

Marraskuu 2017

# *therascreen*<sup>®</sup> PITX2 RGQ PCR Kit -käsikirja



Versio 1

**IVD**

In vitro -diagnostiseen käyttöön  
Käyttöön Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM -instrumentin kanssa  
Käyttöön QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue -sarjan kanssa  
Käyttöön EpiTect<sup>®</sup> Fast DNA Bisulfite -sarjan kanssa

**CE**

**REF**

873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
SAKSA

R1 **MAT**

1107245FI



# Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Tiivistelmä ja kuvaus .....	5
Menetelmän toimintaperiaate .....	6
Toimitetut materiaalit .....	11
Sarjan sisältö .....	11
Tarvitavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen .....	11
Varoitukset ja huomautukset .....	14
Turvallisuustiedot .....	14
Yleiset varotoimet .....	15
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	17
Kuljetusolosuhteet .....	17
Säilytysolosuhteet .....	18
Stabiilius .....	18
Näytteen käsittely ja säilytys .....	19
Toimenpide.....	20
Genomisen DNA:n puhdistus ja preparointi.....	20
FFPE-palan deparafinisaatio QIAGEN-deparafinisaatioliuoksen avulla .....	21
gDNA:n manuaalinen puhdistus QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan avulla .....	23
DNA:n määrittäminen .....	26
gDNA:n bisulfiittikonversio EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjalla.....	27

Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla .....	35
Tulosten tulkinta .....	53
Tietojen analyysi .....	53
Tulosnäyttö .....	56
Merkinnät .....	58
Ongelmien ratkaisu .....	63
Laadunvalvonta .....	67
Rajoitukset .....	67
Suoritusarvot .....	69
LOB (Limit of Blank) .....	69
Havaitsemisraja .....	70
Input-DNA .....	71
Lineaarisuus .....	71
Toistettavuus ja uusittavuus .....	72
Häiritsevät aineet .....	73
Ristikontaminaatio .....	73
Käytön aikajakso .....	74
Kliininen katkaisuhyväksyntä .....	74
Kirjallisuusviitteet .....	76
Symbolit .....	78
Yhteystiedot .....	79
Tilautustiedot .....	80

# Käyttötarkoitus

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on in vitro -käyttöinen metylaatio spesifi reaaliaikainen PCR-testi, joka on tarkoitettu pituitaarisen homeoboksi 2:n (PITX2) promoottori 2:n prosentuaalisen metylaatio suhteen (percent methylation ratio, PMR) määrittämiseen. Testi käyttää korkean riskin rintasyöpäpotilailta saadun FFPE-kudoksen bisulfiittikonvertoitua gDNA:ta. PMR auttaa kliinikkoja ennustamaan vasteen antrasykliinipohjaiselle liitännäissolunsalpaajahoidolle, kun sitä käytetään endokriinisen hoidon kanssa tai ilman korkean riskin imusolmukepositiivisille, estrogeenireseptoriposiivisille, HER2-negatiivisille rintasyöpäpotilaille.

Tuote on tarkoitettu käyttöön päteville käyttäjille, kuten teknikoille ja lääkäreille, jotka ovat saaneet koulutusta molekyylibiologiin tekniikoihin ja in vitro -diagnostisiin toimenpiteisiin.

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjaa käytetään yhdessä QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM -alustan kanssa.

## Tiivistelmä ja kuvaus

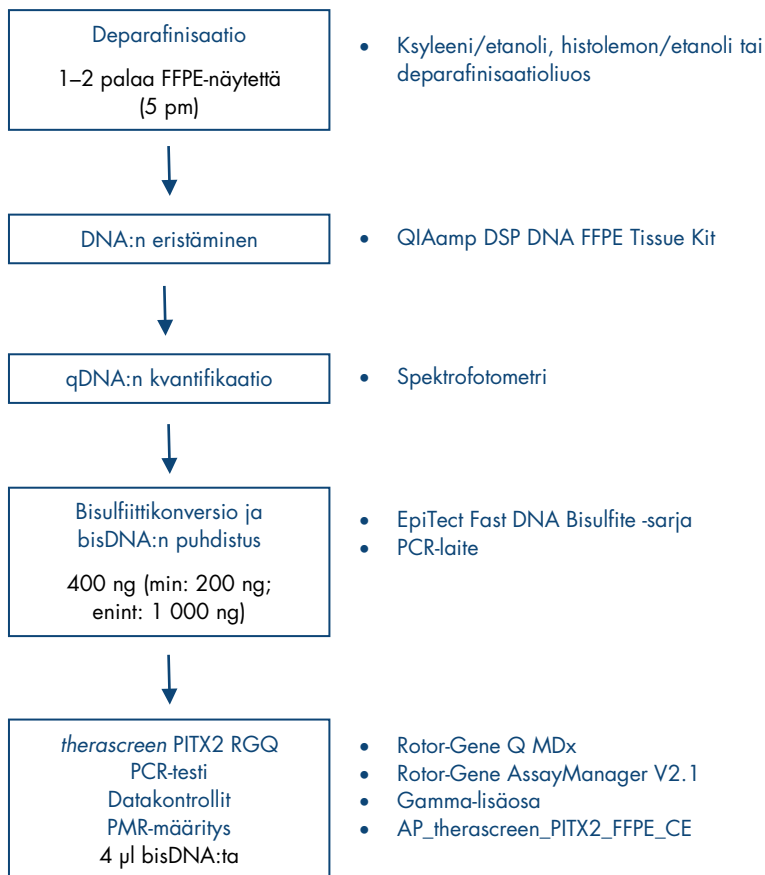
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjaa käytetään DNA:n puhdistamiseen FFPE-kudoksesta. Pituitaarinen homeoboksi 2 (PITX2) on transkriptiotekijä, jonka Wnt/ $\beta$ -kateniinisignaalinvälitysreitti saa aikaan. PITX2 toimii Wnt-signaalin efektorina rekrytoimalla ja vuorovaikuttamalla  $\beta$ -kateniinin kanssa lisätäkseen soluproliferaatiossa, migraatiossa, kasvaimen etenemisessä ja kemosensitiivisyydessä vaikuttavien kohdegeenien ilmentymistä (1–6). Metylaatio säätelee PITX2:n geeniekspression aktiivisuutta sen promoottorialueen sisällä niin kutsutun epigeneettisen modifikaation avulla. Pienet molekyylit, niin kutsutut metyyliryhmät, kiinnittyvät DNA-pohjaiseen sytosiiniin geenin promoottorialueella. Näin täysin tai osittain metyloidun geenin aktiivisuus vaimenee. Rintasyövässä PITX2:n on raportoitu olevan sekä prognostinen markkeri että prediktiiivinen markkeri endokriini- tai antrasykliinipohjaisen solunsalpaajahoidon vasteelle. Useat kliiniset tutkimukset ovat

osoittaneet vahvan tilastollisen korrelaation PITX2-geenin promootorialueen metylaation ja kliinisten tulosten mittareiden, kuten etenemättömyysajan, metastaasittoman elossaoloajan, taudittoman elossaoloajan ja kokonaiselinajan, välillä (7–12).

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on reaaliaikainen metylaatio spesifi PCR-pohjainen (qMSP) testi. Näytetyyppi on bisDNA, eli bisulfiittikonvertoitu genominen DNA (gDNA). gDNA puhdistetaan ensin formaliinifiksoidusta parafiiniin valetusta (FFPE) kudoksesta, joka on saatu korkean riskin imusolmukepositiivisilta, estrogeenireseptoriposiitivisilta, HER2-negatiivisilta rintasyöpäpotilailta. Metyloidun ja metyloimattoman PITX2:n erottamiseen tarvittavan bisulfiittialistumisen jälkeen PITX2-geenipromootori 2:n kolmen CpG-motiivin prosentuaalinen metylaatiosuhde (PMR) määritetään qMSP:n avulla ja lasketaan Rotor-Gene AssayManager® -ohjelmistolla Gamma-lisäosan ja PITX2-testiprofiilin avulla. Saatu PMR antaa hoitavalle lääkärille tietoa siitä, saako potilas todennäköisesti vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta. Jos saatu PMR on enintään 12, potilas saa todennäköisesti vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta. Sitä vastoin jos saatu PMR on yli 12, toista hoitoa voidaan ehdottaa, sillä todennäköisyys sille, että potilas saa vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta, on pienempi (katso "Kliininen katkaisuhyväksyntä", sivu 74).

## Menetelmän toimintaperiaate

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja käyttää reaaliaikaista PCR:ää (qPCR) PITX2-promoottori 2:n prosentuaalisen metylaatiosuhteen (PMR) määrittämiseen. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan näytetyyppi on bisulfiittikonvertoitu gDNA. Tämä bisulfiittikonversio tehdään käyttämällä EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjaa (QIAGEN, luettelonro 59824 tai 59826). Tässä muunnoksessa käytettävä gDNA puhdistetaan korkean riskin rintasyöpäpotilaiden FFPE-kudoksesta käyttämällä QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjaa (luettelonro 60404). Työnkulku näkyy kuvassa 1.



**Kuva 1. *theascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan työnkulku.**

qPCR:n käyttö mahdollistaa kohteena olevan bisDNA-jakson tarkan havaitsemisen monistusprosessin eksponentiaalisen vaiheen aikana. qPCR-tiedot voidaan saada nopeasti ilman PCR:n jälkeistä käsittelyä PCR-sykliden aikaisten fluoresoivien signaalien reaaliaikaisen havaitsemisen avulla.

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan testi hyödyntää TaqMan®-koettimien qPCR-oligonukleotidihydrolyysiperiaatetta yhdessä ei-metylaatiospesifien alukkeiden kanssa (Kuva 2, seuraava sivu). Tämä testi käyttää yhtä alukeparia, joka monistaa kaikki bisulfiittikonvertoidut kohdejaksot. Tästä monistuksesta saadaan kaksi eri signaalia käyttämällä kahta TaqMan-koetinta, jotka on merkitty eri väriaineilla. Nämä koettimet koostuvat oligonukleotideista, jotka on leimattu 5'-reportterivärillä (FAM™ tai HEX™) ja alavirtaan sijaitsevalla 3' väriaineettomalla sammuttajalla. Koettimet hybridisoituvat kohdesekvenssien PCR-tuotteessa. Yksi koetin on spesifinen metyloitujen jaksoiden bisDNA-jaksoille, ja se on värjätty FAM:llä. Toinen on spesifinen metyloimattomien jaksoiden bisDNA-jaksoille, ja se on värjätty HEX:llä. TaqMan qPCR -analyysi hyödyntää *Thermus aquaticus* (*Taq*) -DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuutta. Koettimen ollessa ehjä reportterivärin läheisyys sammuttajaan tukahduttaa reportterin fluoresenssin pääasiassa Förster-tyyppisellä energiansiirrolla. Jos kohdesekvenssi on PCR-ajossa läsnä, sekä etu- että taka-alukkeet pariutuvat pariutuneen koettimen molemmin puolin. Koettimen 3'-pää on estetty, jotta koetin ei pitenisi PCR:n aikana (Kuva 3, sivu 10). Polymerisointivaiheessa DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuus halkaisee koettimen, jolloin sammuttajaväriaine irtaantuu ja reportteri pääsee lähettämään fluoresenssisignaalia. Sen jälkeen koettimen palaset irtaantuvat kohteesta ja juusteen polymerisaatio jatkuu. Tämä prosessi tapahtuu jokaisessa sykissä eikä se häiritse tuotteen eksponentiaalista kertymistä (Kuva 3, sivu 10). Fluoresenssisignaalin voimistuminen havaitaan vain, jos kohdesekvenssi on komplementaarinen alukkeisiin ja koettimeen nähden ja täten monistuu PCR-ajon aikana. PCR-jakso, jossa tietyn reaktion fluoresenssi ylittää ennalta määritetty (*therascreen* PITX2-testipaketin antamat) raja-arvot, on määritetty C<sub>T</sub>-arvoksi.

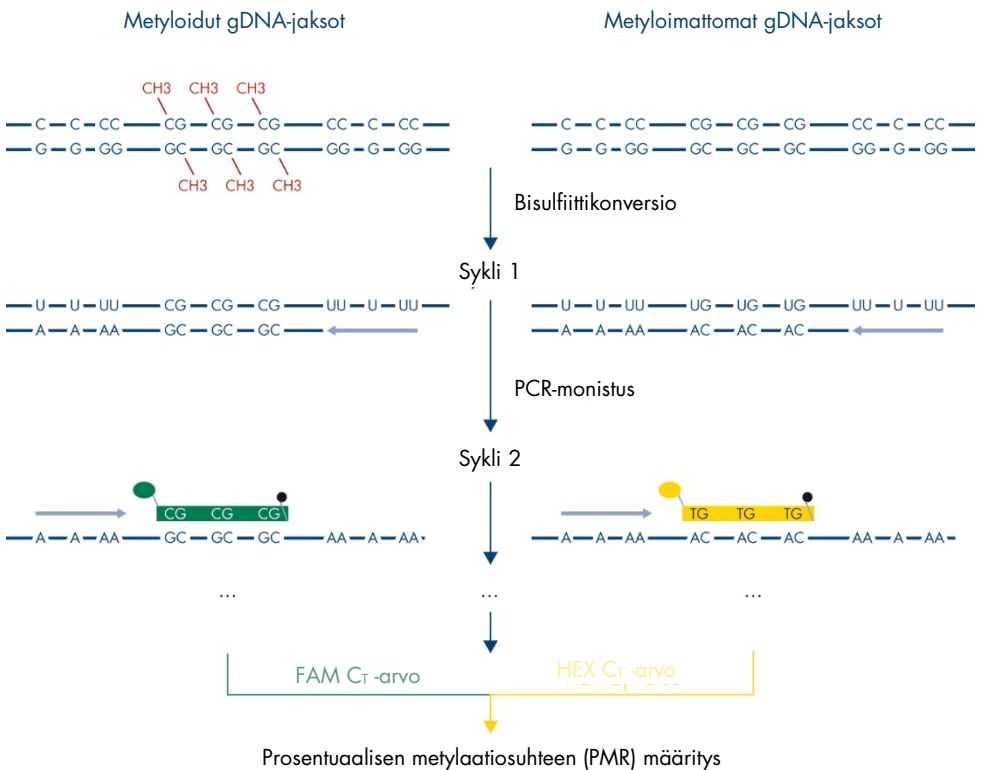
*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan testin tulokset ovat kaksi C<sub>T</sub>-arvoa, yksi FAM:lle ja toinen HEX:lle. Kummankin signaalin välisestä ΔC<sub>T</sub>-arvosta lasketaan PMR (Kuva 2, seuraava sivu). PMR-laskelma perustuu seuraavaan kaavaan (11):

$$PMR = \frac{100}{1 + 2^{C_{T,FAM} - C_{T,HEX}}}$$



Saatu PMR antaa hoitavalle lääkärille tietoa siitä, saako potilas todennäköisesti vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta. Jos saatu PMR on enintään 12, potilas saa todennäköisesti vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta. Sitä vastoin jos saatu PMR on yli 12, toista hoitoa voidaan ehdottaa, sillä todennäköisyys sille, että potilas saa vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta, on pienempi.

Kaikkien tehtävien yhteenlaskettu suoritusaika – gDNA:n puhdistamisesta datan analyysiin – on alle kaksi työpäivää.



Kuva 2. *theascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan testin periaate.

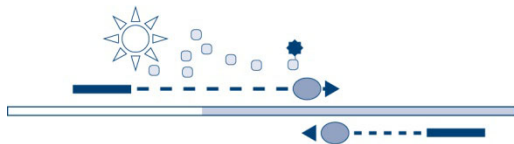


Pariutuminen

Alukkeet ja koetin pariutuvat

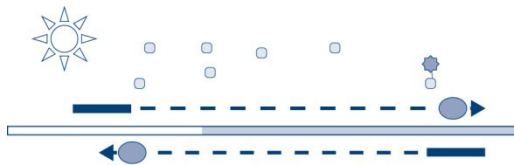


Polymerisaatio  
Juosteen syrjäyttäminen



Halkaisu

Johtaa sammuttajaväriin vapautumiseen,  
jolloin reportteriväri lähettää fluoresoivaa  
signaalia



Polymerisaatio valmis

PCR-tuote on valmis ja fluoresoiva signaali  
kerääntyy joka sykliä



Kuva 3. Reaaliaikaisen TaqMan PCR -testin periaate.

# Toimitetut materiaalit

## Sarjan sisältö

<b><i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit</b>		<b>(8)</b>
<b>Luettelonumero</b>		<b>873211</b>
<b>Reaktioiden määrä</b>		<b>8</b>
Purppura	PITX2 RGQ PCR Master Mix (PITX2 RGQ PCR -pääseos)	660 µl
Sininen	PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (PITX2 RGQ PCR -alukekoetinseos)	192 µl
Keltainen	PITX2 RGQ PCR Reference 50 (PITX2 RGQ PCR -referenssi, 50)	12 µl
Oranssi	PITX2 RGQ PCR Reference Low (Matala PITX2 RGQ PCR -referenssi)	12 µl
Vihreä	PITX2 RGQ PCR Negative Control (Negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli)	12 µl
Väritön	PITX2 RGQ PCR NTC	12 µl
-	Instructions For Use (Handbook) (käyttöohjeet [käsikirja])	1

## Tarvittavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan. Varmista, että sarjan kaikki reagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty asianmukaisissa olosuhteissa.

## Reagenssit

- Etanoli (molekyyliluokka 96–100 %)

**Huomautus:** älä käytä denaturoitua alkoholia, koska se sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

## Laitteisto

- Lämpösekoitin, kuumennettava ravistava inkubaattori, kuumennuslevy tai vesihaude, joka mahdollistaa inkuboinnin 56 ja 90 °C:ssa.

