

November 2017

# *ipsogen*<sup>®</sup> PML-RARA bcr1 Kiti Kasutusjuhend



Versioon 1

Kvantitatiivne in vitro diagnostika

Kasutamiseks Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup>  
7500 Real-Time PCR System, LightCycler<sup>®</sup> ja SmartCycler<sup>®</sup>  
instrumentidega



672123



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden  
SAKSAMAA



1108718ET

# Sisukord

Sihotstarbeline kasutamine .....	4
Kokkuvõte ja selgitus .....	4
Protseduuri põhimõte .....	6
Kitis sisalduvad materjalid .....	9
Kiti sisu .....	9
Lisaks vajalikud materjalid .....	10
Hoiatused ja ettevaatusabinõud .....	11
Üldised ettevaatusabinõud .....	12
Reagentide säilitamine ja käsitlemine .....	13
Protseduur .....	15
Proovi RNA ettevalmistamine .....	15
Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon .....	15
Protokoll: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM instrumendil 72-tuubi rootoriga .....	18
Protokoll: qPCR ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel .....	22
Protokoll: qPCR LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel .....	26
Protokoll: qPCR SmartCycler instrumendil .....	30
Tulemuste tõlgendamine .....	34
Andmeanalüüsi põhimõte .....	34
Tulemused .....	35
Vigade leidmise juhised .....	39

---

Kvaliteedikontroll .....	42
Piirangud .....	42
Toimimise tunnused .....	43
Mittekliinilised uuringud .....	43
Kliinilised uuringud .....	46
Viited .....	51
Sümbolid .....	52
Tellimisinfo .....	53

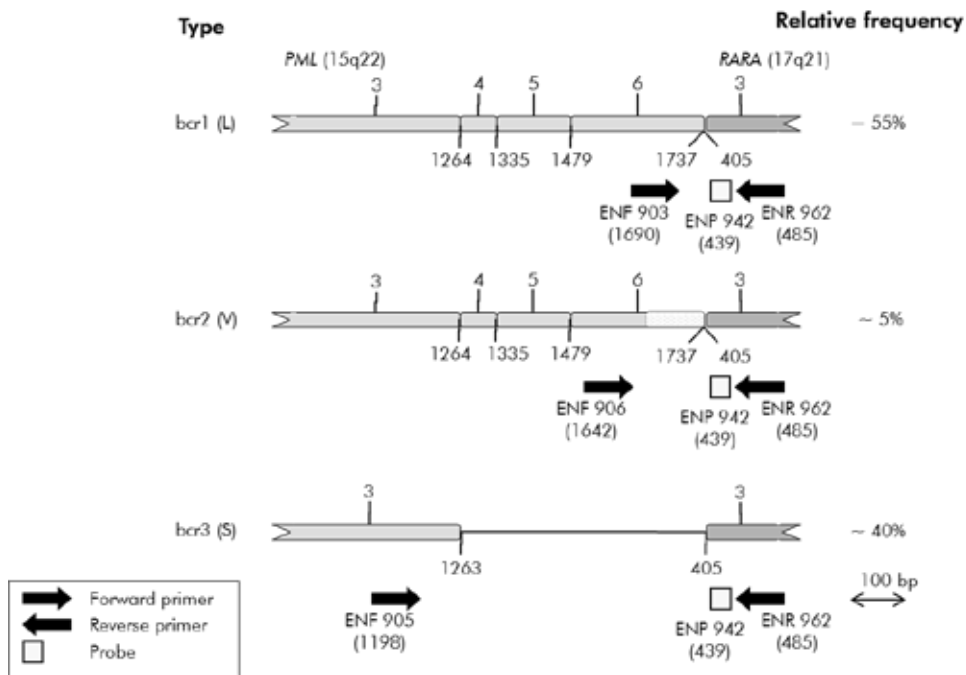
# Sihtotstarbeline kasutamine

*ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitt on mõeldud PML-RARA tüüp bcr1 fusioon-transkriptide kvantifitseerimiseks luuüdis või perifeersetes vereproovides akuutse müeloidse leukeemia (AML) alamgrupi patsientidel, kellel on diagnoositud M3 tsütomorfoloogia ja t(15;17)(q22;q21) translokatsioon, murdepunktiga PML intronis 6. Saadud tulemused on mõeldud kasutamiseks abivahendina ravi saavate patsientide raviefektiivsuse jälgimiseks ja minimaalse residuaalse haiguse (MRD) järelkontrolliks, et jälgida haiguse taastumist.

## Kokkuvõte ja selgitus

PML-RARA fusioongeeni (FG) transkripte, mis on t(15;17)(q22;q21) translokatsiooni molekulaarne tulemus, seostatakse enamuse akuutse progranulotsüütse leukeemia (APL) juhtudega (>90%), see on selgelt eristatav AML alamtüüp M3 tsütomorfoloogiaga, mis moodustab 10–15% kõikidest AML juhtudest. Tasakaalustatud retsiprookne translokatsioon t(15;17) viib promüelotsüütse leukemia (PML) geeni fuseerimiseni retiinhappe (*retinoic acid*) retseptoriga alfa (RARA), tekitades PML-RARA fusioonvalgu. Kimäärne PML-RARA valk on transkriptsiooniline repressor. Selle ekspressiooni seostatakse häiritud müeloidse diferentseerumisega, põhjuseks suurenenud afiinsus nukleaarse repressorvalkude kompleksi (NcoR) vastu, kromatiini struktuuri muutmine histooni deatsetülaasi (HDAC) abil ja transkriptsiooni inhibeerimine. Ravi kõik-trans retiinhappega (ATRA) on APL puhul väga efektiivne ja käitub diferentseeriva agendina soodustades NCoR/HDAC kompleksi vabanemist, seega normaalset transkriptsiooni taastades.

RARA murdepunktid on alati intronis 2. Olenevalt PML saidi murdepunktidest, intron 6, ekson 6 ja intron 3, võivad tekkida vastavad PML-RARA transkriptide subtüübid pikk (L või bcr1), variant (V või bcr2) ja lühike (S või bcr3) (Joonis 1). Need transkriptide subtüübid moodustavad vastavalt 55%, 5% ja 40% juhtudest.



**Joonis 1. Skemaatiline diagramm PML-RARA FG transkriptist, mida katab EAC qPCR praimerite ja proovi komplekt. Tüübi bcr1 (L) korral: ENF903–ENP942–ENR962. Tüübi bcr2 (V) korral: ENF906–ENP942–ENR962. Tüübi bcr3 (S) korral: ENF905–ENP942–ENR962. Number praimerite ja proovi all viitab nende nukleotiidsele positsioonile normaalses geenitranskriptsis. Suhteline sagedus viitab iga FG transkripti tüübi osale PML-RARA variantidest.**

Kombineeritud ravi antratsükliini-põhise kemoteraapia ja ATRA-ga on APL puhul väga edukas, andes pikaajalisi remissioone ja võimalikku tervenemist kuni 70% värskest diagnoositud patsientidel. Sellegipoolest esineb relapse ja madalat elulemust 15–25% patsientidel. Unikaalse PML-RARA fusioongeeni detekteerimine konventsionaalse kvalitatiivse pöördtranskriptsioon polümeraas-ahelreaktsiooni (RT-PCR) abil on olnud laialdaselt kasutusel kiireks diagnoosimiseks ja ravivastuse ennustamiseks. Sellegipoolest on sellel tehnikal miinuseid ja selle tundlikkus on suhteliselt madal.

PML-RARA koopianumbri kvantifitseerimisel reaalaaja kvantitatiivse PCR (qPCR) abil on mitmeid eeliseid. See on väga tundlik ja reprodutseeritav tehnika, mis võimaldab ka kineetika hindamist. Hästi sissetöötatud standardiseeritud qPCR protokoll (EAC Program) prognoostilise väärtuse analüüs erinevates ravifaasides APL patsientidel näitab, et see lähenemine on robustne alternatiiv MRD hindamiseks ja et relapsi-riski stratifikatsiooni saab kindlaks teha normaliseeritud PML-RARA koopiaarvu põhjal. Post-konsolidatsiooni analüüsis on positiivne qPCR reaktsioon tugev ennustus järgnevas hematoloogiliseks relapsiks. Säilitava teraapia ajal ja pärast ravi lõppu seostatakse positiivset qPCR testi kõrgema relapsi-riski ja lühema elulemusega. Relapsi-riski stratifikatsioon, mis põhineb PML-RARA normaliseeritud koopianumbrite (NCN) kvantifitseerimisel, jagab patsiendid 3 gruppi: kõrge relapsi-riskiga, keskmise relapsi-riskiga ja madala relapsi-riskiga (1). PML-RARA monitoorimine transkripti tundliku detekteerimise abil on oluline osa APL üldises ravistrateegias (detailid viidetest 2 ja 3), mille abil valitakse ravitüüp ja intensiivsus erineva relapsi-riskiga patsientidel.

MRD kvantifitseerimise meetodi standardiseerimine ja valideerimine on kehtestatud multitsentrilise projekti abil, mida juhtis EAC ja mis on avaldatud aastal 2003 (4, 5). *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kiti põhineb sellel tehnoloogial.

