

# Prostatype® RT-qPCR-Kit

Bitte lesen Sie vor Benutzung des Kits aufmerksam diese Gebrauchsanleitung und befolgen Sie die Instruktionen genau, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.



IFU 0017DE, Revision 6, November 2017, Chundsell Medicals AB ([www.chundsell.com/ifu](http://www.chundsell.com/ifu))



CM-01-001



Chundsell Medicals AB  
Industrivägen 19  
SE-17148 Solna, Schweden

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>1. Name und Verwendungszweck</b>	<b>3</b>
<b>2. Zusammenfassung und Erklärung des Testprinzips</b>	<b>3</b>
<b>3. Grundlagen des Verfahrens</b>	<b>3</b>
<b>4. Mitgelieferte Materialien</b>	<b>4</b>
4.1. Lieferumfang	4
4.2. Sicherheitshinweis	5
<b>5. Lagerung und Stabilität</b>	<b>5</b>
<b>6. Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien</b>	<b>5</b>
6.1. Allgemeine Laborausrüstung	5
6.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	5
6.3. Erforderliche Spezialausrüstung und spezielle Verbrauchsmaterialien	6
6.4. Installationsvoraussetzungen	6
<b>7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise</b>	<b>6</b>
7.1. Vorsichtsmaßnahmen im Labor	6
7.2. Mikrobiologischer Status und Infektionsstatus	7
<b>8. Testverfahren</b>	<b>7</b>
8.1. Vorbereitung des LightCycler® 480	7
8.2. Vorbereitung des Prostatype® RT-qPCR-Assays	9
8.3. Analyseinstellungen für den LightCycler® 480	13
8.4. Validität des Prostatype® RT-qPCR Tests	16
8.5. Gültigkeit der einzelnen Patientenproben-Wells	17
<b>9. Datenanalyse der Patientenproben</b>	<b>18</b>
<b>10. Qualitätskontrolle</b>	<b>18</b>
10.1. Externe Kontrollen	18
10.2. Interne Kontrollen	19
<b>11. Grenzen des Verfahrens</b>	<b>19</b>
<b>12. Leistungsmerkmale</b>	<b>19</b>
12.1. RNA-Input	19
12.2. Linearität/Genauigkeit/Quantifizierungsgrenze	19
12.3. Detektionsgrenze (Limit of Detection)	20
12.4. Relative Sensitivität	20
12.5. Leerwert-Grenze (Limit of Blank)	20
12.6. Reproduzierbarkeit	21
12.7. Interferenzen	21
<b>13. Erklärung der verwendeten Piktogramme</b>	<b>22</b>
<b>14. Referenzen</b>	<b>23</b>
<b>15. Kontakt</b>	<b>23</b>

## 1. Name und Verwendungszweck

Das Prostatype® RT-qPCR Kit ist ein One-Step quantitativer Reverse-Transkription-PCR (RT-qPCR)-Assay, der zur Quantifizierung der mRNA der drei Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 in Relation zum Expressionsniveau des GAPDH-Gens dient. Analysiert wird hierbei Gesamt-RNA aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) humanen Prostatakarzinom (PCa)-Kern-Nadelbiopsien.

Das Testergebnis des Prostatype® RT-qPCR-Assays kann zusammen mit anderen gängigen Parametern zur Erstellung einer Prognose für Patienten mit Prostatakarzinom (PCa) hinzugezogen werden, um die Aggressivität des Prostatakarzinoms einzuschätzen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Testprinzips

Das Prostatype® RT-qPCR Kit ist ein One-Step 4-Plex RT-qPCR-Assay. Der Test wurde speziell zur Quantifizierung der Genexpression dreier humaner Biomarker-Gene IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3), F3 (Coagulation Factor III (Thromboplastin, Tissue Factor)) und VGLL3 (Vestigial-like family member 3) entwickelt, die aus humanen Prostatakarzinom-FFPE-Gewebeproben extrahiert und auf das Expressionsniveau des GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase)-Gens normalisiert werden. Das Genexpressionsprofil von IGFBP3, F3 und VGLL3 gilt als hilfreich bei der Einschätzung der Gesamtüberlebensdauer von Patienten mit PCa zum Zeitpunkt der Diagnose [1]. Das Genexpressionsprofil wurde in einer schwedischen Kohorte mit 189 PCa-Patienten charakterisiert, bei denen die Erkrankung zwischen 1986 und 2001 diagnostiziert wurde. Bei dieser Kohorte wurden fast vollständige Follow-up-Daten zum Gesamtüberleben erfasst. Es hat sich gezeigt, dass sich die Patienten durch die Bestimmung des Genexpressionsprofil in die Subtypen „hohes Risiko“, „mäßiges Risiko“ und „geringes Risiko“ einstufen ließen [1]. Weitere Untersuchungen und Verifizierungen zeigten außerdem, dass die Vorhersagegenauigkeit im Hinblick auf das Gesamtüberleben bei PCa signifikant erhöht wird, wenn das Genexpressionsprofil ergänzend zu den übrigen gängigen klinischen Parametern mit einbezogen wird [2].

Der Prostatype® RT-qPCR-Assay evaluiert die Gen-Expressionsniveaus dreier Biomarker in PCa-Gewebeproben. Das Gewebe sollte einen angemessen hohen Anteil an Krebsepithelzellen aufweisen, d.h. um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollte die jeweilige Gewebeprobe zu mindestens 50% aus Krebsepithelzellen bestehen [2]. Die kanzerösen Epithelzellen der Prostata tragen unabhängig vom pathologischen Gleason-Score zur prognostischen Aussagekraft der drei Biomarker-Gene bei, was darauf hin deutet, dass das Genprofil die zugrundeliegenden patho-genetischen Mechanismen von PCa reflektiert [2]. Diese Studie unterstützt zudem die Hypothese einer zugrundeliegenden „Stammzellartigkeit“ („stemness“) bei der Entstehung und Progression von PCa [1,2]. Deshalb empfiehlt es sich, das bei der Analyse eingesetzte Gewebe vorab durch einen Pathologen bewerten zu lassen. Dadurch soll gewährleistet werden, dass ausreichend Probenmaterial vorhanden ist, um eine ausreichende Signalstärke und somit ein aussagekräftiges Testergebnis zu erhalten. Eine detaillierte Anleitung zur Probenahme ist in der Gebrauchsanleitung des „Prostatype® Test System“ enthalten.

Zur Erstellung einer Prognose werden die mit dem Prostatype® RT-qPCR-Kit gemessenen Expressionsniveaus der drei Biomarker-Gene zusammen mit den übrigen gängigen klinischen Parametern unter Verwendung der eigenständigen Software CPMA (Classification of Prostatic Malignancy Algorithm) eingesetzt. Anhand eines Vergleichs mit einer umfassenden, anonymisierten Patientendatenbank kann der Arzt unter Zugrundelegung der dort benannten Gesamtüberlebensdaten bzw. Therapien eine genauere Prognose stellen, als dies bisher möglich war. Zusätzlich wird durch den P-Score die Wahrscheinlichkeit von aggressivem Prostatakrebs individuell für jeden Patienten aufgrund seines klinischen und genetischen Profils abgeschätzt.

## 3. Grundlagen des Verfahrens

Die Prostatype® RT-qPCR wurde als ein One-Step RT-qPCR Assay konzipiert. Das Kit enthält alle Reagenzien zur Durchführung der reversen Transkription (RT), Amplifikation und Detektion von mRNA

anhand einer quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem 4-Plex Reaktionsmix. Jede Messung erfolgt in Dreifachbestimmung. Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert und zur Durchführung der RT-qPCR werden keine weiteren Reagenzien benötigt als die im Kit enthaltenen.

Die aus den FFPE-Gewebeproben extrahierte mRNA wird mit Hilfe sequenzspezifischer Primer für die drei Ziel-Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 sowie für das Referenzgen GAPDH *in vitro* in cDNA revers transkribiert. Im Anschluss erfolgt die Amplifikation und Detektion der so erhaltenen cDNA für die vier Gene, wobei dieselben sequenzspezifischen Primer zum Einsatz kommen. Für den genspezifischen Nachweis der Amplifikation werden individuelle, doppelt markierte Hydrolyse-Sonden (Taqman®) verwendet. Die vier Hydrolyse-Sonden sind mit individuellen Fluoreszenzfarbstoffen versehen, die die unabhängige Detektion und Quantifizierung der vier Gene in einem einzigen Reaktionswell ermöglichen. Jede Sonde, die an ein cDNA-Ziel bindet, wird während der Amplifikation der Ziel-DNA hydrolysiert. Hierdurch entstehen unterschiedliche Fluoreszenzsignale in spezifischen Wellenlängen, die vom LightCycler® 480 in den jeweiligen optischen Kanälen erkannt werden.

