

Heinäkuu 2020

therascreen[®] IDH1 /2 RGQ PCR Kit -käsikirja



Versio 1

12:n *IDH1*- ja *IDH2*-mutaatioiden havaitsemiseen glioomissa

IVD

In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -instrumentin kanssa

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA

R5 **MAT**

1119896FI

Sample to Insight



Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Yhteenveto ja selitykset.....	6
Menetelmän toimintaperiaate.....	8
Toimitetut materiaalit.....	10
Sarjan sisältö.....	10
Tarvitavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	12
Varoitukset ja varotoimet.....	15
Turvallisuustiedot.....	15
Yleiset varotoimet.....	15
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	17
Kuljetusolosuhteet.....	17
Säilytys.....	17
Stabiilius.....	17
Näytteen käsittely ja säilytys.....	18
Toimenpide.....	19
DNA:n uuttaminen ja valmistelu.....	19
Protokolla: <i>IDH1/2</i> -mutaatioiden havaitseminen.....	23
Tulosten tulkitseminen.....	28
Vesikontrollit.....	28
Laadunvalvonta käyttämällä kontrollien C_T -arvoja.....	28
Syötetyn näytteen validointi.....	31
Näytetulokset.....	31

Vianmääritys.....	37
Laadunvalvonta	40
Rajoitukset	41
Suorituskykyominaisuudet	43
Tyhjän raja (Limit of blank, LOB)	43
Havaitsemisraja (Limit of Detection, LOD)	43
Lähtö-DNA:n vaikutus.....	45
Toistettavuus ja uusittavuus.....	45
Menetelmien vertailu.....	48
Lähdeviitteet	51
Symbolit	53
Tilastiedot	55
Asiakirjan muutoshistoria	58

Käyttötarkoitus

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit on PCR-tekniikkaan perustuva in vitro -diagnostinen testi, joka on tarkoitettu seitsemän *IDH1*-geenimutaation ja viiden *IDH2*-geenimutaation kvalitatiiviseen havaitsemiseen sekä kolmen merkittävimmän mutaation suoraan havaitsemiseen DNA:ssa, joka on eristetty formaliini kiinnitetystä ja parafiinivaletusta (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) ihmisen aivokudoksesta.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit on tarkoitettu käytettäväksi apuna gliomien luokittelussa.

Yhteenveto ja selitykset

Mutaatiot isositraattidehydrogenaasi- eli IDH-geeneissä *IDH1* ja *IDH2* ovat tavallisia aikuisilla ilmenevissä Maailman terveysjärjestö WHO:n luokituksessa luokkiin II ja III kuuluvissa glioomissa ja WHO-luokan IV sekundaarissa glioblastoamissa (GBM). Diagnostisen arvonsa lisäksi *IDH1/2*-mutaatioiden esiintyminen on yhteydessä glioomapotilaiden (1–13) positiiviseen ennusteeseen.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjalla voidaan havaita seuraavat 12 spesifistä *IDH1/2*-geenien mutaatiota: kuusi mutaatiota *IDH1*-geenin kodonissa 132, viisi mutaatiota *IDH2*-geenin homologisessa kodonissa 172 ja yksi mutaatio *IDH1*-geenin kodonissa 100 (taulukko 1). Lisäksi sarja tunnistaa suoraan merkittävimmät *IDH1*- ja *IDH2*-mutaatiot, jotka johtavat *IDH1* R132H-, *IDH1* R132C- ja *IDH2* R172K -substituutioihin.

Taulukko 1. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjan avulla havaitut IDH1- ja IDH2-mutaatiot

Geeni	Mutaatio	Emäsjärjestyksen muutos	COSMIC-tunniste*
IDH1	Arg132His (R132H)	395G>A	COSM28746
	Arg132Cys (R132C)	394C>T	COSM28747
	Arg132Ser (R132S)	394C>A	COSM28748
	Arg132Gly (R132G)	394C>G	COSM28749
	Arg132Leu (R132L)	395G>T	COSM28750
	Arg132Val (R132V)	394_395CG>GT	COSM28751
	Arg100Gln (R100Q)	299G>A	COSM88208
IDH2	Arg172Lys (R172K)	515G>A	COSM33733
	Arg172Met (R172M)	515G>T	COSM33732
	Arg172Trp (R172W)	514A>T	COSM34039
	Arg172Ser (R172S)	516G>T	COSM34090
	Arg172Gly (R172G)	514A>G	COSM33731

* COSMIC-tunnisteet on otettu Catalog of Somatic Mutations in Cancer -luettelosta (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Menetelmän toimintaperiaate

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjassa on reagenssit yhdeksän erillisen monistumisreaktion tekemiseen 12 mutaation havaitsemista varten (taulukko 1):

- kolme *IDH1*-geenin kodonien 132 ja 100 ja *IDH2*-geenin kodonin 172 kokonaismonistusreaktiota varten
- kolme *IDH1*-geenin kodonien 132 ja 100 ja *IDH2*-geenin kodonin 172 mutaatiomonistusreaktiota varten
- kolme *IDH1* R132H-, *IDH1* R132C- ja *IDH2* R172K -mutaatioiden mutaatiokohtaista monistusreaktiota varten.