**Huomautus:** huomioi lämpösekoittimen putken muotoa koskevat vaatimukset ja valitse sopiva putkikoko (esim. 2 tai 1,5 ml:n putket)

- Säädetäviä pipettejä, \* jotka on tarkoitettu PCR:ään (1–10 µl; 10–100 µl; 100 – 1 000 µl)  
On suositeltavaa varata vähintään kaksi pipettisarjaa: yksi PCR-reaktioseoksien preparointiin ja jakeluun ja toinen bisDNA:n ja kontrollien käsittelyyn, mukaan lukien PCR-mallin lataaminen.
- Nukleasittomia, aerosolinkestäviä, steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobiset suodattimet (aerosoliesteen sisältäviä pipettikärkiä suositellaan ristikontaminaation estämiseksi).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (1,5 ml:n tai 2 ml:n mikrosentrifugiputkia) (1,5 ml:n putkia saatavilla Eppendorffilta, luettelonro 0030120.086, tai Sarstedtilla, luettelonro 72.690)
- Pöytämallinen sentrifugi, jossa on roottori 0,5 ml:n, 1,5 ml:n ja 2,0 ml:n reaktioputkia varten (joilla voidaan saavuttaa 20 000 x g)
- Vortex-laite
- Spektrofotometri, esim. NanoDrop®-instrumentti tai QIAxpert® (QIAamp-lisäosa: kokonaisnukleiinihappomittaus)†

\* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

† Toimittajaluettelo ei ole kattava.

- Kertakäyttökäsineitä

### Valinnaiset reagenssit työnkulkukontrollille

- One vial containing one section (15 or 20 µm) of KRAS G13D Reference Standard (Yksi pullo, joka sisältää yhden palan (15 tai 20 µm) KRAS G13D Reference Standard – referenssiä) (Horizon Discovery, luettelonro HD216).

### Manuaalinen DNA-puhdistus

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAamp DSP DNA FFPE Tissue –sarja) (luettelonro 60404)
- Deparaffinization Solution (Deparafinisaatioliuos) (luettelonro 19093) tai ksyleeni tai histolemon) (Carlo Erba, luettelonro 454911)

**Tärkeää:** deparafinisaatioliuosta, ksyleeniä tai histolemonia ei toimiteta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan mukana, ja ne on tilattava erikseen.

### Ylimääräiset bisulfiittikonversioon

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (EpiTect Fast DNA Bisulfite –sarja) (luettelonro 59824 tai 59826)
- 0,2 ml:n reaktioputket tai 8-kuoppaiset liuskat
- 0,2 ml:n putkille tarkoitettu mikrosentrifugi
- PCR-laite, jossa on lämmitetty kansi (koska bisulfiittireaktiota ei ole päällystetty mineraaliöljyllä, vain PCR-laitteet, jossa on lämmitetty kansi, soveltuvat tähän toimenpiteeseen)

### PCR:ään Rotor Gene Q MDx:llä

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (luettelonro 9002032) ja toimitetut lisävarusteet
- Rotor-Gene AssayManager, ohjelmistoversio 2.1.x (jossa x = 0 tai uudempi)

- Gamma-lisäosa, versio 1.0.x (jossa x = 0 tai uudempi) Rotor-Gene AssayManager v2.1 -laitetta varten
- theascreen\_PITX2\_FFPE\_CE-testiprofiili V1.0.x (jossa x = 1 tai uudempi)
- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (Latauslevy 72 x 0,1 ml:n putkille) (luettelonro 9018901)
- 72-Well Rotor (72-kuoppainen roottori) (luettelonro 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (Sovittimen lukitusrengas 72-kuoppaiselle roottorille), (luettelonro 9018904)
- Rotor Holder (Roottorin pidike) (luettelonro 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q MDx (Liuskaputkia ja korkkeja, 0,1 ml, Rotor-Gene Q MDx -laitetta varten) (luettelonro 981103 tai 981106)
- Jäätä (tai jäähdytyslevy)

## Varoitukset ja huomautukset

In vitro -diagnostiikkaan

### Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjekomponentin käyttöturvallisuustietoita.

Katso deparafinisaatioliuosta, ksyleeni-etanolia, histolemon-etanolia, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjaa tai EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjaa koskevat turvallisuustiedot sarjojen käsikirjoista. Katso instrumenttien turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavan sarjan käyttöoppaasta.

## Yleiset varotoimet

qPCR-testien käyttäminen vaatii hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, mukaan lukien jäljitettävyys ja molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden ylläpito sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämä sarja on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on testattu suorituskyvyltään optimaalisiksi.

- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.
- Hävitä näytteet ja testijäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan reagenssit on laimennettu optimaalisesti. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Älä käytä alle tai yli 20 µl:n reaktiutilavuuksia (reaktioseos + näyte).
- QIAGEN-yhtiön laaduntarkkailumenettelyihin kuuluu julkaistun sarjan toiminnallinen testaus jokaisesta yksittäisestä sarjan valmistuserästä. Älä sekoita eri valmistuseristä peräisin olevia reagensseja keskenään, koska se voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- *therascreen* PITX2:n koko työnkulku edellyttää näytteiden siirtoa eri putkiin. Varmista siksi, että näytteiden jäljitettävyys säilyy hyvin joka vaiheessa.
- Varmista, että PITX2-testiprofiili ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma -lisäosa on asennettu.
- Katso lisätietoja varoituksista, varotoimista ja menettelytavoista julkaisusta Rotor-Gene Q MDx User Manual (Rotor-Gene Q MDX -käyttöopas) ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas).

- Inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Sulata kaikkia *therascreen* PITX2 RGQ PCR -komponentteja ja näytteitä jääkaapissa, jäällä tai jäähdytyslevyllä tai huoneenlämmössä niin kauan kuin tarpeen.

**Huomautus:** jos sulatus tehdään huoneenlämmössä, tarkista materiaalin sulaminen säännöllisesti, erityisesti PITX2 RGQ PCR -pääseoksen (MMx), sillä se sisältää dNTP:tä, joka on herkkä lämpötiloille.

**Huomautus:** PITX2 RGQ PCR PPM on suojaava valolta, sillä se sisältää värinukleotidejä.

**Huomautus:** Toistuvaa sulamista ja jäätymistä on vältettävä. Jäädytä ja sulata enintään neljä kertaa.

- Preparoi kaikki reaktiot (reaktioseos + näyte) jäähautteessa tai jäähdytyslevyllä.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Reaktioseoksissa saattaa tapahtua muutoksia, jos ne altistuvat valolle.
- Älä niele reagenssia.
- Käytä reaktioseoksen valmistuksessa ja mallien lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx -putkia, ennen kuin ajo on päättynyt. Hävitä putket paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- Varmista, että testaat oikean näytteen. Varo väärän näytteen käyttämistä, latausvirhettä ja pipetointivirheitä.
- Varmista näytteiden oikea tunnistus käsittelemällä näytteitä järjestelmällisesti.
- Ole erittäin varovainen, jotta välttäisit reaktioseoksen kontaminoitumisen PITX2 RGQ PCR Reference 50- ja PITX2 RGQ PCR Reference Low Control -reagenssien materiaaleilla.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta DNA tai PCR-tuote ei aiheuttaisi kulkeutumiskontaminaatiota ja siitä seuraavaa väärää positiivista signaalia.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta ei tapahtuisi DNAasi-kontaminaatiota, joka saattaisi hajottaa malli-DNA:n.

Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita:



- Käytä nukleasittomia laboratoriovälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja) ja käytä kertakäyttöisiä käsineitä testiä tehdessäsi.
- Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojujatta pipettikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.

Preparoi PCR-reaktioseos vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipetit, kärjet, jne.) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita). Lisää tällä samalla alueella PITX2 RGQ PCR NTC:tä asianmukaiseen putkeen (kuva 4, sivu 37), mutta sulje tämä putki sen jälkeen, kun olet ladannut kaikki muut kontrollit ja näytteet ristikontaminaation arvioimista varten. Lisää testattavat näytteet, PITX2 RGQ PCR -referenssi 50, matala PITX2 RGQ PCR -referenssi ja negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli erillisessä huoneessa, jossa on tarvittavat materiaalit (pipetit, kärjet, jne.).

## Reagenssien säilytys ja käsittely

### Kuljetusolosuhteet

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja toimitetaan kuivajään päällä. Jos *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja ei ole vastaanottohetkellä jäässä tai jos ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai jos toimituspakkaus ei sisällä lähetyluetteloa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun tai paikalliseen jälleenmyyjään (katso lisätietoja osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Säilytysolosuhteet

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa –30...–15 °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna.

Katso deparafinisaatioliuosta, ksyleeni-etanolia, histolemon-etanolia, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjaa tai EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjaa koskevat säilytys- ja käsittelytiedot sarjojen käsikirjoista.

## Stabiilius

Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on stabiili mainittuun vanhenemispäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan –30...–15 °C:n lämpötilassa pakkauksessa olevaan vanhenemispäivään asti. Toistuvaa sulamista ja jäätymistä on vältettävä. Jäädytä ja sulata enintään neljä kertaa.

Katso deparafinisaatioliuosta, ksyleeni-etanolia, histolemon-etanolia, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjaa tai EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjaa koskevat stabiiliustiedot sarjojen käsikirjoista.

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

# Näytteen käsittely ja säilytys

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on tarkoitettu käyttöön bisDNA-näytteiden kanssa. Puhdistettu ja bisulfiittikonvertoitu DNA on peräisin FFPE-kasvainkudoksesta, joka on saatu korkean riskin imusolmukepositiivisten, estrogeenireseptoriposiitivisten, HER2-negatiivisten rintasyöpäpotilaiden primaarileesioista. Tee näytteille formaliinifiksaatio laboratorion toimintaohjeiden mukaan (10-prosenttinen, neutraali puskuroitu formaliini hyväksytään yleensä) mahdollisimman pian kirurgisen poiston jälkeen.

- Kudosnäyte on fiksoitava 4–10-prosenttisessä formaliinissa mahdollisimman nopeasti kirurgisen poiston tai paksuneulabiopsian jälkeen.
- Ihanteellinen fiksaatioaika on 14–24 tuntia (pidemmät fiksaatioajat johtavat voimakkaampaan DNA-fragmentaatioon, mistä seuraa qPCR/qMSP-testien huono suorituskyky).
- Kuivata näytteet huolellisesti ennen upottamista parafiiniin (formaliinin jäännökset voivat estää proteinaasi K:n hajoamista).
- Parafiinikappaleesta on leikattava 5 µm:n paksuiset palat.
- Paloille, joiden kasvainalue on <math><100\text{ mm}^2</math>, suositellaan kahden palan käsittelyä, jotta kokonaiskasvainalue kasvaisi vähintään 100 mm<sup>2</sup>:n kokoiseksi.
- Merkitse, käsittele ja säilytä puhdistukseen valmiita kasvainnäytteitä, kappaleita, paloja ja näytteitä kontrolloidulla tavalla paikallisten käytäntöjen mukaan.
- Kuljeta ja säilytä FFPE-kappaleita ja -paloja huoneenlämmössä. Paloja voidaan käyttää nopeasti DNA:n puhdistamiseen.
- DNA:ta, joka on puhdistettu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan avulla, voidaan säilyttää lyhytaikaisesti 2–8 °C:ssa enintään 24 tunnin ajan, tai –30...–15 °C:ssa, jos pitkäaikainen säilytys on tarpeen.

- Bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, johon on käytetty EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjaa, voidaan säilyttää -30...-15 °C:ssa vähintään 9 kuukauden ajan ilman, että laatu tai konversio heikkenee. Pitkäaikaista säilytystä tutkitaan parhaillaan. Kysy lisätietoja QIAGENilta.
- KRAS G13D Reference Standard -työnkulkukontrollipalaa (Horizon Discovery, luettelonro HD216) voidaan säilyttää huoneenlämmössä 36 kuukautta valmistuspäivästä alkaen.

## Toimenpide

### Genomisen DNA:n puhdistus ja preparointi

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on hyväksytty yhdessä QIAGEN-deparafinisaatioliuoksen (luettelonro 19093) kanssa FFPE-palan deparafinisaatioon, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan (luettelonro 60404) kanssa gDNA:n puhdistukseen ja EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjan (luettelonro 59824 tai 59826) kanssa gDNA:n bisulfiittikonversioon.

FFPE-palan deparafinisaatio voidaan tehdä deparafinisaatioliuksella, ksyleeni-etanolilla tai histolemon-etanolilla (näiden kolmen deparafinisaatiomenetelmän vastaavuus on varmistettu tuotekehityksen aikana).

Jos deparafinisaatioliuosta (luettelonro 19093) käytetään, aloita toimenpide "FFPE-palan deparafinisaatio QIAGEN-deparafinisaatioliuoksen avulla", sivu 21.

Jos ksyleeni-etanolia tai histolemon-etanolia käytetään, siirry suoraan toimenpiteeseen "gDNA:n manuaalinen puhdistus QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan avulla", sivu 23.

**Valinnainen:** Voit arvioida, onko puhdistus ja bisulfiittikonversio tehty oikein, käyttämällä työnkulkukontrollia. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan työnkulkuun hyväksytty työnkulkukontrolli on KRAS G13D Reference Standard -kontrollipala (Horizon Discovery, luettelonro HD216).

Varmista, että gDNA-puhdistusreagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty asianmukaisissa olosuhteissa. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

## Aloituspohjämateriaali

DNA-puhdistuksen aloituspohjämateriaalin on oltava juuri leikattuja FFPE-kudoksen paloja. Niitä voidaan säilyttää tarvittaessa yön yli huoneenlämmössä. gDNA-puhdistuksen aloituspohjämateriaalina on käytettävä enintään kahta 5 µm:n paksuista palaa, joiden kokonaispinta-ala on yli 100 mm<sup>2</sup>.

## FFPE-palan deparafinisaatio QIAGEN-deparafinisaatioliuoksen avulla

**TÄRKEÄÄ:** jos deparafinisaatio tehdään ksyleeni-etanolilla tai histolemon-etanolilla, jatka kohtaan "gDNA:n manuaalinen puhdistus QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan avulla", sivu 23.

### Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tee kaikki sentrifugointivaiheet huoneenlämmössä (15–25 °C).
- Tasapainota kaikki puskurit huoneenlämpöön ja deparafinisaatioliuos 20–25 °C:seen.
- Deparafinisaatioliuosta ei toimiteta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan mukana, ja se on tilattava erikseen.

### Ennen käyttöä tehtävät toimenpiteet

- Esilämmitä lämpösekoitin tai kuumennettava ravistava inkubaattori 56 °C:seen, jotta laitetta voidaan käyttää vaiheissa 4 ja 8. Jos käytettävissä ei ole lämpösekoitinta tai kuumennettavaa ravistettavaa inkubaattoria, niiden sijaan voidaan käyttää kuumennuslevyä tai vesihaudetta.
- Jos AL-puskuri tai ATL-puskuri sisältää saostumia, liuota ne kuumentamalla liuos 70 °C:een varovasti ravistellen.

- Varmista, että AW1-puskuri ja AW2-puskuri on preparatoitu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -käsikirja) ohjeiden mukaan.

### Toimenpide (enintään kahdelle palalle)

1. Leikkaa ylimääräinen parafiini näytekappaleesta leikkausveitsellä. Leikkaa 5 µm:n paksuisiksi paloiksi.

**Huomautus:** Jos näytteen pinta on altistunut ilmalle, hävitä ensimmäiset 2–3 palaa.

2. Aseta pala(t) välittömästi 1,5 ml:n tai 2 ml:n mikrosentrifugiputkeen (ei sisälly pakkaukseen).
3. Lisää 160 µl deparafinisaatioliuosta ja käytä putkea vortex-laitteessa kovalla teholla 10 sekunnin ajan.  
Sentrifugoi hetki, jotta putken pohjalla oleva näyte sekoittuisi.
4. Inkuboi 56 °C:ssa 3 minuuttia ja anna sitten jäähtyä huoneenlämmössä (15–25 °C).
5. Lisää 180 µl ATL-puskuria ja sekoita vortex-laitteessa.
6. Sentrifugoi 1 minuutin ajan teholla 11 000 x g (10 000 rpm). Näkyviin tulee kaksi kerrosta (sininen ja kirkas).
7. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta alempaan, kirkkaaseen kerrokseen työntämällä pipetti ylemmän kerroksen läpi. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
8. Inkuboi 56 ± 3 °C:ssa ≥1 tunnin ajan (tai kunnes näyte on liuennut täysin).
9. Inkuboi 90 ± 5 °C:ssa 1 tunnin ± 5 minuutin ajan.

Inkubointi 90 °C:ssa ATL-puskurissa kääntää formaldehydin muutoksen nukleiinihappoissa osittain päinvastaiseksi. Pidempi inkubointiaika tai korkeammat inkubointilämpötilat voivat aiheuttaa DNA:n suurempaa fragmentoitumista.

**Huomautus:** jos käytät vain yhtä kuumennuslevyä, jätä näyte huoneenlämpöön (15–25 °C) 56 °C:ssa inkuboinnin jälkeen vaiheessa 8, kunnes kuumennuslevy on saavuttanut 90 °C:n lämmön vaiheessa 9.

10. Poista tipat korkin sisäpuolelta käyttämällä 1,5 ml:n putkea nopeasti sentrifugissa.
11. Siirrä alempi, kirkas kerros uuteen 2 ml:n mikrosentrifugiputkeen (ei sisälly pakkaukseen).

**Huomautus:** älä siirrä yhtään sinistä kerrosta.

12. Jatka vaiheeseen 14 kohdassa "gDNA:n manuaalinen puhdistus QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan avulla", sivu 23.

## gDNA:n manuaalinen puhdistus QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan avulla

gDNA:n manuaalinen puhdistus tehdään QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjalla (luettelonro 60404) julkaisun *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -käsikirja* ohjeiden mukaan.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tee kaikki sentrifugointivaiheet huoneenlämmössä (15–25 °C).