In jedem PCR-Zyklus verstärken sich die Fluoreszenzsignale weiter und werden in Echtzeit (real-time) gemessen. Der Zyklus, in dem ein einzelnes Fluoreszenzsignal einen vordefinierten Schwellenwert überschreitet, wird als Crossing Point (Cp) bezeichnet. Der Cp-Wert hängt von der anfänglichen Konzentration der Ziel-DNA in der Probe ab: Je mehr Ziel-DNA in der getesteten mRNA-Probe vorliegt, desto geringer ist der Cp-Wert. Das Prostatype® RT-qPCR-Kit misst das Expressionsniveau der drei Ziel-Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 in Relation zum Expressionsniveau des GAPDH-Gens. Dies ermöglicht eine relative Quantifizierung unabhängig von der Inputmenge der Gesamt-mRNA. Die relative Expression wird durch den so genannten „Delta Cp-Wert“ angegeben und wie folgt berechnet:

$$\text{Delta Cp (Ziel-Gen)} = \text{Cp (Ziel-Gen)} - \text{Cp (GAPDH)}.$$

Das Referenzgen GAPDH dient darüber hinaus als interne Kontrolle für die Evaluierung der Probenvalidität und –integrität und zur Überprüfung, ob ausreichend Gesamt-mRNA eingesetzt wurde. Der Prostatype® RT-qPCR-Assay wurde zur Verwendung in Kombination mit dem LightCycler® 480-II oder LightCycler® 480-I konzipiert.

#### 4. Mitgelieferte Materialien

Das Prostatype® RT-qPCR-Kit enthält ausreichend Reagenzien für die Expressionsanalyse von bis zu 16 Patientenproben sowie zwei Kontrollen.

**Hinweis:** Wird das Kit für einen einzelnen Testlauf verwendet, können 16 Patientenproben getestet werden; wird das Kit für zwei getrennte Testläufe verwendet, können 14 Patientenproben getestet werden; bei Aufteilung in drei getrennte Testläufe können 12 Patientenproben getestet werden.

##### 4.1. Lieferumfang

Tabelle 1: Lieferumfang des Prostatype® RT-qPCR Kits

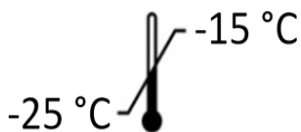
Reagenz	Behälter	Menge
Prostatype Master	1 Röhrchen	> 860 µl
Prostatype Manganese	1 Röhrchen	1 ml
Prostatype Positive Control	1 Röhrchen	> 65 µl
Prostatype Negative Control	1 Röhrchen	> 65 µl

## 4.2. Sicherheitshinweis

Bei der Arbeit mit Chemikalien sollten stets ein Laborkittel und Einweg-Laborhandschuhe getragen werden. Das Prostatype® RT-qPCR-Kit enthält keine gefährlichen oder gesundheitsgefährdenden Bestandteile. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS), die Sie auf unserer Website [http://chundsell.com/msds\\_deutsch/](http://chundsell.com/msds_deutsch/) einsehen und herunterladen können.

## 5. Lagerung und Stabilität

Bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung bleiben die im Prostatype® RT-qPCR-Kit enthaltenen Reagenzien bis zu ihrem Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie die Materialien nicht nach dem Verfallsdatum und mischen Sie keine Komponenten des Prostatype® RT-qPCR-Kits aus verschiedenen Chargen.



Lagern Sie alle Komponenten des Prostatype® RT-qPCR-Kits bei -25 bis -15 °C.

Die einzelnen Komponenten des Prostatype® RT-qPCR-Kits dürfen maximal 2x aufgetaut und wieder eingefroren werden.

## 6. Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

### 6.1. Allgemeine Laborausrüstung

Zur Durchführung des Prostatype® RT-qPCR-Assays ist die folgende Laborausrüstung erforderlich. Alle Geräte müssen nach den Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, bedient und gewartet werden.

- Vortex (z.B. VWR International, Bestellnr. 444-1372 oder gleichwertig)
- Referenzpipetten mit veränderbarem Volumen in folgenden Bereichen: 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (z.B. Eppendorf Reference® von Eppendorf, Bestellnr. 4910 000.018, 4910 000.042 bzw. 4910 000.069 oder gleichwertig)
- Variabler Repeat Pipettor oder Dispenser zur wiederholten Abgabe der entsprechenden Volumina (z.B. Eppendorf Multipette® plus von Eppendorf, Bestellnr. 4981 000.019 oder gleichwertig)
- Zentrifuge mit Rotor für 1,5/2,0-ml-Röhrchen (z.B. Centrifuge 5417 R von Eppendorf, Bestellnr. 5407 000.317 mit Rotor F-45-30-11 von Eppendorf, Bestellnr. 5490 015.002 oder gleichwertig)
- Plattenzentrifuge für PCR-Platten (z.B. Centrifuge 4-16 von Qiagen, Bestellnr. 81320 und 81031 oder gleichwertig)
- Wärmeblock mit Schüttelfunktion (z.B. Eppendorf ThermoMixer® C, Bestellnr. 13527550, oder gleichwertig)

### 6.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

- 2,0 ml Reaktionsgefäße mit rundem Boden, Polypropylen-Klappdeckel und dichtem Verschlussmechanismus (z.B. Sarstedt SafeSeal, Bestellnr. 72.695.400 oder Eppendorf Safe-Lock™, Bestellnr. 0030 120.094 oder gleichwertig)
- Pipettenspitzen mit Aerosolsperre, z.B. ep Dualfilter T.I.P.S.® von Eppendorf:
  - 0,1 – 10 µl, Bestellnr. 0030 077.504 oder gleichwertig

- 2 – 100 µl, Bestellnr. 0030 077.547 oder gleichwertig
- 50 – 1000 µl, Bestellnr. 0030 077.571 oder gleichwertig
- Spitzen für repetitive Pipetten, z.B. Combitips plus® von Eppendorf:
  - 0,5 ml, Bestellnr. 0030 069.226 oder gleichwertig
- Applikator zum Aufbringen der Verschlussfolie auf die Mikroplatte (z.B. LightCycler® 480 Verschlussfolie-Applikator von Roche, Bestellnr. 04706170001)
- DNA-Dekontaminationsreagenz (z.B. DNA AWAY®, VWR, Bestellnr. 732-2353 oder gleichwertig)
- RNase-Dekontaminationsreagenz (z.B. RNase AWAY®, VWR, Bestellnr. 732-2351 oder gleichwertig)

### 6.3. Erforderliche Spezialausrüstung und spezielle Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung des Prostatype® RT-qPCR-Assays sind die nachstehenden Spezialgeräte und Spezial-Verbrauchsmaterialien erforderlich, die nicht durch andere Produkte ersetzt werden dürfen:

- LightCycler® 480 I mit Heizblock für 96 Wells (Roche, Bestellnr. 05015278001) oder LightCycler® 480 II mit Heizblock für 96 Wells (Roche, Bestellnr. 05015278001), jeweils mit Software-Version 1.5.x
- LightCycler® 480 Multiwell-Platte 96 mit Verschlussfolie (Roche, Bestellnr. 04729692001)
- LightCycler® 480 Verschlussfolie (Roche, Bestellnr. 04729757001)

### 6.4. Installationsvoraussetzungen

Bei der Installation, Kalibration, Leistungsverifizierung und Wartung des Roche LightCycler® 480 müssen die Anweisungen des Herstellers befolgt werden.

## 7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

### 7.1. Vorsichtsmaßnahmen im Labor

Das Testverfahren darf nur in professionellen Laboren von Personen durchgeführt werden, die mit der Handhabung von RNA und der Durchführung von real-time PCR-Assays vertraut sind.

Die Einhaltung der Regeln zur Guten Laborpraxis ist äußerst wichtig, um das Risiko der Kreuzkontamination zwischen den Proben während und nach der RNA-Extraktion sowie während des Reinigungsverfahrens zu minimieren.

Vermeiden Sie bakterielle Kontamination der Reagenzien, wenn Sie den Reagenzienflaschen die Aliquote entnehmen. Vermeiden Sie ebenfalls während des Testverfahrens die Einbringung von RNasen in die Proben und Kontrollen. Tragen Sie stets einen Laborkittel und Einweg-Laborhandschuhe. Idealerweise sollten RNA-Tests ausschließlich an einem speziell dafür vorgesehenen Ort im Labor durchgeführt werden. Darüber hinaus müssen vor Gebrauch des Prostatype® RT-qPCR-Kits alle Oberflächen, Materialien und Ausrüstungsgegenstände/Geräte mit einem RNase-Dekontaminationsreagenz behandelt werden (z.B. RNase AWAY®).

Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination der Patientenproben wird die Verwendung steriler Pipettenspitzen mit Aerosolsperre empfohlen.