Kokonaisreaktioseokset

Kokonaisreaktion aluke- ja koetinseoksissa (PPM-kokonais) käytetään alukkeita ja koettimia, joilla monistetaan sekä mutatoituneita että villityypin kohdesekvenssejä (kuva 1).

Mutaatioiden havaitsemiseen tarkoitettut reaktioseokset

Mutaatioiden havaitsemiseen käytettävissä reaktioseoksissa mutatoituneita ja villityypin kohdesekvenssejä monistaviin alukkeisiin ja koettimiin on yhdistetty lisäksi oligonukleotidi, joka on 3'-estetty lisätyllä fosfaattiryhmällä pidentymisen (PCR-puristumisen) estämiseksi ja spesifi villityypiselle kohdesekvenssille.

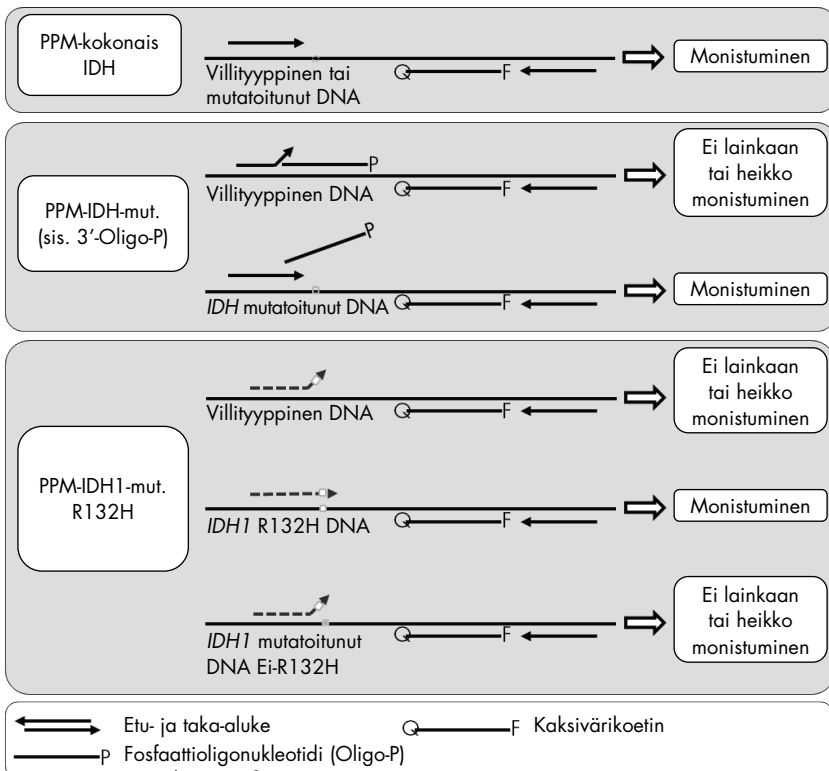
Kun PCR-malli sisältää villityypisen sekvenssin, 3'-fosfaattioligonukleotidi dominoi PCR-alukkeen sitoutumista suuremman affiniteetin vuoksi. DNA-polymeraasin tekemää pidentymistä ei esiinny lainkaan tai vain hyvin vähän, ja monistumista ei havaita lainkaan tai hyvin vähän.

Kun mutatoitunut sekvenssi on läsnä, PCR-alukkeen sitoutuminen dominoi 3'-fosfaattioligonukleotidin sitoutumista ja monistuminen etenee (kuva 1).

Mutaatioiden tunnistamiseen tarkoitetut reaktioseokset

Alleelikohtainen monistaminen tapahtuu käyttämällä ARMS-tekniikkaa (amplifikaation refraktaarinen mutaatiojärjestelmä), jossa hyödynnetään DNA-polymeraasin kykyä erottaa vastaavuudet ja epävastaavuudet PCR-alkukkeen 3'-päässä.

Kun PCR-alue on täysi vastaava, monistuminen etenee täydellä teholla. Kun 3'-emäs ei ole vastaava, tapahtuu vain heikkoa taustamonistumista (kuva 1).