Ennen käyttöä tehtävät toimenpiteet

- Tasapainota kaikki puskurit huoneenlämpöön.
- Aseta lämpösekoitin tai kuumennettava ravistava inkubaattori 56 °C:seen, jotta laitetta voidaan käyttää vaiheessa 12.
- Jos käytettävissä ei ole lämpösekoitinta tai kuumennettavaa ravistettavaa inkubaattoria, niiden sijaan voidaan käyttää kuumennuslevyä tai vesihaudetta.
- Jos AL-puskuri tai ATL-puskuri sisältää saostumia, liuota ne kuumentamalla liuos 70 °C:een varovasti ravistellen.
- Varmista, että AW1-puskuri ja AW2-puskuri on preparoitu *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -käsikirja* ohjeiden mukaan.

Toimenpide

**Huomautus:** jos käytät QIAGEN-deparafinisaatioliuosta, vaiheet 1–14 on korvattava toimenpiteellä, joka kuvataan kohdassa "FFPE-palan deparafinisaatio QIAGEN-deparafinisaatioliuoksen avulla", sivulla 21.

1. Leikkaa ylimääräinen parafiini näytekappaleesta leikkausveitsellä.
2. Leikkaa 1–2 palaa 5 µm:n paksuisiksi siten, että saavutetaan vähintään 100 mm<sup>2</sup>:n kasvainpinta-ala (katso "Aloitusmateriaali", sivu 21).  
Jos näytteen pinta on altistunut ilmalle, hävitä ensimmäiset 2–3 palaa.
3. Aseta palat välittömästi 1,5 tai 2 ml:n mikrosentrifugiputkeen (ei sisälly pakkaukseen).
4. Lisää 1 ml ksyleeniä tai histolemonia näytteeseen. Sulje korkki ja sekoita vortex-laitteella kovalla teholla  $\geq 10$  sekunnin ajan.
5. Käytä näytettä sentrifugissa täydellä teholla noin 2 minuuttia  $\pm$  30 sekuntia huoneenlämmössä.
6. Poista pinnalla kelluva osa pipetoimalla. Älä poista pelletin osia.
7. Lisää 1 ml etanolia (96–100 %) pellettiin ja sekoita vortex-laitteessa.  
Etanoli uuttaa ksyleenijäämän näytteestä.
8. Käytä näytettä sentrifugissa täydellä teholla noin 2 minuuttia  $\pm$  30 sekuntia huoneenlämmössä.
9. Poista pinnalla kelluva osa pipetoimalla. Älä poista pelletin osia.  
Poista huolellisesti kaikki jäänyt alkoholi pienellä pipetin kärjellä.
10. Avaa putki ja inkuboi 15–40 °C:ssa. Inkuboi 10 minuuttia  $\pm$  1 minuutti tai kunnes etanolijäämät ovat haihtuneet.
11. Suspendoi pelletti uudelleen 180 µl:ssa ATL-puskuria. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta ja sekoita vortex-laitteessa.
12. Inkuboi 56  $\pm$  3 °C:ssa  $\geq 1$  tunnin ajan (tai kunnes näyte on liuennut täysin).
13. Inkuboi 90  $\pm$  5 °C:ssa 1 tunnin  $\pm$  5 minuutin ajan.  
Inkubointi 90 °C:ssa ATL-puskurissa kääntää formaldehydin muutoksen nukleinihapoissa osittain päinvastaiseksi. Pidempi inkubointiaika tai korkeammat inkubointilämpötilat voivat aiheuttaa DNA:n suurempaa fragmentoitumista. Jos käytät vain yhtä kuumennuslevyä, jätä näyte huoneenlämpöön 56 °C:ssa inkuboinnin jälkeen, kunnes kuumennuslevy on saavuttanut 90 °C:n lämmön.



14. Poista tipat korkin sisäpuolelta käyttämällä putkea nopeasti sentrifugissa.

**Huomautus:** jos käytät deparafinisaatioliuosta, jatka vaiheeseen 15.

15. Lisää 200 µl AL-puskuria näytteeseen ja sekoita huolellisesti vortex-laitteessa. Lisää sitten 200 µl etanolia (96–100 %) ja sekoita näytettä taas huolellisesti vortex-laitteessa.

On erittäin tärkeää, että näyte, AL-puskuri ja etanoli sekoitetaan välittömästi ja huolellisesti vortex-laitteessa tai pipetoimalla, jotta saadaan aikaan homegeeninen liuos. AL-puskuri ja etanoli voidaan sekoittaa ennakolta ja lisätä yhdessä yhden vaiheen aikana, jotta säästetään aikaa käsiteltäessä useita näytteitä. Kun AL-puskuri ja etanoli lisätään, saattaa muodostua valkoista saostumaa. Tämä saostuma ei haittaa QIAamp-toimenpidettä.

16. Poista tipat korkin sisäpuolelta käyttämällä putkea nopeasti sentrifugissa.

17. Siirrä koko liuote varovasti QIAamp MiniElute® -putkeen (2 ml:n näyteputkessa) reunaan kastelematta, sulje korkki ja käytä sentrifugissa noin teholla  $6\ 000 \times g \geq 1$  minuutin ajan. Aseta QIAamp MiniElute column -putki puhtaaseen 2 ml:n näyteputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä suodosta sisältävä näyteputki.

Jos liuote ei ole kulkenut kokonaan kalvon läpi sentrifugikäsitelyn jälkeen, käytä näyte sentrifugissa uudelleen suuremmalla nopeudella, kunnes QIAamp MiniElute column -putki on tyhjä.

18. Avaa QIAamp MiniElute column -putki varovasti ja lisää 500 µl AW1-puskuriliuosta kastelematta putken reunaan. Sulje korkki ja käytä sentrifugissa noin teholla  $6\ 000 \times g \geq 1$  minuutin ajan. Aseta QIAamp MiniElute column -putki puhtaaseen 2 ml:n näyteputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä suodosta sisältävä näyteputki.

19. Avaa QIAamp MiniElute column -putki varovasti ja lisää 500 µl AW2-puskuriliuosta kastelematta putken reunaan. Sulje korkki ja käytä sentrifugissa noin teholla  $6\ 000 \times g \geq 1$  minuutin ajan. Aseta QIAamp MiniElute column -putki puhtaaseen 2 ml:n näyteputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä suodosta sisältävä näyteputki.

QIAamp MiniElute column -putken ja suodoksen välistä kontaktia on vältettävä. Joidenkin sentrifugien roottorit voivat väristä vauhdin hidastumisen aikana, jolloin etanolipitoinen suodos pääsee kontaktiin QIAamp MiniElute column -putken kanssa. Huolehdi

poistaessasi QIAamp MinElute column -putkea ja näyteputkea roottorista, että suodos ei pääse kontaktiin QIAamp MinElute column -putken kanssa.

20. Käytä sentrifugissa täydellä nopeudella (n. 20 000 × g) ≥3 minuutin ajan, jotta kalvo kuivuisi täysin.

Tämä vaihe on välttämätön, sillä etanolin kulkeutuminen uutteeseen voi estää qPCR-reaktioiden tekemisen.

21. Aseta QIAamp MiniElute column -putki puhtaaseen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä suodosta sisältävä näyteputki. Avaa QIAamp MiniElute column -putken korkki varovasti ja lisää 50 µl ATE-puskuria kalvon keskelle.

22. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämpötilassa (15–25 °C) 5 minuutin ajan. Käytä sentrifugissa täydellä nopeudella (n. 20 000 × g) ≥1 minuutin ajan.

## DNA:n määrittäminen

gDNA-puhdistussarjoissa uuttamiseen käytettävä ATE-puskuri sisältää natriumatsidia säilöntäaineena. Natriumatsidi absorboi sähkömagneettista säteilyä aallonpituudella 260 nm, ja siksi spektrofotometri on kalibroitava tekemällä tyhjä mittausta ATE-puskurilla.

DNA:n pitoisuus määritetään mittaamalla absorbanssi 260 nm:ssä sen jälkeen, kun on tehty instrumentitoimenpide esimerkiksi QIAGENin QIAxpert- (QIAamp-lisäosa: kokonaisnukleiinihappomittaus) tai NanoDrop-instrumentilla\*. Absorbanssilukemien aallonpituudella 260 nm on oltava välillä 0,1–1,0, jotta ne olisivat tarkkoja. Yhden yksikön absorbanssi aallonpituudella 260 nm vastaa 50 µg:aa DNA:ta millilitrassa ( $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ ). Puhdistetun DNA:n kokonaismäärä (ng) = DNA:n pitoisuus (ng/µl) × näytteen tilavuus (µl).

\* Tämä ei ole täydellinen luettelo mahdollisista spektrofotometreista OD<sub>260</sub> nm -mittaukseen.

**Huomautus:** jos käytössä on QIAamp-lisäosa, OD-arvoista vähennetään automaattisesti sisäinen ATE-tyhjä spektri, joten ylimääräistä tyhjää ATE-näytettä ei tarvita tässä kokoonpanossa.

Ihanteellisesti gDNA:n vähimmäispitoisuus on 10 ng/µl\*, mutta näytteet, jotka ovat pitoisuudeltaan vain 5 ng/µl, voidaan käsitellä, vaikka käsittelyssä on virheellisten "Low input" (pieni määrä) -tulosten riski.

## gDNA:n bisulfiittikonversio EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjalla

Tämä protokolla mahdollistaa bisulfiittikonversion 200, 400 tai enintään 1 000 ng:n DNA-määrillä (mitattuna OD<sub>260</sub> nm -mittauksella) enintään 40 µl:n tilavuudessa. Suositeltava DNA-määrä bisulfiittikonversion reaktiota kohden on 400 ng. Jos DNA-tuotos on kuitenkin pieni, jopa 200 ng:n DNA-määriä voidaan käyttää, ja jos testi on tehtävä uudelleen qPCR-analyysin "pieni määrä" -merkinnän vuoksi (katso "Merkinnät", sivu 58), on käytettävä 1 000 ng:n määrää tai mahdollisimman lähellä tätä olevaa määrää.

**Huomautus:** gDNA-määrä viittaa gDNA:n kvantifointiin OD 260 -mittauksella (esimerkiksi kun käytetään NanoDrop- tai QIAxpert-instrumenttia QIAamp-lisäosan kanssa kokonaisnukleiinihappomittaukseen).

### Aloituspainemateriaali

- Genomista DNA:ta on käytettävä bisulfiittihoitoon ilman aiempaa rajoitetun digeroinnin vaihetta.

\* 10 ng/µl 400 ng:n gDNA-määrän saamiseksi (suositeltu määrä) bisulfiittikonversioita varten, kun gDNA:n enimmäistilavuus konversiota varten on 40 µl.

## Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Varmista, että bisulfiittikonversioreagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty asianmukaisissa olosuhteissa. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- DNA-suojapuskurin pitäisi muuttua vihreästä siniseksi sen jälkeen, kun se lisätään DNA-bisulfiittiliuosseokseen. Tämä ilmaisee, että bisulfiittikonversioreaktiota on sekoitettu riittävästi ja sen pH on oikea. Väärä pH voisi vaikuttaa konvertoidun DNA:n fiksointiin putkessa.
- Tee kaikki sentrifugointivaiheet huoneenlämmössä (15–25 °C).
- Bisulfiittiliuosta voidaan säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään 6 kuukauden ajan.
- BD-etanolipuskuriseokseen voi muodostua valkoista saostumaa, kun sitä on säilytetty jonkin aikaa. Tämä seostuma ei vaikuta BD-puskurin suorituskykyyn. Vältä kuitenkin saostumien siirtämistä MinElute DNA spin column -putkeen.

## Ennen käyttöä tehtävät toimenpiteet

- Preparoi sarjan reagenssit julkaisun *EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook*. (EpiTect Fast Bisulfite Conversion -käsikirja) kohdassa "Preparation of reagents" (Reagenssien preparointi) kuvatulla tavalla.
- Tasapainota näytteet ja puskurit huoneenlämpöön.
- **Valinnainen:** Aseta lämpösekoitin, kuumennuslevy tai kuumennettava ravistava inkubaattori 60 °C:seen liottaaksesi bisulfiittiliuoksen.

## MinElute DNA spin column -putkien käsittely

Nukleiinihappoa hyödyntävien vahvistustekniikoiden herkkyyden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä MinElute DNA spin column -putkia, jotta näytteiden ristikontaminaatiolta vältyttäisiin:

- Pipetoi näyte tai liuos varovasti MinElute DNA spin column -putkeen reunaa kastelematta. Älä kosketa MinElute DNA spin column -kalvoa pipetin kärjellä.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Suosittelemme käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosolieste.
- Avaa yksi MinElute DNA spin column -putki kerrallaan ja varo huolellisesti tuottamasta aerosoleja.
- Käytä käsineitä koko toimenpiteen ajan. Jos käsineet ja näyte joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa, vaihda käsineet välittömästi.

## Sentrifugointi

- MinElute DNA spin column -putket sopivat vakiomallisiin 1,5–2 ml:n mikrosentrifugiputkiin. Pakkauksessa on 2 ml:n näyteputkisarja kuivasentrifugointivaihetta varten.
- Kaikki sentrifugointivaiheet on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C).
- Käsittele MinElute DNA spin column -putkia mikrosentrifugissa.
- Sulje MinElute DNA spin column -putket aina ennen niiden asettamista mikrosentrifugiin.
- Jotta useita näytteitä voidaan käsitellä yhtä aikaa tehokkaasti, suosittelemme telineen täyttämistä näyteputkilla, joihin MinElute DNA spin column -putket voidaan siirtää sentrifugikäsitelyn jälkeen. Näyteputkia voidaan käyttää useita kertoja.

## Toimenpide

1. Sulata bisulfiittikonversioreaktioihin käytettävä DNA. Varmista, että bisulfiittiliuos on täysin liuennut.

**Huomautus:** lämmitä bisulfiittiliuos tarvittaessa 60 °C:seen ja käytä vortex-laitteessa, kunnes kaikki saostumattomat ovat taas lienneet.

**Huomautus:** älä aseta liuennutta bisulfiittiliuosta jään päälle.

2. Preparoi bisulfiittireaktiot 200 µl:n PCR-putkissa (eivät sisälly pakkaukseen) seuraavan sivun taulukossa Taulukko 1 kuvatulla tavalla. Lisää jokainen osa luetellussa järjestyksessä.

**Huomautus:** DNA:n ja RNase-puhdistetun veden kokonaismäärän on oltava 40 µl.

**Huomautus:** Käytä gDNA-kohdemäärän soveltuvan tilavuuden määrittämiseen seuraavaa kaavaa:

$$\text{bisulfiittikonversioon tarvittava gDNA-tilavuus (}\mu\text{l)} = \frac{\text{kohdemäärä (ng)}}{\text{keskimääräinen gDNA-pitoisuus (ng/}\mu\text{l)}}$$

**Huomautus:** kun käytät *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjaa, julkaisun *EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook* (EpiTect Fast -bisulfiittikonversion käsikirja) "pieni pitoisuus" -protokollaa on aina käytettävä, myös 1 000 ng:n määrillä, sillä FFPE-näytteistä puhdistetun gDNA:n pitoisuus on yleensä pieni.

**Huomautus:** näytteet on suojattava hajoamiselta käyttämällä bisulfiittiseosta vortex-laitteessa 5 sekunnin ajan välittömästi sen jälkeen, kun DNA-suojapuskuri on lisätty.

Taulukko 1. Bisulfiittireaktio-osat

Osa	Tilavuus reaktiota kohti (µl)
DNA	Muuttuja* (enintään 40 µl)
RNase-puhdistettu vesi	Muuttuja*
Bisulfiittiliuos	85
DNA-suojapuskuri	15
<b>Kokonaismäärä</b>	<b>140</b>

\* DNA:n ja RNase-puhdistetun veden kokonaismäärän on oltava 40 µl.

3. Sulje PCR-putket ja sekoita bisulfiittireaktioita huolellisesti välittömästi. Säilytä putkia huoneenlämpötilassa (15–25 °C).

**Huomautus:** DNA-suojapuskurin pitäisi muuttua vihreästä siniseksi sen jälkeen, kun se lisätään DNA-bisulfiittiliuosseokseen. Tämä ilmaisee, että bisulfiittikonversioreaktiota on sekoitettu riittävästi ja sen pH on oikea tai että DNA sitoutuu MinElute DNA spin column -putkeen.

4. Tee bisulfiitti-DNA-konversio PCR-laitteella. Ohjelmoi PCR-laite seuraavan sivun Taulukko 2:n ohjeiden mukaan.

Koko syklin pitäisi kestää noin 30 minuuttia.

**Huomautus:** jos käytät PCR-laitetta, johon ei voi lisätä reaktiilavuutta (140 µl), määritä instrumenttiin suurin mahdollinen tilavuusasetus.

Taulukko 2. PCR-laitteen bisulfiittikonversion olosuhteet

Vaihe	Aika	Lämpötila
Denaturointi	5 min	95 °C
Inkubaatio	10 min	60 °C
Denaturointi	5 min	95 °C
Inkubaatio	10 min	60 °C
Pito	Määrittämätön*	20 °C

\* Konvertoitu DNA voidaan jättää PCR-laitteeseen yön yli ilman, että suorituskyky heikkenee.

5. Aseta bisulfiittireaktiot sisältävät PCR-putket PCR-laitteeseen. Aloita inkubaatio PCR-laitteessa.

**TÄRKEÄÄ:** Koska bisulfiittireaktiota ei ole päällystetty mineraaliöljyllä, vain PCR-laitteet, joissa on lämmitetty kansi, soveltuvat tähän toimenpiteeseen. On tärkeää käyttää PCR-putkia, jotka voi sulkea tiukasti.

**Huomautus:** konvertoitu DNA voidaan jättää PCR-laitteeseen yön yli ilman, että suorituskyky heikkenee.

### Bisulfiittikonvertoidun DNA:n puhdistus

6. Kun bisulfiittikonversio on valmis, käytä bisulfiittireaktiot sisältäviä PCR-putkia sentrifugissa hetken aikaa ja siirrä sitten bisulfiittireaktiot kokonaisuudessaan puhtaisiin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin.  
Saostumien siirtyminen liuokseen ei vaikuta reaktion suorituskykyyn tai tuotokseen.
7. Lisää 310 µl BL-puskuria joka näytteeseen. Sekoita liuosta käyttämällä sitä ensin vortex-laitteessa ja sitten hetki sentrifugissa.
8. Lisää 250 µl etanolia (96–100 %) joka näytteeseen. Sekoita liuoksia käyttämällä niitä vortex-laitteessa pulssittaisella teholla 15 sekunnin ajan ja poista sitten pisarat korkin sisäpuolelta käyttämällä liuoksia sentrifugissa hetken aikaa.



9. Aseta tarvittava määrä MinElute DNA spin column -putkia ja näyteputkia soveltuvaan telineeseen. Siirrä koko seos jokaisesta vaiheen 8 putkesta vastaavaan MinElute DNA spin column -putkeen.
10. Käytä spin column -putkia sentrifugissa enimmäisnopeudella 1 minuutin ajan. Hävitä suodos ja aseta spin column -putket takaisin näyteputkiin.
11. Lisää 500 µl BW-puskuria (pesupuskuria) jokaiseen spin column -putkeen ja käytä sentrifugissa enimmäisnopeudella 1 minuutin ajan. Hävitä suodos ja aseta spin column -putket takaisin näyteputkiin.
12. Lisää 500 µl BD-puskuria (desulfonaatiopuskuria) jokaiseen spin column -putkeen ja inkuboi 15 minuutin ajan huoneenlämmössä (15–25 °C).  
Jos BD-puskurissa on saostumia, vältä niiden siirtämistä spin column -putkiin.  
**TÄRKEÄÄ:** BD-puskuria sisältävä pullo on suljettava välittömästi käytön jälkeen, jotta vältetään ilman sisältämän hiilidioksidin aiheuttama happamoituminen.  
**Huomautus:** spin column -putkien korkit on tärkeää sulkea ennen inkubointia.
13. Käytä spin column -putkia sentrifugissa enimmäisnopeudella 1 minuutin ajan. Hävitä suodos ja aseta spin column -putket takaisin näyteputkiin.
14. Lisää 500 µl BW-puskuria jokaiseen spin column -putkeen ja käytä sentrifugissa enimmäisnopeudella 1 minuutin ajan. Hävitä suodos ja aseta spin column -putket takaisin näyteputkiin.
15. Toista vaihde 14 kerran.
16. Lisää 250 µl etanolia (96–100 %) jokaiseen spin column -putkeen ja käytä sentrifugissa enimmäisnopeudella 1 minuutin ajan.
17. Aseta spin column -putket uusiin 2 ml:n näyteputkiin (sisältyvät pakkaukseen) ja käytä spin column -putkia sentrifugissa enimmäisnopeudella 1 minuutin ajan poistaaksesi mahdolliset nestejäämät.
18. Aseta spin column -putket, joiden korkit ovat auki, puhtaisiin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin (eivät sisälly pakkaukseen) ja inkuboi putkia 5 minuutin ajan 60 °C:ssa kuumennuslevyssä. Tämä vaihe varmistaa mahdollisen jäljelle jääneen nesteen haihtumisen.

---

19. Lisää 15 µl EB-puskuria (uuttamispuskuria) suoraan jokaisen spin-column-kalvon keskelle ja sulje korkit varovasti.

**Huomautus:** älä uuta alle 15 µl:lla puskuria, sillä tällöin uutteen määrä on liian pieni qPCR-vaihetta varten.

20. Inkuboi spin column -putkia huoneenlämmössä 1 minuutin ajan.

21. Uuta DNA käyttämällä sentrifugissa 1 minuutin ajan teholla 15 000 x g (12 000 rpm).

**Huomautus:** Suosittelemme säilyttämään puhdistettua DNA:ta 2–8 °C:ssa enintään 24 tunnin ajan. Jos puhdistettua DNA:ta säilytetään yli 24 tuntia, suosittelemme säilyttämistä –30...–15 °C:ssa.

# Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla\* ja tulokset on tulkittava automaattisesti Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistolla.

Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston käyttöön ennen protokollan aloittamista. Katso lisätietoja instrumentin, Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaista.

**Tärkeä ilmoitus:** Jos käytät Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoa, Gamma Plug-in -lisäosaa ja testiprofiilia ensimmäistä kertaa, katso asennusohjeet kohdasta "Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja testiprofiilin tuominen", sivulta 50. Jos Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto, Gamma Plug-in -lisäosa ja testiprofiili on jo asennettu ja tuotu tietokoneeseesi, jatka alla olevien ohjeiden mukaan:

## qPCR-ajon asettaminen

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja sisältää tuotteet kahdeksan näytteen testaamiseen enintään kolmella ajolla.

## Ennen käyttöä tehtävät toimenpiteet

- Jäähdytä 72 x 0,1 ml:n putken latauslevy 10 minuutin ajan pakastimessa tai vähintään 1 tunnin ajan jääkaappilämpötilassa.

\* Mikäli mahdollista, voidaan käyttää Rotor-Gene Q 5plex HRM -instrumenttia, jonka valmistuspäivä on tammikuussa 2010 tai myöhemmin. Valmistuspäivä on nähtävissä laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

- Sulata kaikkia *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan komponentteja ja näytteitä jääkaapissa, jäällä tai jäähdytyslevyllä tai huoneenlämmössä niin kauan kuin tarpeen.  
**Huomautus:** jos sulatus tehdään huoneenlämmössä, tarkista materiaalin sulaminen säännöllisesti, erityisesti PITX2 RGQ PCR MMx -pääseoksen, sillä se sisältää dNTP:tä, joka on herkkä lämpötiloille.  
**Huomautus:** PITX2 RGQ PCR PPM on suojattava auringonvalolta, sillä se sisältää värinukleotidejä.
- Aseta sulatetut tuotteet jälle, jäähdytyslevylle tai jääkaappiin, ennen kuin asetat ne takaisin -30...-15 °C:seen käytön jälkeen.  
**Huomautus:** *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan osat voidaan pitää 2–8 °C:ssa ja valolta suojattuina enintään 6 tuntia, jos niitä käytetään monta kertaa saman päivän aikana.  
**Huomautus:** *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan komponentteja voidaan käyttää enintään neljän pakastus- ja sulatussyklin ajan.
- Tyhjennä työpöydän alue, jossa PCR-seos preparoidaan, jotta malli- tai nukleasikontaminaation riski pienenesi.
- Käytä putkia vortex-laitteessa (10–12 sekuntia) ja sitten hetki sentrifugissa ennen käyttöä. Poikkeuksena PITX2 RGQ PCR MMx -seos, joka sekoitetaan pipetoimalla ylös ja alas, sillä se sisältää *Taq*-polymeraasia.

## Toimenpide

1. Preparoi PITX2 qPCR -reaktioseosta **jäällä** (tai käyttämällä jäähdytyslevyä) 1,5 tai 2 ml:n putkessa (eivät sisälly pakkaukseen) käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.  
Taulukko 3 (seuraava sivu) kuvaa pipetointitapaa, jolla PITX2-reaktioseos lopulliseksi reaktiotalavuudeksi tulee 20 µl sen jälkeen, kun niihin on lisätty 4 µl bisDNA-näytettä tai kontrolliliuosta. Mukaan on sisällytetty lisätalavuutta pipetointivirheiden kompensoimiseksi ja jotta reaktioseosta voitaisiin valmistaa riittävä määrä neljälle näytteelle tuplana sekä neljälle kontrollille. Jos näytteitä testataan vähemmän, reaktioseosta voidaan preparoida vastaavasti. Muista antaa lisätalavuuden kompensoida pipetointivirheet (yksi ylimääräinen kuoppa 10 kuoppaa kohden ja kaksi ylimääräistä kuoppaa 20 kuoppaa kohden).

Taulukko 3. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -reaktioseoksen preparointi

Osa	1 reaktio (µl)	Esimerkki 12 kuopan levyllä: 12 + 2 ylimääräistä reaktiota (µl)*
PITX2 RGQ PCR -pääseos	10	140
PITX2 RGQ PCR -alukekoetinseos	6	84
qPCR-reaktioseoksen kokonaistilavuus (µl)	16	224
qPCR-reaktioseoksen jakaminen	16 µl/putki	
Näytteen jakaminen	4 µl/putki	
qPCR-reaktion kokonaistilavuus	20 µl	

\* Sisältää ylimääräistä reaktiota, joka kompensoi pipetointivirheen: yksi ylimääräinen kuoppa 10 kuoppaa kohden ja kaksi ylimääräistä kuoppaa 20 kuoppaa kohden.

- Käytä vortex-laitteessa (10–12 sekuntia) ja sentrifugoi PITX2 qPCR -reaktioseosta hetken aikaa. Aseta qPCR-liuskaputket esijähdytetylle Loading Block 72 -latauslevylle ja jakele 16 µl tarvittavaa PITX2 qPCR -reaktioseosta kuhunkin liuskaputkeen Kuva 4:n latauslevyn asetускаavion mukaisesti.

**Huomautus:** 16 µl:n reaktioseos on suositeltavaa jakaa käänteispiipetoinnilla.

1	REF50	9	Sample 3	17	NA	25	NA	33	NA	41	NA	49	NA	57	NA	65	NA
2	REFlow	10	Sample 3	18	NA	26	NA	34	NA	42	NA	50	NA	58	NA	66	NA
3	NC	11	Sample 4	19	NA	27	NA	35	NA	43	NA	51	NA	59	NA	67	NA
4	NTC	12	Sample 4	20	NA	28	NA	36	NA	44	NA	52	NA	60	NA	68	NA
5	Sample 1	13	NA	21	NA	29	NA	37	NA	45	NA	53	NA	61	NA	69	NA
6	Sample 1	14	NA	22	NA	30	NA	38	NA	46	NA	54	NA	62	NA	70	NA
7	Sample 2	15	NA	23	NA	31	NA	39	NA	47	NA	55	NA	63	NA	71	NA
8	Sample 2	16	NA	24	NA	32	NA	40	NA	48	NA	56	NA	64	NA	72	NA

**Kuva 4. Latauslevyn asetukset tehtäessä neljän näytteen testiä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjalla.** Numerot ilmaisevat sijainnit latauslevyissä sekä roottorin loppuasennon. Kontrollien sijainnit on määritetty PITX2-testiprofilissa, eikä niitä voi muuttaa. Jos kontrolleja ei aseteta neuvotulla tavalla, tuloksia ei voi analysoida automaattisesti.

**REF50:** PITX2 RGQ PCR -referenssi 50; **REFlow:** matala PITX2 RGQ PCR -referenssi; **NC:** negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli, **NTC:** PITX2 RGQ PCR NTC (NTC); **Näytteet 1–4:** bisDNA-näytteet, **NA:** tyhjennä kuoppa.

- Käytä bisDNA-näytteet, PITX2 RGQ PCR -referenssi 50 (Ref50), matala PITX2 RGQ PCR -referenssi (RefFlow), negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli (NC) ja PITX2 RGQ PCR NTC (NTC) vortex-laitteessa (10–12 sekuntia) ja sitten lyhyesti sentrifugissa.

4. Lisää 4 µl näytettä tai kontrollimateriaalia vastaavaan putkeen kohdan Kuva 4 mukaisesti, jolloin kokonaistilavuudeksi tulee 20 µl. Sekoita varovasti 5 kertaa pipetoimalla ylös ja alas.

**Huomautus:** Muista vaihtaa pipetin kärki jokaisen putken kohdalla. Näin vältät väävät positiiviset tulokset, jotka ovat seurausta ei-spesifin mallin aiheuttamasta kontaminaatiosta.

5. Sulje kaikki putket ja tarkista, ettei putkien pohjalla ole kuplia.
6. Palauta kaikki *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan osat ja näytteet asianmukaisesti säilytysolosuhteisiin, jotta materiaali ei hajoaisi.

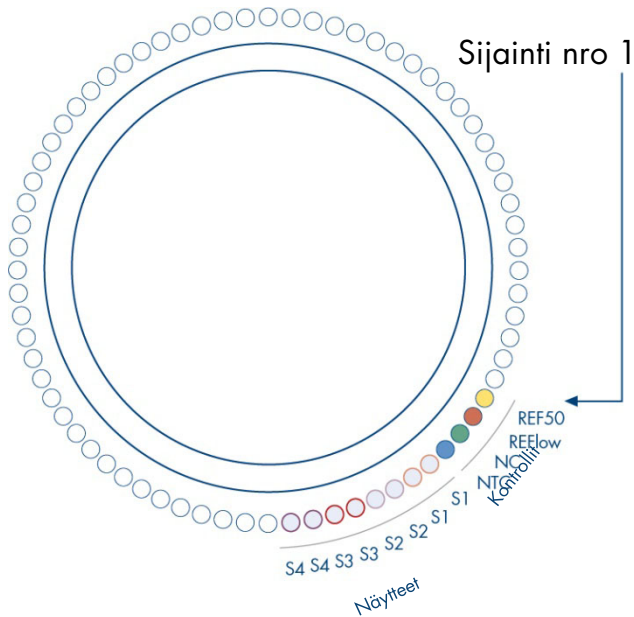
### Preparing the Rotor-Gene MDx:n preparointi


On erittäin suositeltavaa käynnistää ajo niin pian kuin mahdollista preparoinnin jälkeen. Jos levy kuitenkin preparoidaan, mutta sitä ei voida ajaa suoraan (koska instrumentti ei ole käytettävissä), levyä voidaan säilyttää at 2–8 °C:ssa valolta suojattuna enintään 24 tuntia (katso "Käytön aikajakso", sivu 74).

7. Aseta 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -roottoripitimeen.
8. Täytä roottori liuskaputkilla, jotka on preparoitu aiemmin osoitettujen sijaintien mukaan. Aloita sijainnista 1 kuvan 5 mukaisesti.
9. Täytä tyhjät sijainnit tyhjiillä, suljetuilla putkilla niin, että roottori on kokonaan täynnä.

**Huomautus:** Varmista, että ensimmäinen putki on asetettu sijaintiin 1, ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja sijainteihin (tärkeää näytteen ajon kelvollisuuden ja jäljitettävyyden kannalta) kuvan 5 osoittamalla tavalla.

**Huomautus:** Pidä neljä kontrollia (REF50, REFflow, NC ja NTC) sijainneissa 1–4, jotta poiminnan optimointi (joka tehdään putken sijainnissa 1) tehdään aina samassa monistuksessa. Varmista, että kontrollit on lisätty oikeassa järjestyksessä niiden automaattista analysointia varten (kontrollien käänteinen järjestys mitätöi PITX2-testiprofiilin ajon).



**Kuva 5. Roottorin asetukset tehtäessä testiä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjalla. REF50:** PITX2 RGQ PCR -referenssi 50; **REFlow:** Matala PITX2 RGQ PCR -referenssi; **NC:** Negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli, **NTC:** PITX2 RGQ PCR NTC (NTC); **S1–S4:** bisDNA-näytteet. **Huomautus:** Kaikki jäljellä olevat sijainnit  on täytettävä tyhjiillä putkilla.

10. Kiinnitä lukitusrengas.

11. Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -instrumenttiin. Sulje instrumentin kansi.

Työluettelon luominen ja qPCR-ajon aloittaminen

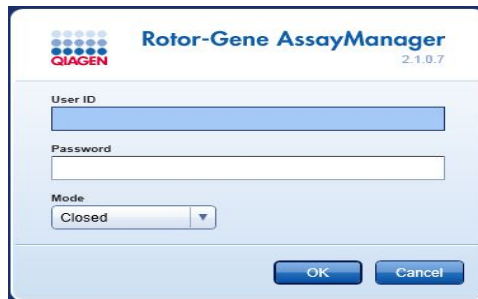
**Huomautus:** työluettelo voidaan luoda ja tallentaa ennen näytteiden preparointia tai kun testi määritetään instrumenttiin tässä käsikirjassa kuvatulla tavalla.

12. Käynnistä Rotor-Gene Q MDx -instrumentti.

13. Avaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto napsauttamalla kuvaketta:



Rotor-Gene AssayManager -ikkuna avautuu (kuva 6).



**Kuva 6.** Rotor-Gene AssayManager -kirjautumisnäyttö.

14. Kirjautu sisään "Operator" (Operaattori) -roolin käyttäjänä suljetussa tilassa. Valitse "OK". Rotor-Gene AssayManager -näyttö avautuu (Kuva 7, seuraava sivu).

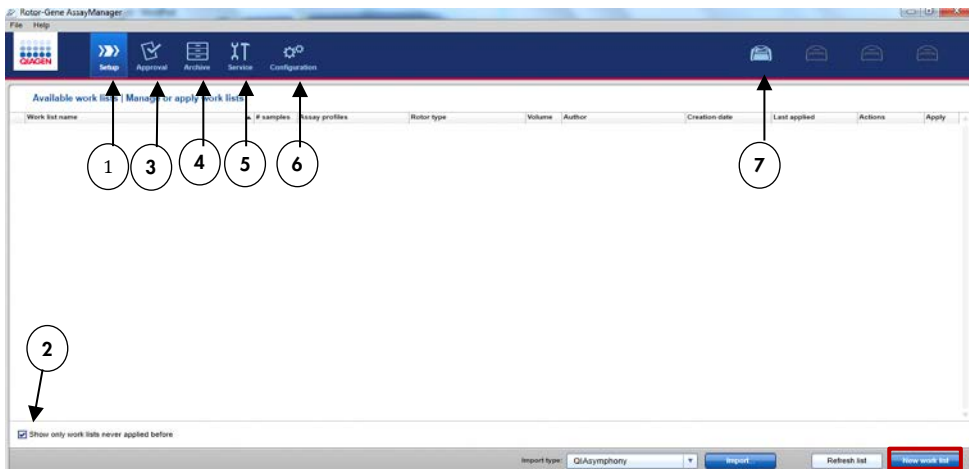
15. Tarkista, että ohjelmisto on havainnut RGQ:n oikein ennen ajon käynnistämistä.

16. Valitse "Setup" (Asetukset) -välilehti.







**Huomautus:** "Setup"-ympäristön ja työluettelon luonnin ja muokkauksen yleiset toiminnot on kuvattu julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas).