## Protseduuri põhimõte

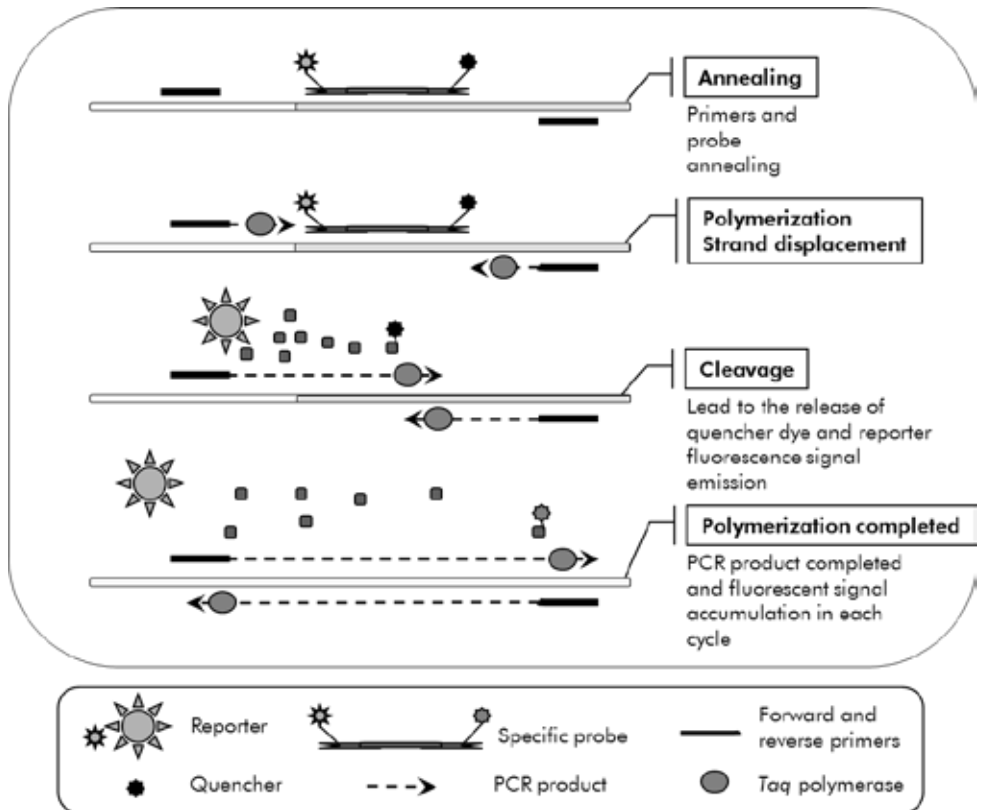
qPCR tehnika võimaldab PCR produktide täpset kvantifitseerimist PCR amplifitseerimise protsessi eksponentsiaalses faasis. Lisaks saab qPCR andmeid kiiresti lugeda ilma PCR-järgse töötlemiseta – fluorestsents-signaalide reaalaajas detekteerimine toimub PCR tsükleerimise ajal ja/või koheselt pärast seda vähendades nii drastiliselt PCR produkti kontaminatsiooni ohtu. Hetkel on saadaval 3 põhilist tüüpi qPCR tehnikat: qPCR analüüs kasutades SYBR® Green I värv, qPCR analüüs kasutades hüdrolüüsitavaid proove ja qPCR analüüs kasutades hübriidisatsiooniproove.

---

Selles analüüsis kasutatakse qPCR kahe-värvi oligonukleotiidi hüdrolüüsi põhimõtet. PCR ajal hübridiseeruvad *forward* ja *reverse* praimerid kindlale järjestusele. Kahe värviga märgistatud oligonukleotiidid on samas segus. See proov, mis koosneb 5' otsas reportervärvi ja 3' otsas summutaja mäkega oligonukleotiidist, hübridiseerub sihtmärk-järjestusele PCR produktis. Hüdrolüüsiproovidega qPCR analüüs kasutab ära *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasest aktiivsust. Kui proov on intaktne, summutab summutaja lähedus reportervärvi fluorestsentsi peamiselt Förster-tüüpi energia ülekande teel.

PCR ajal kui huvipakkuv märklaud on olemas, seondub proov spetsiifiliselt *forward* ja *reverse* praimerisaitide vahele. DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasne aktiivsus hüdrolüüsib proovi reporteri ja summutaja vahel ainult siis, kui proov on sihtmärgile hübridiseerunud. Proovi fragmendid tõrjutakse seejärel sihtmärgilt eemale ja ahela polümeriseerumine jätkub. Proovi 3' ots on blokeeritud, et vältida proovi pikendamist PCR käigus (Joonis 2). See protsess toimub igas tsüklis ega sega produkti eksponentsiaalset kogunemist.

Fluorestsents-signaali kasvu detekteeritakse ainult siis, kui sihtmärkjärjestus on prooviga komplementaarne ja seetõttu amplifitseerub PCR käigus. Nende nõuete tõttu ei nähta mittespetsiifilist amplifikatsiooni. Seega on fluorestsentsi kasv otseselt proportsionaalne sihtmärgi amplifitseerumisega PCR käigus.



**Joonis 2. Reaktsiooni põhimõte.** Totaalne RNA pöördtranskribeeritakse ja saadud cDNA amplifitseeritakse PCR abil kasutades spetsiifiliste praimerite paari ja spetsiifilist sisemist kahevärvilist proovi (FAM™–TAMRA™). Proov seondub amplikonile igas PCR seondumise etapis. Kui Taq pikendab amplikonile seondunud praimerit, asendab see proovi 5' otsa, mis degradeeritakse Taq DNA polümeraasi 5' → 3' eksonukleaaase aktiivsuse abil. Hüdrolüüs jätkub kuni allesjäänv proov amplikonilt lahti sulab. Selle protsessi tulemusena vabanevad fluorofoor ja summutaja lahusesse, satuvad teineteisest ruumiliselt eemale, FAM fluorestsents kasvab ning TAMRA fluorestsents väheneb.



# Kitis sisalduvad materjalid

## Kiti sisu

<b>ipsogen PML-RARA bcr1 Kitt</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalooginr.</b>		<b>672123</b>
<b>Reaktsioonide arv</b>		<b>24</b>
<b>Component</b>	<b>Name</b>	<b>Amount</b>
ABL kontrollgeeni standardi lahus (10 <sup>3</sup> koopiat/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL kontrollgeeni standardi lahus (10 <sup>4</sup> koopiat/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL kontrollgeeni standardi lahus (10 <sup>5</sup> koopiat/5 µl)	C3-ABL	50 µl
PML-RARA bcr1 fusioongeeni standardi lahus (10 <sup>1</sup> koopiat/5 µl)	F1-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 fusioongeeni standardi lahus (10 <sup>2</sup> koopiat/5 µl)	F2-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 fusioongeeni standardi lahus (10 <sup>3</sup> koopiat/5 µl)	F3-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 fusioongeeni standardi lahus (10 <sup>5</sup> koopiat/5 µl)	F4-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 fusioongeeni standardi lahus (10 <sup>6</sup> koopiat/5 µl)	F5-PML-RARA bcr1	50 µl
Praimerite ja proovi segu ABL*	PPC-ABL 25x	90 µl
Praimerite ja proovi segu PML-RARA bcr1 fusioongeen†	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 µl
ipsogen PML-RARA bcr1 Kiti Kasutusjuhend (eesti k.)		1

\* Spetsiifiliste *reverse* ja *forward* praimerite segu ABL kontrollgeenile pluss spetsiifiline FAM–TAMRA proov.

† Spetsiifiliste *reverse* ja *forward* praimerite segu PML-RARA bcr1 fusioongenile pluss spetsiifiline FAM–TAMRA proov.

**Märkus:** Tsentrifuugige standardite lahuseid ja praimerite-proovi segusid kergelt enne kasutamist.

## Lisaks vajalikud materjalid

Kemikaalidega töötamisel tuleb alati kanda sobivat laborikiltit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisainformatsiooni saamiseks lugege SDS infolehti (*safety data sheets*), mille saate tootjalt.

Veenduge, et kõik instrumendid on kontrollitud ja kalibreeritud vastavalt tootja soovitudele.

### Reagendid

- I Nukleaaaside-vaba PCR puhtusega vesi
- I Reagendid pöördtranskriptsiooniks: Valideeritud reagent on Superscript® II (või Superscript) Reverse Transcriptase, sisaldab 5x *first-strand* puhvrit, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. nr. 18064-022)
- I RNAasi inhibiitor: Valideeritud reagent on RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. nr. 10777-019)
- I dNTP-d, PCR puhtusega
- I Juhuslik heksameer
- I MgCl<sub>2</sub>
- I Puhver ja Taq DNA polümeraas: Valideeritud reagentid on TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. nr. 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. nr. 04535286001)

## Kulutarvikud

- I Nukleaaside-vabad aerosooli-resistentsed steriilsed PCR pipetiotsikud hüdrofoobsete filtritega
- I 0.5 ml või 0.2 ml RNAasi- ja DNAasi-vabad PCR tuubid
- I Jää

## Seadmed

- I Mikrolitri pipetid ainult PCR jaoks (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- I Lauasentrifuug rootoriga 0.2 ml/0.5 ml tuubidele (maksimumkiirusega 13,000 / 14,000 rpm)
- I Reaalaja PCR instrument: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või muu Rotor-Gene Q instrument; LightCycler 1.2, 2.0 või 480; ABI PRISM 7000, 7700, või 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; või SmartCycler; ja sellega seotud spetsiifiline materjal
- I Termotsükler või vesivann (pöördtranskriptsiooni etapp)

## Lisareagendid

- I Kontrollide komplekt *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit (kat nr 672091) on ette nähtud ainult teaduslikuks kasutamiseks. See sisaldab fusioongeeni PML-RARA bcr1 negatiivse, kõrge ja madala ekspresiooniga rakuliine RNA eraldamise ja pöördtranskriptsiooni kvalitatiivseks valideerimiseks

# Hoiatused ja ettevaatusabinõud

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

---

Kemikaalidega töötamisel tuleb alati kanda sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisainformatsiooni saamiseks lugege SDS infolehti (*safety data sheets*). Need on internetis kättesaadavad mugavas ja kompaktses PDF formaadis [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kus saate iga QIAGENi kiti ja kiti komponendi kohta SDS otsida, vaadata ja printida.