Kuva 1. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjan aluke- ja koetinseoksilla saadut tulokset. Sama IDH1 R132H:n havaitsemiseen esitetty periaate pätee IDH1 R132C:hen ja IDH2 R172K:hon.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Tuotenumero		873011
Reaktioiden määrä		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Aluke- ja koetinseos kokonais- <i>IDH1/R132</i> :n havaitsemiseen) (villityyppinen ja mutatoitunut)	PPM-kokonais <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Aluke- ja koetinseos kokonais- <i>IDH2/R172</i> :n havaitsemiseen) (villityyppinen ja mutatoitunut)	PPM-kokonais <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Aluke- ja koetinseos kokonais- <i>IDH1/R100</i> :n havaitsemiseen) (villityyppinen ja mutatoitunut)	PPM-kokonais <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Aluke- ja koetinseos (sis. Oligo-P:n) mutatoituneen <i>IDH1/R132</i> :n havaitsemiseen)	PPM- <i>IDH1/R132</i> -mut. 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i> (Aluke- ja koetinseos (sis. Oligo-P:n) mutatoituneen <i>IDH2/R172</i> :n havaitsemiseen)	PPM- <i>IDH2/R172</i> -mut. 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i> (Aluke- ja koetinseos (sis. Oligo-P:n) mutatoituneen <i>IDH1/R100</i> :n havaitsemiseen)	PPM- <i>IDH1/R100</i> -mut. 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H (Aluke- ja koetinseos <i>IDH1</i> -mutaation R132H tunnistamiseen)	PPM- <i>IDH1</i> -mut. R132H 25x	40 µl

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Sarjan sisältö (jatkoa)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Tuotenumero		873011
Reaktioiden määrä		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C (Aluke- ja koetinseos <i>IDH1</i> -mutaation R132C tunnistamiseen)	PPM-IDH1-mut. R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> Mut R172K (Aluke- ja koetinseos <i>IDH2</i> -mutaation R172K tunnistamiseen)	PPM-IDH2-mut. R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (<i>IDH1/IDH2</i> -villityypin genominen DNA)	<i>IDH1/IDH2</i> -villityypin kontrolli	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control (<i>IDH1/IDH2</i> -mutatoitunut positiivinen kontrolli)	<i>IDH1/IDH2</i> -positiivinen kontrolli	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (<i>Taq</i> DNA-polymeraasin, dNTP:n, MgCl ₂ :n ja puskurin seos qPCR:ää varten)	qPCR-päaseos 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water (Nukleasiton vesi)	Nukleasiton vesi	5 x 525 µl
therascreen <i>IDH1/2</i> RGQ PCR Kit -käsikirja (englanti)		1

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvallisuustiedotteissa (Safety Data Sheets, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

Tärkeää: Varmista, että tässä menetelmässä käytettävät välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Reagenssit (manuaalinen DNA:n eristäminen)

- DNA:n eristämissarja: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit -sarja (tuotenumero 56404)
- RNase A (17 500 U) (tuotenumero 19101)
- Ksyleeniä tai Histolemon™-liuosta (Carlo Erba, tuotenumero 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanolia (96–100 %)
- 1x TE -puskuri, pH 8,0

Reagenssit (automaattinen DNA:n eristäminen)

- DNA:n eristämissarja: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit -sarja (tuotenumero 937236)
- Buffer ATL (tuotenumero 19076 tai 939016)
- RNase A (tuotenumero 19101)
- Ksyleeniä tai Histolemon-liuosta (Carlo Erba, tuotenumero 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanolia (96–100 %)
- 1x TE -puskuri, pH 8,0

Kulutustavarat

- Skalpelleja
- Nukleasittomia aerosolisuojattuja steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- 2,0 ml:n tai 1,5 ml:n nukleasittomia putkia
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, Rotor-Gene Q -laitetta varten (tuotenumero 981103 tai 981106)
- Jäätä

DNA:n automaattiseen eristämiseen tarvittavat lisätarvikkeet

- Sample Prep Cartridges, 8-well (tuotenro 997002)
- 8-Rod Covers (tuotenro 997004)
- Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (tuotenro 990332) ja Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (tuotenro 997024)
- Elution Microtubes CL (tuotenro 19588)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, tuotenro 72.693, www.sarstedt.com)

Välineet

- Objektilevyteline ja kaksi yhteensopivaa objektilevyhaudetta ksyleenille/Histolemonliuokselle ja etanolille
- Mikrolitrapipettejä, jotka on tarkoitettu PCR:ään (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)
- Pöytämallinen sentrifugi, jossa on roottori 0,5/1,5 ml:n reaktioputkia ja mikrolevyjä varten (ja joka kykenee saavuttamaan nopeuden 13 000–14 000 rpm)
- Pöytämallinen vortex-sekoitin
- Reaaliaikainen PCR-laite: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ja siihen liittyvät erityismateriaalit
- Rotor-Gene Q MDx -ohjelmistoversio 2.1.0 tai uudempi

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

Lisälaitteet automaattista puhdistamista varten

- QIASymphony SP -laite
- QIASymphony SP -ohjelmistoversio 4.0 tai uudempi

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavilla PDF-muotoisina verkossa sivulla www.qiagen.com/safety, jossa voit tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjekomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.