17. Valitse "New work list" (Uusi työluettelo) (Kuva 7).

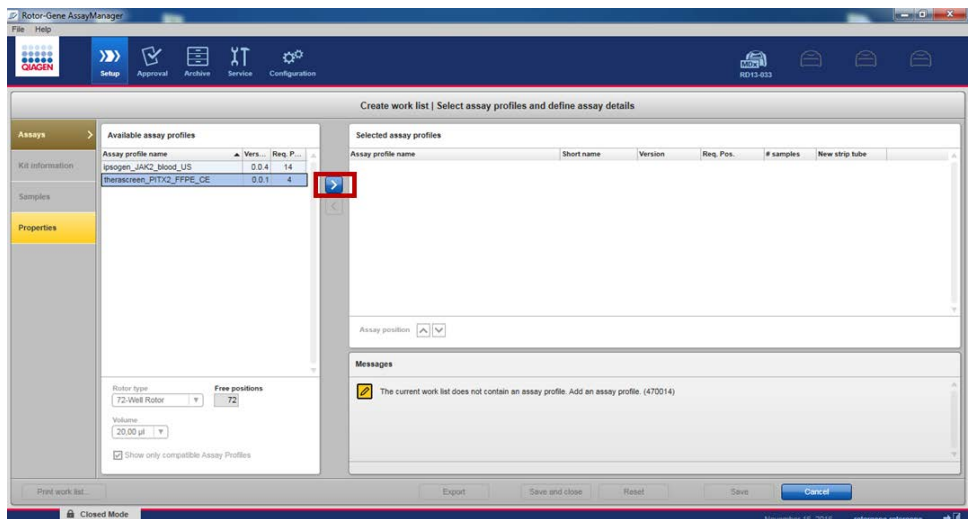




**Kuva 7. RGAM-ohjelmiston eri välilehtien kuvaukset.**

- |  |  |  |               |  |            |
|--|--|--|---------------|--|------------|
| <p>1 "Setup"-välilehti. Tämä välilehti on työluetteloiden hallitsemista tai käyttämistä varten.</p> <p>2 Käyttöön otettujen työluetteloiden valitseminen. Näyttää vain uudet työluettelot. "Applied work list" (Käyttöön otettu työluettelo) on jo tehty.</p> <p>3 "Approval" (Hyväksyntä) -välilehti. Tässä välilehdessä voit etsiä aiempia testejä.</p> <p>4 "Archive" (Arkisto) -välilehti. Mahdollistaa vanhojen, jo hyväksytyjen testien etsimisen.</p> | <p>5 "Service" (Huolto) -välilehti. Sisältää jokaisen ohjelmiston luoman tiedoston auditointilokin raportin.</p> <p>6 "Configuration" (Kokoonpano) -välilehti. Mahdollistaa kaikkien ohjelmistoparametrien määrittämisen.</p> <p>7 Rotor-Gene Q MDx (RGQ) -kuvakkeet:</p> <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td></td> <td>Ei yhdistetty</td> <td></td> <td>Yhdistetty</td> </tr> </table> |  | Ei yhdistetty |  | Yhdistetty |
|    | Ei yhdistetty  |  | Yhdistetty    |  |            |

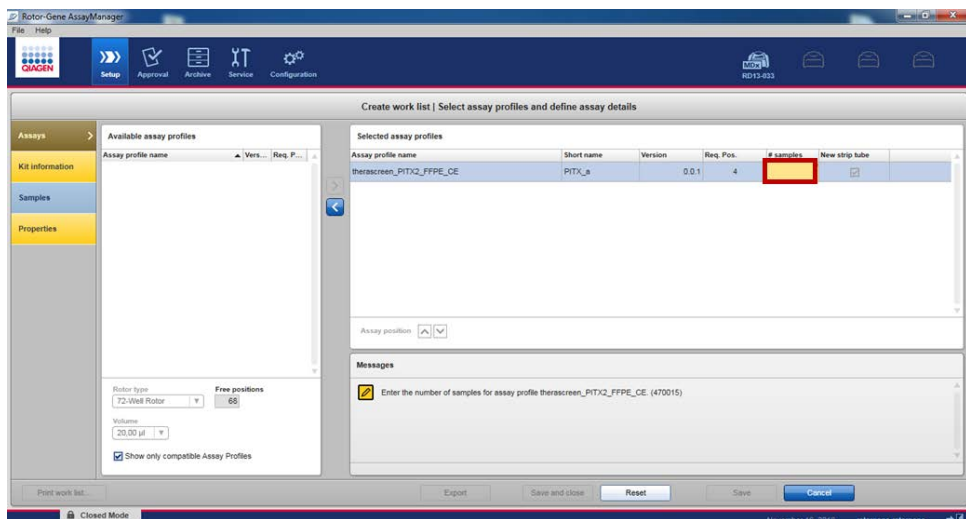
18. Valitse PITX2-testiprofiili käytettävissä olevien testiprofiilien luettelosta (kuva 8).



**Kuva 8. Testiprofiilin tuonti.**

19. Siirrä valittu testiprofiili valittujen testiprofiilien luetteloon napsauttamalla nuolta (testiprofiilin nimen oikealla puolella). Testiprofiilin pitäisi nyt näkyä "Selected assay profiles" (Valitut testiprofiilit) -luettelossa (kuva 8).
20. Täytä keltaiset kentät "Assays" (Testit) -välilehdessä: Näytteiden määrä (enintään 8) levyn määritysten mukaan (Kuva 9).

**Huomautus:** Näytteiden määrä ei vastaa kuoppien määrää eikä sisällä kontroleja. Näytteet testataan tuplana, minkä vuoksi yksi näyte vastaa kahta kuoppaa. Esimerkiksi 12 kuopan levyn kohdalla asetettavien näytteiden määrä on 4, katso Kuva 4 (sivu 37).



Kuva 9. Näytemäärän lisääminen.

21. Valitse "Kit Information" (Sarjan tiedot) -välilehti. Lisää sarjan tiedot valitsemalla joko "Use kit bar code" (Käytä sarjan viivakoodia) tai "Enter kit information manually" (Lisää sarjan tiedot käsin) ja lisäämällä käsin sarjan tiedot, jotka ovat *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan laatikon etiketissä:



Materiaalinumero



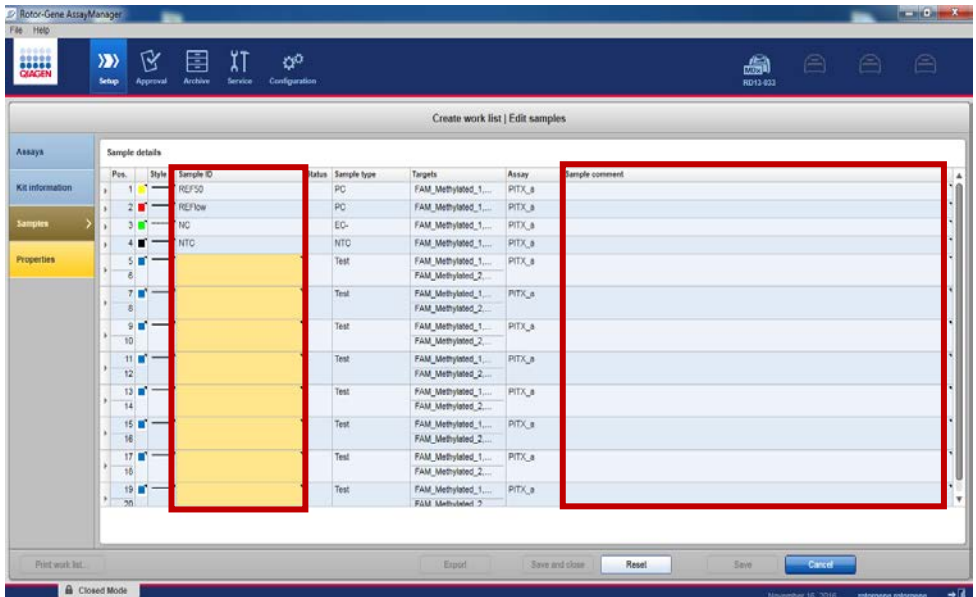
Viimeinen käyttöpäivä



Eränumero

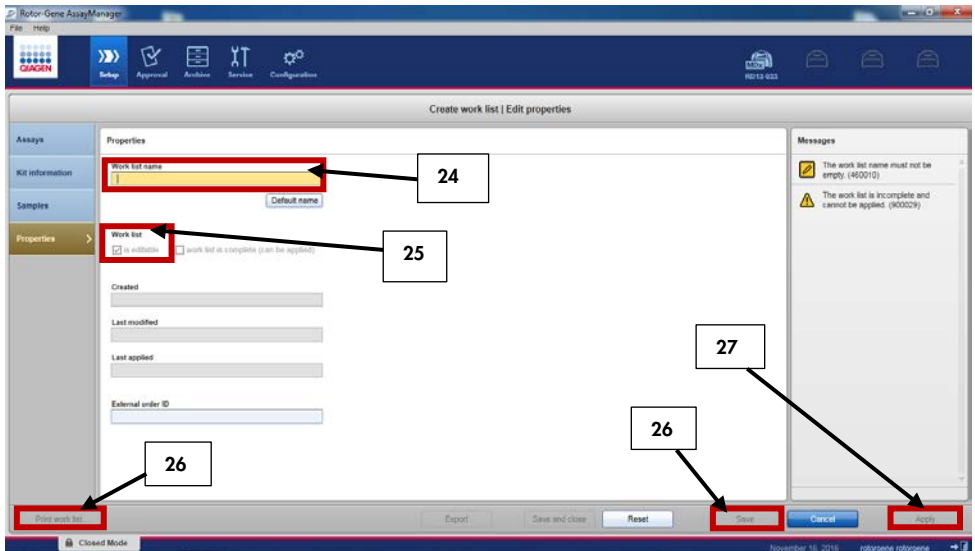
22. Valitse "Samples" (Näytteet) -välilehti. Näkyviin tulee luettelo näytteen tiedoista. Luettelo edustaa roottorin odotettua asettelua.

23. Kirjoita näytteen tunniste sekä mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot kommenttina jokaisen näytteen kohdalle (kuva 10).



Kuva 10. Näyteasetus.

24. Valitse "Properties" (Ominaisuudet) ja kirjoita työluettelon nimi (kuva 11).



Kuva 11. Työluettelon luominen.

25. Valitse "Worklist is complete (can be applied)" (Työluettelo on valmis [voidaan ottaa käyttöön]) -valintaruutu.

26. Tallenna työluettelo.

**Valinnainen:** Tulosta työluettelo "Print work list" (Tulosta työluettelo) -vaihtoehdolla.

Työluettelon tulostaminen voi auttaa ajon valmistelussa ja asettamisessa. Näytteen tiedot ovat osa työluetteloa.

27. Valitse vastaava työluettelo työluettelon hallintaluettelosta ja napsauta "Apply" (Käytä) -painiketta. Jos työluettelo on vielä avoinna, voit myös napsauttaa "Apply"-painiketta.

**Huomautus:** tarkista, että ohjelmisto on havainnut Rotor-Gene Q MDx:n oikein ennen ajon käynnistämistä.

28. Kirjoita testin nimi.

29. Valitse käytettävä sykleri "Cycler Selection" (Syklerin valinta) -kohdasta.

**Huomautus:** Käytettävän syklerin on oltava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

30. Tarkista, että lukitusrengas on kiinnitetty oikein ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty.

31. Valitse "Start run" (Aloita ajo). qPCR-ajon pitäisi käynnistyä.

Vapauta ja raportoi qPCR-tulokset

"Approval" (Hyväksyntä) -ympäristön yleinen toiminnallisuus on kuvattu julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in -lisäosan käyttöopas).

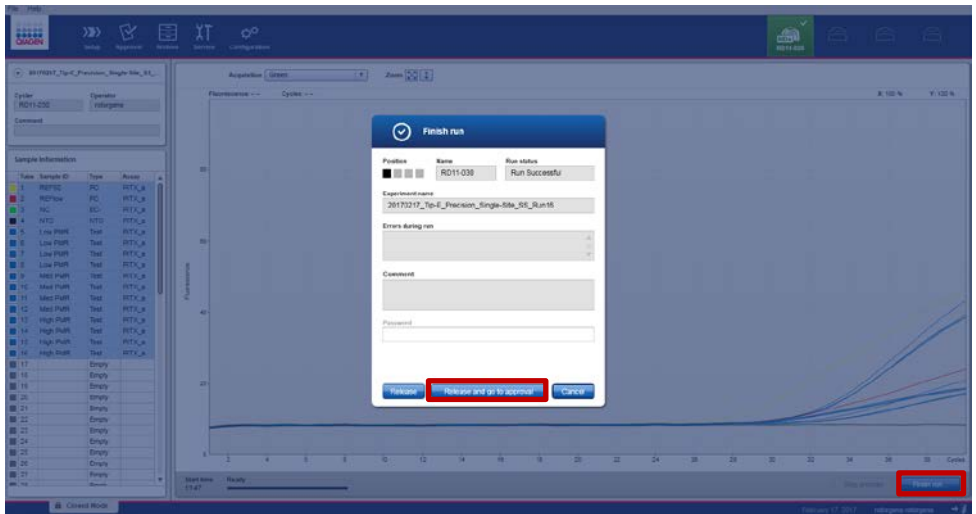
Kun ajo on päättynyt ja sykleri on vapautettu, testi tallentuu sisäiseen tietokantaan. Kerätyt tiedot analysoidaan automaattisesti testiprofiilissa määritettyjen sääntöjen ja parametrien mukaan.

**Huomautus:** ajon hyväksyminen edellyttää käyttäjää "Approver" (Hyväksyjä).

1. Kun ajo on valmis, analysoi ja vie tiedot valitsemalla "Finish run" (Päätä ajo).

**Huomautus:** testi tallentuu sisäiseen tietokantaan vasta kun tämä vaihe on valmis.

2. Kun olet valinnut "Finish run", anna salasana ja valitse "Release and go to approval" (Vapauta ja siirry hyväksyntään) (Kuva 12).



Kuva 12. Ajon viimeistely.

"Approver"-roolilla kirjautuneiden käyttäjien on valittava "Release and go to approval" -vaihtoehto.

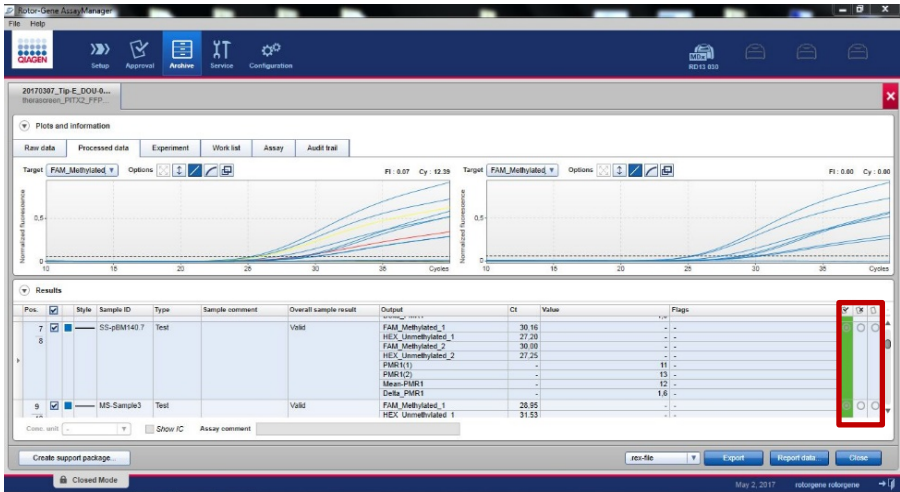
"Operator"-roolilla kirjautuneiden käyttäjien on valittava "Release" (Vapauta) -vaihtoehto.

"Release and go to approval" -vaihtoehdon valinta tuo testin tulokset näkyviin "Approval"-ympäristössä.

Jos "Operator"-roolissa oleva käyttäjä napsauttaa "Release"-vaihtoehtoa, jonkin toisen käyttäjän on kirjauduttava sisään "Approver"-roolissa ja valittava "Approval"-ympäristö.

**Huomautus:** "Approval"-välilehdessä tutkimuksia voidaan analysoida vaihtamalla kunkin välilehden välillä (eli testi, auditointi, loki, ajon kontrollitulokset).

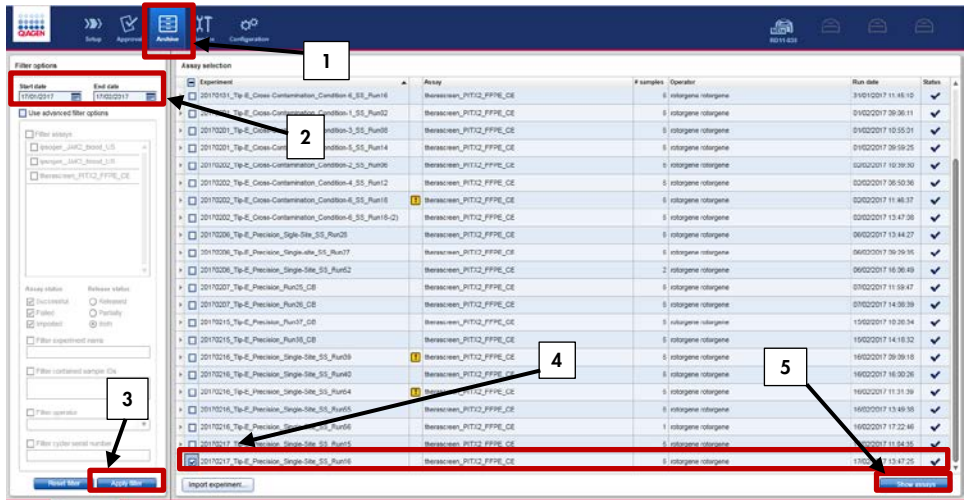
3. Tarkista kunkin näytteen monistumiskäyrät, valitse lippusarakkeen oikealla puolella oleva ensimmäinen ruutu (ruutu muuttuu vihreäksi) (kuva 13).



Kuva 13. Monistumiskäyrän tarkistaminen.

- Luo pdf-raportti ja tallenna LIMS-tiedosto valitsemalla "Release/report data" (Vapauta/raportoi tiedot) (kopio tallentuu automaattisesti kohteeseen C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports).
- Sulje pdf-tiedosto ja palaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon. Valitse "OK" aina pyydettyä.
- Vie rex-tiedosto menemällä "Archive"-välilehteen. Tarkista, että "Start date" (Aloituspäivä) ja "End date" (Päätymispäivä) ovat oikein ja valitse "Apply filter" (Käytä suodatinta). Valitse vietävä testi ja valitse sitten "Show assays" (Näytä testit) (kuva 14).





Kuva 14. Ajotietojen vieminen.

7. Vie rex-tiedosto (tiedosto tallentuu kohteeseen C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments).

**Huomautus:** ohjelmisto luo LIMS-tiedoston automaattisesti kohteeseen C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS

8. Poista Rotor-Gene Q MDx -instrumenttiin ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

**Huomautus:** Jos tarvitaan QIAGENin teknisen tuen tekemää vianmäärittystä, sen avuksi on tuotettava ajosta peräisin oleva tukipaketti. Tukipaketteja voidaan tuottaa "Approval"-tai "Archive"-ympäristössä. Lisätietoja on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas) kohdassa "Creating a support package" (Tukipaketin luominen).

Tukipaketin lisäksi hyödyllinen on myös auditointiloki ajalta  $\pm 1$  vuorokautta.

Auditointilokin voi noutaa "Service"-ympäristöstä. Lisätietoja on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas).

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja testiprofiilin tuominen


Rotor-Gene Q MDx -instrumenttiin liitettyssä tietokoneessa on oltava asennettuna Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto. Ohjelmiston voi ladata Rotor-Gene AssayManager v2.1 -tuotesivun "Product Resources" (Tuoteressurssit) -välilehden kohdasta "Operating Software" (Käyttöohjelmisto) osoitteessa [www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2\\_1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx).

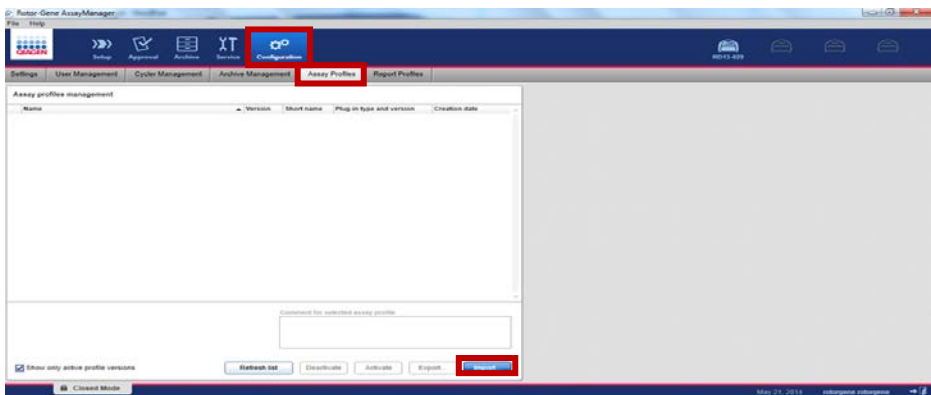
Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmistosta on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas). Lisätietoja instrumenttiin liitettyssä tietokoneessa olevista muista ohjelmistoista on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 -pikaopas).

Tulosten automaattinen tulkinta käytettäessä *therascreen PITX2 RGQ PCR -sarjaa* ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoa edellyttää, että Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon on asennettu Gamma Plug-in -lisäosan viimeisin versio. Katso "Product Resources" Rotor-Gene AssayManager v2.1 -tuotesivulta [www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2\\_1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx) ohjeet lisäosan viimeisimmän version käyttämiseen.

*therascreen PITX2 RGQ PCR -sarjan* kanssa tarvitaan myös testiprofiili. Testiprofiili sisältää kaikki parametrit, joita tarvitaan PITX2-testin sykleihin ja analyysiin. Nämä parametrit ovat lukittuina ajon aikana. PITX2-testiprofiili (AP\_therascreen\_PITX2\_FFPE\_CE) vastaa .iap-tiedostoa, jonka voi ladata *therascreen PITX2 RGQ PCR -sarjan* tuotesivulta: [www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/](http://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/) "Product Resources" -välilehden kohdasta "Protocol Files" (Protokollatiedostot). Testiprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon.

Alla on tarkempia tietoja Gamma Plug-in -lisäosan asennuksesta ja testiprofiilin tuomisesta Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon.

1. Lataa Gamma Plug-in -lisäosa osoitteesta **www.qiagen.com**.
2. Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla GammaPlugin.Installation.msi-tiedostoa. Noudata näkyviin tulevia asennusohjeita. Yksityiskohtaisia tietoja tästä prosessista on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas) osassa "Installing Plugins" (Lisäosien asentaminen).
3. Lisäosan onnistuneen asennuksen jälkeen henkilön, jolla on Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston ylläpitäjän oikeudet, on tuotava tarvittava testiprofiili seuraavalla tavalla:
4. Mene Windows Exploreriin ja tallenna testiprofiili seuraavaan tiedostoon:  
"C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\  
Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles".
5. Avaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto napsauttamalla  kuvaketta.
6. Kirjaudu sisään Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon käyttäjätunnuksellasi ja salasanallasi. Älä muuta "Closed mode" (Suljettu tila) -asetusta. Valitse "OK". Rotor-Gene AssayManager -näyttö avautuu.
7. Valitse "Configuration" -ympäristö (Kuva 15).



Kuva 15. "Configuration" -välilehti.

- 
8. Valitse "Assay Profiles" (Testiprofiilit) -välilehti.
  9. Valitse "Import" (Tuo).
  10. Valitse tuotava testiprofiili AP\_therascreen\_PITX2\_FFPE\_CE\_V1.0.x.iap (missä x = 1 tai suurempi luku) valintaikkunassa ja valitse "Open" (Avaa).
  11. Kun testiprofiilin tuonti on valmis, sitä voidaan käyttää "Setup"-ympäristössä.

# Tulosten tulkinta

## Tietojen analyysi

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto Gamma Plug-in v1.0 -lisäosan ja PITX2 -testiprofiilin kanssa (tästedes PITX2 -testipaketti) analysoivat automaattisesti *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan tulokset jokaisen kontrollin ja näytteen osalta.

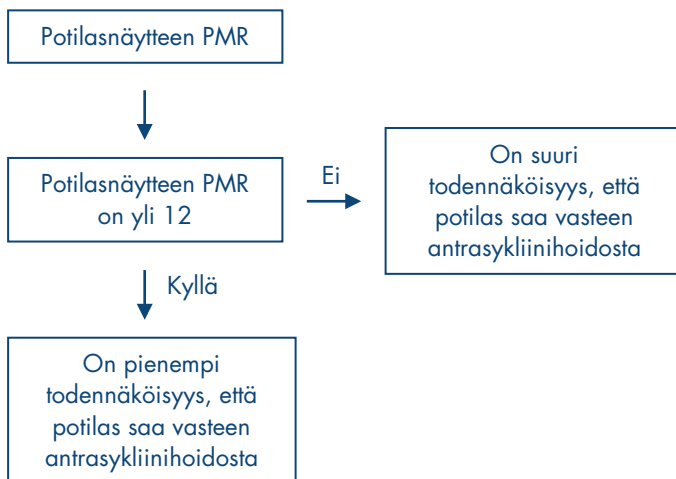
PITX2-testipaketti analysoi monistumiskäyriä ja voi merkitä epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä. Varoitusmerkintöjä voi näkyä myös muiden kuin mitätöinnin aiheuttavien käyräpoikkeamien kohdalla (katso merkintäluettelo ja yksityiskohdat kohdasta "Merkinnät", sivu 58).

Määrittäkseen testin kelvollisuuden PITX2-testipaketti analysoi myös ajokontrollit: PITX2 RGQ PCR -referenssi 50 (REF50), matala PITX2 RGQ PCR -referenssi (REFlow), negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli (NC) ja PITX2 RGQ PCR NTC (NTC). Kunkin kontrollin kelvollisuus perustuu C<sub>T</sub>- ja tai PMR-arvojen yhdenmukaisuuteen esimääritettyjen tietojen kanssa (katso "Näytteen kokonaistulokset", sivu 56, ja "Merkinnät", sivu 58).

**Huomautus:** jos vähintään yksi kontrolli on virheellinen, kaikista testinäytteistä saadut tulokset katsotaan virheellisiksi, eikä yhtäkään PMR-tulosta tule näkyviin.

PITX2-testipaketti analysoi näytteet myös tarkistamalla kaksoiskappaleiden kelvollisuuden ja määrän kelvollisuuden (katso "Näytteen kokonaistulokset", sivu 56, ja "Merkinnät", sivu 58). Lopuksi ohjelmisto määrittää näytteille numerottoman PMR-arvon jokaiselle näytetoistolle saatujen PMR-tulosten perusteella. Kullekin potilasnäytteelle saatu PMR antaa hoitavalle lääkärille tietoa siitä, saako potilas todennäköisesti vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta. Jos saatu PMR on enintään 12, potilas saa todennäköisesti vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta. Sitä vastoin jos saatu PMR on yli 12, toista

hoitoa voidaan ehdottaa, sillä todennäköisyys sille, että potilas saa vasteen antrasykliinipohjaisesta solunsalpaajahoidosta, on pienempi (kuva 16).



Kuva 16. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan potilasnäytteiden PMR-tulosten tulkinta.

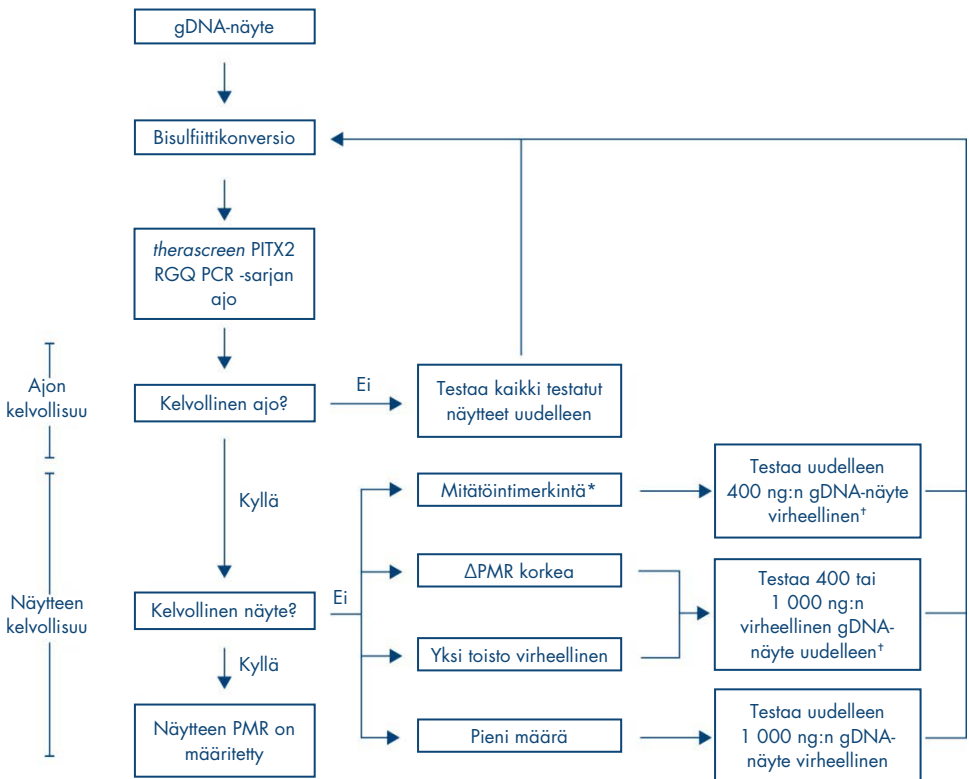
“Approver”-roolissa olevan käyttäjän on hyväksyttävä ja julkaistava PITX2-testipaketin automaattisesti analysoimat ja määrittämät testitulokset. Hyväksyttävissä näytetuloksissa on kolme hyväksyntäpainiketta vastaavan rivin perässä. Näillä painikkeilla voidaan hyväksyä tai hylätä näytetulokset. Lisätietoja on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in -lisäosan käyttöopas).

**Työnkulkukontrollia koskeva huomautus:** Näytteen HD216 (työnkulkukontrolli) on annettava PMR-arvo alueelta 30–50. Jos tämä PMR saadaan tällä työnkulkukontrollilla, sekä gDNA:n puhdistus- että bisulfiittikonversiovaiheet voidaan hyväksyä.

Jos saat virheellisiä tuloksia, noudata kohdan "Ongelmien ratkaisu", sivu 63, ohjeita.

## Uudelleentestaukset

Jos saat virheellisiä tuloksia, uudelleentestaus on tarpeen. Jos testi on virheellinen, eli yksi neljästä kontrollista on virheellinen, koko ajo kaikki testatut näytteet mukaan lukien on testattava uudelleen. Jos testi on kelvollinen, mutta yksi tai useampi näyte on virheellinen, virheellinen näyte (virheelliset näytteet) on testattava uudelleen virheen tyyppin tutkimisen jälkeen (katso "Merkinnät", sivu 58, Taulukko 6 ja Taulukko 7, sivut 59–60). Kuva 17 kuvaa uudelleentestaustoimenpiteen työnkulkua.



**Kuva 17.** *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan työnkulun uudelleentestaus.

\* Katso Taulukko 6 ja Taulukko 7, sivut 59–60.

† 200 ng:n määrä voidaan käyttää, jos gDNA:ta ei ole saatavilla riittävästi. Pienestä määrästä johtuvasta merkinnästä johtuvan virheellisen tuloksen riski on kuitenkin suurempi.

---

## Tulosnäyttö

### Kohteet ja yhdistetyt kohteet

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan kunkin testin tulokset näkyvät seuraavan nimisten kohteiden ja yhdistettyjen kohteiden alla:

- "FAM\_Methylated\_1": vihreän kanavan tulokset kaikille kontrolleille ja testinäytteiden toistolle 1.
- "FAM\_Methylated\_2": vihreän kanavan tulokset testinäytteiden toistolle 2.
- "HEX\_Unmethylated\_1": keltaisen kanavan tulokset kaikille kontrolleille ja testinäytteiden toistolle 1.
- "HEX\_Unmethylated\_2": keltaisen kanavan tulokset testinäytteiden toistolle 2.
- "PMR": Nämä kohteet ovat yhdistettyjä kohteita. Vastaava tulos huomioi kontrollien kelvollisuuden. Nämä kohteet näkyvät kaikille kontrolleille ja testinäytteille, jos ne ovat kelvollisia.
- "Mean\_PMR": Nämä kohteet ovat yhdistettyjä kohteita. Vastaava tulos huomioi kontrollien kelvollisuuden. Nämä kohteet näkyvät kaikille testinäytteille, jos ne ovat kelvollisia.

### Näytteen kokonaistulokset

Lopputulos kunkin kontrollin ja näytteen analyysistä näkyy raportin sarakkeessa "Overall Sample Result" (Näytteen kokonaistulos) (Taulukko 4).



**Taulukko 4. Näytteen kokonaistulos ja toimenpiteet**

Näytteen kokonaistulos	Näytetyyppi	Kuvaus	Toimenpide
Kelvollinen	REF50, REFlow, NC, NTC ja testinäyte*	Kontrolli tai testinäyte on kelvollinen	-
Virheellinen†	REF50, REFlow, NC, NTC ja testinäyte	Kontrolli on virheellinen	Suorita koko ajo uudelleen
Virheellinen	Testinäyte	testinäyte on virheellinen	Toista virheelliset näytteet tekemällä uusi ajo
Virheellinen, yksi toisto virheellinen	Testinäyte	Jos jokin kohteista (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 tai HEX_Unmethylated_2) on virheellinen, näyte katsotaan virheelliseksi	Toista virheelliset näytteet tekemällä uusi ajo
Virheellinen, delta PMR korkea‡	Testinäyte	Jos ensimmäisen toiston ja toisen toiston välinen delta PMR -arvo on tiettyä arvoa korkeampi§, näyte katsotaan virheelliseksi	Toista virheelliset näytteet tekemällä uusi ajo

\* Testinäytteen kelvollisen PMR-tuloksen tulkinta selitetään edellä (katso kuva 16).

† Jos kontrollit ovat virheellisiä, virheelliset C<sub>T</sub>-arvot ja PMR-tulokset näkyvät tiedoksi hakasulkeissa.

‡ Jos näyte on mitätöivä korkean delta PMR -arvon vuoksi, kummankin toiston ja keskimääräisen PMR:n C<sub>T</sub>-arvot ja PMR-tulokset näkyvät tiedoksi. Näyte on kuitenkin testattava uudelleen, jotta saadaan kelvollinen tulos.

§ Tietty arvo vaihtelee kustakin näytteestä saadun PMR-arvon mukaan (katso Taulukko 5, seuraava sivu).

Taulukko 5. Delta PMR -kriteerit

Keskimääräinen PMR	Delta PMR -kaksoiskappaleet
0-1	≤1
1-5	≤5
5-10	≤7
10-15	≤9
15-35	≤13
35-65	≤15
65-85	≤18
85-100	≤6

## Merkinnät

Tuloksissa näkyvät merkinnät antavat lisätietoja tuloksista, varsinkin virheellisistä tuloksista. Ongelmattomat anomaliat on ilmaistu varoitusmerkinnällä, joka ei johda virheelliseen tulokseen. Gamma Plug-in -lisäosaan sisältyviä yleisistä merkinnöistä on tietoja julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plugin -lisäosan käyttöopas).

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan automaattinen analyysi voi antaa sekä testikohtaisia merkintöjä (Taulukko 6, seuraava sivu) että yleisiä merkintöjä (Taulukko 7, sivu 60).

**Taulukko 6. Testikohtaiset merkinnät**

Testikohtainen merkintä	Näytetyppi	Kuvaus	Toimenpide
<b>Kontrollien testikohtaiset merkinnät</b>			
BELOW_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	PMR-tulos on hyväksytyin vaihtelualueen alapuolella (<36 REF50-näytteelle, <2 REFlow-näytteelle).	Suorita koko ajo uudelleen
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	PMR-tulos on hyväksytyin vaihtelualueen yläpuolella (>65 REF50-näytteelle, >13 REFlow-näytteelle).	Suorita koko ajo uudelleen
NO_SIGNAL	REF50	Kohde-FAM_Methylated_1- ja/tai HEX_Unmethylated_1-kohteen C <sub>T</sub> -arvo on >32	Suorita koko ajo uudelleen
NO_SIGNAL	REFlow	HEX_Unmethylated_1-kohteen C <sub>T</sub> -arvo on >32	Suorita koko ajo uudelleen
<b>Testinäytteiden testikohtaiset merkinnät</b>			
PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92*	Testinäyte	PMR-tulos on aiempiin metyloimattomiin sekvensseihin kohdistuvalla koettimelle määritetyn havaitsemisrajan yläpuolella. Merkintä ei ole mitätöitävä, se on varoitusmerkintä.	Ei mitään
PMR_BELOW_OR_EQUAL_4*	Testinäyte	PMR-tulos on aiempiin metyloituihin sekvensseihin kohdistuvalla koettimelle määritetyn havaitsemisrajan alapuolella. Merkintä ei ole mitätöitävä, se on varoitusmerkintä.	Ei mitään
LOW_INPUT_RETEST_NEEDED	Testinäyte	FAM_Methylated_1- ja -HEX_Unmethylated_1- tai -FAM_Methylated_2 and HEX_Unmethylated_2-kohteen C <sub>T</sub> -arvo on >32,5	Lisää gDNA-määrää bisulfiitti-konversiossa ja suorita ajo uudelleen

\* Koska PMR-tuloksissa ei ole numeroita, mutta ohjelmisto laskee numerollisen PMR:n, PMR-rajalla olevassa arvossa (4 ja 92) voi olla havaitsemisrajamerkintä tai ei. PMR-tuloksille >92 ja <4 on merkintä, joten esimerkiksi PMR-tulokset 4,1 ja 91,8, jotka pyöristyvät arvoihin 4 ja 92, ei tule merkintää, sillä ne ovat havaitsemisrajan ala- ja yläpuolella.

**Huomautus:** Kaikki edellä näkyvät merkinnät ovat mitätöitäviä, paitsi havaitsemisrajaan liittyvät kaksi merkintää. Kun toistot ovat mitätöitäviä, C<sub>T</sub>-arvot näkyvät hakasulkeissa tiedoksi, mutta virheellinen PMR-tulos ei näy. Kummankaan toiston keskimääräinen PMR ei näy.

---

## Taulukko 7. Yleiset merkinnät

Yleinen merkintä	Käyttäytyminen	Kuvaus	Toimenpide
CONSECUTIVE_FAULT	Virheellinen	Tämän kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen.	Toista näyte tai ajo, jos se johtuu kontrollin virheellisyydestä.
ASSAY_INVALID	Virheellinen	Testi on virheellinen, sillä vähintään yksi kontrolli on virheellinen	Suurita koko ajo uudelleen.
ANALYSIS_FAILED	Virheellinen	Testi on määritetty virheelliseksi, koska analyysi epäonnistui eri syistä.	Ota yhteys QIAGENin tekniseen palveluun.
CURVE_SHAPE_ANOMALIA	Virheellinen	Raakadatan monistuskäyrän muoto poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
FLAT_BUMP	Virheellinen	Raakadatan monistuskäyrän muoto on litteä tösyy, mikä poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi C <sub>T</sub> -arvon määrittäminen on virheellinen).	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
INVALID_CALCULATION	Virheellinen	Tämän kohteen laskelma epäonnistui.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Varoitus	Tämän näytteen fluoresenssin muutos suhteessa putkeen, jossa tapahtui suurin fluoresenssin muutos, on pienempi kuin määritetty alaraja.	Ei mitään
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Varoitus	Tämän näytteen reaktiotehokkuus ei ole ylittänyt määritettyyn raja-arvoon.	Ei mitään
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Virheellinen	Monistuskäyrä ylittää kynnyсарvon useammin kuin kerran. Selvää C <sub>T</sub> -arvoa ei voida määrittää.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
NO_BASELINE	Virheellinen	Lähtötasoa ei löydy. Jatkoanalyysiä ei voi tehdä.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
RUN_FAILED	Virheellinen	Testi määritettiin virheelliseksi, koska syklerissä tai sen liitännässä ilmeni ongelma.	Suurita koko ajo uudelleen.
RUN_STOPPED	Virheellinen	Testi määritettiin virheelliseksi, koska ajo lopetettiin manuaalisesti.	Suurita koko ajo uudelleen.

SATURATION	Virheellinen	Fluoresenssin raakadata saturoituu voimakkaasti ennen monistuskäyrän taipumispistettä.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
SATURATION_IN_PLATEAU	Varoitus	Raakadatan fluoresenssi saturoituu ennen monistuskäyrän tasautumisvaihetta.	Ei mitään
SPIKE	Varoitus	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa piikki, mutta se on C <sub>T</sub> -määritysalueen ulkopuolelle.	Ei mitään
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Virheellinen	Monistuskäyrässä havaittiin piikki lähellä C <sub>T</sub> -arvoa.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
STEEP_BASELINE	Virheellinen	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi nouseva perustaso.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
STRONG_BASELINE_DIP	Virheellinen	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa voimakas pudotus perustasossa.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
STRONG_NOISE	Virheellinen	Monistuskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Virheellinen	Monistuskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Virheellinen	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa aaltoileva perustaso.	Toista näyte tai ajo, jos se havaitaan kontrollissa.

**Huomautus:** Kun näytteiden toistoissa näkyy mitätöivä merkintä, C<sub>T</sub>-arvot näkyvät hakasulkeissa tiedoksi, mutta virheellinen PMR-tulos ei näy. Kummankaan toiston keskimääräinen PMR ei näy.

# Ongelmien ratkaisu

Tästä vianmääritysoppaasta voi olla apua ongelmissa, joita ilmenee PITX2-promoottori 2:n PMR-määrityksessä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan avulla. QIAGENin tukikeskuksen asiantuntijat vastaavat mielellään kysymyksiisi joko tähän käsikirjaan liittyvistä tiedoista ja/tai protokollista tai näyte- ja analyysiteknikoista (katso yhteystiedot osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Katso deparafinisaatioliuoksen (luettelonro 19093), QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan (luettelonro 60404) ja EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjan (luettelonro 59824 tai 59826) vianmääritykseen liittyvät tiedot vastaavan sarjan käsikirjasta.

Vianmääritystietoja Rotor-Gene Q MDx -instrumentista ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistosta on niiden käyttöoppaassa.

## Kommenteja ja ehdotuksia

---

### Pieni gDNA-tuotos

Puhdistetun gDNA:n määrä on alle 400 ng, jota suositellaan *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan työnkulun suorittamiseen

200 ng:n määrää voidaan käyttää, mutta virheellisen tuloksen riski on kuitenkin suurempi pienestä määrästä johtuvan merkinnän takia.

### Testi on virheellinen, koska REFlow ja/tai REF50 ovat virheellisiä

- a) Yhtiä reaktioseoksen osaa ei ole lisätty
  - b) Vika Rotor-Gene Q MDx -instrumentissa
  - c) Vika Rotor-Gene Q MDx -instrumentin lisävarusteissa
- Tarkista, että reaktioseos on preparoitu oikein (Taulukko 3, sivu 37). Tarkista, että kaikki qPCR-reaktioseoksen osat on lisätty. Suorita PCR-ajo uudelleen.
- Tarkista instrumentin ylläpitolokit. Esimerkiksi virheellisesti kohdistettu linssi voi saada aikaan suuremman taustan. Jos linssin kohdistus ei kuulu ylläpitosuunnitelmaan, pyydä lisäohjeita ja apua QIAGENin teknisistä palveluista.
- 72-kuoppainen roottori on ehkä lukittu väärin. Suorita PCR-ajo uudelleen.

## Kommenteja ja ehdotuksia

- |   |   |
|---|---|
| d) Reaktioseos on hajonnut                                      | Sarja on pakastettu/sulatettu yli neljä kertaa tai sen sisältöä ei ole säilytetty $-30...-15$ °C:ssa tai PPM:ää tai reaktioseosta ei ole säilytetty valolta suojattuna.<br><br>Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso etiketti) ja käytä uutta sarjaa. Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| e) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.   |
| f) Kontrolleja puuttuu tai ne on asetettu väärään sijaintiin    | Varmista, että oikea kontrolli on asetettu oikeaan sijaintiin.  |
| g) Kontrollinäytteiden huono sekoitus                           | Kontrolleja ei ole sulatettu täysin ennen latausta tai kontrollien ja reaktioseoksen sekoittamista (ylös ja alas pipetoimalla) ei ole tehty oikein. Suorita PCR-ajo uudelleen.  |
| h) Väärä pipetointimäärä  | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että olet lisännyt 4 $\mu$ l kontrollia ja 16 $\mu$ l qPCR-reaktioseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.<br><br>Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.                          |
| i) Putken huono sulkeminen                                      | Putkea ei ole suljettu kunnolla korkilla, minkä vuoksi qPCR-ajon aikana on tapahtunut haihtumista.  |

## Testi virheellinen mallittoman kontrollin (NTC) tai negatiivisen kontrollin (NC) virheen vuoksi

- |   |   |
|---|---|
| a) Reagensseissa on tapahtunut ristikontaminaatiota tai muuta kontaminaatiota | Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja kulutuskomponentteja suositeltujen menettelytapojen mukaisesti, jotta kulkeutumiskontaminaatiota ei tapahtuisi.<br><br>Varmista, että kärjet vaihdetaan eri reagenssien pipetoinnin välillä tai ladattaessa eri putkia. Preparaoi qPCR-reaktioseos tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipettejä, kärkiä, jne.).<br><br>Preparaoi qPCR-reaktioseos ja NTC-reaktio erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita).<br><br>Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| b) Yhtä reaktioseoksen osaa ei ole lisätty                                    | Tarkista, että reaktioseos on preparoitu oikein (Taulukko 3, sivu 37). Tarkista, että kaikki qPCR-reaktioseoksen osat on lisätty. Suorita PCR-ajo uudelleen.  |
| c) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään               | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.   |
| d) Reaktioseos tai koettimet ovat hajonneet                                   | Säilytä sarjan sisältö $-30...-15$ °C:ssa ja suojaa PPM-putki valolta.<br><br>Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso etiketti) ja käytä uutta sarjaa. Suorita PCR-ajo uudelleen.  |



## Kommenteja ja ehdotuksia

- |   |   |
|---|---|
| e) Virheellinen monistuskäyrä (artefakteja) | Tarkista, onko vastaavassa monistumisessa poikkeavia käyriä (esim. suora viiva).<br>Suorita qPCR-ajo uudelleen. |
|---|---|

### Virheellinen näyte pienestä määrästä johtuvan merkinnän vuoksi

- |   |   |
|---|---|
| a) FFPE-kappaleiden olosuhteet                                  | Tarkista käytettävän FFPE-kappaleen kuljetus-/säilytysolosuhteet.   |
| b) FFPE-kappaleen preparointi                                   | Varmista, että näyte on fiksoitu 4–10-prosenttisessa formaliinissa. Tarkista, että yksi tai kaksi 5 µm:n paksuista palaa on leikattu ja näin on saavutettu 100 mm <sup>2</sup> :n kudospinta-ala, jotta soluja olisi varmasti riittävästi.  |
| c) Pipetointitilavuus voi olla väärä                            | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että olet lisännyt 4 µl näytettä ja 16 µl qPCR-reaktioseosta. Tarkista kaikki pipetoituid tilavuudet silmämääräisesti.<br><br>Tarkista pipetit ja kalibro ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.  |
| d) gDNA:n puhdistus tai bisulfiittikonversio epäonnistui        | Tarkista, antoiko työnkulkukontrolli odotetut tulokset. Varmista, että <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR -sarjan edellä kuvattua työnkulkuprotokollaa on noudatettu. Varmista, etteivät sarjat ole vanhentuneet ja että reagenssit on preparoitu oikein (esim. etanolia lisätty, välttä soostumien siirtämistä MinElute DNA spin column -putkeen). Tarkista, ettei huoneenlämpö ole alle 15 °C käsittelyn aikana, jotta puskurit eivät kiteydy. Tarkista kuljetus- ja säilytysolosuhteet.<br>Suorita koko työnkulku uudelleen. |
| e) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään | Tarkista pipetointitapa tai onko tyhjä putki oikeassa sijainnissa ja tarkista reaktion asetukset. Suorita PCR-ajo uudelleen.  |
| f) Huono gDNA-näytteen laatu                                    | Toista suuremmalla näytemäärällä. Enintään 1 000 ng:n DNA-määrää OD 260 nm:n menetelmällä mitattuna voidaan käyttää.  |
| g) Putken huono sulkeminen                                      | Putkea ei ole suljettu kunnolla korkilla, minkä vuoksi qPCR-ajon aikana on tapahtunut haihtumista.  |
| h) Näytettä ei ole ladattu                                      | Varmista, että näytettä on ladattu molempiin kuoppiin.  |

### Virheellinen näyte korkean Delta PMR:n vuoksi

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| a) Reaktioseos on hajonnut | Säilytä sarjan sisältö –30...–15 °C:ssa ja suoja reaktioseokset valolta.<br>Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso etiketti) ja käytä uutta sarjaa. Suorita PCR-ajo uudelleen. |
|----------------------------|--|

## Kommenteja ja ehdotuksia

- |    |  |   |
|----|--|---|
| b) | Pipetointitilavuus voi olla väärä  | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että olet lisännyt 4 µl kontrollia/näytettä ja 16 µl qPCR-reaktioseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.<br><br>Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista. |
| c) | Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään                       | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.   |
| d) | Monistumiskäyrä voi olla virheellinen  | Tarkista, onko vastaavassa monistumiskaaviossa poikkeavia käyriä.<br><br>Toista virheellinen näyte.   |
| e) | Myöhäinen signaali pienen määrän vuoksi, mikä johtaa vaihtelevampiin PMR-tuloksiin | Toista suuremmalla näytemäärällä. Enintään 1 000 ng:n DNA-määrää OD 260 nm:n menetelmällä mitattuna voidaan käyttää.  |
| f) | Kontrollinäytteiden huono sekoitus   | Kontrollia ei ole sulatettu täysin ennen latausta tai kontrollin ja reaktioseoksen sekoittamista (ylös ja alas pipetoimalla) ei ole tehty oikein. Suorita PCR-ajo uudelleen.  |
| g) | Putken huono sulkeminen  | Putkea ei ole suljettu kunnolla korkilla, minkä vuoksi qPCR-ajon aikana on tapahtunut haihtumista.  |

## Virheellinen näyte yhden virheellisen toiston vuoksi

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Ei riittävästi materiaalia (lähellä rajaa)                   | Toista suuremmalla näytemäärällä. Enintään 1 000 ng:n DNA-määrää OD 260 nm:n menetelmällä mitattuna voidaan käyttää.  |
| b) | Pipetointitilavuus voi olla väärä                            | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että olet lisännyt 4 µl kontrollia/näytettä ja 16 µl qPCR-reaktioseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.<br><br>Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista. |
| c) | Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.   |
| d) | Monistumiskäyrä voi olla virheellinen                        | Tarkista, onko vastaavassa monistumiskaaviossa poikkeavia käyriä.<br><br>Suorita PCR-ajo uudelleen.   |
| e) | Kontrollinäytteiden huono sekoitus                           | Kontrollia ei ole sulatettu täysin ennen latausta tai kontrollin ja reaktioseoksen sekoittamista (ylös ja alas pipetoimalla) ei ole tehty oikein. Suorita PCR-ajo uudelleen.  |
| f) | Putken huono sulkeminen                                      | Putkea ei ole suljettu kunnolla korkilla, minkä vuoksi qPCR-ajon aikana on tapahtunut haihtumista.  |

## Kommenteja ja ehdotuksia

---

- g) Kummankaan näytekupovan yhtä kuoppaa ei ole ladattu Varmista, että näytettä on ladattu molempiin kuoppiin.

**Ajo epäonnistui, koska fluoresenssisignaali kontrolleissa ja/tai näytteissä ei ollut johdonmukainen (vaikuttaa kaikkiin putkiin)**

- Vika Rotor-Gene Q MDx -instrumentin lisävarusteissa Tarkista instrumentin ylläpitolokit.  
72-kuoppainen roottori on ehkä viallinen.

## Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Valmiin sarjan laadunvarmistus on tehty Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla. Tämä sarja on valmistettu ISO 13485 -standardin mukaisesti. Analyysin sertifikaatit ovat saatavana pyydetessä osoitteessa [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support).

## Rajoitukset

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön. Järjestelmän suorituskyky on määritetty vain formaliinifikoidulla, parafiinivaletuilla (FFPE) rintasyöpäkudoksilla.

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on hyväksytty vain FFPE-kudokselle, joka on saatu korkean riskin estrogeenireseptoriposiitivista, HER2-negatiivista, imusolmukepositiivista rintasyöpää sairastavilta potilailta.

Tuotetta saavat käyttää vain pätevät käyttäjät, kuten teknikot ja lääkärit, jotka ovat saaneet koulutusta molekyylibiologisiin tekniikoihin ja in vitro -diagnostisiin toimenpiteisiin.

---

Tätä sarjaa on käytettävä tämän käsikirjan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun instrumentin kanssa, joka on lueteltu kohdassa "Tarvittavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen" sivulla 11.

Kaikki *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa.

Ota huomioon pakkauksen etiketissä ilmoitetut vanhenemispäivämäärät. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarja on hyväksytty käyttöön vain yhdessä deparafinisaatioliuoksen (luettelonro 19093) tai ksyleeni-etanolin tai histolemon-etanolin, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan (luettelonro 60404) ja EpiTect Fast DNA Bisulfite -sarjan (luettelonro 59824 tai 59826) kanssa.

Vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (PCR:ään) on hyväksytty.

Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai osien muokkaaminen on tehtävä QIAGENin vastuun.

Diagnoosi on laadittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

# Suoritusarvot

Kaikissa tämän osion tutkimuksissa käytettiin biologisia näytteitä, mutta gDNA:n uuttamista edeltävässä deparafinisaatiovaiheessa käytettiin QIAGEN-deparafinisaatioliuosta. Huomaa kuitenkin, että deparafinisaatioliuoksen ja ksyleenin tai histolemonin välinen vastaavuus on osoitettu.

## LOB (Limit of Blank)

Limit of blank (LoB) -arvo määritettiin sen tietopisteen perusteella, joka vastaa PMR 0- ja PMR 100 -näytteillä saatujen tulosten alemmaa ja ylempää 95 %:n prosenttipistettä, kuten CLSI/NCCLS EP17-A2 (14) -protokollassa on kuvattu. Testatut näytteet vastaavat keinotekoisia näytteitä, jotka on luotu ei-kohdeplasmidien (toisen koettimen kohde) eri kopiomäärillä (100, 200, 500 ja 750 kopiota), kun taustalla on konvertoimaton gDNA. LoB-tulokset perustuvat 64 ja 63 mittaukseen koettimilla, jotka kohdistuvat aiemmin metyloituihin jaksoihin, ja 64 ja 61 mittaukseen koettimille, jotka kohdistuvat aiemmin metyloimattomiin jaksoihin, erää kohti, kun käytetään kahta eri sarjan pilottierää. LoB-tulosten yhteenveto: Taulukko 8.

**Taulukko 8. Limit of blank -tulosten yhteenveto**

	PMR 0 -näytteet		PMR 100 -näytteet	
	Mitattu LoB, PMR	Lopullinen LoB, PMR	Mitattu LoB, PMR	Lopullinen LoB, PMR
Erä 1	0		99	
Erä 2	0	0	98	98

## Havaitsemisraja

CLSI/NCCLS EP17-A2 (14) -protokollassa kuvatus probittimenetelmän jälkeen havaitsemisraja (LoD) on PMR-arvo, jossa 95 % mittauksista ylittää LoB:n. LoD on määritetty jokaiselle koettimelle 200 ng:n gDNA-minimimäärällä ja suositellulla 400 ng:n gDNA-määrällä käyttämällä kahta eri *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää. Testattua määrää (200 ng ja 400 ng) ja jokaista koetinta kohti oli kolme näytettä. Nämä näytteet tuotettiin erilaisilla monistettavilla kokonaiskopiomäärillä, eli 50, 100 ja 150 kopiota 200 ng:n gDNA-määrällä ja 100, 200 ja 300 kopiota 400 ng:n gDNA-määrällä. Täten LoD-tutkimusta varten tuotettiin yhteensä 60 näytettä. Testatut näytteet vastaavat keinotekoisia näytteitä, jotka tuotetaan kohde- ja ei-kohdeplasmidien seoksista (jotka antavat viisi erilaista teoreettista PMR-tasoa näytettä kohden), kun taustalla on konvertoimatonta gDNA:ta. Jokaisella määrällä testattua koetinta kohti LoD-tuloksia saadaan vähintään 20 mittauksesta *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää kohti jokaisen näytteen PMR-tasolla. Pienten PMR-näytteiden LoD on 4 ja suurten PMR-näytteiden LoD on 92 (Taulukko 9).

**Taulukko 9. Havaitsemisrajatulosten yhteenveto**

Näyte	Määrä (ng)	Erä	LOD-arvo	Alaraja	Yläraja
Matala PMR -näyte	200	Erä 1	3	3	5
	200	Erä 2	3	3	4
	400	Erä 1	3	2	6
	400	Erä 2	4	3	6
Korkea PMR -näyte	200	Erä 1	92	92	92
	200	Erä 2	>92	-	-
	400	Erä 1	94	93	95
	400	Erä 2	95	93	95

∴ ei olennainen

## Input-DNA

Viisi eri gDNA-määrää (50, 100, 200, 400 ja 1 000 ng) testattiin ja jokainen edusti seitsemää eri PMR-tasoa (0, 5, 10, 25, 40, 50 ja 75). Suurimmaksi mahdolliseksi gDNA-määräksi määritettiin teknisistä syistä 1 000 ng, sillä suurempi määrä olisi vaikea saavuttaa tosielämässä. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjalle hyväksyttävä gDNA-määrän vaihteluväli määritettiin Deming-regressiolla käyttämällä yhtä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää ja yhtä Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia.

Tutkimus osoitti seuraavat asiat:

- *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan kanssa käytettävä suositeltava gDNA-määrä on 400 ng.
- Pienin hyväksyttävä gDNA-määrä on 200 ng gDNA:ta ja suurin hyväksyttävä gDNA-määrä on 1 000 ng.
- Pienin mahdollinen gDNA-määrä tulee testata vain, jos suositeltavaa määrää ei voida saavuttaa, sillä pienestä määrästä johtuvan virheellisen tuloksen riski on suurempi ja aiheuttaa suuremman uudelleentestauksen riskin. Suurinta mahdollista gDNA-määrää suositellaan testaukseen, jos 400 ng:n gDNA-määrä antaa virheellisen gDNA-tuloksen esimerkiksi pienen määrän merkinnän vuoksi.

## Lineaarisuus

Lineaarisuustutkimus tehtiin CLSI/NCCLS EP6-A (15) -protokollan mukaisesti. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan lineaarisuus määritettiin seitsemällä eri PMR-tasolla (0, 5, 10, 25, 40, 50 ja 75) näytteillä, jotka oli preparoitu viidestä eri gDNA-määrästä (mukaan lukien 200, 400 ja 1 000 ng). Tutkimus tehtiin käyttämällä yhtä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää yhdessä Rotor-Gene Q MDx -instrumentissa, ja käyttäjiä oli yksi. Tutkimus osoitti, että lineaarisuus varmistuu näytteillä, joiden PMR on 5–50, ja hyväksyttävillä gDNA-määrillä (200 – 1 000 ng).

## Toistettavuus ja uusittavuus

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan toistettavuus ja uusittavuus määritettiin yhden tutkimuskeskuksen tarkkuustutkimuksessa ja monikeskustarkkuustutkimuksessa, jotka molemmat suoritettiin CLSI/NCCLS EP5-A3 (16) -protokollan mukaisesti, katso Taulukko 10 ja Taulukko 11. Tarkkuustutkimukset suoritettiin kolmella biologisella näytteellä, jotka antoivat hyvin matalia, matalia ja korkeita PMR-tuloksia (9, 16 ja 77). Yhden tutkimuskeskuksen tarkkuustutkimuksessa kolme käyttäjää arvioivat vaihtelun lähteet 23 ei-peräkkäisenä työpäivänä käyttämällä kolmea eri *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää ja kolmea Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia. Jokaisen ajon aikana saatiin kaksi mittausta näytettä kohden. Kaksi identtistä ajoa suoritettiin päivää kohti ja ajojen välillä oli vähintään kaksi tuntia. Ajoaika on vaihdellut työpäivän aikana, ja testausta on satunnaistettu entisestään säilyttämällä vähintään kahden tunnin väli ajojen välillä. Monikeskustarkkuustutkimus tehtiin kolmessa eri keskuksessa, joissa yksi käyttäjä käytti yhtä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää yhdessä Rotor-Gene Q MDx -instrumentissa. Jokaisen ajon aikana saatiin viisi mittausta näytettä kohden. Jokaisessa keskuksessa suoritettiin yksi ajo päivää kohti, vuorotellen aamulla ja iltapäivällä.

**Taulukko 10. Yhteenveto yhden tutkimuskeskuksen tarkkuustutkimuksen tuloksista**

Näyte	Vaihtelun lähde (%)						Yhteensä
	Ajonsisäinen	Ajo	Erä	Laite	Käyttäjä	Päivä	
Hyvin matala PMR	12,29	4,20	0,00	12,54	0,00	9,49	20,39
Matala PMR	19,99	0,00	0,00	3,09	0,00	8,04	21,76
Korkea PMR	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	4,23

**Taulukko 11. Yhteenveto monikeskustarkkuustutkimuksen tuloksista**

Näyte	Vaihtelun lähde (%)				Yhteensä
	Ajojen välinen	Päivä	Paikka		
Hyvin matala PMR	13,90	8,43	4,72		16,93
Matala PMR	28,72	0,00	0,00		28,72
Korkea PMR	4,25	0,00	1,77		4,61



## Häiritsevät aineet

Häiritseviä aineita koskeva tutkimus tehtiin CLSI/NCCLS EP7-A2 (17)-protokollan mukaisesti. Ensinnäkin arvioitiin näytteen preparoinnin työnkulussa käytettyjen aineiden lopullinen pitoisuus (ottaen huomioon jokaisen vaiheen laimennusvaikutus). *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan aloitusmateriaalin (bisDNA) jokaisen aineen lopullisen pitoisuuden oleellisuuden perusteella kaikki mahdolliset häiritsevät aineet testattiin käyttämällä yhtä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää. Tulokset eivät osoittaneet mitään häiritsevää vaikutusta aineista, joita *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan työnkulun aikana käytettiin (Taulukko 12).

**Taulukko 12. Testatut häiritsevät aineet**

Testattu aine	Lopullinen testattu tilavuus 30 µl:ssa
Deparafinisaatioliuos	$1,4 \times 10^{15}$
Histolemon	$2,10 \times 10^{20}$
Etanolia (96–100 %)	0,50
Bisulfiittiliuos	$7,2 \times 10^{09}$
DNA-suojapuskuri	$2,26 \times 10^{10}$
Puskuri-BL	$3,44 \times 10^{08}$
Puskuri-BW	0,1102
Puskuri-BD	0,002

## Ristikontaminaatio

Negatiivisten ja positiivisten näytteiden välinen ristikontaminaatio arvioitiin käyttämällä yhtä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää ja kahta Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia. Kuusi ehtoa testattiin käyttämällä NTC- ja/tai negatiivista kontrollia negatiivisina näytteinä yhdessä bisDNA-näytteen kanssa tai ilman, ja matala PMR annettiin positiivisena näytteenä. Ristikontaminaatioksi arvioitiin 1,3 %.

## Käytön aikajakso

Enimmäisaikajakso levyn preparoinnin ja qPCR-ajon käynnistämisen välillä määritettiin käyttämällä yhtä *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan pilottierää ja yhtä keinotekoista näytettä, joka luotiin kohde- ja ei-kohdeplasmideista, jotka antoivat kohtalaisen PMR:n. Pisin hyväksyttävä aikajakso on 24 tuntia. *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan qPCR-ajoa ei ole kuitenkaan suositeltavaa käynnistää heti levyn preparoinnin jälkeen (eli kaikkien testattavien näytteiden lataamisen jälkeen).

## Kliininen katkaisuhyväksyntä

*therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan kliinisen katkaisurajan hyväksymistä varten tehtiin prospektiivinen analyysi käyttämällä FFPE-kudosta 145 korkean riskin imusolmukepositiiviselta, estrogeenireseptoriposiitiviselta, HER2-negatiiviselta rintasyöpäpotilaalta. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat arkistoitua FFPE-kudosta, joka täytti seuraavat kriteerit:

- histologisesti varmistettu invasiivinen rintasyöpä
- primaarinen kasvainvaihe pT1, pT2 ja pT3
- histologisesti varmistettu imusolmukesuhde ( $\geq N1$ )
- standardi antrasykliinipohjainen liitännäissolunsalpaajahoito
- ei annostiheää hoitoa
- ei muuta primaaria systeemistä solunsalpaajahoitoa (ei ylimääräisiä taksaaneja), pois lukien hormonihoido.

PMR mitattiin jokaisesta näytteestä käyttämällä sarjan lopullista muotoa ja käsikirjan ohjeita.

---

Tauditon elossaoloaika (DFS) oli ensisijainen päätetapahtuma ja se määritettiin ajaksi ensisijaisesta leikkauksesta ensimmäiseen dokumentoituun DFS-tapahtumaan. Ensisijaisen leikkauksen päivämäärä katsottiin seurannan indeksipäivämääräksi. DFS-tapahtumiin sisältyivät syövän uusiutuminen (taudin paikallinen uusiutuminen tai etäpesäke), hengenvaarallisiksi katsotut toissijaiset maligniteetit ja mistä tahansa johtuva kuolema. Jos potilas kuoli ilman, että syöpä oli uusiutunut, tehtiin kilpaileva Fine and Gray -riskianalyysi (13).

Analyysi tehtiin 10 vuoden DFS-seuranta-ajalta. Eloojäämiskäyrät laskettiin esiintyvyyksifunktion mukaan (13). PITX2-esimääritetty PMR 12:n katkaisuarvo osoitti tilastollisesti merkittävän eron kahden ryhmän välillä ensisijaisen DFS-päätetapahtuman osalta. Merkitsevyystaso oli  $p < 0,05$  (kaksipuolinen, alfa-arvo). Täten *therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan testillä arvioitu PITX2-promoottorin metylaatio-tila antoi prediktivisen arvon korkean riskin imusolmukepositiivisten, estrogeenireseptoriposiitivisten, HER2-negatiivisten rintasyöpäpotilaiden antrasykliinipohjaiselle solunsalpaajahoidolle.














# Kirjallisuusviitteet

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H., et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iPepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prosperi, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015)  $\beta$ -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (no. 1 Supplement), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T., et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A., et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N., et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S., et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (supplement), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T., et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. European Patent 2011; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R., et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. Article ID 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; approved Guideline, first edition. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Approved Guideline, third edition. CLSI Document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

# Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Symbolin määritelmä
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaite
	Eurooppalaista vaatimustenmukaisuutta ilmaiseva CE-merkki
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
<b>Rn</b>	Käsikirjan versio, jossa n on versionumero
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Säilytettävä auringonvalolta suojattuna
	Huomio

---

## Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, soita ilmaisnumeroomme 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Katalogi-numero
<b><i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR -sarja – PITX2-promoottori 2:n prosentuaalisen metylaatioosuuden (PMR) määrittämiseen</b>		
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit (8)	8 reaktiota varten: PITX2 RGQ PCR -pääseos, PITX2 RGQ PCR -alukekoetinseos, PITX2 RGQ PCR -referenssi 50, matala PITX2 RGQ PCR -referenssi, negatiivinen PITX2 RGQ PCR -kontrolli ja PITX2 RGQ PCR NTC	873211
<b>Rotor-Gene Q MDx -alusta, ohjelmisto ja lisävarusteet</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-sykləri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sisällä asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-sykləri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennus ja koulutus	9002033



Tuote	Sisältö	Katalogi-numero
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Ohjelmisto rutiinitestaukseen yhdessä Rotor-Gene Q- ja Rotor-Gene Q MDx -instrumenttien kanssa.	9024203
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 kpl:ssa 0,1 ml:n putkia	9018901
72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps 0.1 ml -liuskaputkien ja korkkien säilytystä varten; vaatii Locking Ring 72 Well Rotor -roottorin	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps 0.1 ml -liuskaputkien ja korkkien lukitsemiseen 72-Well Rotor -roottoriin	9018904
Rotor Holder	Metalliton vapaasti seisova pidike putkien ja Rotor-Disc®-levyjen kokoamiseksi roottoreihin	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
<b>Liittyvät tuotteet</b>		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50:een DNA:n valmistelukertaan: 50 QIAamp MinElute -sarjaa, Proteinase K, puskureita, näyteputkia	60404
Deparaffinization Solution (16 ml)	16 ml deparafinisaatioliuosta	19093

Tuote	Sisältö	Katalogi-numero
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200)	200:een DNA-konversioon: bisulfiittiliuos, DNA-suojapuskuri, MinElute DNA Spin Column -putket, katalysaattori-RNA ja puskurit	59826
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50)	50:een DNA-konversioon: bisulfiittiliuos, DNA-suojapuskuri, MinElute DNA Spin Column -putket, katalysaattori-RNA ja puskurit	59824

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

---

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi

---

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi

Tämä tuote on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. QIAGEN-tuotteiden jälleenmyynti, muokkaus jälleenmyyntiä varten tai käyttö kaupallisten tuotteiden valmistukseen on kielletty ilman QIAGENin kirjallista lupaa.

Tässä asiakirjassa olevia tietoja saatetaan muuttaa ilman erillistä ilmoitusta. QIAGEN ei ole vastuussa mistään tässä asiakirjassa mahdollisesti olevista virheistä. Tämän asiakirjan uskotaan olevan julkaisuhenkeenään kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, monenkertaisista tai seurannaisvahingoista, jotka liittyvät tämän asiakirjan käyttöön tai ovat seurausta sen käytöstä.

QIAGEN-tuotteille on myönnetty takuu siitä, että ne ovat ilmoitettujen ominaisuuksiensa mukaisia. QIAGENin ainoa velvollisuus ja asiakkaan saama ainoa korvaus rajoittuu tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuun kertomalla tavalla.

Tavaramerkit: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIAxpert<sup>®</sup>, EpiTect<sup>®</sup>, MinElute<sup>®</sup>, *therascreen*<sup>®</sup>, Rotor-Disc<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, Rotor-Gene AssayManager<sup>®</sup> (QIAGEN Group); FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>, NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan<sup>®</sup> (Roche Group).

#### ***therascreen* PITX2 RGQ PCR -sarjan käsikirjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus**

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä henkisen omaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). QIAGENin käyttäjät ovat toimitaneet joitakin näistä protokollista toisille QIAGENin käyttäjille. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN sanoutuu irti muista suorista ja epäsuorista lisensseistä.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneelin ja/tai sen osien osalta.

Päivitetty lisenssiehdot saa osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Mar-17 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

---

Tilaukset [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tekninen tuki [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Verkkosivusto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)