Käideldge proovide ja analüüside jäätmed vastavalt kohalikele regulatsioonidele.

## Üldised ettevaatusabinõud

qPCR testide kasutamine eeldab häid laboritöõharjumusi, sh seadmete hooldamine, mis on pühendatud molekulaarbioloogiale ja kooskõlas vastavate regulatsioonide ning oluliste standarditega.

See kitt on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Selle kiti reagentid ja juhised on valideeritud optimaalseks toimimiseks. Reagentide edasine lahjendamine või inkubatsiooniaegade ja –temperatuuride muutmine võib anda vigaseid või ebakõlalisi tulemusi. PPC ja PPF reagentid võivad kokkupuutel valgusega muutuda. Kõik reagentid on formuleeritud spetsiifiliselt selle testiga kasutamiseks. Testi optimaalseks toimimiseks ei tohi ühtegi komponenti asendada.

Transkripti hulga määramine qPCR abil vajab nii mRNA pöördtranskribeerimist kui ka saadud cDNA amplifitseerimist PCR abil. Seega tuleb kogu analüüs viia läbi RNAasi/DNAasi-vabadel tingimustel.

Olge eriti ettevaatlikud, et vältida:

- I RNAasi/DNaasi kontaminatsiooni, mis võib degradeerida algse mRNA ja sünteesitud cDNA
- I mRNA või PCR jääkontaminatsiooni, mis annab valepositiivse signaali

Seetõttu soovitame järgmist.

- I Kasutage nukleaaaside-vabasid laboritarvikuid (nt pipetid, pipetiotsikud, reaktsioonituubid) ja kandke analüüsi läbi viies kindaid.
- I Kasutage kõikides pipeteerimisetappides värsked aerosooli-resistentseid pipetiotsikuid, et vältida proovide ja reagentide kross-kontaminatsiooni.
- I Valmistage pre-PCR mastermix selleks pühendatud materjaliga (pipetid, otsikud jne) selleks pühendatud alal, kus ei ole kindlasti DNA maatrikseid (cDNA, DNA, plasmiid). Lisage proovimaterjal eraldi alal (eelistatult eraldi ruumis) spetsiifilise materjaliga (pipetid, otsikud jne).
- I Käsitsege standardite lahjendusi (C1–3 ja F1–5) eraldi ruumis.

## Reagentide säilitamine ja käsitsemine

Kitid transporditakse kuival jääl ja neid tuleb säilitada kohalejõudmisel temperatuuril  $-30^{\circ}\text{C}$  kuni  $-15^{\circ}\text{C}$ .

- I Minimeerige praimerite ja proovi segude (PPC ja PPF tuubid) valgusega kokkupuudet.
- I Enne avamist segage tube õrnalt ja tsentrifuugige.
- I Säilitage kõiki kiti komponente originaalpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui avamata komponentidele. Komponentid, mida on hoitud teistel tingimustel kui siltidel kirjas, ei pruugi korralikult toimida ning võivad analüüsi tulemusi ebasoodsalt mõjutada.

---

Iga reagenti aegumistähtjad on näidatud komponendi sildil. Korrektsete säilitamistingimuste korral on toode kasutamiskõlblik sildil prinditud aegumistähtjani.

Toote ebastabiilsuse määramiseks ei ole üheseid signaale. Sellegipoolest tuleb positiivseid ja negatiivseid kontrole alati tundmatute proovidega koos analüüsida.

# Protseduur

## Proovi RNA ettevalmistamine

RNA ettevalmistamine patsientide proovidest (veri või luuüdi) tuleb läbi viia valideeritud protseduuri abil. Analüüsi kvaliteet sõltub suuresti sisend-RNA kvaliteedist. Seetõttu soovitame enne analüüsi puhastatud RNA kvaliteeti kontrollida agaros-geelelektroforeesi\* või Agilent® Bioanalyzer® instrumendi abil.

## Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon

### Mida teha enne alustamist

- I Valmistage ette dNTP-d, 10 mM igauks. Säilitage temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  alikvootidena.
- I Valmistage ette juhuslik heksameer, 100  $\mu\text{M}$ . Säilitage temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  alikvootidena.
- I Valmistage ette  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM. Säilitage temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  alikvootidena.

### Protseduur

1. Sulatage kõik komponendid ja asetage need jääle.
2. Inkubeerige 1  $\mu\text{g}$  RNA-d (1–4  $\mu\text{l}$ ) 10 minutes temperatuuril  $70^{\circ}\text{C}$  ja jahutage koheselt jääle 5 minutit.
3. Tsentrifugeerige lühidalt (ca 10 sekundit, 10,000 rpm), et koguda vedelik tuubi põhja. Seejärel hoidke jääle.
4. Valmistage ette järgmine RT segu vastavalt töödeldavate proovide arvule (Tabel 1).

\* Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikiltit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille.

**Tabel 1. RT segu ettevalmistamine**

Komponent	Maht proovi kohta (µl)	Löpp-kontsentr.
First-Strand Buffer (kaasas Superscript II Reverse Transcriptase ensüümiga), 5x	4.0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2.0	5 mM
dNTP-d (10 mM igaüks, eelnevalt valmistada ja säilitada temperatuuril -20°C alikvootidena)	2.0	1 mM
DTT (100 mM, kaasas Superscript II Reverse Transcriptase ensüümiga)	2.0	10 mM
RNAasi inhibitor (40 U/µl)	0.5	1 U/µl
RNAasi inhibitor (40 U/µl)	0.5	1 U/µl
Juhuslik heksameer (100 µM)	5.0	25 µM
Superscript II või Superscript Reverse Transcriptase ensüüm (200 U/µl)	0.5	5 U/µl
Kuumutatud RNA proov (lisada etapis 5)	1.0–4.0	50 ng/µl
Nukleaside-vaba PCR-puhtusega vesi (lisada etapis 5)	0.0–3.0	–
Löppmaht	20.0	–

5. Pipeteerige 16 µl RT segu igasse PCR tuubi. Seejärel lisage 1–4 µl (1 µg) RNA (etapist 3) ja kohandage mahuni 20 µl nukleaside-vaba PCR-puhtusega veega (vt Tabel 2).

**Tabel 2. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni ettevalmistamine**

Komponent	Maht (µl)
RT segu	16
Kuumutatud RNA proov (1 µg)	1–4
Nukleaside-vaba PCR-puhtusega vesi	0–3
Löppmaht	20



- 
6. Segage korralikult ja tsentrifuugige lühidalt (ca 10 sekundit, 10,000 rpm), et koguda vedelik tuubi põhja.
  7. Inkubeerige temperatuuril 20°C 10 minutit.
  8. Inkubeerige temperatuuril 42°C termotsükleris 45 minutit, seejärel koheselt temperatuuril 99°C 3 minutit.
  9. Jahutage jääl (reaktsiooni peatamiseks) 5 minutit.
  10. Tsentrifugeerige lühidalt (ca 10 sekundit, 10,000 rpm), et koguda vedelik tuubi põhja. Seejärel hoidke jääl.
  11. Lahjendage lõplik cDNA 30 µl nukleaaside-vaba PCR-puhtusega veega nii, et lõppmaht on 50 µl.
  12. Viige läbi PCR vastavalt järgnevatele protokollidele, vastavalt teie qPCR instrumendile.

## Protokoll: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM instrumendil 72-tuubi rootoriga

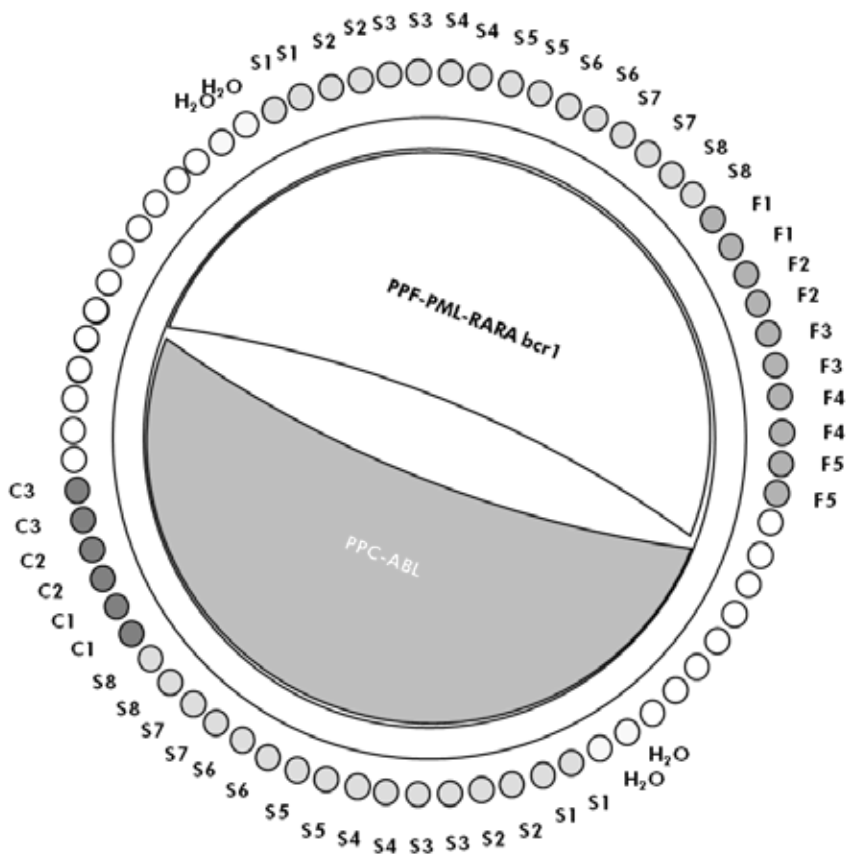
Kasutades seda instrumendi, soovitate kõik mõõtmised läbi viia duplikaatidena, nagu näidatud Tabelis 3.

**Tabel 3. Reaktsioonide arv Rotor-Gene Q instrumendil 72-tuubi rootoriga**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	2 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni
<b>PML-RARA bcr1 praimerite ja proovi seguga (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
PML-RARA standard	2 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni

Proovide töötlemine Rotor-Gene® Q instrumendil 72-tuubi rootoriga

Soovitate testida vähemalt 8 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist.



Joonis 3. Soovituslik rootori paigutus igas eksperimendis *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitiga. F1–5: PML-RARA bcr1 standardid; C1–3: ABL standardid; S: cDNA proov; H<sub>2</sub>O: vee-kontroll.

**Märkus:** Veenduge, et asetate rootori 1. positsiooni alati testitava proovi. Vastasel juhul ei saa instrument kalibreerimise etapis kalibreerimist läbi viia ja kogutakse ebaõigeid fluorestsentsandmeid.

Täitke kõik ülejäänud positsioonid tühjade tuubidega.

qPCR Rotor-Gene Q instrumendil 72-tuubi rootoriga

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

## Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 4 kirjeldatakse ühe reagenssegu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 25 µl. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-PML-RARA bcr1). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sissearvestatud lisamahud.

**Tabel 4. qPCR segu ettevalmistamine**

Komponent	PML-RARA bcr1:			Lõpp-kontsentr.
	1 reakts. (µl)	ABL: 24 + 1 reakts. (µl)	28 + 1 reakts. (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	312.5	362.5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	25	29	1x
Nukleasideta PCR-puhtusega vesi	6.5	162.5	188.5	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	25	25 igat	25 igat	–

3. Dispenseerige iga tuubi kohta 20 µl qPCR eelsegu.
4. Lisage 5 µl RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon", lk 15) vastavasse tuubi (kogumaht 25 µl).
5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.
6. Asetage tuubid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
7. Programmeerige Rotor-Gene Q instrumendi termotsükleerimise programm nagu toodud Tabelis 5.

**Tabel 5. Temperatuuriprofiil**

<b>Analüüsirežiim</b>	Quantitation
<b>Hold</b>	Temperatuur: 50 kraadi Aeg: 2 min
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95 kraadi Aeg: 10 min
<b>Cycling</b>	50 korda 95 kraadi 15 sekundit 60 kraadi 1 min FAM fluorestsentsi kogumine kanalis Green: Single

8. Käivitage termotsükleerimise programm, nagu kirjeldatud Tabelis 5.
9. Rotor-Gene Q instrumendil valige analüüsiks "Slope Correct". Soovitame lävendiks panna 0.03.

Protokoll: qPCR ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel

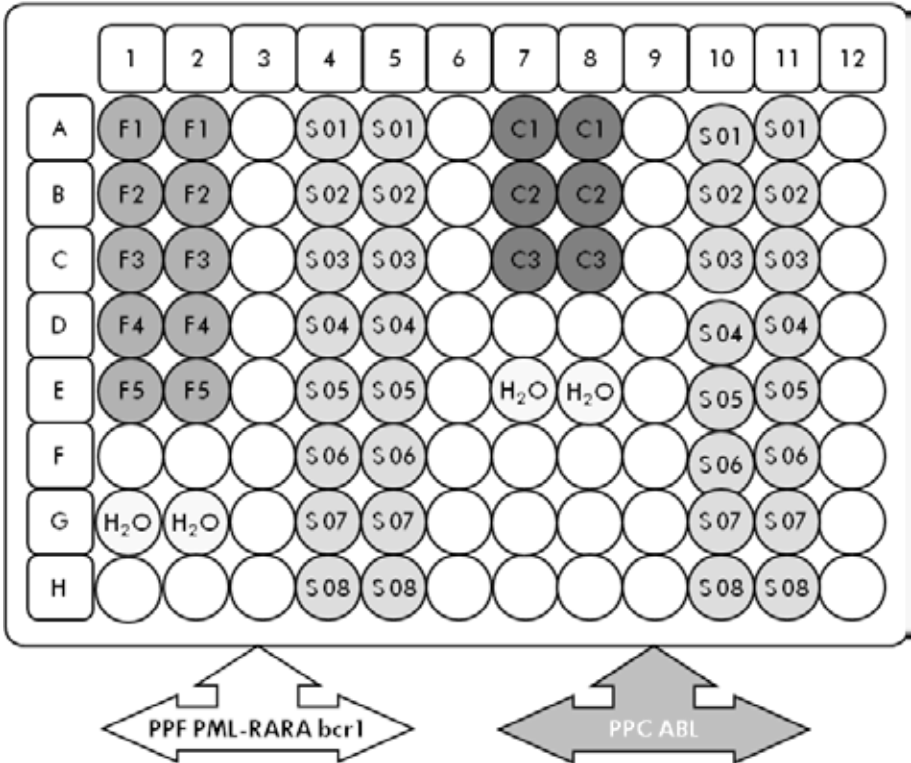
Kasutades 96-augulise-plaadi qPCR seadmeid, soovitame kõik mõõtmised läbi viia duplikaatidena, nagu näidatud Tabelis 6.

**Tabel 6. Reaktsioonide arv kasutades 96-augulise-plaadi qPCR seadet**

<b>Proovid</b>	<b>Reaktsioonid</b>
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	2 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni
<b>PML-RARA bcr1 praimerite ja proovi seguga (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
PML-RARA bcr1 standard	2 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni

Proovi töötlemine ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel

Soovitame testida vähemalt 8 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist. Joonisel 4 on näidatud sellise eksperimendi plaadiskeem.



**Joonis 4. Soovituslik plaadiskeem ühe eksperimendi jaoks.** S: cDNA proov; F1–5: PML-RARA bcr1 standardid; C1–3: ABL standardid; H<sub>2</sub>O: vee-kontroll.

qPCR ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

## Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 7 kirjeldatakse ühe reagendisegu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 25 µl. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-PML-RARA bcr1). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sissearvestatud lisamahud.

**Tabel 7. qPCR segu ettevalmistamine**

Komponent	1 reakts. (µl)	ABL: 24 +1 reakts. (µl)	PML-RARA bcr1: 28 +1 reakts. (µl)	Lõpp- kontsentr.
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	312.5	362.5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	25	29	1x
Nukleasideta vaba PCR- puhtusega vesi	6.5	162.5	188.5	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	25	25 igat	25 igat	–

3. Dispenseerige iga plaadiaugu kohta 20 µl qPCR eelsegu.
4. Lisage 5 µl RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon", lk 15) vastavasse auku (kogumaht 25 µl).
5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.
6. Sulgege plaat ja tsentrifuugige lühidalt (300 x g, ca 10 sekundit).



7. Asetage tuubid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele. Programmeerige termotsükleri termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 8 ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System kohta, või Tabelis 9 LightCycler 480 instrumendi kohta.

**Tabel 8. Temperatuuriprofiil ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System puhul**

<b>Analüüsirežiim</b>	Standard Curve — Absolute Quantitation
<b>Hold</b>	Temperatuur: 50°C Aeg: 2 minutes
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutes
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 15 sekundit 60°C 1 minutit kogudes FAM fluorestsentsi; summutaja: TAMRA

**Tabel 9. Temperatuuriprofiil LightCycler 480 instrumendi puhul**

<b>Mode of analysis</b>	Absolute Quantification ("Abs Quant")
<b>Detection formats</b>	Valige "Simple Probe" Detection formats aknas
<b>Hold</b>	Temperatuur: 50°C Aeg: 2 minutit
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutit
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 15 sekundit 60°C 1 minut kogudes FAM fluorestsentsi, mis vastab (483–533 nm) LC versioonis 01 ja (465–510 nm) LC versioonis 02

8. ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System seadme korral järgige etappi 8a. LightCycler 480 puhul järgige etappi 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Soovitame lävendi seada 0.1 nagu kirjeldatud EAC protokollis analüüsetapis ja *baseline* seada tsüklite 3 ja 15 vahele. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 8.
- 8b. LightCycler 480: Soovitame Fit point analüüsirežiimi, taust 2.0 ja lävend 2.0. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 9.

## Protokoll: qPCR LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel

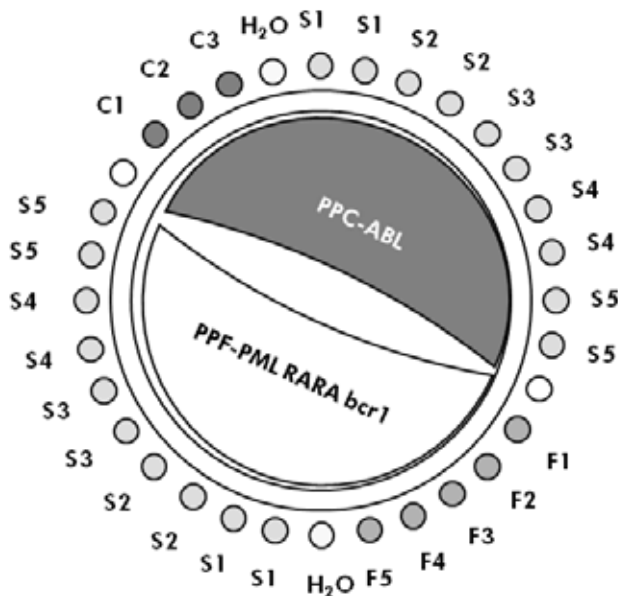
Kapillaarinstrumentide puhul soovitame mõõta proove duplikaatidena ja kontrolle ainult ühe korra, nagu kirjeldatud Tabelis 10.

**Tabel 10. Reaktsioonide arv LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	1 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon
<b>PML-RARA bcr1 praimerite ja proovi seguga (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
PML-RARA bcr1 standard	1 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon

Proovide töötlemine LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel

Soovitame testida vähemalt 5 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist. Joonise 5 kapillaarskeemil on näidiseksperiment.



Joonis 5. Soovituslik rootori paigutusega eksperimendi jaoks *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitiga. F1–5: PML-RARA bcr1 standardid; C1–3: ABL standardid; S: tundmatu DNA proov analüüsimiseks; H<sub>2</sub>O: vee-kontroll.

qPCR LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel

**Märkus:** Tehnoloogiliste nõuete tõttu tuleb LightCycleri eksperimente läbi viia spetsiaalsete reagentidega. Soovitame kasutada LightCycler TaqMan Master ja järgida tootja juhiseid Master Mix 5x valmistamisel.

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

## Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 11 kirjeldatakse ühe reagendisegu ettevalmistamise pipeteerimiskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 20 µl. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-PML-RARA bcr1). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sissearvestatud lisamahud.

**Tabel 11. qPCR segu ettevalmistamine**

Komponent	1 reakt. (µl)	ABL: 14 + 1 reakts. (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reakts. (µl)	Lõpp- kontsentr.
Värskelt valmistatud LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	60	68	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	0.8	12	13.6	1x
Nukleaside-vaba PCR- puhtusega vesi	10.2	153	173.4	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	20	20 igat	20 igat	–

3. Dispenseerige 15 µl qPCR eelsegu kapillaari kohta.
4. Lisage 5 µl RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon", lk 15), vastavasse tuubi (kogumaht 20 µl).
5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.

6. Asetage kapillaarid seadmega kaasasolevatesse adapteritesse ja tsentrifuugige lühidalt (700 x g, ca 10 sekundit).
7. Laadige kapillaarid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
8. Programmeerige LightCycler 1.2 või 2.0 instrumendi termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 12.

**Tabel 12. Temperatuuriprofiil**

<b>Mode of analysis</b>	Quantification
<b>Hold</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutes Ramp: 20
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 10 sekundit; ramp: 20 60°C 1 minut; ramp: 20; FAM fluorestsentsi kogumine: Single
<b>Hold 2</b>	45°C 1 minut; ramp: 20

9. LightCycler 1.2 puhul järgige etappi 9a. LightCycler 2.0 puhul järgige etappi 9b.
  - 9a. LightCycler 1.2: Soovituslik on F1/F2 ja "2<sup>nd</sup> derivative analysis" režiim. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 12.
  - 9b. LightCycler 2.0: Soovituslik on Automated (F''max) analüüs LightCycler 2.0 Software versioonil 4.0, et saada korratavaid tulemusi. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 12.

## Protokoll: qPCR SmartCycler instrumendil

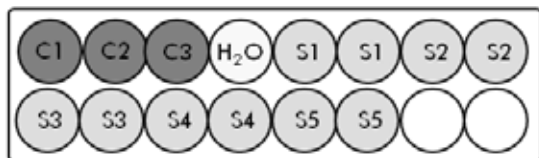
Seda instrumenti kasutades on soovitatav mõõta proove duplikaatidena ja kontrolle ühekordselt, nagu näidatud Tabelis 13.

**Tabel 13. Reaktsioonide arv SmartCycler instrumendil**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	1 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon
<b>PML-RARA bcr1 praimerite ja proovi seguga (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
PML-RARA bcr1 standard	1 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon

### Proovi töötlemine SmartCycler instrumendil

Soovitame testida vähemalt 5 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist. Joonisel 6 toodud kahe-bloki skeemil on toodud näidis.



All the assays on this first block are performed with PPC-ABL



All the assays on this second block are performed with PPF-PML-RARA bcr1

**Joonis 6. Soovituslik plaadipaigutus ühe eksperimendi jaoks.** S: cDNA proov; F1–5: PML-RARA bcr1 standardid; C1–3: ABL standardid; H<sub>2</sub>O: vee-kontroll.

qPCR SmartCycler instrumendil

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

### Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 14 kirjeldatakse ühe reagendiseгу ettevalmistamise pipeteerimiskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 25 µl. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-PML-RARA bcr1). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sissearvestatud lisamahud.

Tabel 14. qPCR segu ettevalmistamine

Komponent	1 reakts. (µl)	ABL: 14 + 1 reakts. (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reakts. (µl)	Löpp- kontsentr.
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	187.5	212.5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	15	17	1x
Nukleaaside-vaba PCR-puhtusega vesi	6.5	97.5	110.5	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	25	25 igat	25 igat	–

- Dispenseerige 20 µl qPCR eelsegu plaadiaugu kohta.
- Lisage 5 µl RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon", lk 15), vastavasse tuubi (kogumaht 25 µl).
- Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.
- Laadige proovid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
- Programmeerige SmartCycler instrumendi termotsükleerimise program nagu kirjeldatud Tabelis 15.



**Tabel 15. Temperatuuriprofiil**

<b>Hold</b>	Temperatuur: 50°C Aeg: 2 minutit
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutit
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 15 sekundit 60°C 1 minut andmete kogumisega <i>acquisition</i> : Single

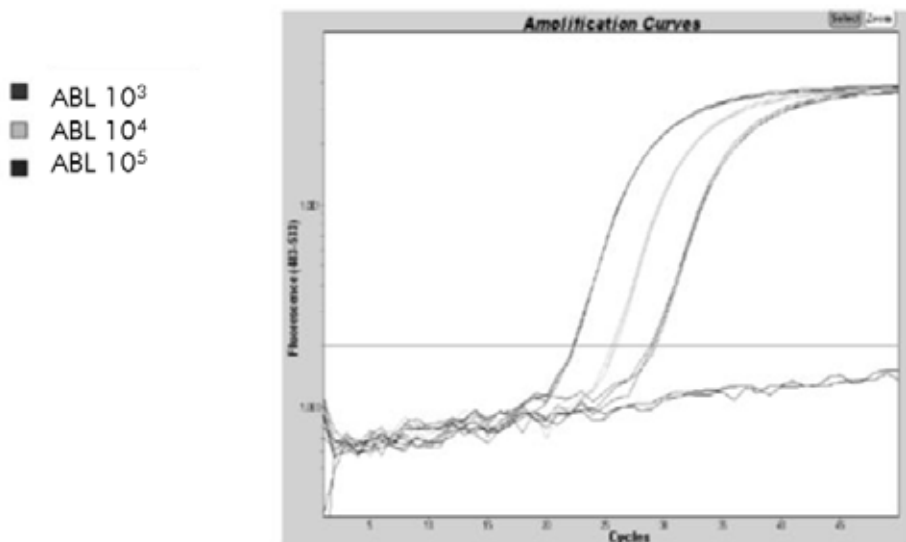
8. Soovitame lävendi seada 30. Käivitage termotsükleerimise program nagu kirjeldatud Tabelis 15.

# Tulemuste tõlgendamine

## Andmeanalüüsi põhimõte

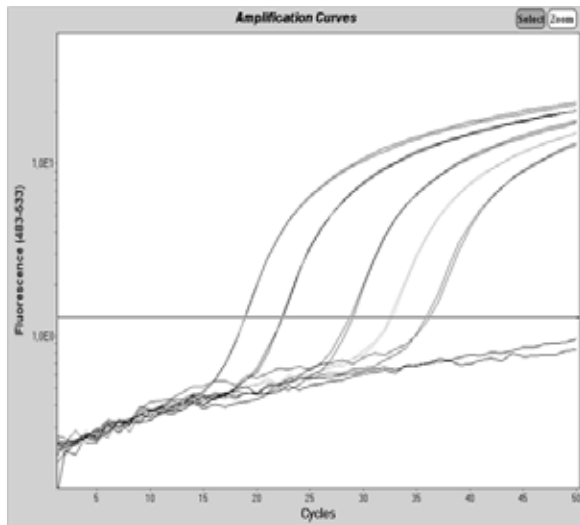
TaqMan tehnoloogiat kasutades nimetatakse PCR tsüklite arvu, mis on vajalik signaali detekteerimiseks üle lävendi, lävitsükliks ( $C_T$ ) ning see on otseselt proportsionaalne reaktsiooni alguses olemas olnud sihtmärgi hulga.

Kasutades teadaoleva molekulide arvuga standardeid, on võimalik tekitada standardkõver ja määrata kindlaks sihtmärgi täpne hulk testitavas proovis. *ipsogen* standardkõverad on plasmiidipõhised; kasutame 3 plasmiidse standardi lahjendust ABL kontrollgeeni (CG) ja 5 standardi lahjendust fusioongeeni (PML-RARA *bcr1*) puhul, et kindlustada täpsed standardkõverad. Joonistel 7 ja 8 on toodud näidised TaqMan amplifikatsioonikõveratest, mis on saadud *ipsogen* PML-RARA *bcr1* Kitiga.



Joonis 7. ABL standardite detekteerimine ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ).  $10^3$ ,  $10^4$  ja  $10^5$  koopiat/5  $\mu$ l.

- PML-RARA bcr1 10<sup>1</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>2</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>3</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>5</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>6</sup>



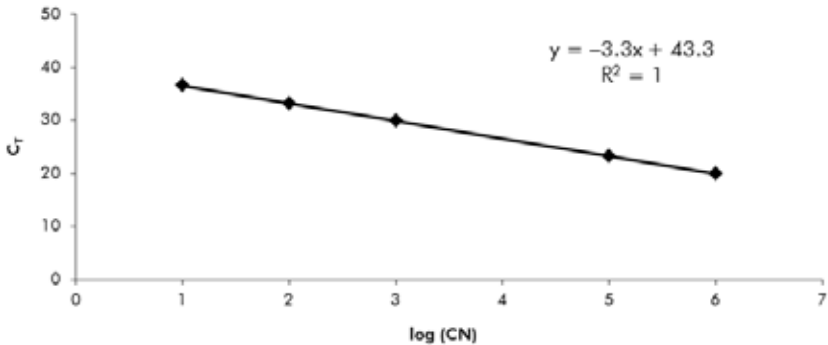
Joonis 8. PML-RARA bcr1 standardite detekteerimine (F1–F5). 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> ja 10<sup>6</sup> koopiat/5 µl.

## Tulemused

### Standardkõver ja kvaliteedikriteeriumid

Toorandmeid on võimalik transportida analüüsimiseks Excel® faili.

Iga geeni (ABL ja PML-RARA) toor-C<sub>T</sub> väärtused, mis saadakse plasmiidse standardi lahjendustest, seatakse graafikule vastavalt log koopianumbrile (3, 4 ja 5 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> ja C<sub>3</sub> puhul; 1, 2, 3, 5 ja 6 F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> ja F<sub>5</sub> puhul). Joonisel 9 on toodud näidis teoreetilisest kõverast, mis on arvutatud 5 standardi lahjenduse põhjal.



**Joonis 9. Teoreetiline kõver, mis on arvatud 5 standardi lahjenduse põhjal.** Lineaarne regressioonikõver ( $y = ax + b$ ) arvutatakse igale geenile (ABL ja PML-RARA), milles  $a$  on joone kalle ja  $b$  on  $y$ -lõikaja, mis on joone  $y$ -teljega lõikumise punkti  $y$ -koordinaat. Selle võrrandi ja määramise koefitsient ( $R^2$ ) prinditakse graafikule.

Kuna standardid on 10-kordsed lahjendused, on joone teoreetiline kalle  $-3.3$ . Kalle  $-3.0$  kuni  $-3.9$  on vastuvõetav seni kuni  $R^2$  on  $>0.95$  (6). Sellegipoolest on täpsete tulemuste huvides eelistatav  $R^2$  väärtus  $>0.98$  (7).

Normaliseeritud koopianumber (NCN)

ABL standardkõvera valemist tuleb kasutada, et teisendada tundmatute proovide toor- $C_T$  väärtused (saadud PPC-ABL-ga) ABL koopianumbriteks ( $ABL_{CN}$ ).

PML-RARA standardkõvera valemist tuleb kasutada, et teisendada tundmatute proovide toor- $C_T$  väärtused (saadud PPF-PML-RARA-ga) PML-RARA koopianumbriteks ( $PML-RARA_{CN}$ ).

Nende CN väärtuste suhe annab normaliseeritud koopianumbri (NCN):

$$NCN = \frac{PML-RARA_{CN}}{ABL_{CN}}$$

## MRD väärtus

Minimaalse residuaalse haiguse (MRD) väärtus on suhe CG normaliseeritud FG ekspressiooni vahel kordusproovis  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$  ja diagnostilises proovis  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ .

$$\text{MRD väärtus (MRDv)} = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}}$$

## Tundlikkus

Tundlikkus (SENSv) arvutatakse vastavalt FG relatiivsele ekspressioonile diagnoosimisel  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$  ja CG ekspressioonile  $(CG_{CN,FUP})$  kordusproovis.

$$\text{Tundlikkus (SENSv)} = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

## ABL väärtuste kvaliteedikontroll

Kehv RNA kvaliteet või probleemid qPCR etappides annavad tulemuseks madala  $ABL_{CN}$ . Soovitame kõrvale jätta nende proovide tulemused, mille  $ABL_{CN} < 1318$  (madalam väärtus 95% CI patsientide proovidest EAC uurimuses, viide 2).

## Kordusproovide korratavus

$C_T$  väärtuste varieeruvus kordusproovide vahel peaks olema  $< 2$ , mis vastab 4-kordsele muutusele koopianumbrite väärtustes.

$C_T$  väärtuste varieeruvus kordusproovide vahel on tavaliselt  $< 1.5$  kui kordusproovide keskmine  $C_T$  väärtus on  $< 36$  (6).

**Märkus:** Iga kasutaja peab mõõtma nende enda korratavust oma laboris.

---

## Vee-kontrollid

Negatiivsed kontrollid peaksid andma null CN.

Positiivsed vee-kontrolli tulemused näitavad kross-kontaminatsiooni. Vt "Vigade leidmise juhis", allpool, et leida lahendus.

## Vigade leidmise juhis

Vigade leidmise peatükk on võimalike probleemide lahendamisel abiks. Lisateabe saamiseks pöörduge kliinilise koordinaatori poole või külastage veebisaiti [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

### Kommentaariid ja soovitused

---

#### **Negatiivne tulemus kontrollgeeni (ABL) ja PML-RARA bcr1 puhul kõikides proovides — standard korras**

- |   |  |
|---|--|
| a) Kehv RNA kvaliteet                         | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. nr. 672091)*). |
| b) Pöördtranskriptsiooni etapi ebaõnnestumine | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. nr. 672091)*). |

#### **Negatiivne tulemus kontrollgeeni (ABL) puhul proovides — standard korras**

- |   |  |
|---|--|
| a) Kehv RNA kvaliteet                         | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. nr. 672091)*). |
| b) Pöördtranskriptsiooni etapi ebaõnnestumine | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. nr. 672091)*). |

#### **Standardi signaal negatiivne**

- |                     |   |
|---------------------|---|
| a) Pipeteerimisviga | Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni koostist.<br>Korrake PCR. |
|---------------------|---|

## Kommentaariid ja soovitused

---

- b) Kiti komponentide ebaõige säilitamine Säilitage *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kiti temperatuuril –15 kuni –30°C ja hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPF) valguse eest kaitstuna. Vt “Reagentide säilitamine ja käsitsemine”, lk 13.
- Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.
- Säilitage reagentid alikvootidena.

### Negatiivsed kontrollid on positiivsed

- Kross-kontaminatsioon Asendage kõik olulised reagentid.
- Korrake eksperimenti kõikide reagentide uute alikvootidega.
- Käsitsege alati proove, kiti komponente ja kulutarvikuid kooskõlas üldtunnustatud tavadega vältimaks *carry-over* kontaminatsiooni.

### Puuduv signaal, isegi standardkontrollide puhul

- a) Pipeteerimisviga või unustatud reagentid Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni koostist. Korrake PCR.
- b) Proovimaterjali inhibitoorsed efektid, põhjuseks ebapiisav puhastamine Korrake RNA puhastamist.
- c) LightCycler: valitud vale detektsioonikanal Seadke Channel Setting F1/F2 või 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: andmete kogumine ei ole programmeeritud Kontrollige tsükliprogramme. PCR programmi iga seondumise etapi lõpus valige *acquisition mode* “single”.

### Proovidel puuduvad või madalad signaalid, aga standardkontrollid korras

- a) Kehv RNA kvaliteet või madal kontsentratsioon Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.
- Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. nr. 672091\*).



## Kommentaariid ja soovitused

---

- b) Pöördtranskriptsiooni etapi ebaõnnestumine      Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. nr. 672091)\*).

### Fluorestsentsi intensiivsus liiga madal

- a) Kiti komponentide ebaõige säilitamine      Säilitage *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitti temperatuuril –15 kuni –30°C ja hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPF) valguse eest kaitstuna. Vt “Reagentide säilitamine ja käsitsemine”, lk 13.  
Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.  
Säilitage reagentid alikvootidena.
- b) Väga madal algne sihtmärk-RNA hulk      Suurendage proovi RNA hulka.  
**Märkus:** Olenevalt valitud RNA puhastamise meetodist võib esineda inhibitoorseid efekte.

### LightCycler: Fluorestsentsi intensiivsus varieerub

- a) Pipeteerimisviga      Nn “pipeteerimisveast” põhjustatud varieeruvust saab vähendada analüüsides andmeid F1/F2 või 530 nm/640 nm režiimis.
- b) Kapillaaride ebapiisav tsentrifuugimine      Ettevalmistatud PCR segu võib olla endiselt kapillaari ülemises kambris või on kapillaari otsas õhumull.  
Tsentrifuugige reaktsiooniseguga laaditud kapillaare alati nii nagu on kirjeldatud spetsiifilise seadme kasutusjuhendis.
- c) Kapillaari otsa välispind on määrdunud      Kandke kapillaaridega töötamisel alati kindaid.

### LightCycler: Standardkövera viga

- Pipeteerimisviga      Nn “pipeteerimisveast” põhjustatud varieeruvust saab vähendada analüüsides andmeid F1/F2 või 530 nm/640 nm režiimis.

\*The *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, cat. no. 672091, is for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

---

# Kvaliteedikontroll

Kogu kiti kvaliteedikontroll on läbi viidud LightCycler 480 instrumendil. See kitt on toodetud vastavuses ISO 13485:2003 standardile. Analüüsisertifikaadid on soovi avaldamise korral kättesaadavad [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Piirangud

Kasutajad peavad olema koolitatud ja tehnoloogiaga tuttavad enne selle seadme kasutamist. Seda kitti tuleb kasutada järgides käesolevas kasutusjuhendis olevaid juhiseid, koos valideeritud instrumendiga, mis on mainitud "Lisaks vajalikud materjalid", lk 10.

Kõiki saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete leidudega. On kasutaja vastutusel valideerida süsteemi toimimine sellisteks nende laboris läbiviidavateks protseduurideks, mis ei ole kaetud QIAGEN toimimise uuringutega.

Tähelepanu tuleb pöörata karbil ja kõikide komponentide siltidel prinditud aegumiskuupäevadele. Ärge kasutage aegunud komponente.

**Märkus:** See kitt on disainitud kooskõlas "Europe Against Cancer" (EAC) uuringutega (4, 5). Seda tuleb kasutada järgides selles kasutusjuhendis toodud juhiseid, koos valideeritud reagentide ja instrumentidega. Selle toote igasugune mitte-ettenähtud kasutus ja/või komponentide modifitseerimine tühistab QIAGENi vastutuse.

---

# Toimimise tunnused

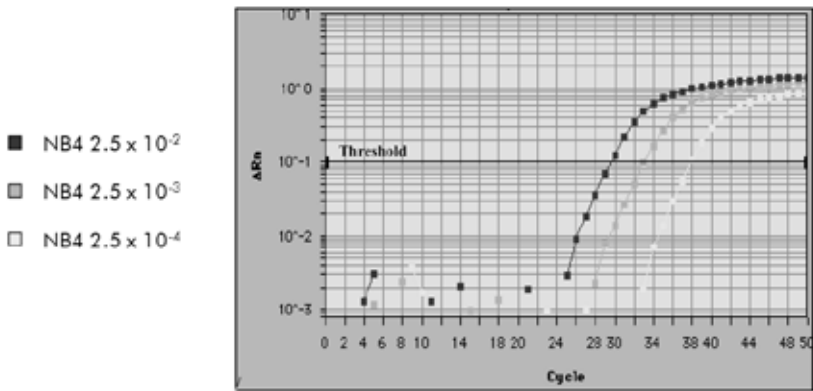
## Mittekliinilised uuringud

### Materjalid ja meetodid

Toimimise hindamine viidi läbi ABI PRISM 7700 SDS seadmel koos reagentidega, mis on toodud "Lisaks vajalikud materjalid", lk 10. Ekvivalentsuse uuringutes valideeriti selle kasutamine järgmistel instrumentidel: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor-Gene 3000 ja SmartCycler.

Viidi läbi mittekliinilised uuringud, et määrata *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kiti analüütiline toimimine. Need mittekliinilised laboratoorsed uuringud viidi läbi NB4 rakuliini totaalse RNA-ga, mis oli lahjendatud konstantses lõppmahus MV4-11 rakuliini totaalses RNA-s.

Analüüsi korratavuse määramiseks analüüsiti 5 erinevat kontsentratsiooni NB4 totaalses RNA-d (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg ja 0.5 pg), mis oli lahjendatud MV4-11 totaalses RNA-s, konstantses lõppmahus 200 ng, 5 kordusena ühes töotsükli ja 4 erinevas töotsükli. 5 pg ja 0.5 pg NB4 RNA-d MV4-11 RNA-s sisaldavad proovid olid liiga lahjad, et tulemust anda (Joonis 10).



Joonis 10. Amplifikatsioonikõverad  $2.5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2.5 \times 10^{-3}$  (0.5 ng) ja  $2.5 \times 10^{-4}$  (0.05 ng) NB4 totaalse RNA lahjendustest MV4-11 negatiivses totaalses RNA-s.

#### Analüütilised andmed

Tabelites 16–19 on toodud testidevahelised analüüsid keskmise lävitsükli ( $C_T$ ), standardhälbe (SD), proovide arvu (n), variatsioonikordaja (CV), keskmise koopianumbri (CN) ja keskmise normaliseeritud koopianumbriga (NCN).

Tabel 16. Testidevaheline ja –sisene analüüs — rakuliinid PML-RARA ja ABL

Raku-liin	Lahjendus	Testidevaheline analüüs			Testidesisene analüüs		
		Keskm. $C_T$	SD	n	CV (%)	Min CV	Max CV
PML-RARA	5 ng	29.86	0.29	20	0.98	0.32	1.42
	0.5 ng	33.70	0.48	20	1.42	0.56	2.16
	0.05 ng	37.03	0.37	18	1.01	1.07	2.03
ABL	–	24.06	0.22	100	0.92	0.15	2.31

**Tabel 17. Testidevaheline analüüs — plasmiidid**

Geen	Plasmiid	Keskm. C <sub>T</sub>	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 <sup>1</sup> koopiat)	35.95	0.29	8	0.79
	F2 (10 <sup>2</sup> koopiat)	32.25	0.59	8	1.84
	F3 (10 <sup>3</sup> koopiat)	28.71	0.55	8	1.90
	F4 (10 <sup>5</sup> koopiat)	22.14	0.49	7	2.23
	F5 (10 <sup>6</sup> koopiat)	18.64	0.72	8	3.84
ABL	C1 (10 <sup>3</sup> koopiat)	28.85	0.76	7	2.62
	C2 (10 <sup>4</sup> koopiat)	25.25	0.71	8	2.82
	C3 (10 <sup>5</sup> koopiat)	21.74	0.81	8	3.74

**Tabel 18. Testidevaheline analüüs — rakuliinid PML-RARA bcr1 ja ABL (keskmine CN)**

Rakuliin	Lahjendus	Keskm. CN	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2.5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 µg)	583.95	149.19	20	25.55
	2.5 x 10 <sup>-3</sup> (0.5 ng/200 ng)	44.98	12.25	20	27.23
	2.5 x 10 <sup>-4</sup> (0.05 ng/200 ng)	4.91	1.55	19	31.52
ABL	–	35,171.47	22,448.3	99	63.83

**Tabel 19. Testidevaheline analüüs — rakuliin PML-RARA bcr1 (keskmine NCN)**

Rakuliin	Lahjendus	Keskm NCN*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	$2.5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	271.4	150.00	20	55.56
	$2.5 \times 10^{-3}$ (0.5 ng/200 ng)	15.35	8.12	20	52.87
	$2.5 \times 10^{-4}$ (0.05 ng/200 ng)	1.66	0.91	18	55.14
ABL	–	35,171.47	22,448.3	99	63.83

\* Ainult nendes analüüsitulemustes on NCN antud kui  $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10,000$ .

## Kliinilised uuringud

Toimimise hindamine viidi läbi ABI PRISM 7700 SDS seadmel koos reagentidega, mis on kirjas “Lisaks vajalikud materjalid”, lk 10. Ekvivalentsuse uuringutes valideeriti selle kasutamine järgmistel instrumentidel: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor-Gene 3000 ja SmartCycler.

26 laborist koosnev grupp 10 Euroopa riigis, mis olid organiseeritud EAC poolt, kasutasid *ipsogen* plasmide, et töötada välja standardiseeritud protokoll peamiste leukeemiaga seostatud fusioongenide qPCR analüüsiks kliinilises keskkonnas. PML-RARA bcr1 transkript oli üks uuritud fusioongenidest (FG). Esitame siin selle valideerimisuuringu kokkuvõtte; täielikud tulemused on avaldatud aastal 2003 (4, 5).

## CG ja FG plasmiidsete standardite laboritevaheline korratavus

11 laborit osales laboritevahelises korratavuse eksperimendis, et hinnata CG ja FG plasmiidse standardi lahjenduste mõtmise varieeruvust. Lahjendusi testiti igas laboris duplikaatidena. Tabelis 20 on iga lahjenduse keskmine, standardhälve, ja CV (%).

Tabel 20. CG ja FG plasmiidsete standardite laboritevaheline korratavus

Geen	Lahjendus	Keskmine	C <sub>r</sub> SD	CV (%)
ABL kontrollgeen	C1	29.26	0.69	2.31
	C2	25.79	0.65	2.53
	C3	22.40	0.61	2.70
PML-RARA bcr1 fusioongen	F1	35.84	0.79	2.21
	F2	32.47	0.49	1.50
	F3	28.91	0.34	1.17
	F4	21.82	0.30	1.40
	F5	18.47	0.29	1.55

#### PML-RARA bcr1 FG transkripti ekspresiooniväärtused

Tabellides 21 ja 22 on toodud PML-RARA bcr1 FG transkripti ja ABL CG ekspresiooniväärtused NB4 rakuliinis, APL patsientidel diagnoosimisel ja negatiivsetel kontrollpatsientidel.

Tabel 21. PML-RARA bcr1 FG transkripti ja ABL CG ekspressiooniväärtused — C<sub>T</sub> väärtused

	C <sub>T</sub> väärtused (95% vahemik)	
	PML-RARA bcr1	ABL
<b>NB4 rakuliin</b>	24.7	23.7
<b>APL patsientide proovid</b>		
Luuüdi (n = 14)	25.6 (23.1–27.5)	24.5 (21.7–28.5)
Perifeerne veri (n = 9)	25.7 (23.7–29.4)	24.6 (22.0–27.4)
<b>Negatiivsete patsientide proovid</b>		
Luuüdi (n = 26)	–	25.35 (24.68–26.02)
Perifeerne veri (n = 74)	–	25.15 (24.83–25.48)

ABL CT väärtused ei erinenud oluliselt normaalsete ja leukeemiaproovide vahel, ega ka proovitüüpide (PB või BM) või APL diagnoosiga patsientide leukeemia proovide vahel.



Tabel 22. PML-RARA bcr1 FG transkripti ja ABL CG ekspresiooniväärtused — CN ja NCN väärtused

	CN väärtused (95% vahemik)		NCN väärtused (95% vahemik)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
<b>Patsientide proovid</b>			
Luuüdi (n = 14)	5129 (1480–25,704)	1538.7 (133.2–46,781.28)	0.30 (0.09–1.82)
Perifeerne veri (n = 9)	3891 (475–14,454)	1400.76 (50.27–11,274)	0.36 (0.11–0.78)
<b>Negatiivsed patsientide proovid</b>			
Luuüdi (n = 26)	–	19,201 (12,922–25,480)	–
Perifeerne veri (n = 74)	–	21,136 (17,834–24,437)	–

### Valepositiivsete ja valenegatiivsete esinemine

Valepositiivsete ja valenegatiivsete esinemise sagedus arvatati järgmiste kontrollide abil.

- I Positiivsed kontrollid: NB4 rakud, rakuliin, mis on tuntud PML-RARA bcr1 FG positiivsuse poolest; patsientide proovid, mis on juba hinnatud PML-RARA bcr1 positiivseks
- I Negatiivsed kontrollid: Negatiivsed RNA proovid, amplifikatsioonivabad kontrollid (NAC), milles on inim-RNA asemel *E. coli* RNA, et kontrollida PCR kontaminatsiooni, ja ilma sihtmärgita kontrollid (NTC), milles on inim-RNA asemel vesi

FG RNA proovide amplifitseerimine viidi läbi kolmes korduses ja CG puhul kahes korduses.

Valenegatiivseks loeti positiivne RNA proov, mis andis vähem kui 50% positiivseid tulemusi (0/2, 0/3 või 1/3).

Valepositiivseks loeti negatiivne RNA proov, mis andis vähemalt 50% positiivseid tulemusi (1/2, 2/3, or 3/3).

Tabelis 23 on toodud valenegatiivsete ja valepositiivsete proovide arv ja protsent.

**Tabel 23. Valenegatiivsed ja valepositiivsed proovid**

Valenegatiivsus		Valepositiivsus	
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	FG negatiivne kontroll	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

---

# Viited

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.
5. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

# Sümbolid

Pakendil ja siltidel võivad olla järgmised sümbolid:



<N>

Sisaldab piisavalt reagente <N> reaktsioonile



Kasutada enne



In vitro diagnostiline meditsiiniseade



Katalooginumber



Loti number



Materjali number (st komponentide sildistamine)



Globaalne kaubaartikli number (GTIN)



Temperatuuri piirangud



Tootja



Kasutamiseks tutvuge juhendiga

## Dokumendi muudatuste ajalugu

R5, november 2017

Lisatud on märkused, et *ipsogen* PML-RARA bcr1 kontrollkomplekt, kat nr 672091, ettenähtud üksnes uurimistööks; parandatud väiksemad kirjavead.

# Tellimisinfo

Toode	Sisu	Kat. nr.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	24 reaktsiooni jaoks: ABL kontrollgeeni standardid, PML-RARA bcr1 fusioongeeni standardid, Praimerite ja proovi segu ABL, Praimerite ja proovi segu PML-RARA bcr1 Fusioongeen	672123
<b>Rotor-Gene Q MDx —IVD-valideeritud reaalaja PCR analüüsiks kliinilistes rakendustes</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaalaja PCR tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karminpunane) pluss HRM kanal, sülearvuti, tarkvara, lisad, 1-aastane garantii, installatsioon ja koolitus ei ole kaasa arvatud	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaalaja PCR tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karminpunane) pluss HRM kanal, sülearvuti, tarkvara, lisad, 1-aastane garantii, installatsioon ja koolitus	9002033
<b><i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit — RNA ekstraktsiooni ja PML-RARA bcr1 fusioongeeni kvalitatiivseks valideerimiseks</b>		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Rakuliinid PML-RARA bcr1 fusioongeeni negatiivse, kõrge ja madala positiivse ekspresiooniga	672091*

\*Kontrollide komplekt *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat nr 672091 on ette nähtud ainult teaduslikuks kasutamiseks. Mitte kasutada diagnostiliste protseduuride korral. Tootega seotud väited ja kirjeldused ei ole mõeldud andma teavet haiguse diagnoosi, ennetuse või ravi kohta.

Kaasaegset infot litsentside ja toodete kohta saate vastava toote QIAGENi kasutusjuhendist. QIAGENi kasutusjuhendid on saadaval veebis [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) või saate neid küsida QIAGENi tehnilisest toest või kohalikult edasimüüjalt.

See toode on mõeldud kasutamiseks in vitro diagnostikas. Ipsogen tooteid ei tohi edasi müüa, edasimüümiseks modifitseerida ega kasutada kommertsiaalsete toodete tootmiseks ilma QIAGENi kirjaliku loata.

Selles dokumendis toodud infot võib ilma ettevaatamata muuta. QIAGEN ei võta vastutust selles dokumendis esineda võivate vigade eest. See dokument usutakse publitseerimise hetkel olevat täielik ja täpne. Mingil juhul ei ole QIAGEN vastutav juhuslike, eriliste, mitmekordsete või tegevusest tulenevate kahjustuste eest, mis on seotud või tulenevad selle dokumendi kasutamisest.

*Ipsogen* tooted on garanteeritud vastama kirjasolevale spetsifikatsioonile. QIAGENi ainus kohustus ja kasutaja ainus abinõu piirneb toodete tasuta asendamises juhul kui tooted ei toimi nii nagu garanteeritud.

**Kaubamärgid:** QIAGEN®, *Ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Life Technologies Corporation); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); SmartCycler® (Cepheid).

Piiratud litsentsileping komplekti *ipsogen* PML-RARA bcr1 kasutamiseks

Selle toote kasutamine tähendab, et toote ostja või kasutaja nõustub järgmistega tingimustega.

1. Toodeid tohib kasutada ainult vastavalt tootega kaasas olevatele protokollidele ja sellele käsiraamatule ning ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna oma mis tahes intellektuaalse omandi alusel litsentse komplekti komponentide kasutamiseks või ühendamiseks sellesse komplekti mittekuuluvate komponentidega, välja arvatud toote protokollides, selles käsiraamatus ja veebisaidil [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) kirjeldatud juhtudel. Mõne neist lisaprotokollidest on lisanud QIAGEN-i kasutajate jaoks teised QIAGEN-i kasutajad. QIAGEN pole neid protokolle põhjalikult testinud ega optimeerinud. QIAGEN ei garanteeri, et need ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
2. Peale sõnaselgelt avaldatud litsentside, ei anna QIAGEN garantiid, et see kiti ja/või selle kasutusala(d) ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
3. See kiti ja selle komponendid on litsentseeritud ühekordseks kasutamiseks ja neid ei või korduvalt kasutada, värskendada ega uuesti muua.
4. QIAGEN ütleb lahti kõikidest muudest litsentsidest, väljendatud või vihjatud, va need mis on sõnaselgelt avaldatud.
5. Kiti ostja ja kasutaja ei tohi midagi, mis võiks ulatuda keeldude rikkumiseni viia või seda kergendada, samuti ei tohi nad lubada kellelgi teisel selliseid samme ette võtta. QIAGEN võib selles limiteeritud litsentsi kokkuleppes olevad keelud jõustada igas kohtus ja saada tagasi kõik uurimis- ja kohtulukul, sh kulud advokaadile, tegevuses selle limiteeritud litsentsi kokkuleppe või kiti ja/või selle komponente puudutava intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks.

Uuendatud litsentsitingimused leiata [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

H HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN kõik õigused reserveeritud.