Käytettyä puhdistussarjaa koskevia turvallisuustietoja on vastaavan sarjan käsikirjassa. Katso instrumenttien turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavan sarjan käyttöoppaasta.

Yleiset varotoimet

- Testi on tarkoitettu käytettäväksi puskuroitujen formaliiniikiinnitettyjen ja parafiinivalettujen (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) kirurgisten resektiokudosnäytteiden kanssa.
- 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* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjan reagenssit on laimennettu optimaalisesti. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen. Älä käytä alle 25 µl:n reaktiitolavuuksia (reaktioseos + näyte).
- Kaikki *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä vaihda reagensseja *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjojen välillä, sillä se voi vaikuttaa suorituskykyyn.

-
- Katso Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöoppaasta lisävaroitukset, varotoimet ja toimenpiteet.
 - Inkubaation ja lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
 - Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
 - Aluke- ja koetinseoksissa saattaa tapahtua muutoksia, jos ne altistuvat valolle.
 - Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta seokset eivät sekoittuisi positiivisissa kontrollireagensseissa olevien synteettisten materiaalien kanssa.
 - Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta ei tapahtuisi DNAaasi-kontaminaatiota, joka saattaisi hajottaa malli-DNA:n.
 - Käytä reaktioseosten valmistuksessa ja mallien lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä.
 - Suorita reaktioseosten valmistaminen ja annostelu eri paikassa kuin mallien lisääminen.
 - Älä avaa Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitetta ennen kuin ajo on päättynyt.
 - Älä avaa Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -putkia ennen kuin ajo on päättynyt.
 - Varmista, että testaat oikean näytteen. Varo väärän näytteen käyttämistä, latausvirhettä ja pipetointivirheitä.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit toimitetaan kuivajään päällä. Jos *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ei ole vastaanottohetkellä jäässä tai jos ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai jos toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloä, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä johonkin QIAGENin tekniseen palveluun tai paikalliseen jälleenmyyjään (katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytys

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa $-30...-15^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna.

Stabiilius

Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit on stabiili mainittuun vanhenemispäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30...-15^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa pakkauksessa olevaan vanhenemispäivään asti. Sarjan toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään 5.

Näytteen käsittely ja säilytys

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit on tarkoitettu käytettäväksi formaliiniikiinnitetystä ja parafiinivaletusta (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) kasvainkudoksesta eristettyjen DNA-näytteiden kanssa, jotka on saatu aivosyöpöpotilaille tehdyistä kirurgisista resektioista. Kaikkia kudoksenäytteitä tulee käsitellä mahdollisesti vaarallisina.

- Kudoksenäyte on fiksoitava 4–10-prosenttisessä neutraalissa puskuroidussa formaliinissa (neutral buffered formalin, NBF).
- Parafiinilohkosta on leikattava sarjassa 10 µm:n paloja, jotka asetetaan objektilaseille.
- Koulutetun henkilön (kuten patologin) tulee arvioida kasvaimen sisältö ja alue vieressä olevalla hematoksyliini-eosiini (HE) -värjättyllä palalla. Käytä DNA:n eristämiseen sarjapaloja.
- Testiin kelpaavat vain palat, joiden kasvainsisältö on $\geq 40\%$.
- Alle <50 mm²:n kudosalueen palojen osalta suosittelemme käsittelemään riittävän määrän paloja, jotta kokonaiskudosalue saadaan kasvatettua vähintään 50 mm²:iin (100 mm²:iin QIASymphony SP -laitteella tehtävän automatisoidun eristämisen yhteydessä).
- Merkitse, käsittele ja säilytä eristykseen valmiita kasvainnäytteitä, kappaleita, objektilaseja ja näytteitä kontrolloidulla tavalla paikallisten käytäntöjen mukaan.
- Säilytä FFPE-lohkoja ja objektilaseja huoneenlämmössä. Objektilaseja voi säilyttää huoneenlämpötilassa enintään 4 viikkoa ennen DNA:n eristämistä *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa käytettäessä.
- Eristämisen jälkeen genomista DNA:ta voidaan säilyttää enintään 1 viikko 2–8 °C:n lämpötilassa tai 8 viikkoa -25...-15°C:n lämpötilassa.


Toimenpide

DNA:n uuttaminen ja valmistelu

Käytä QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa (tuotenro 56404) tai QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa (tuotenro 937236) genomisen DNA:n puhdistamiseen FFPE-aiivosyöpänäytteistä valmistelluista näytteistä.

Huomautus: *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan tai QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan kanssa käytettäväksi. Mitään muuta DNA:n eristämistuotetta ei saa käyttää.

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan käyttö

<p>HUOMIO</p> 	<p>Lue huolellisesti seuraavat muutokset, jotka on tehtävä QIAamp-protokollaan.</p>
---	---


- Katso *QIAamp DNA FFPE Tissue* -käsikirjan aloitusmateriaalia käsittelevästä kohdasta ja tämän käsikirjan kohdasta Näytteen käsittely ja säilytys, sivu 18, kuinka näytteet tulee valmistella ennen parafiinin poistoa ja DNA:n eristämistä.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa tulee käyttää vain manuaalisesti.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue* -käsikirjassa kuvattu Rnaasivaihe on suoritettava.
- Älä käytä QIAGEN Deparaffinization Solution -liuosta. Käytä parafiinin poistoon ainoastaan kohdassa Objektilasien parafiinin poistomenettely käytettäessä QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa alla alla kuvattua ksyleeni-/etanolimenetelmää. Ksyleeni voidaan korvata Histolemon-liuksella (ksyleenin korvike).
- Proteinaasi K:ta on uutettava 1 tunnin ajan.
- Näytteet on eluoitava kaksi kertaa 30 µl:aan eluointipuskuria (Buffer ATE), joka toimitetaan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan mukana.

Objektilasien parafiinin poistomenettely käytettäessä QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa

1. Aseta objektilasit niille tarkoitettuun telineeseen.
2. Aseta objektilasiteline ksyleeniä tai Histolemon-liuosta sisältävään objektilasihauteeseen 2 minuutiksi. Ravista taakse- ja eteenpäin suuntautuvalla liikkeellä 2 tai 3 kertaa.
3. Aseta teline 2 minuutiksi toiseen objektilasihauteeseen, joka sisältää (96–100-prosenttista) etanolia. Ravista taakse- ja eteenpäin suuntautuvalla liikkeellä 2 tai 3 kertaa.
4. Kuivaa objektilasit 15–37 °C:n lämpötilassa. Tämä kestää muutaman minuutin.
5. Merkitse kullekin näytteelle 1,5 ml:n mikrosentrifugiputki ja lisää jokaiseen putkeen 180 µl (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan mukana toimitettua) Buffer ATL -puskuria.
6. Pane muutama tippa Buffer ATL -puskuria objektilaseilla oleville kudospaloille (sen verran, että kudospinta peittyi).
7. Raaputa kudosalue sterilillä skalpellilla ja lisää raaputettu kudos sille merkittyyn mikrosentrifugiputkeen.
8. Lisää 20 µl (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan mukana toimitettua) proteinaasi K:ta jokaiseen putkeen ja sekoita vorteksoimalla.
9. Inkuboi 56 °C:ssa 1 tunnin ajan.

Jatka QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -protokollan 90 °C:n inkubointivaiheeseen (vaihe 12 sivulla 13 *QIAamp DNA FFPE Tissue -käsikirjassa* kesäkuulta 2012).

QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan käyttö

<p>HUOMIO</p> 	<p>Lue huolellisesti seuraavat muutokset, jotka on tehtävä QIAsymphony SP -protokollalomakkeeseen: Tissue_LC_200_V7_DSP.</p>
---	--

- Katso kohdasta Näytteen käsittely ja säilytys, vulla 18, kuinka näytteet tulee valmistella ennen parafiinin poistoa ja DNA:n eristämistä.
- QIAsymphony SP -protokollalomakkeessa kuvattu Rnaasivaihe on suoritettava.
- Älä käytä QIAGEN Deparaffinization Solution -liuosta. Käytä parafiinin poistoon ainoastaan kohdassa Objektilasien parafiinin poistomenettely käytettäessä QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa alla alla kuvattua ksyleeni-/etanolimenetelmää. Ksyleeni voidaan korvata Histolemon-liuoksella (ksyleenin korvike).
- Proteinaasi K:ta on uutettava 1 tunnin ajan.
- Eluaattivilavuus 50 µl on valittava kosketusnäytöstä.

Objektilasien parafiinin poistomenettely käytettäessä QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa

Suorita parafiinin poistomenettely seuraavien vaiheiden mukaisesti, jotka poikkeavat protokollasta QIAsymphony SP -protokollalomakkeessa: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Aseta objektilasit niille tarkoitettuun telineeseen.
2. Aseta objektilasiteline ksyleeniä tai Histolemon-liuosta sisältävään objektilasihauteeseen 2 minuutiksi. Ravista taakse- ja eteenpäin suuntautuvalla liikkeellä 2 tai 3 kertaa.
3. Aseta teline 2 minuutiksi toiseen objektilasihauteeseen, joka sisältää (96–100-prosenttista) etanolia. Ravista taakse- ja eteenpäin suuntautuvalla liikkeellä 2 tai 3 kertaa.
4. Kuivaa objektilasit 15–37 °C:n lämpötilassa. Tämä kestää muutaman minuutin.
5. Merkitse kullekin näytteelle 1,5 ml:n mikrosentrifugiputki ja lisää jokaiseen putkeen 220 µl Buffer ATL -puskuria.

6. Pane muutama tippa Buffer ATL -puskuria objektilaseilla oleville kudospaloille (sen verran, että kudospinta peittyy).
7. Raaputa kudosalue steriilillä skalpellilla ja lisää raaputettu kudosisille merkittyyn mikrosentrifugiputkeen.
8. Lisää 20 µl (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan mukana toimitettua) proteinaasi K:ta jokaiseen putkeen ja sekoita vorteksoimalla.

Jatka 56 °C:n inkubointivaiheeseen QIASymphony SP -protokollalomakkeessa: Tissue_LC_200_V7_DSP protocol (vaihe 12 Parafiinin poisto ksyleenillä [Deparaffinization using xylene] -protokollassa huhtikuulta 2012). Inkuboi 56 °C:ssa 1 tunnin ajan.

Genominen DNA

Säilytä genomista DNA:ta eristämisen jälkeen 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 1 viikko tai 8 viikkoa –25...–15 °C:n lämpötilassa.

DNA:n määrä tulee selvittää mittaamalla näytteen optinen tiheys (Optical Density, OD) 260 nm:ssä.

Laimenna DNA:n pitoisuudeksi 5 ng/µl 1x TE -puskurissa pH:ssa 8,0.

PCR-reaktio on optimoitu näytteille, jotka sisältävät 25 ng puhdistettua genomista DNA:ta.

Protokolla: *IDH1/2*-mutaatioiden havaitseminen

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* -sarjan tehokkaan toiminnan takaamiseksi näytteet on jaettava neljän kappaleen eriin. Jos erä koko on pienempi, *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* -sarjalla voidaan testata pienempi määrä näytteitä.
- Kaikki näytteet on suositeltavaa testata kerran PCR-ajoa kohti taulukon 2 mukaisesti ja noudattamalla taulukon 3 ja kuvan 2 mukaista latauslohkoasettelua ja roottoriasetuksia.

Taulukko 2. Reaktioiden määrä Rotor-Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

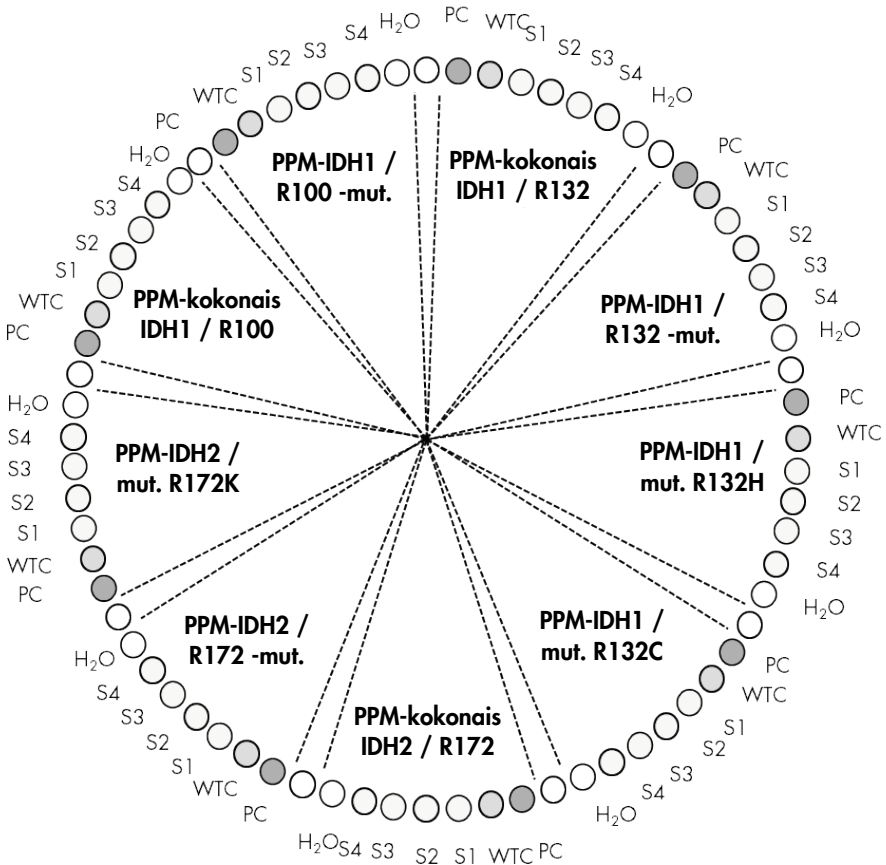
Näytteet	Reaktiot
n DNA-näytettä	n x 1 reaktio
2 DNA-kontrollia	2 reaktiota: positiiviset ja villityyppiset kontrollit, joista kumpikin testataan kerran PCR-ajoa kohti
Vesikontrolli	1 reaktio

Taulukko 3. Ehdotettu latauslohko tehtäessä testiä #herascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjalla

Näyte	Kokonais- IDH1/ R132 -mut.	R132H	IDH1 -mut.	R132C	IDH2/ R172 -mut.	Kokonais- IDH2/ R172 -mut.	R172K	IDH2 -mut.	Kokonais- IDH2/ R100 -mut.	R100	IDH1/ R100 -mut.
Mut PC*	1	9	17	25	33	41	49	57	65		
WTC†	2	10	18	26	34	42	50	58	66		
S1	3	11	19	27	35	43	51	59	67		
S2	4	12	20	28	36	44	52	60	68		
S3	5	13	21	29	37	45	53	61	69		
S4	6	14	22	30	38	46	54	62	70		
H ₂ O	7	15	23	31	39	47	55	63	71		
Tyhjiä putki	8	16	24	32	40	48	56	64	72		

* PC: positiivinen kontrolli

† WTC: villityypin kontrolli



Kuva 2. Ehdotetut roottoriaisetukset tehtäessä testiä *theascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjalla

Tärkeää: Muista asettaa näyte aina roottorin paikkaan 1. Muutoin laite ei tee kalibrointia ja testistä saadaan virheellisiä fluoresenssitietoja.

Toimenpide

1. Sulata kaikki tarvittavat osat ja aseta ne jäähauteeseen.
2. Valmista seuraavat PCR-seokset käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Huomautus: Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 4 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Kullekin aluke- ja koetinseokselle (Primer and Probe Mix, PPM) voidaan valmistaa esiseos reaktioiden määrän mukaisesti. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheiden kompensoimista varten.

Taulukko 4. PCR-seosten valmistelu

Komponentti	1 reaktio (µl)	Esiseos: 7 + 1 reaktiota (µl)	Lopullinen määrä
qPCR-pääseos, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Nukleasiiton vesi	6,5	52	–
Näyte tai kontrolli† (lisätään vaiheessa 4)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

* Valmista 9 esiseosta, yksi kullekin sarjan mukana tulleelle aluke- ja koetinseokselle (PPM).

† Positiivinen kontrolli, negatiivinen kontrolli tai vesikontrolli.

3. Annostele 20 µl esiseosliuosta Rotor-Gene-putkea kohti (Taulukko 3).
4. Lisää 5 µl kvantifioitavaa materiaalia (25 ng genomista DNA-näytettä tai kontrollia) vastaavaan putkeen (kokonaismäärä on 25 µl, Taulukko 3).
5. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
6. Aseta putket laitteen mukana tulleeseen sovittimeen (Kuva 2).
Huomautus: Käyttämättömät paikat on täytettävä tyhjiillä putkilla.
7. Lataa täysi sovitin Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen.
8. Ohjelmoi Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen lämpösykliohjelma taulukon 5 mukaisesti.

Taulukko 5. Lämpötilaprofiili

Hold (Pito)	Lämpötila: 95°C Aika: 10 min
Syklit	40 kertaa 95 °C 15 sekuntia 60 °C 60 sekuntia FAM™-fluoresenssin keruulla Green-kanavalla: Yksittäinen

9. Valitse New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -valintaikkunasta **Gain Optimisation** (Vahvistuksen optimointi), jolloin näyttöön avautuu Auto-Gain Optimisation Setup (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset) -valintaikkuna. Aseta Green-kanavan alue välille **2Fl (Min Reading (Minimilukema)) – 10Fl (Max Reading (Maksimilukema))**.
10. Valitse **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu ja sulje Auto-Gain Optimisation Setup (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset) -valintaikkuna.
11. Käynnistä lämpösykliohjelma.
12. Kun lämpösykliohjelma on päättynyt, tee seuraavat.
- 12a. Valitse **Options (Asetukset) > Crop Start Cycles** (Poista aloitusykliä). Poista ennen sykliä **10** olevat tiedot artefaktien hävittämiseksi.
 - 12b. Valitse **Analysis (Analyysi) > Cycling A. Green from 10** (Vihreä jakso 10:stä), joka näkyy raportissa merkinnällä left threshold = 10.00 (vasen kynnys = 10,00).
 - 12c. Valitse normalisointimenetelmäksi **Dynamic Tube** (Dynaaminen putki) ja korjaa kohinakulmakerroin valitsemalla **Slope Correct** (Kulmakertoimen korjaus).
 - 12d. Määritä **Outlier Removal** (Poikkeavan arvon poisto) -asetukseksi **0%** (vastaa NTC-kynnystä).
 - 12e. Määritä käytöstä poistettava **Reaction Efficiency Threshold** (Reaktiotehokkuuden kynnysarvo) -asetus.
 - 12f. Määritä kynnysarvoksi **0.03** (0,03).
 - 12g. Aseta käyrä lineaariseen asteikkoon.
 - 12h. Valitse **Digital Filter: Light** (Digitaalinen suodatin: valo).

Tulosten tulkitseminen

Vesikontrollit

Vesikontrollien (ei mallikontrollien) tulee antaa nolla C_T -arvoa kaikille aluke- ja koetinseoksille.

Jos vesikontrollilla saadaan positiivinen C_T -arvo, tämä on seurausta ristikontaminaatiosta. Hae ratkaisua katsomalla Vianmääritys, sivu 37.

Laadunvalvonta käyttämällä kontrollien C_T -arvoja

IDH1/2:n villityypin kontrolli (Wild-Type Control, WTC) ja mutatoituneen *IDH1/2:n* positiivinen kontrolli (Mut-PC) mahdollistavat testin validoinnin.

- Jos C_T -arvoa ei ole, kontrolli luokitellaan mutaationegatiiviseksi kyseiselle havaitsemismääritykselle.
- Jos C_T -arvoja havaitaan, laske ΔC_T kullekin kontrollille seuraavasti

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132-mut.} = C_T \text{ IDH1/R132-mut.} - C_T \text{ kokonais-IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172-mut.} = C_T \text{ IDH2/R172-mut.} - C_T \text{ kokonais-IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100-mut.} = C_T \text{ IDH1/R100-mut.} - C_T \text{ kokonais-IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1-mut. R132H} = C_T \text{ IDH1-mut. R132H} - C_T \text{ kokonais-IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1-mut. R132C} = C_T \text{ IDH1-mut. R132C} - C_T \text{ kokonais-IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2-mut. R172K} = C_T \text{ IDH2-mut. R172K} - C_T \text{ kokonais-IDH2/R172}$$

Kontrollit luokitellaan mutaatioposiivisiksi, jos ΔC_T -arvot ovat pienempiä tai yhtä suuria kuin vastaavat ΔC_T -raja-arvot, jotka esitetään taulukossa 6. Jos ΔC_T -arvo on suurempi kuin raja-arvo, kontrolli luokitellaan mutaationegatiiviseksi kyseiselle mutaatiomääritykselle.

Taulukko 6. Mutaatiotestien raja-arvot

Mutaatiotesti	Raja-arvo (ΔC_t)
IDH1/R132-mut.	5,34
IDH2/R172-mut.	6,42
IDH1/R100-mut.	4,65
IDH1-mut. R132H	6,87
IDH1-mut. R132C	7,14
IDH2-mut. R172K	8,49

- *IDH1/2:n* villityypin kontrolli on havaittava mutaationegatiiviseksi jokaisessa mutaatiotestissä (Taulukko 7).
- Mutatoituneen *IDH1/2:n* positiivinen kontrolli on havaittava mutaatioposiitiviseksi jokaisessa mutaatiotestissä (Taulukko 7).

Koko testi hylätään, mikäli molemmat ehdot eivät täyty.

Taulukko 7. Esimerkki kontrolleille tehdyn ajan validoinnista

Arvo	Vesi (NTC)	IDH1/IDH2 -villityypin kontrolli	IDH1/IDH2 -positiivinen kontrolli
C _T kokonais-IDH1/R132	Havaitsematon	25,45	23,95
C _T IDH1/R132-mut.	Havaitsematon	34,32	25,76
ΔC _T IDH1/R132-mut.	Havaitsematon	8,87	1,81
C _T kokonais-IDH2/R172	Havaitsematon	25,42	24,93
C _T IDH2/R172-mut.	Havaitsematon	34,36	26,36
ΔC _T IDH2/R172-mut.	Havaitsematon	8,94	1,43
C _T kokonais-IDH1/R100	Havaitsematon	26,30	24,69
C _T IDH1/R100-mut.	Havaitsematon	33,04	26,39
ΔC _T IDH1/R100-mut.	Havaitsematon	6,74	1,70
C _T IDH1-mut. R132H	Havaitsematon	35,20	26,48
ΔC _T IDH1-mut. R132H	Havaitsematon	9,75	2,53
C _T IDH1-mut. R132C	Havaitsematon	37,16	27,07
ΔC _T IDH1-mut. R132C	Havaitsematon	11,71	3,12
C _T IDH2-mut. R172K	Havaitsematon	Ei löytynyt	27,97
ΔC _T IDH2-mut. R172K	Havaitsematon	Ei oleellinen	3,04

Syötetyn näytteen validointi

Syötetty näyte on validoitava ennen tulkintaa.

Näytteelle jokaisella PPM-kokonais-arvolla ($C_{T \text{ kokonais-IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ kokonais-IDH2/R172}}$ ja $C_{T \text{ kokonais-IDH1/R100}}$) saadun C_T -arvon on oltava pienempi kuin 32,00. C_T kokonais-arvot $\geq 32,00$ ovat seurausta DNA:n huonosta laadusta. Näyte on testattava uudestaan. