<b>Nastavení</b>
Name	např. Plate_BT5_datum
Application	Vyberte GeneMapper
Plate type	96-well
Owner Name / Operator Name	...

- Klikněte na **OK**. Nové okno **Plate Editor** se automaticky otevře.

### **Plate Editor (II)**

<b>Parametr</b>	<b>Nastavení</b>
Sample Name	Vložte jména vzorků
Priority	např. 100 (default)
Sample Type	Alelický ladder nebo vzorek
Size Standard	např. SST-BTO_60-550bp



Panel	např. AMLplex_Panels_v1
Analysis Method	např. AMLplex_HID_3130_200rfu
Snp Set	-
User-defined 1-3	-
Result Group 1	Vyberte kam chcete data ukládat
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_BT5_26min (popsán výše)

- Kliknutím na záhlaví sloupce a vyberte celý sloupec, vyberte **File → Fill Down** na zkopírování informací o vybraných vzorcích a potvrďte tlačítkem **OK**.
- V **Run Scheduler** klikněte na **Find All**, vyberte **Link**, čímž označíte destičku v autosampleru jako nový záznam (pozice A nebo B a spusťte analýzu).
- Během analýzy je možné sledovat případně chyby jako **Error Status** v **Event Log** nebo lze sledovat raw data pro každou kapiláru v **Capillaries Viewer** nebo v **Cap/Array Viewer**.
- Zobrazit data lze i v **Run History** nebo v **Cap/Array Viewer**. Data jsou uložena ve složce **Run Folder** v dříve vybrané **Result Group**.

#### 5.4. Parametry analýzy / metoda analýzy

Doporučené parametry analýzy:

Peak Detection Algorithm	Advanced
Ranges	Analysis: Full range Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light Baseline Window: 51 pts
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Treshold B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 15 pts** Slope Treshold: 0.0

\* Peak amplitude treshold (cut-off value) odpovídá minimální výšce píku, které budou detekovány softwarem GeneMapper<sup>®</sup> ID. Pro Mentype<sup>®</sup> AMLplexQS 200 RFU je doporučeno, nebo by měla být stanovena individuálně v laboratoři. Doporučení: minimální výška píku by měla být 3x vyšší než pozadí baseline.

\*\*Pokud je to nutné, Peak Window Size může minimalizován na 11 pts pro zlepšení detekce píků.

## 6. Elektroforéza na ABI PRISM<sup>®</sup> 3500/3500xl Genetický analyzátor

Pro základní instrukce k použití přístroje, spektrální kalibrace nebo použití softwaru Applied Biosystems 3500 Series Data Collection verze 3.0 a GeneMapper® ID-X verze 1.4 použijte příslušné manuály od výrobce.

Systém s 8 kapilárami se jmenuje ABI 3500 a systém s 24 kapilárami se jmenuje ABI 3500xl.

Pro kombinované použití pěti fluorescenčních barev 6-FAM, BTG, BTY, BTR, a BTO lze použít virtuální sadu filtrů **Any5Dye**. Standardní matice se bude jmenovat BT5.

#### **Materiál**

Kapilára\* 36 cm Capillary Array for 3500/3500xl

Polymer\* POP-4™ polymer pro 3500/3500xl

Pufr 10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA for 3500/3500xl

\*jiná nastavení jsou možná

### **6.1. Spektrální kalibrace / vytvoření matrice**

Správná spektrální kalibrace je důležitá pro vyhodnocení vícebarevného systému s ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer a provádí se před provedením fragmentační analýzy. Kalibrační postup vytvoří matici, která se používá pro správné překrytí emise fluorescence spekter barviv.

Spektrální kalibrace zahrnuje následující kroky:

- Připravte a kalibračních spektrálních standardů.
- Naneste standard do 96-jamkové destičky (jeden vzorek na kapiláru).
- Připravte přístroj a vytvořte Dye Set BT5
- Proveďte spektrální kalibraci a zkontrolujte matici.

#### **Příprava standardu spektrální kalibrace**

Příklad pro 8 kapilár / ABI 3500

<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
Hi-Di™ Formamide	108,0 µl
Matrix standard <b>BT5</b>	9,0 µl

- Nadávkujte 12 µl mixu do 96-well destičky, např. do pozic **A1-H1**.
- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Příklad pro 24 kapilár / ABI 3500xl

<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
Hi-Di™ Formamide	300,0 µl

Matrix standard **BT5** 25,0 µl

- Nadávkujte 12 µl mixu do 96-well destičky, např. do pozic **A1-H1, A2-H2 a A3-H3**.\*
- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

\*Pokud používáte 384 well destičku, dávkujte 10 µl směsi do pozic 1, 3 a 5 v řadách A, C, E, G, I, K, M a O.

**Provedení spektrální kalibrace**

- Vložte 96-well destičku do autosampleru.
- Poté připravte přístroj a specifické nastavení spektrální kalibrace.

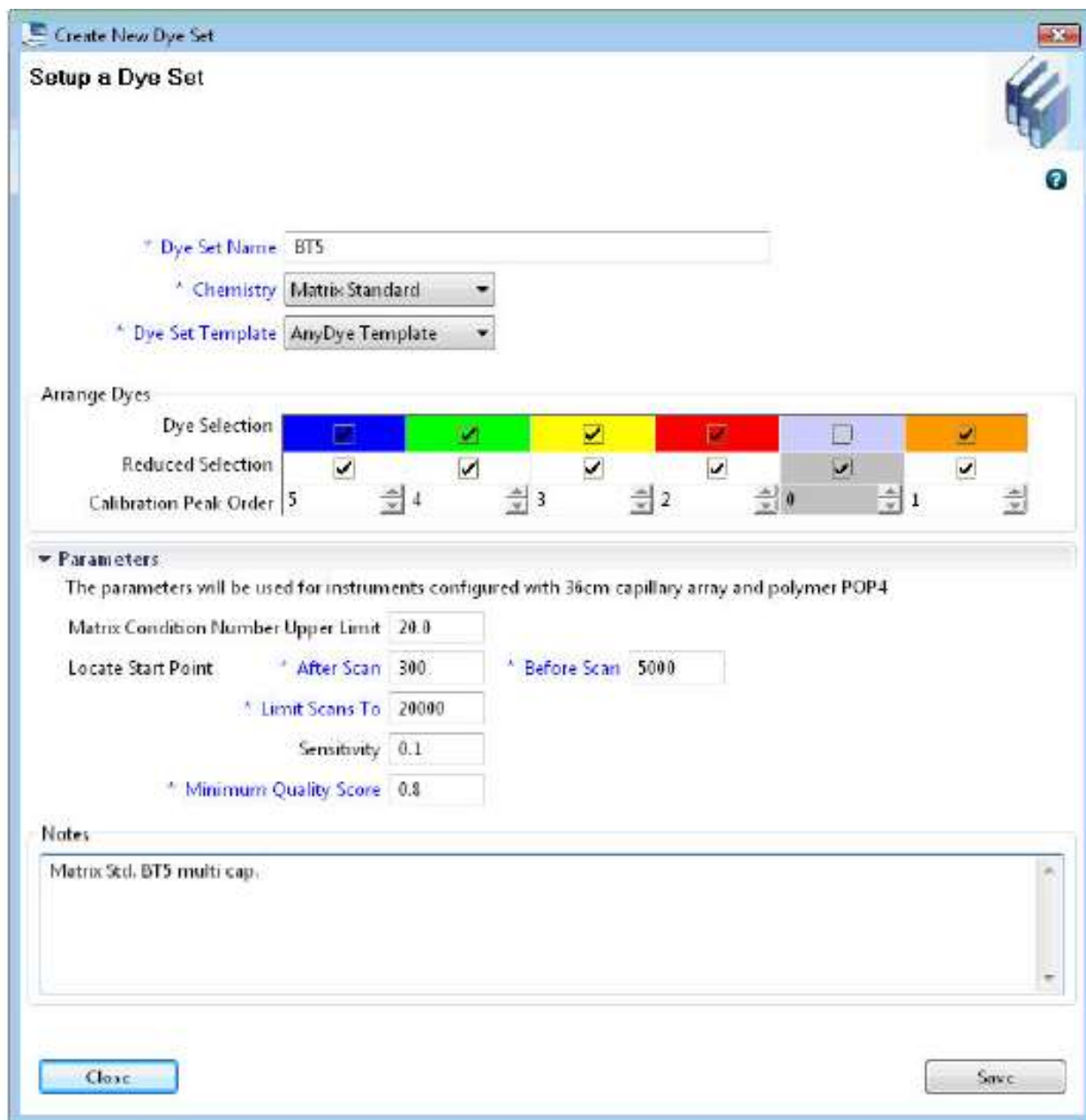
**Příprava přístroje**

Před zahájením spektrální kalibrace se přesvědčte, že byly provedeny prostorové kalibrace. Tento proces je nezbytný, pokud byla nainstalována nová kapilára, tak jak je podrobně popsáno v manuálu Applied Biosystems 3500/3500xL genetické analyzátořy.

**Příprava dye setu BT5**

Před spektrální kalibrací je nutné nastavit matici BT5.

1. Pro nastavení nového dye setu jděte do **Library**, vyberte **Analyze**, poté **Dye Sets** a klikněte na **Create**.
2. Vložte **Dye Set Name**, např. BT5.
3. Vyberte **Matrix Standard** jako chemistry a **AnyDye Template** jako dye set template.
4. Zrušte označení **Purple** v poli **Arrange Dyes**. Ujistěte se, že všechny ostatní barvy jsou označené.
5. V **Calibration Peak Order** je nutné přeskupit barvy následovně: 5-blue, 4-green, 3-yellow, 2-red a 1-orange.
6. Neměňte **Parameter settings**.
7. Klikněte na **Save**.

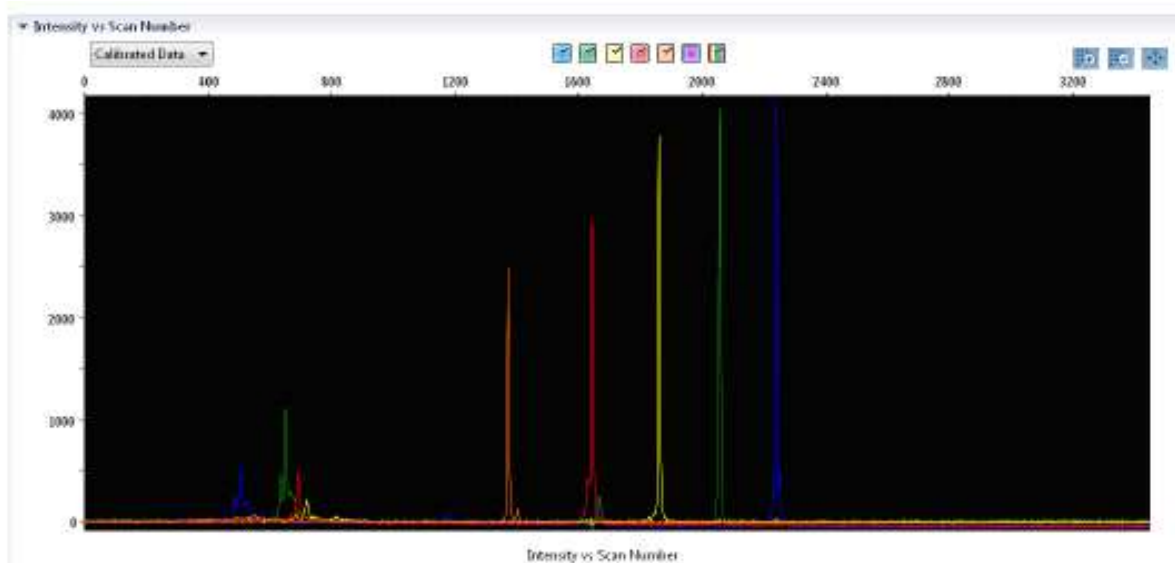


Obrázek 6. Nastavení dye setu BT5.

### Příprava analýzy spektrální kalibrace

Jakmile se multi-well destička obsahující směs na spektrální kalibrační umístí v zásobníku autosampleru, může se spektrální kalibrace spustit.

1. Pro přístup k Spectral Calibration screen vyberte **Maintenance** v menu Dashboard softwaru 3500 Series Data Collection.
2. Počet pozic a jejich lokalizace v destičce se spektrální kalibrací musí být zadána.
3. Vyberte **Matrix Standard** jak chemistry standard a **BT5** jako dye set (popsáno výše).
4. Umožněte **Allow Borrowing** (nepovinné).
5. Klikněte na **Start Run**.



Obrázek 7. Elektroferogram spektrální kalibrace s matrix standardem BT5 na ABI 3500.

### Kontrola matrice

- Quality value (**Q value**) musí být větší než 0,8 a condition number (**C value**) musí být mezi 1 a 20.
- Zkontrolujte, že matrice mají plochou baseline. Musí zde být pět píků s výškami okolo 1000 – 5000 RFU (Y osa) v každém vzorku matrice. Optimální rozmezí je 2000 – 4000 RFU.
- Úspěšná kalibrace je označena zelenou v **Overall** v každé kapiláře.
- Pokud všechny kapiláry projdou kalibrací, klikněte na **Accept Results**.
- Pokud kalibrace není úspěšná, klikněte na **Reject Results** a postupujte dle „spectral calibration troubleshooting“ v manuálu Applied Biosystems 3500/3500xl Genetický analyzátor.

### 6.2. Příprava vzorků

Reagencie	Objem
Hi-Di™ Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

Připravte 12 µl mixu (formamide + DNA size standard) pro všechny vzorky, přidejte 1 µl PCR produktu (naředěte, pokud je to třeba) nebo alelického ladderu

- Denaturujte při 95°C 3 minuty.
- Zchladte na 4°C a vložte vzorky do přístroje Genetic Analyzer.

Vzhledem k tomu, že analýza bude probíhat současně na všech kapilárách, je třeba 8 nebo 24 vzorků napipetovaných do destičky multi-kapilárních analyzátorů. Je-li analyzováno méně vzorků prázdné pozice musí být naplněny 12 ul Hi-Di™ Formamide. Spusťte několik alelických ladderů pro zajištění spolehlivých výsledků na multi-kapilárním analyzátoru.

Teplota místnosti může ovlivnit analýzu PCR produktů na multi-kapilárním přístroji. Nízká teplota způsobí, že píky se zakulatí nebo se rozdělí vrcholy píků. Věnujte pozornost tomu, aby okolní podmínky byly v souladu s doporučením výrobce přístroje. Optimální výsledky jsou dosahovány při teplotě místnosti > 22 ° C.

### Intenzity signálů

#### Možnosti zvýšení intenzity signálu:

- Snižte objem DNA Size Standardu 550 (BTO) tak, aby výška píků byla 500 RFU.
- Přečištěte PCR produkty před analýzou.

### 6.3. Nastavení softwaru Data Collection

Před první analýzou kitem Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** je nutné nastavit několik protokolů v 3500 Series Data Collection Software.

#### Vytvoření Instrument protocol

- V **Library** vyberte **Analyze / Instrument protocol a Create**
- Změňte parametry dle následující tabulky.

#### Instrument protocol pro Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>**

Parametr	Nastavení
Application Type	HID or Fragment
Capillary Length	Default
Polymer	Default
Dye Set	BT5
Run Module	Default
Protocol Name	např. Mentype AMLplex
Oven Temperature [°C]	Default
Run Voltage [kV]	Default
Injection Voltage [kV]	<b>3.0</b>
Run Time [s]**	<b>1560</b>
PreRun Time [s]	Default
Injection Time [s]*	<b>8*</b>
Data Delay Time [s]	Default
Advanced Options	Default

\* Odchýlení od standardního nastavení je možné. Injection time může být v rozmezí 1 až 20 sekund v závislosti na typu vzorku. U referenčních vzorků s velmi vysokou intenzitou signálu může být injection time zkrácen, aby se zabránilo pull-up píků. U vzorků s nízkým obsahem cDNA nebo u kritických vzorků pacienta lze injection time prodloužit až na 20 s.

\*\* V závislosti na podmínkách analýzy může být run time kitu Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** upraven tak, aby bylo možné analyzovat fragmenty o délce až 550 bp.

- Klikněte na **Save** pro potvrzení nastavení.

### Vytvoření Size Standard

- V **Library** vyberte **Analyze / Size Standards** a klikněte na **Create**.
- Změňte parametry dle následující tabulky.

Parametr	Nastavení
Size standard	BTO_550
Dye Color	Orange

DNA Size Standard 550 (BTO) obsahuje fragmenty této délky:

**60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 a 550bp.**

- Klikněte na **Save** a potvrďte nastavení.

### Vytvoření QC (Size Calling) protokolu

- V **Library** vyberte **Analyze / QC nebo Size Calling** a klikněte na **Create**.
- Změňte parametry dle následující tabulky.

Parametr	Nastavení
Protocol Name	zadejte jméno
Size Standard	BTO_550
Sizecaller	Size Caller v.1.1.0

- V **Analysis Settings / Peak Amplitude Treshold** a zrušte označení **purple**. Všechny ostatní barvy musí zůstat označeny.
- Všechny ostatní nastavení nechte původní (Default).
- Klikněte na **Save** pro potvrzení nastavení.

### Vytvoření Assay

- V **Library** vyberte **Manage / Assaya** a klikněte na **Create**.
- Změňte parametry dle následující tabulky.

Parametr	Nastavení
Assay Name	např. Mentype AMLplex
Color	Default
Application Type	HID nebo Fragment
Instrument Protocol	např. Mentype AMLplex
QC (Size Calling) Protocol	např. BTO_550
Genemapper Protocol	může být definován

- Klikněte na **Save** pro potvrzení nastavení.

### Spuštění runu

- Vložte připravenou 96-well destičku do autosampleru.
- V softwaru Data Collection v Dashboard klikněte na **Create New Plate**.
- Dále zvolte **Plate Details** v **Define Plate Properties**
- Změňte parametry dle následující tabulky.

## Plate Details

Vlastnost	Nastavení
Name	např. Mentype AMLplex
Number of wells	96 nebo 384
Plate Type*	HID neb Fragment
Capillary Length	<b>36 cm</b>
Polymer	<b>POP4</b>

- Klikněte na **Assign Plate Contents** pro potvrzení nastavení.
- Definujte pozici každého vzorku nebo alelického ladderu v data collection pro sběr a zpracování dat.
- Přiřadte **Assay** (povinné), což je konvence názvů souborů a skupin výsledků pro všechny pojmenované vzorky.
- Klikněte na **Link the plate for Run** a vložte Run Name.
- Klikněte na **Start Run**.

## 7. Analýza

Pro základní instrukce o automatické analýze vzorku použijte GeneScan nebo GeneMapper® ID/ID-X software manuál.

### 8.1 Parametry analýzy / metoda analýzy

Doporučené parametry analýzy jsou:

Peak Detection Algorithm	Advanced
Allele	No specific stutter ratio, set all to 0.0 Amelogenin cut off: 0.0
Ranges	Analysis: Full Range Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light Baseline Window: 51 pts
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds B:200 Y:200 G:200 R:200 O:50 Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 15 pts** Slope Thresholds: 0.0
Peak Quality	Heterozygote Balance: 0.0 Max expected alleles: 22

\* Peak amplitude threshold (hodnota cut-off) odpovídá minimální výšce píku detekovaného pomocí softwaru GeneMapper® ID. Pro kit Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> je doporučena intenzita (výška píku) 200 RFU a měla by být stanovena individuálně v každé laboratoři.



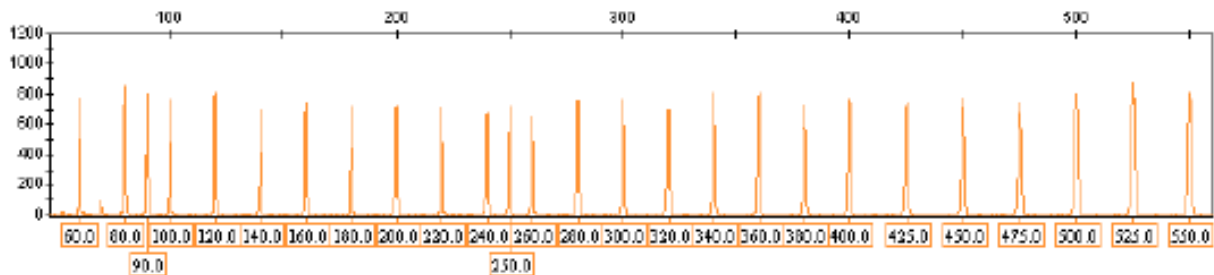
Doporučení: Minimální výška píku by měla být třikrát vyšší než výška background píků na baseline.

\*\* Pokud je třeba zlepšit detekci píků, tak Peak Window Size může být minimalizována na 11pts.

**Poznámka:** V případě Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> může být červená barva vyloučena z analýzy.

Přesný výpočet délky amplifikovaných produktů je závislý na typu zařízení, na podmínkách elektroforézy, stejně jako typu použitého DNA velikostního standardu (ladderu). Z tohoto důvodu, by určování velikosti mělo být založeno na rovnoměrně rozdělených datech. Je tedy doporučeno použít velikostní DNA Standard 550 (ladder BTO) s následujícími délkami fragmentů:

**60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 a 550 bp.**



Obrázek 8. Elektroferogram DNA size standardu 550 (BTO), fragmenty s délkou v bp.

**Poznámka:** Templát pro DNA size standard SST-BTO\_60-550bp může být použit pro analýzu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> v softwaru GeneMapper® ID/ID-X.

## 8.2 Biotype® templáty

Rozdělení transkriptů fúzního genu a variant by mělo být provedeno pomocí vhodného softwaru pro analýzu, např. GeneMapper® ID / ID-X v kombinaci s Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> templátů BioType®. Biotype® templáty včetně příslušného návodu jsou k dispozici na naší domovské stránce ([www.biotype.de](http://www.biotype.de)) ke stažení nebo jako CD-ROM na vyžádání.

Doporučené Biotype® templáty pro GeneMapper® ID/ID-X jsou:

Panels	AMLplex_Panels_v2/v2X	nebo vyšší verze
BinSets	AML_plex_Bins_v2/v2X	nebo vyšší verze
Size Standard	SST-BTO_60-550bp	
Analysis Method	AMLplex_HID_310_200rfu	doporučená
	AMLplex_HID_3130_200rfu	doporučená
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 10 Alleles	
	Table for 22 Alleles	

Panels a BinSets musí být použity při každé analýze, ostatní templáty jsou volitelné.

**Důležitá poznámka:** Import a vyhodnocení alel s uvedenými templáty je garantované pouze pomocí GeneMapper® ID / ID-X softwaru. Pokud se použije pro analýzu GeneMapper® software, může docházet k problémům s importem některého z templátů. Možná bude nutné upravit panels a binsets pomocí analýzy alelického ladderu. Kontaktujte nás pro podporu (podpora @ biotype.de).

#### **Základní postup analýzy**

1. Zkontrolujte DNA size standard.
2. Zkontrolujte alelický ladder.
3. Zkontrolujte pozitivní kontrolu.
4. Zkontrolujte negativní kontrolu.
5. Analyzujte a vyhodnoťte vzorky.

### **8.3 Kontroly**

Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** PCR amplifikační kiz obsahuje cDNA kontrolu, která je pozitivní na následující aberace:

#### **Tabulka 3.** Součást Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>**

cDNA z buněčných kultur*	Aberace
KASUMI-1 (Asou et al. 1991)	AML1-ETO

\* Buněčná kultura pro přípravu cDNA byla získána z DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany.

Použití cDNA je možné jen společně s Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>**.

### **8.4 Délka fragmentů a aberace variant**

**Tabulka 4.** V tabulce jsou uvedeny délky fragmentů individuálních variant, které odkazují na DNA Size Standard 550 (BTO). Všechny analýzy byly provedeny na ABI PRISM® 3130 Gnetickém Analyzáru s POP-4® polymerem. Použití různých analýz, nástrojů, DNA size standardů nebo polymerů může mít za následek různé délky fragmentů. Vzhledem rozdílům mezi jednotlivými přístroji je doporučeno individuální doladění detekce délky fragmentů.

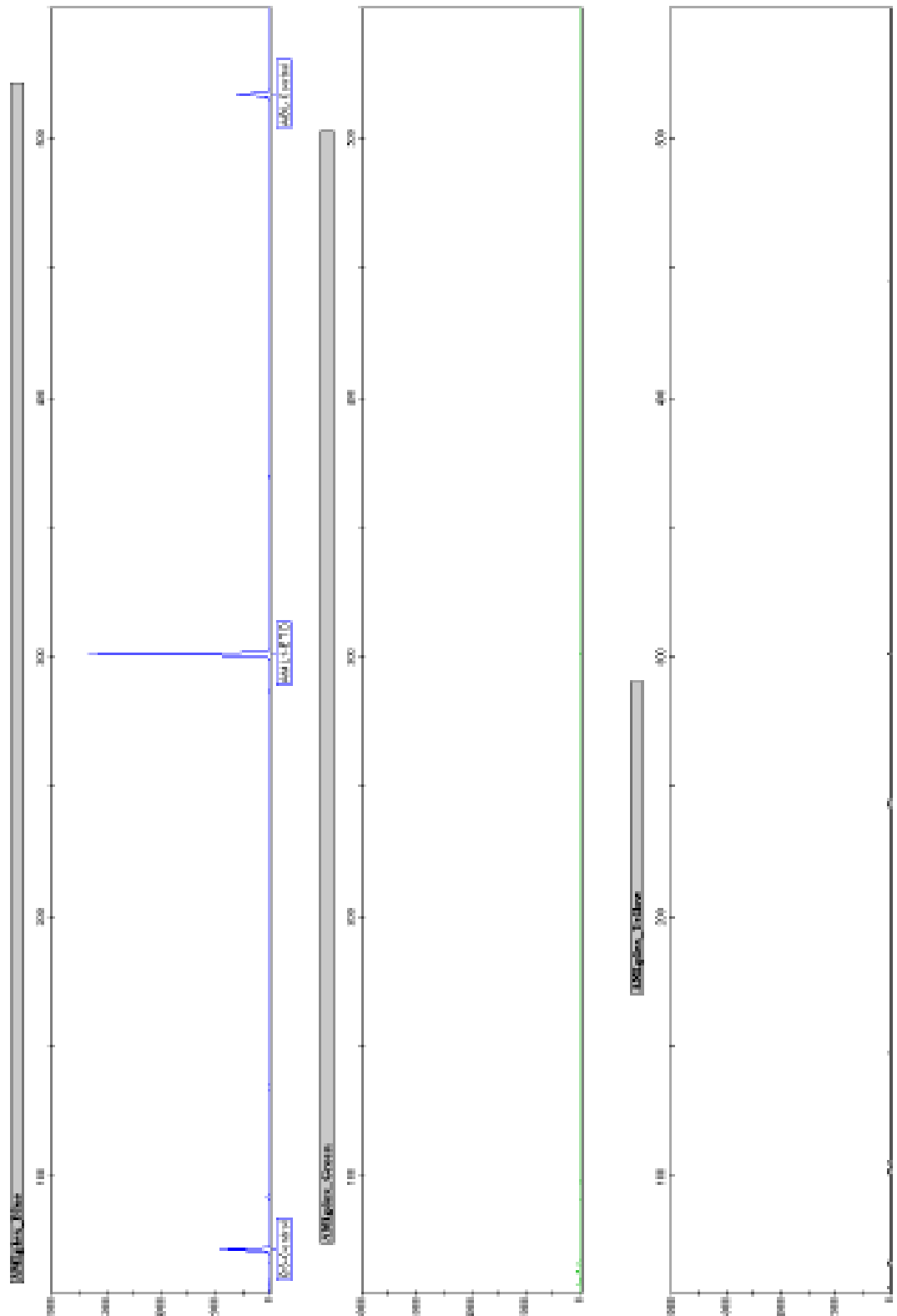
Kromě toho je vhodné vizuální vyrovnání délek fragmentů pomocí allelic ladder.

#### **Scaling**

Horizontální: 55-550bp

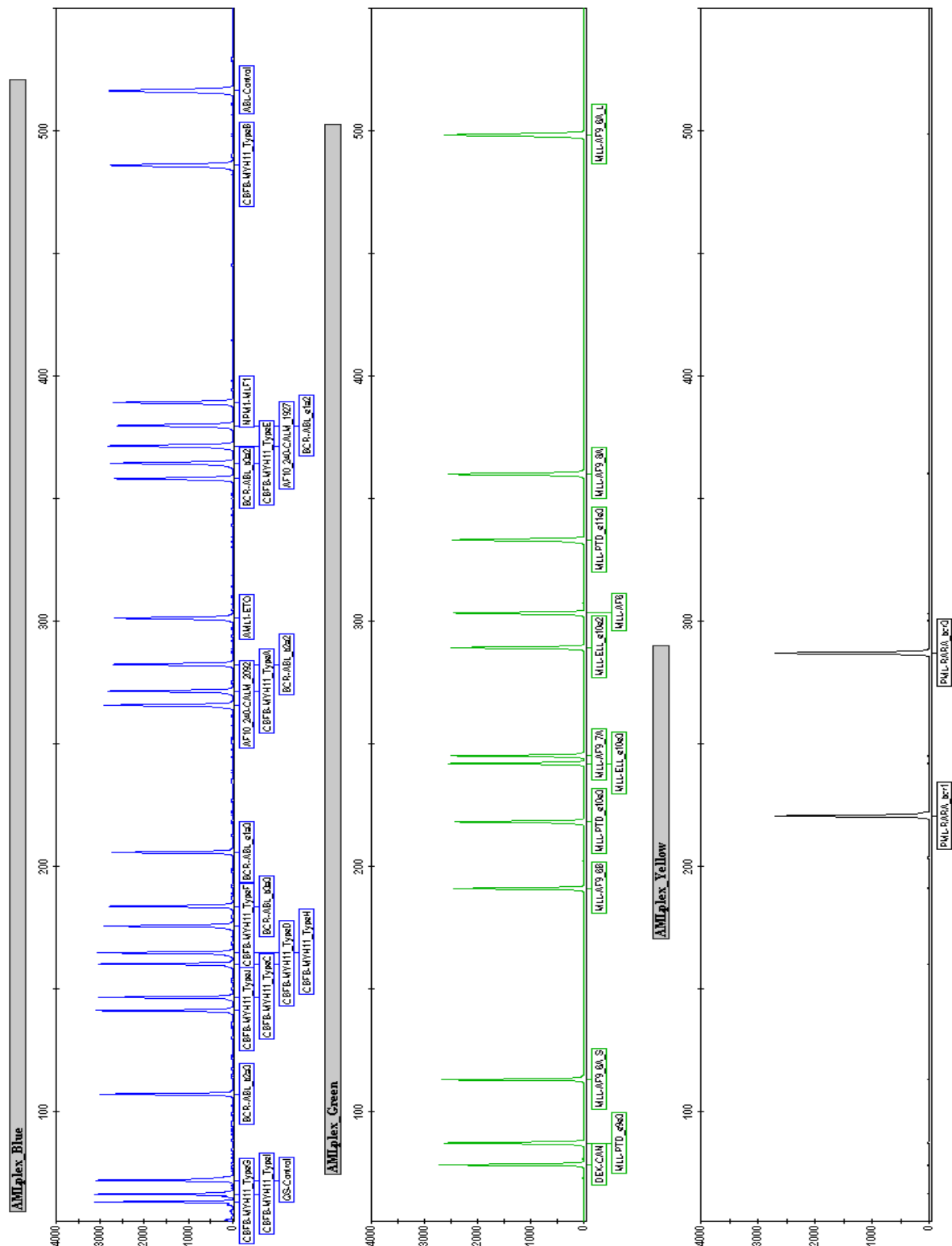
Vertikální: Záleží na síle signálu.

Obrázek 9.



Obrázek 9. Elektroferogram výsledku analýzy 250 ng cDNA control KASUMI-1 kitem Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>**. Analýza byla provedena pomocí ABI PRISM® 3130 a DNA Size Standardem 550 (BTO). Vyhodnocení bylo provedeno softwarem GeneMapper® ID a templáty Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>**.

Obrázek 10.



Obrázek 10. Elektroferogram výsledku alelického ladderu kitem Mentype® AMLplex<sup>QS</sup>. Analýza byla provedena pomocí ABI PRISM® 3130 a DNA Size Standardem 550 (BTO). Vyhodnocení bylo provedeno softwarem GeneMapper® ID a templáty Mentype® AMLplex<sup>QS</sup>.

**Tabulka 4.** Délky fragmentů alelického ladderu kitu Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** měřené na ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymerem. Vemte, prosím, v úvahu poznámku pod kapitolou 8.3.

Panel/Varianty	Size [bp]*	Panel/Varianty	Size [bp]*	Ostatní
<b>AMLplex Blue</b>		<b>AMLplex Green</b>		
CBFB-MYH11_TypeG	63	DEK-CAN	78	
CBFB-MYH11_TypeI	66	MLL-PTD_e9e3	87	
QS-Control	72	MLL-AF9_6A_S <sup>+</sup>	113	
BCR-ABL_b2a3	107	MLL-AF9_6B	191	
CBFB-MYH11_TypeJ	141	MLL-PTD_e10e3	218	
CBFB-MYH11_TypeC	146	MLL-ELL_e10e3	242	
CBFB-MYH11_TypeD	160	MLL-AF9_7A	245	
CBFB-MYH11_TypeH	165	MLL-ELL_e10e2	289	
CBFB-MYH11_TypeF	175	MLL-AF6	303	
BCR-ABL_b3a3	183	MLL-PTD_e11e3	333	
BCR-ABL_e1a3	206	MLL-AF9_8A	360	
AF10_240-CALM_2092	265	MLL-AF9_6A_L <sup>+</sup>	498	
CBFB-MYH11_TypeA	271			
BCR-ABL_b2a2	282			
AML1-ETO	301	<b>AMLplex Yellow</b>		
BCR-ABL_b3a2	358	PML-RARA_bcr1	220	
CBFB-MYH11_TypeE	365	PML-RARA_bcr3	288	
AF10_240-CALM_1987	371			<i>PML-RARA_bcr2**</i>
BCR-ABL_e1a2	380			
NPM1-MLF1	389			
CBFB-MYH11_TypeF	486			
ABL-Control	518			

\* zaokrouhleno na celé číslo.

\*\* I tato varianta je detekována kitem Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** primery, mění se délka ampliconu (cca 173 bp) ale brání automatické lokalizaci píku.

+ Dva amplicony pro variantu MLL-AF9\_6A.

## 8. Interpretace výsledků

Jak je uvedeno výše, post PCR analýza a automatické vyhodnocení přítomných alel vhodným softwarem umožňuje přesnou a spolehlivou detekci fúzních genových transkriptů a variant. Zkontrolujte, prosím, správné přiřazení allelic ladder v rámci každého runu.

### Detekční limit

Při použití plazmidů, experimentální data ukázala, že 1000 kopií dalo výsledek s výškou píku > 200 RFU.

Vezměte prosím na vědomí, že Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** byl navržen, ověřen a certifikován jako screeningový nástroj pro klasifikaci podtypu AML. Tato aplikace není vhodná pro kvantifikaci počtu kopií nebo sledování minimální reziduální nemoci (MRN).

### **Pull-up píky**

Pull-up píky mohou vznikat, pokud jsou výšky píků PCR produktů mimo rozsah snímání přístroje, nebo v případě, že byl použit nesprávný matrix standard. Objevují se v místech specifických píků, ale v jiných barevných kanálech než mají být, a které mají obvykle nižší intenzitu signálu. Pokud je to nutné, naředte PCR produkt a zopakujte test, pro kontrolu výsledku. V případě, že potíže s pull-up píky přetrvávají i přes optimální výšky píku, měl by být spuštěn nový run matrice.

### **Na templátu nezávislé přidání nukleotidů**

Vzhledem terminálně transferázové aktivitě Taq DNA Polymerasy a její tendenci přidat adenosinový zbytek na 3'-konec amplifikovaných fragmentů DNA, můžeme poté detekovat zbytkový pík (-1 bp vrcholy). Všechny Biotype® primery jsou konstruovány tak, aby minimalizovali vznik těchto fragmentů. Tvorba artefaktů je dále snížena díky prodloužení kroku protokolu PCR při 68 ° C na dobu 10 minut. Výška píku artefaktu koreluje s množstvím cDNA. Laboratoře by měly definovat své jednotlivé limity pro analýzu těchto píků.

### **Artefakty**

Teplota místnosti může ovlivnit analýzu PCR produktů na multi-kapilárním přístroji. Nízká teplota způsobí, že píky se zakulatí nebo se rozdělí vrcholy píků. Věnujte pozornost tomu, aby okolní podmínky byly v souladu s doporučením výrobce přístroje. Kromě toho, automatické vyhodnocení může být ovlivněno teplotou. Pokud se tyto potíže vyskytnou, doporučujeme analyzovat vzorek při vyšší teplotě a lze použít i více než jeden alelický ladder v jedné analýze. Dejte pozor na dodržení výrobcem doporučených podmínek. Optimální teplota je >22°C.

### **Vliv typu polymeru**

Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> kit byl ověřen a certifikován pro analýzu s POP-4® polymerem. Použití jiných polymerů (např. POP-7™ nebo POP-6™), může ovlivnit chování specifických PCR produktů. V případě, že je nutno upravit Biotype® templáty (panel a binset), kontaktujte, prosím, technickou podporu ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)). Navíc se může zvýšit background v důsledku rozdílného chování fluorescenčními barviv.

## 9. Vysvětlení symbolů

	Výrobce
	Datum výroby
	Šarže
	Obsahuje dostatek reagensů pro <N> testů
	Konzultujte s návodem (manuálem)
	Použitelné do
	Teplotní limity
	Katalogové číslo
	In-Vitro-Diagnostika

## **A Analytická validace**

### **A a) Stanovení standardních reakčních a lot-specifické tolerance**

**Cíl:** Stanovení standardních reakčních a lot-specifické tolerance multiplexní PCR s ohledem na absolutní výšky signálu (RFU), vyvážení výšek signálu a baseline. Stanovení specifického nastavení pro genotypování pomocí kapilární elektroforézy (biny a panely) na základě hodnocení zkušebních templátů sekvenačních DNA přístrojů.

**Metody:** Byla použita kontrolní cDNA buněčné linie KASUMI-1 (ACC220, Leibnitzův institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), která je součástí kitu a obsahuje genovou fúzi AML1-ETO s chromozomální aberací t (8; 21) (q22, q22) [7]. Dále byl použit umělá ekvimolární templát, směs plazmidů, obsahujícími 33 z 34 detekovatelných variant. Standardní reakce byla provedena s kontrolní cDNA při nominální koncentraci 250 ng na PCR amplifikaci s PCR 25 cykly. Mix templátu se upraví tak, aby výška signálu spadala do lineárního měřicího rozsahu analyzátorů (max. 5000 RFU), při použití 25 PCR cyklů. Bylo také provedeno čtyřnásobné dodatečné stanovení čtyř hodnot blanků bez DNA (netemplátová kontrola, NTC).

**Výsledky:** Byly stanoveny následující specifikace pro lot-specifické mixy PCR primerů, když jsou použity jako mixy templátů s: ABI Prism® 310 Genetic Analyzer byla výška signálu 1000-4000 RFU a při použití ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer byla úroveň signálu 1000-5000 RFU. Specifické signály jsou detekovány od výšky signálu 200 RFU. V rozsahu měřítka, nebyly zjištěny žádné nespecifické signály (bez barviva, artefakty) > 200 RFU netemplátové kontroly (základní linie).

### **A b) Přesnost měření**

**Cíl:** Informace o přesnosti metody měření a dostatečně podrobný souhrn údajů, který umožní posoudit, zda jsou prostředky pro zjišťování přesnosti vhodné. Měření přesnosti pro kvantitativní a kvalitativní testy může být vydáváno pouze v případě, že je k dispozici referenční standard nebo metoda.

**Metody:** Kit je validován pravidelnou účastí na kruhových testováních s ohledem na správné kvalitativní prohlášení (Diagnostické). Biotype se pravidelně účastní od 3. června 2013 testování v rámci United Kingdom National Quality Assessment Scheme (UKNEQAS, [www.ukneqas.org.uk](http://www.ukneqas.org.uk)) pro detekci BCR-ABL a AML translokací. Testování se organizuje pravidelně (2x) za rok a je vyhodnocováno autoritou. Výsledky (performance status) včetně srovnání s ostatními účastníky jsou zveřejňovány.



**Výsledky:** Status hodnocení Biotype je „zelený“. Produkt je prokazatelně vhodný pro detekci BCR-ABL variant a AML translokací a dosahuje správné výsledky (kvalitativní) v porovnání s ostatními molekulárně genetickými metodami.

#### **A c) Analytická Specificita**

##### **A c) a) Analytická Specificita negativně před-testovaných cDNA**

**Cíl:** Účelem této studie je vyloučení falešně pozitivních výsledků v důsledku interference a kross-reaktivity u vybraných cDNA z negativně předem otestovaných vzorků (pacientů a zdravých dárců).

**Metody:** Bylo otestováno 22 cDNA negativně předem otestovaných na translokační varianty zjištěné kitem. Množství použité cDNA by mělo pokrýt rozsah koncentrací očekávaných v klinické praxi a v rozmezí od 145 ng do max. 934 ng na PCR reakci o 25 cyklech.

**Výsledky:** Žádná kross-reaktivita (> 200 RFU), nebyla nalezena v rozsahu alel určených v binech a panelech. Měření signálu pro vnitřní kontrolu cDNA (ABL genu) bylo > 200 RFU u 21 cDNA, v jednom případě bylo přibližně 50 RFU. Automatické omezení rozpoznání alel bylo nastaveno na 200 RFU.

##### **A c) b) Analytická Specificita pozitivně před-testovaných cDNA**

**Cíl:** Účelem této studie je vyloučení falešně negativních výsledků v důsledku interference a kross-reaktivity primerů u vybraných cDNA z pozitivně předem otestovaných pacientů.

**Metody:** Bylo otestováno 20 cDNA pozitivně předem otestovaných na translokační varianty zjištěné kitem. Množství použité cDNA bylo upraveno na 250 ng na PCR o 25 cyklech.

**Výsledky:** Všechny somatické mutace byly identifikovány. Žádná kross-reaktivita (> 50 RFU), nebyla nalezena v rozsahu alel. Měření signálu pro somatické mutace a vnitřní kontrolu cDNA (ABL genu) bylo > 200 RFU u 16/20 vzorků a > 50 RFU u 3/20 vzorků. Jeden vzorek měl hodnotu nižší než 50 RFU, ale fúzní varianta henu byla stále detekovatelná. Automatické omezení rozpoznání alel bylo nastaveno na 200 RFU.

#### **A d) Analytická Sensitivita**

**Cíl:** Stanovení analytického detekčního limitu (sensitivity) testu.

**Metody:** Série ředění od 1 ug do 31,25 ng referenční cDNA (Kasumi-1) byla testována čtyřmo. Program PCR byla provedena s 25 cykly. Kromě toho, pro každou variantu transkripce, které mají být detekovány, byla testována série ředění uměle připraveného referenčního templátu (plasmide encoded gene fusion inserts, GeneArt/Life Technologies, Regensburg, DE) s pevným počtem kopií v duplikátech.

**Výsledky:** Až do koncentrace cDNA 62,5ng by mohla být dosažena intenzita signálu > 200 RFU pro specifické translokace i pro kontrolu ABL. U koncentrace 31,25 ng cDNA byla dosažena intenzita signálu u konkrétní varianty > 200 RFU a u ABL kontroly > 50 RFU. Optimálních hodnot s ohledem na rozsah měření kapilárního sekvenátoru bylo dosaženo v rozmezí koncentrací 150 ng - 250 ng. Měření ředění plazmidů vykazovalo mez detekce > 200 RFU u 100 kopií, které může být dosaženo u všech variant translokací.

#### **A e) Test výkonnosti kitu s různými PCR thermocyclery**

**Cíl:** PCR thermocyclery různých výrobců se liší svými specifikacemi. Zejména se liší různými ramp rates a také různými typy kontroly a dosažení ohřevu.

**Metody:** Standardní reakce s kontrolní cDNA v koncentraci 250 ng byly provedeny s následujícími thermocyclery ve čtyřnásobném stanovení se stejným mastermixem a se dvěma blank vzorky (bez DNA): Thermocycler Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 se stříbrným blokem (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 s hliníkovým blokem (Life Technology GmbH, Darmstadt).

**Výsledky:** Správné přiřazení všech amplifikátů bylo pozorováno u všech typů termocyclerů. Všechny fragmenty templátové směsi byly úspěšně amplifikovány.

#### **A f) PCR annealing teploty**

**Cíl:** Stanovit robustnost PCR, teplotní fluktuace byly simulovány v multiplexních PCR v kroku primer annealingu. Tento teplotní krok je kritický pro sensitivitu a specifitu PCR.

**Metody:** Kit-specifická annealing teplota 60°C pro standardní reakci s kontrolní cDNA v koncentraci 250 ng byla měněna o  $\pm 1^\circ\text{C}$  a  $\pm 2^\circ\text{C}$ . Stanovení bylo provedeno se stejným mastermixem 3x.

**Výsledky:** Kit se ukázal být stabilním při  $\pm 1^\circ\text{C}$  annealing teploty. Optimální výška signálu pro všechny systémy byla získána s annealing teplotou 61°C.

## **A g) Fluktuace šarží PCR pufrů**

**Cíl:** Rozmezí koncentrací složek PCR pufru REM A (dNTPs, koncentrace iontů, zejména Mg<sup>2+</sup>) je kritické pro sensitivitu, specifitu a vyváženost signálů v multiplexní PCR. Proto byla robustnost testu analyzována vzhledem k fluktuacím u jednotlivých šarží dodaných subdodavatelem PCR pufru.

**Metody:** 3 nezávislé šarže REM A byly testovány ve standardní reakci s kontrolní DNA v koncentraci 250 ng, spolu s alelickým ladderem a cDNA linií se slabou expresí (MLL-AF6).

**Výsledky:** Každá nově vyprodukovaná šarže REM A byla testována kitem Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup>. Schválení příslušného REM je možné pouze v případě, že výsledky získané s Mentype® **AMLplex**<sup>QS</sup> jsou v rámci specifikace.

## **A h) In-Use stabilita**

**Cíl:** Stabilita jednotlivých reagensů PCR kitu byla testována po opakovaném zmrazování a rozmrazování.

**Metody:** Reagencie z kitu byly podrobeny dvaceti cyklům zmrazení a rozmrazení. Zmrazení bylo provedeno na přibližně 1 h při -20°C. Mix byl poté rozmrazen při laboratorní teplotě a mix byl před použitím homogenizován promícháním. Následně byla provedena standardní reakce s kontrolní DNA o koncentraci 250 ng a s blankovými vzorky bez DNA v triplicátech. Vyhodnocení bylo porovnáno se standardní reakcí bez opakovaného zmrazování a rozmrazování.

**Výsledky:** Odchylka od průměrných výšek píků ve srovnání se standardní reakcí byla maximálně 20% (částečná ztráta signálu). Žádné píky >50 RFU navíc nebyly nalezeny ve rozsahu zvětšení u blankových vzorků.

## **B Klinické údaje o výkonnosti**

### **B a) Design studie, etické a regulační aspekty**

Klinická studie výkonnosti byla provedena v souladu s §§ 20-24 německého Medizinproduktegesetz. Protokol byl schválen Národní kompetentní Autoritou BfArM podle § 7 německé Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten a institucionální etickou komisí. Všichni účastníci (10 dobrovolníků, 297 pacientů) poskytli písemný informovaný souhlas.

## **B b) Referenční metody**

Primárním cílem je stanovení diagnostických citlivostí a specifit ve srovnání s referenčními metodami. Standardizované cytogenetické metody (karyotyp, FISH analýzy) byly k dispozici pro výběr translokace [8]. Validovaná a zavedená monoplexní-nested-PCR byla použita pro translokace, které nemohly být řešeny cytologicky [9, 10].

## **B c) Extrakce a purifikace DNA**

Mononukleární buňky (MNC) byly odebrány z heparinované plné krve centrifugací v hustotním gradientu. Následně, celková mRNA byla izolována s použitím komerčně dostupných souprav extrakčních mRNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Reverzní transkripce na cDNA byla provedena s komerčně dostupnými kity. Kvalita cDNA byla analyzována pomocí PCR v reálném čase (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Validované in-house single PCR sloužily k potvrzení fúzních genů a mutací.

## **B d) Výsledky**

Amplifikační PCR kit Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>** nevykazuje žádné falešně pozitivní výsledky z analýzy cDNA z 10 zdravých dobrovolníků. Celkem bylo vyšetřeno 297 vzorků pacientů. Z nich, 5 vzorků nemohlo být hodnoceno (kontrolní signál pro BCR-ABL byl pod doporučenou prahovou hodnotou). Ze zbývajících 292 vzorků bylo zjištěno, že správně negativní bylo ve srovnání s karyotypem, FISH a / nebo kontrolní PCR 199. Ze správně negativních vzorků, 56 v karyogramu ukázalo genetické změny (chromozomální anomálie), které nemohly být rozpoznávány pomocí testovacího kitu. To lze vysvětlit tím, že amplifikační PCR kit Mentype® **AMLplex<sup>QS</sup>**, i když obsahuje nejčastější translokace, se vztahuje pouze přibližně 37% z genetických abnormalit často pozorovaných u AML [8]. Jednotlivé výsledky srovnávacích testů jsou shrnuty v tabulce 5.

Celkově bylo dosaženo diagnostické citlivosti 94% a diagnostické specifity 99,5%. Všechny cytogenetické nálezy ověřené kontrolními PCR [9, 10] byly jednoznačně potvrzeny.

Tabulka 5: Závěr z údajů klinické výkonnosti.

Biomarker Genfusion	Chromosomale Aberration	Variante	Prävalenz bei AML [%] (Grimwade et al. 2010)	Bewertung der		Leistungsbewertungsprüfung		Leistungsprüfung (n=292)	
				Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch positiv	Falsch negativ	Diagnostische Sensitivität [%]	Diagnostische Spezifität [%]
AML1-ETO	t(8;21) (q22;q22)	n. b.	7	14	277	0	1	93.3	100.0
BCR-ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3	1	1	291	0	0	100.0	100.0
CALM-AF10	t(10;11) (p13;q14)	AF10_240-CALM_1987 AF10_240-CALM_2092	1	0	292	0	0	n.b.	100.0
CBFB-MYH11	inv(16) (p13;q22)	Type A Type B Type C Type D Type E Type F Type G Type H Type J	5	25	264	1	2	92.6	99.6
DEK-CAN	t(6;9) (p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100.0	100.0
MLL-AF6	t(6;11) (q27;q23)	n. b.	<0,5	0	292	0	0	n.b.	100.0
MLL-AF9	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)	1	4	287	0	1	80.0	100.0
MLL-ELL	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3	1	0	291	0	1	0.0	100.0
MLL-PTD	Partial Tandem Duplication	e9e3 e10e3 e11e3	5 bis 7	23	269	0	0	100.0	100.0
NPM1-MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	n. b.	<0,5	1	291	0	0	100.0	100.0
PML-RARA	t(15;17) (q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)	13	8	284	0	0	100.0	100.0
Gesamt			ca. 37	79	207	1	5	94.0	99.5

**B e) Reference:**

**Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S.** A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):744-52. PubMed PMID: 17550846.

**Huret JL, Dessen P, Bernheim A.** Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, year 2003. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 1;31(1):272-4. PubMed PMID: 12520000; PubMed Central PMCID: PMC165573.

**Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD.** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51. Epub 2009 Apr 8. Review. PubMed PMID: 19357394.

**Reference: AML1-ETO, t(78;21)(q22;q22):**

**Licht JD.** AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5660-79. Review. PubMed PMID: 11607817.

**Lo Coco F, Pisegna S, Diverio D.** The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 1997 May-Jun;82(3):364-70. Review. PubMed PMID: 9234595.

**Nucifora G, Rowley JD.** AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995 Jul 1;86(1):1-14. Review. PubMed PMID: 7795214.

**Richkind K, Hromas R, Lytle C, Crenshaw D, Velasco J, Roherty S, Srinivasiah J, Varella-Garcia M.** Identification of two new translocations that disrupt the AML1 gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000 Oct 15;122(2):141-3. Review. PubMed PMID: 11106827.

**Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C.** New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*. 2003 Jan;17(1):9-16. Review. PubMed PMID: 12529654.

**Reference: BCR-ABL, t(9;22)(q34;q11):**

**Burmeister T, Reinhardt R.** A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts. *Leuk Res*. 2008 Apr;32(4):579-85. Epub 2007 Oct 24. PubMed PMID: 17928051.

**Emilia G, Luppi M, Ferrari MG, Temperani P, Marasca R, Giacobbi F, Vaccari P, Bandieri E, Di Donato C, Carapezzi C, Torelli G.** Chronic myeloid leukemia with thrombocythemic onset may be associated with different BCR/ABL variant transcripts. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Feb;101(1):75-7. PubMed PMID: 9460506.

**Jones D, Luthra R, Cortes J, Thomas D, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Hai S, Ravandi F, de Lima M, Kantarjian H, Jorgensen JL.** BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):5190-2. Epub 2008 Sep 22. PubMed PMID: 18809762; PubMed Central PMCID: PMC2597614.

**Kim TD, Türkmen S, Schwarz M, Koca G, Nogai H, Bommer C, Dörken B, Daniel P, le Coutre P.** Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):582-8. Epub 2009 Dec 16. PubMed PMID: 20015884; PubMed Central PMCID: PMC2857187.

**Quintás-Cardama A, Cortes J.** Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. Epub 2008 Sep 30. Review. PubMed PMID: 18827185.

**Reference: DEK-CAN, t(6;9)(p23;q34):**

**Soekarman D, von Lindern M, Daenen S, de Jong B, Fonatsch C, Heinze B, Bartram C, Hagemeyer A, Grosveld G.** The translocation (6;9) (p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):2990-7. PubMed PMID: 1586743.

**Soekarman D, von Lindern M, van der Plas DC, Selleri L, Bartram CR, Martiat P, Culligan D, Padua RA, Hasper-Voogt KP, Hagemeyer A, et al.** Dek-can rearrangement in translocation (6;9)(p23;q34). *Leukemia*. 1992 Jun;6(6):489-94. PubMed PMID: 1602786.

**Reference: CALM-AF10; t(10;11)(p13;q22):**

**Jones LK, Chaplin T, Shankar A, Neat M, Patel N, Samuel DP, Hill AS, Debernardi S, Bassini A, Young BD, Saha V.** Identification and molecular characterisation of a CALM-AF10 fusion in acute megakaryoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):910-4. PubMed PMID: 11417476.

**Reference: CFBF-MYH11, inv(16)(p13;q22):**

**Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwien K, Du J, Bullinger L, Fröhling S, Reimer P, Rummel M, Derigs HG, Nachbaur D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K.** Prognostic impact of minimal residual disease in CFBF-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 10;28(23):3724-9. Epub 2010 Jul 12. PubMed PMID: 20625124.

**Mühlematter D, Lafage-Pochitaloff M, Gabert J, Reiffers J, Bilhou-Nabera C, van Ommen GJ, Hagemeyer A, Breuning MH.** Genomic acute myeloid leukemia-associated inv(16)(p13q22) breakpoints are tightly clustered. *Oncogene*. 1999 Jan 14;18(2):543-50. PubMed PMID: 9927211.

**Roth CG, Contis L, Gupta S, Agha M, Safyan E.** De novo acute myeloid leukemia with Philadelphia chromosome (BCR-ABL) and inversion 16 (CBFB-MYH11): report of two cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2011 Mar;52(3):531-5. Epub 2011 Feb 1. Review. PubMed PMID: 21281226

**Reference: MLL-AF6, t(6;11)(q27;q23):**

**Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyama K, et al.** Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res*. 1993 Dec 1;53(23):5624-8. PubMed PMID: 8242616.

**Welborn JL, Jenks HM, Hagemeijer A.** Unique clinical features and prognostic significance of the translocation (6;11) in acute leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993 Feb;65(2):125-9. Review. PubMed PMID: 8453597.

**Reference: MLL-AF9, t(9;11)(q22;q23):**

**Giugliano E, Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Serra A, Wlodarska I, Emanuel B, Saglio G, Hagemeijer A.** MLL-AF6 fusion resulting from a new three-way translocation t(6;11;7) in a patient with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2001 Oct;15(10):1674-6. PubMed PMID: 11587234.

**Mitterbauer G, Zimmer C, Pirc-Danoewinata H, Haas OA, Hojas S, Schwarzinger I, Greinix H, Jäger U, Lechner K, Mannhalter C.** Monitoring of minimal residual disease in patients with MLL-AF6-positive acute myeloid leukaemia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol.* 2000 Jun;109(3):622-8. PubMed PMID: 10886213.

**Strehl S, König M, Mann G, Haas OA.** Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 2001 Feb 1;97(3):805-8. PubMed PMID: 11157501.

**Tanabe S, Zeleznik-Le NJ, Kobayashi H, Vignon C, Espinosa R 3rd, LeBeau MM, Thirman MJ, Rowley JD.** Analysis of the t(6;11)(q27;q23) in leukemia shows a consistent breakpoint in AF6 in three patients and in the ML-2 cell line. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996 Apr;15(4):206-16. PubMed PMID: 8703846.

**Reference: MLL-ELL, t(11;19)(q23;p13.1):**

**Huret JL, Brizard A, Slater R, Charrin C, Bertheas MF, Guilhot F, Hählen K, Kroes W, van Leeuwen E, Schoot EV, et al.** Cytogenetic heterogeneity in t(11;19) acute leukemia: clinical, hematological and cytogenetic analyses of 48 patients--updated published cases and 16 new observations. *Leukemia.* 1993 Feb;7(2):152-60. Review. PubMed PMID: 8426468.

**Mitani K, Kanda Y, Ogawa S, Tanaka T, Inazawa J, Yazaki Y, Hirai H.** Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood.* 1995 Apr 15;85(8):2017-24. PubMed PMID: 7718874.

**Reference: MLL-PTD, Parciální tandemová duplikace:**

**Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE.** The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2006 Nov;135(4):438-49. Epub 2006 Sep 11. Review. PubMed PMID: 16965385.



**Pajuelo-Gómez JC, Cervera J, García-Casado Z, Mena-Durán AV, Valencia A, Barragán E, Such E, Bolufer P, Sanz MA.** MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Apr 15;174(2):127-31. PubMed PMID: 17452254.

**Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL.** Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia.* 2006 Feb;20(2):218-23. PubMed PMID: 16341046.

**Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Vukosavljevic T, Powell BL, Carroll AJ, Koltz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD.** Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5164-7. Epub 2007 Mar 6. PubMed PMID: 17341662; PubMed Central PMCID: PMC1890839.

**Reference: NPM1-MLF1, t(3;5)(q25.1;q34):**

**Arber DA, Chang KL, Lyda MH, Bedell V, Spielberger R, Slovak ML.** Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Hum Pathol.* 2003 Aug;34(8):809-13. PubMed PMID: 14506644.

**Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, Valentine MB, Raimondi SC, Cohen KJ, Carroll AJ, Morris SW.** The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene.* 1996 Jan 18;12(2):265-75. PubMed PMID: 8570204.

**Reference: PML-RARA, t(15;17)(q22;q21):**

**Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F, et al.** Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 1;88(5):1977-81. PubMed PMID: 1848017; PubMed Central PMCID: PMC51149.

**Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli M, Zangrilli D, Mencarelli A, Diverio D, Biondi A, Lo Coco F, Rambaldi A, Grignani F, et al.** Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 1992 Apr;11(4):1397-407. PubMed PMID: 1314166; PubMed Central PMCID: PMC556589.

## Ostatní reference

- 1) **Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rosenblum BB, Wike C, Gilbert DA, Efcavitch JW.** High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res* 1998; 8: 69-80.
- 2) **Sgueglia JB, Geiger S, Davis J.** Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 1247-54.
- 3) **Gilder JR, Doom TE, Inman K, Krane DE.** Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007; 52: 97-101.
- 4) **Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S.** A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 744-52.
- 5) **Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD.** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.
- 6) **Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, Guignard JC, Jacquemot-Perbal MC, Labarussias M, Leberre V, Malo A, Morel-Pair C, Mossafa H, Potier JC, Texier G, Vigié F, Yau Chun Wan-Senon S, Zasadzinski A, Dessen P.** Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D920-4.
- 7) **Kozu T, Miyoshi H, Shimizu K, Maseki N, Kaneko Y, Asou H, Kamada N, Ohki M.** Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 82: 1270-6.
- 8) **Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK;** National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-65.
- 9) **Studel C, Wermke M, Schaich M, Schäkel U, Illmer T, Ehninger G, Thiede C.** Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 237-51.
- 10) **van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A.** Standardized RTPCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.