Zur Vermeidung einer Kontamination durch Amplifikate aus früheren PCR-Läufen empfehlen wir die strikte Trennung zwischen den Aktivitäten vor (z.B. RNA-Extraktion, Reinigung, PCR-Vorbereitung) und nach der PCR (z.B. real-time-PCR). Weiterhin empfehlen wir, benutzte PCR-Platten so zu entsorgen, dass keine PCR-Produkte freigesetzt werden können; z.B. sollten die PCR-Platten sofort nach ihrer Entnahme aus dem PCR-Gerät in einen wiederverschließbaren Plastikbeutel (oder eine gleichwertige

Verpackung) gegeben werden, dann sollte der Beutel in einen speziell dafür vorgesehenen Abfallbehälter gegeben werden. Lagern Sie niemals eine benutzte PCR-Platte außerhalb des PCR-Geräts. Öffnen Sie auch niemals eine benutzte PCR-Platte. Darüber hinaus sollten vor Gebrauch des Prostatype® RT-qPCR-Kits alle Oberflächen, Materialien und Ausrüstungsgegenstände/Geräte mit einem DNase-Dekontaminationsreagenz behandelt werden (z.B. DNA AWAY®).

Die Vorbereitung der Prostatype® RT-qPCR sollte bei Zimmertemperatur erfolgen (15 – 25 °C).

## 7.2. Mikrobiologischer Status und Infektionsstatus

Das Produkt enthält keine infektiösen Substanzen oder Stoffe, die bei Mensch oder Tier Erkrankungen auslösen.

## 8. Testverfahren

**Hinweis:** Vor dem Test muss die RNA-Extraktion aus den Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben erfolgen. Die Verwendung des folgenden, kommerziell erhältlichen RNA-Extraktionskits wird empfohlen: Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Purification Kit (Promega, Bestellnr. AS1260). Die RNA-Extraktion erfolgt halbautomatisch und muss gemäß den Anweisungen des Herstellers erfolgen, jedoch mit folgenden Modifikationen:

- 1) Nach der Zugabe von Mineralöl wird der Inkubationsschritt bei 80°C für 2 min unter Schütteln bei 1200 rpm durchgeführt.
- 2) Verdau des Gewebes: Die Inkubationsschritte bei 56°C für 15 min sowie bei 80°C für 1 Stunde werden unter Schütteln bei 650 rpm durchgeführt.

**Hinweis:** Das Prostatype® RT-qPCR-Kit wurde validiert, um einen Cp (GAPDH)  $\leq 28$  mit etwa 95% Wahrscheinlichkeit zu generieren, wenn bei der Probenahme folgende Kriterien erfüllt wurden: 1) Es handelt sich um ungefärbte FFPE-Gewebeschnitte aus Kern-Nadelbiopsien. 2) Die Schnitte weisen eine Dicke von 10  $\mu\text{m}$  auf. 3) Die verwendete Tumorregion ist mindestens 30  $\text{mm}^2$  groß und hat einen Tumorzellenanteil von  $>50\%$  (1/2).

Für Proben mit einer Tumorregion zwischen 15  $\text{mm}^2$  und 30  $\text{mm}^2$  mit einem Tumorzellenanteil von 50% ist es dennoch sinnvoll, mit der RNA-Extraktion und dem Prostatype® RT-qPCR-Test fortzufahren, da die Wahrscheinlichkeit der Erzielung eines Cp (GAPDH)  $\leq 28$  bei diesen Proben immer noch bei  $>90\%$  liegt. Für Proben mit einer Tumorfläche zwischen  $<15\text{mm}^2$  bei 50% Tumorzellenanteil, liegt die Wahrscheinlichkeit, Cp(GAPDH)-Werte  $\leq 28$  zu generieren bei etwa 80%. Proben mit  $<5\text{mm}^2$  Tumorfläche sind nicht für ein Testen mit dem Prostatype RT-qPCR Kit geeignet

### 8.1. Vorbereitung des LightCycler® 480

Vor der ersten Durchführung des Prostatype® RT-qPCR-Tests muss auf dem LightCycler® 480 eine Color Compensation Datei gespeichert werden. Allgemeine Informationen zur Durchführung der Color Compensation finden Sie im LightCycler® 480 Benutzerhandbuch. Die Reagenzien für die Durchführung der Color Compensation, die beim Prostatype® RT-qPCR-Kit erforderlich ist, kann von Chundsell Medicals AB bezogen werden (Prostatype® RT-qPCR Color Compensation Plate; Best.-Nr. CMC-001).

#### 8.1.1. Speichern eines neuen Detektionsformats auf dem LightCycler® 480 I

**Hinweis:** Nachstehend wird die Konfiguration des LightCycler® 480 I beschrieben. Die entsprechenden Informationen für den LightCycler® 480 II finden Sie weiter unten.

Vor der ersten Verwendung des Prostatype® RT-qPCR-Tests auf dem LightCycler® 480 I muss ein neues Detektionsformat eingerichtet werden, siehe Abbildung 1.

- Starten Sie die Softwareversion 1.5.x.
- Klicken Sie auf „Open Tools“.
- Klicken Sie in der Tools-Anzeige auf „Detection Formats“.
- Klicken Sie auf „New“ und benennen Sie das neue Detektionsformat, z.B. „Prostatype-Kanäle“.
- Kreuzen Sie folgende Filterkombinationen an:
  - Filterkombination 1: 523 – 568
  - Filterkombination 2: 558 – 610
  - Filterkombination 3: 483 – 533
  - Filterkombination 4: 615 – 670
- Ändern Sie die Namen der Filterkombinationen wie folgt:
  - 523 – 568: GAPDH
  - 558 – 610: IGFBP3
  - 483 – 533: F3
  - 615 – 670: VGLL3
- Ändern Sie die Filtereinstellungen für jede Kombination wie folgt:
  - Melt Factor: 1
  - Quant Faktor: 10
  - Max Integration Time (Sec): 2

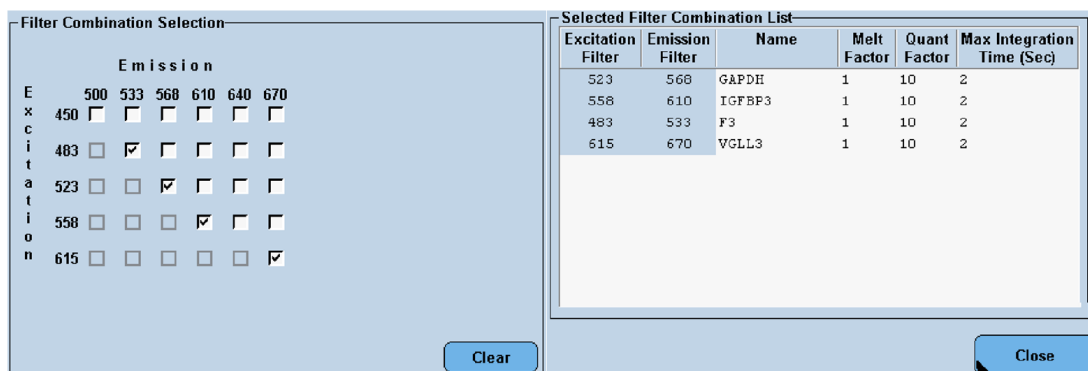


Abbildung 1: Filterkombination des Prostatype® RT-qPCR Assays auf dem LightCycler® 480 I

### 8.1.2. Speichern eines neuen Detektionsformats auf dem LightCycler® 480 II

**Hinweis:** Nachstehend wird die Konfiguration des LightCycler® 480 II beschrieben. Die entsprechenden Informationen für den LightCycler® 480 I finden Sie weiter oben.

Vor der ersten Verwendung des Prostatype® RT-qPCR-Tests auf dem LightCycler® 480 II muss ein neues Detektionsformat eingerichtet werden, siehe Abbildung 2.

- Starten Sie die Software-Version 1.5.x.
- Klicken Sie auf „Open Tools“.
- Klicken Sie in der Tools-Anzeige auf „Detection Formats“.
- Klicken Sie auf „New“ und benennen Sie das neue Detektionsformat, z.B. „Prostatype-Kanäle“.
- Kreuzen Sie alle nachstehenden Filterkombinationen an:
  - Filterkombination 1: 533 – 580
  - Filterkombination 2: 533 – 640
  - Filterkombination 3: 465 – 510
  - Filterkombination 4: 618 – 660



- Ändern Sie die Namen der Filterkombinationen wie folgt:
  - 533 – 580: GAPDH
  - 533 – 640: IGFBP3
  - 465 – 510: F3
  - 618 – 660: VGLL3
- Ändern Sie die Filtereinstellungen für jede Kombination wie folgt:
  - Melt factor: 1
  - Quant factor: 10
  - Max Integration Time (Sec): 2

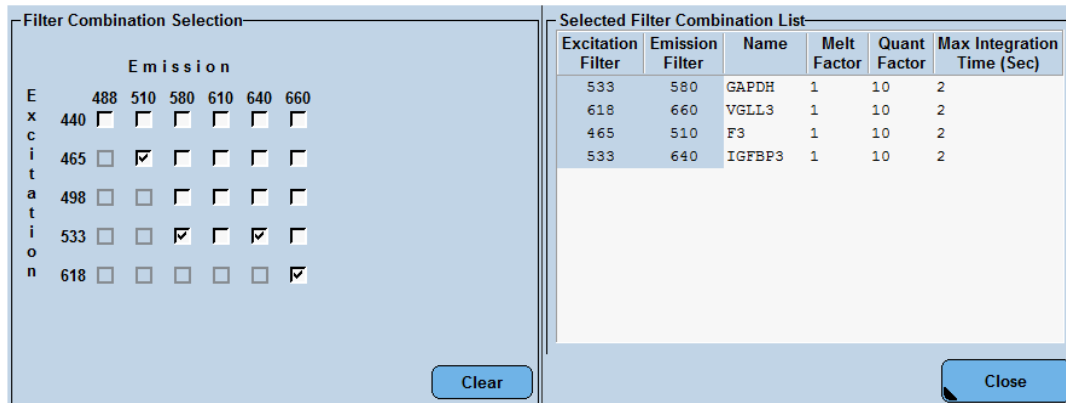


Abbildung 2: Filterkombination des Prostatype® RT-qPCR Assays auf dem LightCycler® 480 II

## 8.2. Vorbereitung des Prostatype® RT-qPCR-Assays

Das Prostatype® RT-qPCR-Kit enthält eine ausreichende Reagenzienmenge für bis zu 16 Patientenproben plus zwei Kontrollen. Jede RNA-Probe (Patienten-RNA-Probe, Prostatype Positivkontrolle oder Prostatype Negativkontrolle) muss dreifach getestet werden. Bei jedem separaten Lauf muss die Prostatype Positivkontrolle und die Prostatype Negativkontrolle mitanalysiert werden.

**Hinweis:** Zur optimalen Ausnutzung der Reagenzien im Prostatype® RT-qPCR-Kit sollten die Proben zusammen abgearbeitet werden. Bei der Einzeltestung von Proben wird mehr Reagenzienvolumen verbraucht, so dass sich die Anzahl der mit dem Prostatype® RT-qPCR-Kit zu analysierenden Proben verringert.

**Hinweis:** Mit den mitgelieferten Kitreagenzien können bis zu drei einzelne PCR-Läufe durchgeführt werden. Lagern Sie die Reagenzien zwischen den Läufen bei -25 bis -15 °C.

**Hinweis:** Bei vielen Schritten dieser Testanweisung ist ein kurzes Zentrifugieren der Mikroröhrchen erforderlich („Die Röhrchen kurz zentrifugieren“), um die Tröpfchen vom Deckel zu lösen oder um verbleibende Flüssigkeit zu sammeln und zu vereinen. Es wird empfohlen, die Röhrchen 10 - 20 Sekunden bei  $1.000 \pm 150$  rcf zu zentrifugieren.

**Hinweis:** Bei vielen Schritten dieser Testanweisung ist ein kurzes Vortexen der Röhrchen und Behälter erforderlich, um eine homogene Mischung der Flüssigkeit zu gewährleisten. Es wird empfohlen, die Röhrchen bzw. Behälter 15 - 20 Sekunden bei mittlerer Geschwindigkeit im Vortex zu mischen. Dies ist sehr wichtig, um die Reagenzien gründlich zu mischen und verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

**Hinweis:** Falls zwei getrennte Testläufe durchgeführt werden, können 14 Patientenproben analysiert werden, bei drei getrennten Läufen genügt die Reagenzienmenge für 12 Patientenproben.

**Wichtig:** Vor der ersten Durchführung des Prostatype® RT-qPCR-Tests muss auf dem LightCycler® 480 ein Color Compensation-Lauf durchgeführt werden. Auf jedem LightCycler® 480 Gerät, auf dem der Prostatype® RT-qPCR-Test durchgeführt wird, ist eine separate Color Compensation Datei erforderlich. Allgemeine Informationen zur Erstellung der Color Compensation Datei finden Sie im LightCycler® 480 Benutzerhandbuch.

## 8.2.1. Auftauen der Komponenten

Lassen Sie jeweils 1 Röhrchen Prostatype Master, Prostatype Manganese, Prostatype Positivkontrolle und Prostatype Negativkontrolle **25 bis 35 Minuten** bei Zimmertemperatur auftauen (15 – 25 °C).

**Hinweis:** Vortexen Sie die Reagenzien 3 x 15 - 20 Sekunden vor Herstellung des Master-Mix.

## 8.2.2. Herstellung des Master Mix

**Hinweis:** Stellen Sie sicher, dass die PCR-Vorbereitungszeit vom Beginn der Master Mix-Herstellung bis zum Start der PCR-Platte nicht mehr als **90 Minuten** beträgt.

**Hinweis:** Bei jedem einzelnen Lauf müssen eine Prostatype Positivkontrolle und eine Prostatype Negativkontrolle mitanalysiert werden.

**Hinweis:** Jede RNA-Probe (Patienten-RNA-Probe, Prostatype Positivkontrolle oder Prostatype Negativkontrolle) muss dreifach getestet werden.

- Mischen Sie das Prostatype Master-Röhrchen und das Prostatype Manganese-Röhrchen sanft im Vortex und zentrifugieren Sie die Röhrchen anschließend kurz.
- Übertragen Sie in Abhängigkeit der zu testenden Proben (Anzahl von Patientenproben + 2 Kontrollen) die jeweiligen Mengen von Prostatype Master und Prostatype Manganese in ein 2,0-ml-Reaktionsföhrchen, siehe Tabelle 2.
- Mischen Sie den Master Mix sanft im Vortex.
- Zentrifugieren Sie den Master Mix kurz, um die Tropfen vom Deckel zu lösen.

**Hinweis:** Master Mix nicht lagern, sondern unmittelbar verwenden. Nicht benutzte Mengen Prostatype Master und Prostatype Manganese direkt nach Gebrauch wieder tiefkühlen. Alle Bestandteile des Prostatype® RT-qPCR-Kits können je zweimal aufgetaut und wieder tiefgekühlt werden.

Tabelle 2: Herstellung des Master Mix

Anzahl von Proben	Anzahl von Wells in der PCR-Platte	Volumen Prostatype Master	Volumen Prostatype Manganese
16 Proben (+2 Kontrollen)	54 Wells	823,0 µl	84,2 µl
15 Proben (+2 Kontrollen)	51 Wells	777,3 µl	79,5 µl
14 Proben (+2 Kontrollen)	48 Wells	731,6 µl	74,8 µl
13 Proben (+2 Kontrollen)	45 Wells	685,8 µl	70,2 µl
12 Proben (+2 Kontrollen)	42 Wells	640,1 µl	65,5 µl
11 Proben (+2 Kontrollen)	39 Wells	594,4 µl	60,8 µl
10 Proben (+2 Kontrollen)	36 Wells	548,7 µl	56,1 µl
9 Proben (+2 Kontrollen)	33 Wells	503,0 µl	51,4 µl
8 Proben (+2 Kontrollen)	30 Wells	457,2 µl	46,8 µl
7 Proben (+2 Kontrollen)	27 Wells	411,5 µl	42,1 µl
6 Proben (+2 Kontrollen)	24 Wells	365,8 µl	37,4 µl
5 Proben (+2 Kontrollen)	21 Wells	320,1 µl	32,7 µl
4 Proben (+2 Kontrollen)	18 Wells	274,3 µl	28,1 µl
3 Proben (+2 Kontrollen)	15 Wells	228,6 µl	23,4 µl
2 Proben (+2 Kontrollen)	12 Wells	182,9 µl	18,7 µl
1 sample (+2 Kontrollen)	9 Wells	137,2 µl	14,0 µl

### 8.2.3. Vorbereitung der Platten

**Hinweis:** Bei einer höheren Anzahl zu testender Proben empfiehlt sich der Einsatz einer Repetierpipette für das Vorlegen des Master Mixes.

Bereiten Sie die PCR-Platte wie folgt vor. Die empfohlene Plattenbelegung wird in Tabelle 3 gezeigt.

- Geben Sie 15 µl Master Mix in jedes ausgewählte Well einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 96.
- Mischen Sie die Patienten-RNA-Proben, die Prostatype Positivkontrolle und die Prostatype Negativkontrolle sanft im Vortex und zentrifugieren Sie die Rörchen anschließend kurz.
- Geben Sie 5 µl der Patienten-RNA-Proben, der Prostatype Positivkontrolle und der Prostatype Negativkontrolle in die entsprechenden Wells der PCR-Platte.
- Stellen Sie sicher, dass alle Proben dreifach getestet werden.
- Versiegeln Sie die PCR-Platte mit LightCycler® 480 Verschlussfolie.
- Zentrifugieren Sie die PCR-Platte kurz in einer Plattenzentrifuge (2 Minuten bei 2.000 ± 100 rcf).
- Starten Sie die PCR-Platte innerhalb von **30 Minuten** nach ihrer Vorbereitung.

**Hinweis:** Nicht benutzte Mengen Prostatype Positivkontrolle und Prostatype Negativkontrolle direkt nach Gebrauch wieder tiefkühlen. Alle Bestandteile des Prostatype® RT-qPCR-Kits können je zweimal aufgetaut und wieder tiefgekühlt werden.

Tabelle 3: Empfohlene Plattenbelegung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	PC	PC	NC	NC	NC	S1	S1	S1	S2	S2	S2
B	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6
C	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S10	S10	S10
D	S11	S11	S11	S12	S12	S12	S13	S13	S13	S14	S14	S14
E	S15	S15	S15	S16	S16	S16						
F												
G												
H												

PC: Prostatype Positivkontrolle, NC: Prostatype Negativkontrolle, S: Patientenprobe

## 8.2.4. Einsetzen und Starten der PCR Platte

**Hinweis:** Starten Sie die PCR-Platte innerhalb von 30 Minuten nach Abschluss der Plattenvorbereitung.

**Hinweis:** Es wird empfohlen, in der LightCycler® 480 Software ein Template mit den festgelegten Laufeinstellungen zu speichern.

- Starten Sie die Software-Version 1.5.x.
- Legen Sie ein neues Experiment an, indem Sie auf „New Experiment“ klicken.
- Laden Sie das Template für den betreffenden Lauf oder definieren Sie das folgende Experiment gemäß den in Tabelle 4 und der Abbildung 3 angegebenen PCR Programmparametern.
- Wählen Sie das Detektionsformat, wie gemäß 8.1.1 oder 8.1.2 angelegt (z.B. „Prostatype-Kanäle“).
- Klicken Sie auf „Subset Editor“ und erstellen Sie so ein Proben-Subset mit allen benutzten Wells, wie im LightCycler® 480 Bedienerhandbuch beschrieben.
- Geben Sie für jede der 3 Replikate jeder Probe eine unverwechselbare Proben-ID ein.
- Speichern Sie das Experiment unter einem unverwechselbaren Namen.
- Öffnen Sie den Platten-Einschub.
- Setzen Sie die PCR-Platte in den Rahmen ein (Position A1 kommt in die obere linke Ecke) und vergewissern Sie sich, dass die Platte genau im Rahmen sitzt. Schließen Sie dann den Platten-Einschub.
- Klicken Sie auf „Start Run“.

Tabelle 4: Das Standard-PCR-Programm für den LightCycler® 480

Programmparameter	RT-Step	Cycling		Cooling
Analysis Mode	None	Quantification mode		None
Cycles	1	40		1
Segment	1	1	2	1
Target [°C]	63	92	60	40
Hold [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:40	00:00:10
Ramp Rate [°C/s]*	1,6	1,6	1,6	1,6
Acquisition Mode	None	None	Single	None

\* Wählen Sie das gemäß Abschnitt 8.1. angelegte Detektionsformat; aktivieren Sie die Filterkombinationen für GAPDH, IGFBP3, F3 und VGLL3 und stellen Sie das Reaktionsvolumen („Reaction Volume“) auf „20“ ein.

The screenshot shows the software interface for configuring a PCR program. It is divided into three sections: A, B, and C.

**Section A: Programs**

Program Name	Cycles	Analysis Mode
RT-step	1	None
cycling	40	Quantification
cooling	1	None

**Section B: cycling Temperature Targets**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
92	None	00:00:05	1,6		0	0	0
60	Single	00:00:40	1,6		0	0	0

**Section C: cooling Temperature Targets**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:10	1,6		0	0	0

Abbildung 3: Screenshot der LightCycler® 480 Software v1.5: Lauf-Protokoll des Prostate® RT-qPCR Kits. A: Details des RT-Schritts. B: Details des Cycling-Schritts. C: Details des Cooling-Schritts.

### 8.3. Analyseneinstellungen für den LightCycler® 480

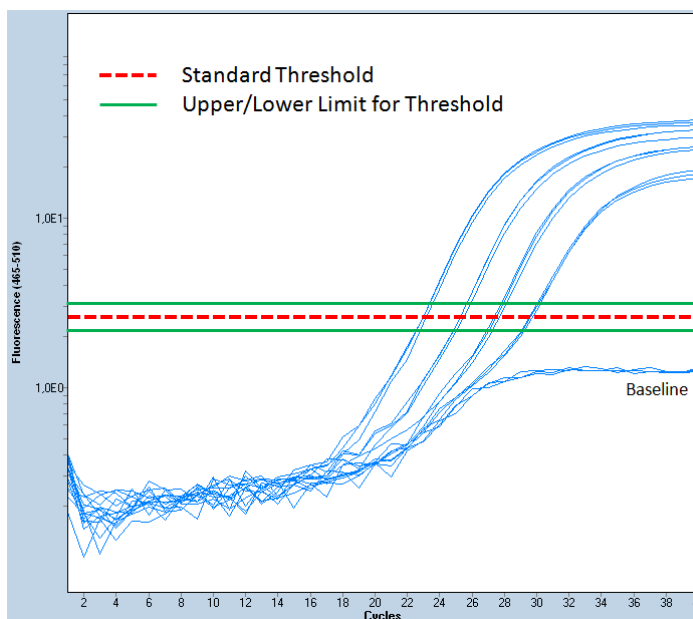
#### 8.3.1. Allgemeines

Um eine zuverlässige Quantifizierung zu gewährleisten, muss sich der Crossing Point („Cp“, Kreuzungspunkt) einer Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert („threshold“) in der frühen exponentiellen Phase einer PCR befinden (exponentielle Phase = das gerade Segment einer PCR-Kurve bei Darstellung auf einer logarithmischen Skala).

Zur Gewährleistung zuverlässiger Cp-Werte kann eine Anpassung des Schwellenwerts erforderlich sein. Hierzu kann die horizontale Schwellenwert-Linie im Amplifikationsdiagramm manuell angepasst werden; dabei müssen die folgenden Regeln eingehalten werden (siehe Abbildung 4 unten):

1. Der Schwellenwert muss die PCR-Kurven in der frühen exponentiellen Phase kreuzen.
2. Der Schwellenwert muss sich oberhalb der Grundlinie der PCR-Kurven befinden.
3. Der Schwellenwert muss innerhalb der definierten Unter- und Obergrenzen des „STD Multipliers“ befinden, wie in Abschnitt 8.3.2. für jedes einzelne Gen angegeben.

Jedes Amplifikationssignal ist visuell auf unregelmäßige Amplifikation zu prüfen. Den Schwellenwert kreuzende Signale infolge inkonsistenter Datenpunkte (Rausch-Höchstwerte) sowie lineare Kurvenformen werden nicht evaluiert. Im Falle einer irregulären Amplifikation muss das betreffende Well von der Analyse ausgeschlossen werden, indem das „Include“-Kreuzchen bei dieser Probe in der Proben-tabelle entfernt wird.



**Abbildung 4:** Screenshots der Amplifizierungskurven auf dem LightCycler® 480 (logarithmische Skala). Die rote unterbrochene Linie zeigt den Schwellenwert („threshold“) unter Verwendung der Standard-„STD Multiplier“-Werte wie in Abschnitt 8.3.2. angegeben. Der Schwellenwert kann bei Bedarf innerhalb der Unter- und Obergrenzen angepasst werden.

### 8.3.2. Analyseverfahren

**Hinweis:** Führen Sie die Datenanalyse nur für benutzte Wells durch, indem Sie ein entsprechendes Proben-Subset anlegen, wie im LightCycler® 480 Benutzerhandbuch beschrieben.

- Nach Ende des Laufs klicken Sie im LightCycler® 480 Basic Software Modul-Balken auf „Analysis“, um die Anzeige „Analysis Overview“ zu öffnen.
- Wählen Sie die Option „Abs Quant/Fit Points“.
- Wählen Sie in der Anzeige „Create new analysis“ das entsprechende Subset mit allen benutzten Wells und bestätigen Sie die Auswahl.
- Aktivieren Sie die Color Compensation, indem Sie die Pfeiltaste neben der Option „Color Comp (Off)“ drücken; dann klicken Sie auf „In Use“ und wählen die entsprechende Color Compensation-Datei.
- Stellen Sie die Option „First Cycle“ auf „1“ ein und die Option „Last Cycle“ auf „40“.
- Stellen Sie den Hintergrund auf „6 - 11“ ein (klicken Sie hierzu auf den blauen Button „Background“), indem Sie in der Anzeige „Cycle Range“ die Option „Min Offset“ auf „5“ und „Max Offset“ auf „10“ einstellen.

## **GAPDH:**

- Aktivieren Sie die entsprechende Filterkombination für GAPDH:
  - LightCycler® 480 I: „Filter Comb 523 – 568“
  - LightCycler® 480 II: „Filter Comb 533 – 580“
- Stellen Sie in der „Noise Band“-Anzeige das Noise Band auf „Noise Band (STD Mult)“ und die Option „STD Multiplier“ manuell auf „**50.0**“ ein.
- Bei Bedarf kann der Schwellenwert manuell gemäß den Regeln in Abschnitt 8.3.1. angepasst werden. Stellen Sie sicher, dass der angezeigte „STD Multiplier“-Wert zwischen **40.0** und **60.0** liegt.
- Stellen Sie sicher, dass der Schwellenwert („threshold“) in der „Analysis“-Anzeige dem „Noise Band“-Wert entspricht.
- Stellen Sie sicher, dass die Anzahl von Fit Points „2“ beträgt.
- Klicken Sie auf „Calculate“.
- Der GAPDH-Crossing Point („Cp“, Kreuzungspunkt) für jede Probe ist in der Proben­tabelle angegeben.
- Exportieren Sie die Cp-Werte durch rechten Mausklick innerhalb der Proben­tabelle. Wählen Sie die Option „Export“. Speichern Sie die Datei unter dem Experimentnamen unter Einbeziehung des Gen-Namens „GAPDH“.

## **IGFBP3:**

- Aktivieren Sie die entsprechende Filterkombination für IGFBP3:
  - LightCycler® 480 I: „Filter Comb 558 – 610“
  - LightCycler® 480 II: „Filter Comb 533 – 640“
- Lassen Sie alle Einstellungen unverändert wie zuvor, mit einer Ausnahme:
- Stellen Sie den STD Multiplier in der „Noise Band“-Anzeige manuell auf „**35.0**“ ein.
- Bei Bedarf kann der Schwellenwert manuell gemäß den Regeln in Abschnitt 8.3.1. angepasst werden. Stellen Sie sicher, dass der angezeigte „STD Multiplier“-Wert zwischen **28.0** und **42.0** liegt.
- Stellen Sie sicher, dass der Schwellenwert („threshold“) in der „Analysis“-Anzeige mit dem „Noise Band“-Wert übereinstimmt.
- Stellen Sie sicher, dass die Anzahl von Fit Points „2“ beträgt.
- Klicken Sie auf „Calculate“.
- Der IGFBP3-Crossing Point („Cp“, Kreuzungspunkt) für jede Probe wird in der Proben­tabelle angezeigt. Exportieren Sie die Cp-Werte durch rechten Mausklick innerhalb der Proben­tabelle.
- Wählen Sie die Option „Export“. Speichern Sie die Datei unter dem Experimentnamen unter Einbeziehung des Gen-Namens „IGFBP3“.

## **F3:**

- Aktivieren Sie die entsprechende Filterkombination für F3:
  - LightCycler® 480 I: „Filter Comb 483 – 533“
  - LightCycler® 480 II: „Filter Comb 465 – 510“
- Lassen Sie alle Einstellungen unverändert wie zuvor, mit einer Ausnahme:
- Stellen Sie den STD Multiplier in der „Noise Band“-Anzeige manuell auf „**80.0**“ ein.
- Bei Bedarf kann der Schwellenwert manuell gemäß den Regeln in Abschnitt 8.3.1. angepasst werden. Stellen Sie sicher, dass der angezeigte „STD Multiplier“-Wert zwischen **64.0** und **96.0** liegt.

- Stellen Sie sicher, dass der Schwellenwert („threshold“) in der „Analysis“-Anzeige dem „Noise Band“-Wert entspricht.
- Stellen Sie sicher, dass die Anzahl von Fit Points „2“ beträgt.
- Klicken Sie auf „Calculate“.
- Der F3 Crossing Point („Cp“, Kreuzungspunkt) für jede Probe ist in der Proben­tabelle angegeben.
- Exportieren Sie die Cp-Werte durch rechten Mausklick innerhalb der Proben­tabelle. Wählen Sie die Option „Export“. Speichern Sie die Datei unter dem Experimentnamen unter Einbeziehung des Gen-Namens „F3“.

### **VGLL3:**

- Aktivieren Sie die entsprechende Filterkombination für VGLL3:
  - LightCycler® 480 I: „Filter Comb 615 – 670“
  - LightCycler® 480 II: „Filter Comb 618 – 660“
- Lassen Sie alle Einstellungen unverändert wie zuvor, mit einer Ausnahme:
- Stellen Sie den STD Multiplier in der „Noise Band“-Anzeige manuell auf „**27.5**“ ein.
- Bei Bedarf kann der Schwellenwert manuell gemäß den Regeln in Abschnitt 8.3.1. angepasst werden. Stellen Sie sicher, dass der angezeigte „STD Multiplier“-Wert zwischen **22.0** und **33.0** liegt.
- Stellen Sie sicher, dass der Schwellenwert („threshold“) in der „Analysis“-Anzeige dem „Noise Band“-Wert entspricht.
- Stellen Sie sicher, dass die Anzahl von Fit Points „2“ beträgt.
- Klicken Sie auf „Calculate“.
- Der VGLL3 Crossing Point („Cp“, Kreuzungspunkt) für jede Probe ist in der Proben­tabelle angegeben.
- Exportieren Sie die Cp-Werte durch rechten Mausklick innerhalb der Proben­tabelle. Wählen Sie die Option „Export“. Speichern Sie die Datei unter dem Experimentnamen unter Einbeziehung des Gen-Namens „VGLL3“.

## **8.4. Validität des Prostate® RT-qPCR Tests**

Der Prostate® RT-qPCR-Lauf ist gültig, wenn die in den nachstehenden Tabellen angegebenen Kriterien für die Prostate Positivkontrolle und die Prostate Negativkontrolle erfüllt sind.

Falls die Prostate Positivkontrolle oder die Prostate Negativkontrolle (oder beide) ungültig sind, können die Daten der Patientenproben nicht interpretiert werden. Dann muss der Test für alle in diesem Lauf enthaltenen Patientenproben wiederholt werden.

**Hinweis:** Verwenden Sie für die nachstehenden Berechnungen die medianen Cp-Werte/Delta-Cp-Werte der drei Replikate einer jeden Probe. „Median“ bezieht sich auf den mittleren Wert bei Anordnung aller Werte vom niedrigsten zum höchsten (siehe Beispiel in Tabelle 9 auf Seite 22). Falls nur zwei Werte vorliegen, wird der Mittelwert/Durchschnitt dieser beiden Werte verwendet. Für die Kontrollen und Patientenproben müssen jeweils drei PCR-Replikate durchgeführt und ausgewertet werden. Bei irregulären Kurven kann eines der drei Ergebnisse ausgelassen werden, so dass mindestens zwei Replikate für die Auswertung verbleiben.

### **8.4.1. Evaluierung der Prostate Positivkontrolle**

- Vergewissern Sie sich, dass die Ergebnisse von mindestens zwei PCR-Replikaten der Positivkontrolle vorliegen.
- Falls für ein Gen kein Cp-Wert angegeben wird, verwenden Sie die Zahl „**38**“ als „simulierten Cp-Wert“ für die Berechnung des Delta-Cp-Wertes.
- Ermitteln Sie den medianen Cp-Wert für GAPDH.



- Vergewissern Sie sich, dass die Validitätsgrenze für GAPDH erfüllt ist:

Tabelle 5: GAPDH-Cp-Validitätsgrenze der Prostatype Positivkontrolle.

Gen	Cp-Validitätsgrenze
GAPDH	$20,00 \leq \text{Medianer Cp-Wert} \leq 22,00$

- Berechnen Sie die Delta-Cp-Werte für IGFBP3, F3 und VGLL3 für jedes Well gemäß der nachstehenden Formel:

$$\text{Delta Cp} = \text{Cp Wert} - \text{Cp Wert [GAPDH]}$$

*(wobei Gen IGFBP3, F3 oder VGLL3 ist)*

- Ermitteln Sie die medianen Delta-Cp-Werte für IGFBP3, F3 und VGLL3.
- Vergewissern Sie sich, dass die Validitätsgrenzen für IGFBP3, F3 und VGLL3 erfüllt sind:

Tabelle 6: Delta-Cp-Validitätsgrenzen der Prostatype Positivkontrollen

Gen	Delta-Cp-Validitätsgrenzen
IGFBP3	$1,90 \leq \text{Medianer Delta-Cp-Wert} \leq 3,90$
F3	$0,90 \leq \text{Medianer Delta-Cp-Wert} \leq 2,90$
VGLL3	$2,80 \leq \text{Medianer Delta-Cp-Wert} \leq 4,80$

#### 8.4.2. Evaluierung der Prostatype Negativkontrolle

- Vergewissern Sie sich, dass die Ergebnisse von mindestens zwei PCR-Replikaten der Negativkontrolle vorliegen.
- Ermitteln Sie den medianen Cp-Wert für GAPDH.
- Vergewissern Sie sich, dass die Validitätsgrenzen für die Prostatype Negativkontrolle erfüllt sind:

Tabelle 7: Validitätsgrenzen der Prostatype Negativkontrollen

Gen	Cp-Validitätsgrenzen
GAPDH	$29,00 \leq \text{Medianer Cp-Wert} \leq 31,00$
IGFBP3, F3, VGLL3	Kein Cp-Wert

#### 8.5. Gültigkeit der einzelnen Patientenproben-Wells

Nur wenn die externen Kontrollen gemäß Abschnitt 8.4 gültig sind, dürfen die Ergebnisse der internen Kontrollen für jede Patientenprobe evaluiert werden. Ein einzelnes Well ist gültig, wenn das Kriterium der internen Kontrolle gemäß Tabelle 8 erfüllt ist.

- Vergewissern Sie sich, dass die Validitätsgrenze für einzelne Patientenproben-Well erfüllt ist:

Tabelle 8: Validitätsgrenze der Patientenproben

Gen	Cp-Validitätsgrenze
GAPDH	Medianer Cp-Wert $\leq$ 28,00

- Stellen Sie sicher, dass mindestens zwei Patientenproben-Well dieses Kriterium erfüllen.

Wenn ein Patientenproben-Well die Validitätsgrenze überschreitet, dürfen die Daten dieses Patientenproben-Well nicht ausgewertet werden. Für die weitere Datenanalyse sind mindestens zwei gültige Patientenproben-Well erforderlich, sonst ist das Ergebnis für diese Patientenprobe ungültig und die entsprechende Patientenprobe muss neu getestet werden.

## 9. Datenanalyse der Patientenproben

Sind alle in Abschnitt 8.4 und 8.5 erläuterten Anforderungen erfüllt, so sind die Ergebnisse einer einzelnen Probe gültig und dürfen berechnet und berichtet werden. Das mRNA-Expressionsniveau der drei Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 in Relation zum Expressionsniveau des Gens GAPDH wird durch den medianen Delta-Cp-Wert angegeben, der wie nachstehend beschrieben ermittelt wird. In Tabelle 9 finden Sie ein Beispiel für die Berechnung des medianen Delta-Cp-Werts für eines der Gene.

- Berechnen Sie die Delta-Cp-Werte für IGFBP3, F3 und VGLL3 für jedes Well gemäß der nachstehenden Formel:

$$\text{Delta Cp Wert} = \text{Cp Wert} - \text{Cp Wert [GAPDH]}$$

(wobei Gen IGFBP3, F3 oder VGLL3 ist.)

- Falls kein Cp-Wert berichtet ist, lag die Genexpression unterhalb der Detektionsgrenze. Zur Berechnung eines Delta-Cp-Wertes verwenden Sie in diesem Fall die Zahl „38“ als „simulierten Cp-Wert“.
- Ermitteln Sie die medianen Delta-Cp-Wert-Werte für IGFBP3, F3 und VGLL3.

Tabelle 9: Beispiel für die Berechnung des medianen Delta-Cp-Werts für VGLL3 für eine Probe. Eine vergleichbare Berechnung muss für die Gene F3 und IGFBP3 durchgeführt werden.

PCR-Replikat	Cp-Wert GAPDH	Cp-Wert VGLL3	Errechneter Delta-Cp-Wert	Medianer Delta-Cp-Wert VGLL3
Well 1	20,25	25,36	Delta Cp <sub>1</sub> = 25,36 – 20,25 = 5,11	Median {5,11; 4,99; 18,02} = 5,11
Well 2	20,15	25,14	Delta Cp <sub>2</sub> = 25,14 – 20,15 = 4,99	
Well 3	19,98	Kein Cp	Delta Cp <sub>3</sub> = 38 – 19,98 = 18,02	

## 10. Qualitätskontrolle

### 10.1. Externe Kontrollen

Das Prostatype® RT-qPCR Kit enthält eine Prostatype Positivkontrolle und eine Prostatype Negativkontrolle. Diese Kontrollen müssen bei jedem PCR-Lauf dreifach mitanalysiert werden, um die Gültigkeit der Testergebnisse sicherzustellen. Das mitgelieferte Material ist ausreichend für die Durchführung von drei einzelnen PCR-Läufen. Die Ergebnisse der Prostatype Positivkontrolle und der Prostatype Negativkontrolle müssen innerhalb der Validitätsgrenzen liegen (siehe Tabelle 5, Tabelle 6 bzw. Tabelle 7). Liegt ein Kontrollergebnis außerhalb des angegebenen Bereichs, so sind die

entsprechenden Testergebnisse ungültig und dürfen nicht berichtet werden. Diese Tests müssen wiederholt werden.

## 10.2. Interne Kontrollen

Für jede Patientenprobe wird das Expressionsniveau des Referenzgens GAPDH ermittelt und zur Evaluierung der Probenvalidität und –integrität verwendet. Das GAPDH-Niveau muss über einem bestimmten Wert liegen, um eine robuste Messung der entsprechenden Ziel-Gene zu garantieren (siehe Tabelle 8). Weiterhin wird die interne Kontrolle verwendet, um sicherzustellen, dass bei der RNA-Extraktion genügend amplifizierbare RNA gewonnen wurde.

## 11. Grenzen des Verfahrens

Der Test darf nur durch Laborpersonal verwendet werden, das mit molekularbiologischen Testmethoden, insbesondere mit real-time-PCR-Assays, vertraut ist. Um einer DNA-Kontamination vorzubeugen, sind die allgemeinen Empfehlungen zur Organisation und Durchführung von Prozeduren eines Labors zu befolgen.

Alle Ergebnisse des Prostatype® RT-qPCR-Kits müssen im Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung des Patienten sowie mit sonstigen vorliegenden Informationen betrachtet werden.

## 12. Leistungsmerkmale

### 12.1. RNA-Input

Die Kompatibilität des Prostatype® RT-qPCR-Kits mit Gesamt-RNA als Input, die aus in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben von humanen Prostata-Kern-Nadelbiopsien extrahiert wurde, wurde durch Untersuchung von 16 einzelnen klinischen Proben validiert. Die Gesamt-RNA wurde von ungefärbten Prostata-Kern-Nadelbiopsien extrahiert, die mindestens 50% Krebszellen enthielten. Die Probenahme erfolgte gemäß den nachstehenden Kriterien: Tumorregion  $\geq 30$  mm<sup>2</sup>, Dicke 10  $\mu$ m. Es wurde das in Abschnitt 8 empfohlene RNA-Extraktionskit verwendet. Die Ergebnisse des Prostatype® RT-qPCR-Assays waren bei etwa 95% der Proben gültig.

### 12.2. Linearität/Genauigkeit/Quantifizierungsgrenze

Die Linearität wurde durch Testung einer Verdünnungsserie synthetischer Ziel-RNA evaluiert, die einen Bereich von  $2,5 \times 10^6$  bis 38 Molekülen/ $\mu$ l abdeckte. Die Testung erfolgte anhand von drei unterschiedlichen Prostatype® RT-qPCR-Kitchargen. Bei dem GAPDH- und F3-Assay deckt der lineare Bereich Konzentrationen von  $2,5 \times 10^6$  bis 38 Kopien/ $\mu$ l ab. Bei IGFBP3 ist die Linearität bis 153 Kopien/ $\mu$ l gegeben und bei VGLL3 bis 305 Kopien/ $\mu$ l. Innerhalb der berichteten Bereiche weisen die Assays eine Linearität mit einem Regressionskoeffizienten  $R^2 > 0,99$  auf (siehe Abbildung 5). Im linearen Bereich liegt die Steigung zwischen -3,12 und -3,29. Die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (VK, engl. CV) wurden innerhalb des definierten Linearitätsbereichs errechnet. Die höchsten SD-Werte von 0,4 Cp wurden für IGFBP3 in einer Konzentration von 153 Kopien/ $\mu$ l sowie für VGLL3 in einer Konzentration von 305 Kopien/ $\mu$ l ermittelt, der höchste VK-Wert von 1,6% für VGLL3 in einer Konzentration von  $3,9 \times 10^4$  Kopien/ $\mu$ l. Die Quantifizierungsgrenze des Prostatype® RT-qPCR-Assays wird durch die untere Stufe des Linearbereichs des jeweiligen vorgenannten Tests dargestellt.

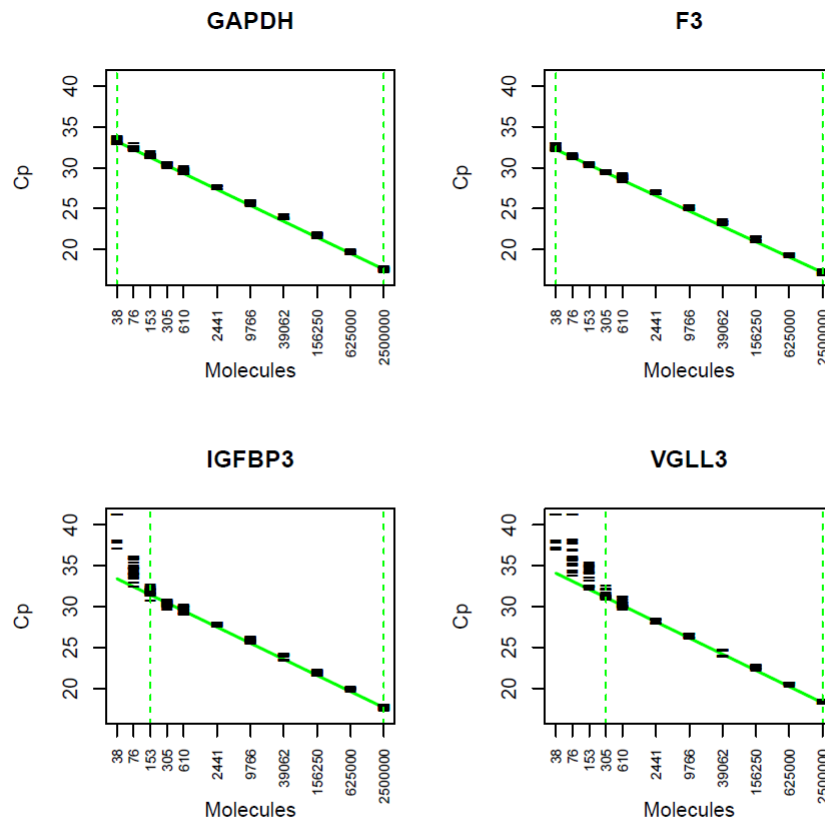


Abbildung 5: Linearität der 4 Gene des Prostatype® RT-qPCR-Kits. Die beobachteten Cp-Werte (schwarze Linien) sind für die 11 getesteten Zielkonzentrationen zwischen 38 und  $2,5 \times 10^6$  Moleküle/µl abgebildet. Jede Zielkonzentration wurde in mindestens 15 PCR-Replikaten untersucht. Die angepasste lineare Regression ist als durchgehende grüne Linie dargestellt.

### 12.3. Detektionsgrenze (Limit of Detection)

Die Detektionsgrenze wurde durch wiederholte Analyse der synthetischen Ziel-RNA evaluiert, die einen Bereich von  $2,5 \times 10^6$  bis 38 Moleküle/µl abdeckt. Die vier niedrigsten Zielkonzentrationen wurden in 24 Replikaten unter Verwendung von drei verschiedenen Prostatype® RT-qPCR-Kitchargen analysiert. Die niedrigsten Konzentrationen mit Amplifikationskurven für alle Replikate (100% Detektion) waren wie folgt: GAPDH: 38 Kopien/µl, F3: 38 Kopien/µl, IGFBP3: 76 Kopien/µl, VGLL3: 153 Kopien/µl.

### 12.4. Relative Sensitivität

Die relative Sensitivität wurde durch Testung von Proben mit unterschiedlichen Anteilen von IGFBP3-, F3- und VGLL3-Ziel-RNA in einer gleichen Menge von GAPDH-Hintergrund RNA untersucht. Die nachstehenden Proben wurden in 6 Replikaten je Probe mittels verschiedener Prostatype® RT-qPCR-Kitchargen getestet: 800 Kopien/µl, 400 Kopien/µl und 200 Kopien/µl von IGFBP3, F3 und VGLL3-Ziel-RNA in einer gleichen Menge von  $4,0 \times 10^4$  Kopien/µl GAPDH-Hintergrund RNA, so dass ein Verhältnis von 1:50, 1:100 bzw. 1:200 erzielt wurde. Bei allen vier Assays wiesen alle Replikate der Proben (18 PCR-Wells) eine Amplifikationskurve auf (100% Detektion), was eine relative Sensitivität von unter 1% für die drei Zielassays bestätigt.

### 12.5. Leerwert-Grenze (Limit of Blank)

21 PCR-Wells, die keine RNA-Ziel-DNA enthielten, wurden mit Hilfe unterschiedlicher Prostatype® RT-qPCR-Kitchargen untersucht, um die Leerwert-Grenze (Limit of Blank) zu evaluieren. Die drei Ziel-Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 wiesen bei allen 21 Wells keine Amplifikationskurve auf. Daher entspricht die Leerwert-Grenze dem maximal zu beobachtenden Cp-Wert 38 für diese Gene. Bei GAPDH zeigten 16

der 21 PCR-Wells eine Amplifikationskurve mit Cp-Werten zwischen 35,2 und 38,0. Die Leerwert-Grenze für GAPDH wurde anhand des 95%-Quantils geschätzt und entspricht dem Cp-Wert von 35,2.

## 12.6. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde durch wiederholte Testung von Aliquoten aus 8 RNA-Pools geprüft, die aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) humanen Prostata-Kern-Nadelbiopsien extrahiert wurden, die Krebszellen enthielten. Die Tests wurden durch vier Laboranten in drei verschiedenen Labors in Europa durchgeführt. Jedes Labor erstellte 12 separate PCR-Platten anhand von drei verschiedenen Prostatype® RT-qPCR-Kitschargen. Die Ergebnisse dieser Prüfung sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsprüfung. Cp-Mittelwert (MW Cp), entsprechende Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (VK, engl. CV) sind für die 4 Gene angegeben. Alle acht RNA-Pools wurden in 36 unabhängigen PCR-Läufen gemessen.

RNA-Probe	GAPDH			F3			VGLL3			IGFBP3		
	MW Cp	SD (Cp)	CV (%)	MW Cp	SD (Cp)	CV (%)	MW Cp	SD (Cp)	CV (%)	MW Cp	SD (Cp)	CV (%)
Pool 1	23,9	0,150	0,626	26,2	0,295	1,126	26,4	0,316	1,198	27,2	0,327	1,205
Pool 2	25,4	0,189	0,742	27,6	0,302	1,096	28,4	0,388	1,366	27,6	0,315	1,140
Pool 3	24,4	0,208	0,856	26,2	0,307	1,172	28,9	0,474	1,639	26,5	0,292	1,100
Pool 4	24,6	0,267	1,086	25,6	0,288	1,122	28,1	0,459	1,632	26,5	0,299	1,131
Pool 5	23,4	0,203	0,867	25,3	0,300	1,184	27,1	0,357	1,318	25,4	0,258	1,019
Pool 6	24,2	0,181	0,749	26,5	0,299	1,126	29,5	0,609	1,060	26,4	0,265	1,002
Pool 7	24,0	0,165	0,685	26,2	0,277	1,059	28,8	0,457	1,586	26,1	0,297	1,141
Pool 8	23,6	0,186	0,791	25,1	0,228	0,909	28,2	0,408	1,447	25,7	0,296	1,154


MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient (VK)

## 12.7. Interferenzen


Aliquote von drei RNA-Pools, die nicht gespiked oder mit potenziell störenden Stoffen gespiked waren, wurden getestet. Es wurde keine Interferenz durch erhöhte Konzentrationen von Hämatoxylin/Eosin (HE, 0,01% v/v), Xylol/Xylen (0,01% v/v), DNase I (0,06 U/μl), humaner genomischer DNA (20 ng/μl), Guanidiniumchlorid (5 mM), Ethanol (1% v/v) und EDTA (1 mM) festgestellt.

### 13. Erklärung der verwendeten Piktogramme


---

	Bitte lesen Sie die Gebrauchsinformation
---	--


---

	Bestellnummer
---	---------------


---

	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum
---	-------------------------------


---

	Chargennummer
---	---------------


---

	Verfallsdatum
---	---------------


---

	Hersteller
--	------------


---

	Temperaturbegrenzung
---	----------------------

---

	Ausreichend für
---	-----------------

---

	Barcode
---	---------

---

## 14. Referenzen

1. Peng Z, Skoog L, Hellborg H, Jonstam G, Wingmo IL, et al. (2014) An expression signature at diagnosis to estimate prostate cancer patients' overall survival. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 17: 81-90.
2. Peng Z, Andersson K, Lindholm J, Bodin I, Pramana S, et al. (2014) Operator dependent choice of prostate cancer biopsy has limited impact on a gene signature analysis for the highly expressed genes IGFBP3 and F3 in prostate cancer epithelial cells. *PLoS One* 9: e109610.
3. Peng Z, Andersson K, Lindholm J, Dethlefsen O, Pramana S, et al (2016) Improving the prediction of prostate cancer overall survival by supplementing readily available clinical data with gene expression levels of IGFBP3 and F3 in formalin-fixed paraffin embedded core needle biopsy material. *PLoS One* 11: e0145545.

## 15. Kontakt

Hersteller des Prostatype® RT-qPCR Kits ist:

Chundsell Medicals AB  
Industrivägen 19  
SE-17148 Solna  
Schweden

Wenn Sie weitere Informationen und technischen Support benötigen, schreiben Sie uns bitte eine E-Mail an [info@chundsell.com](mailto:info@chundsell.com) oder rufen Sie uns unter der Telefonnummer +46 (0) 8-20 87 00 an.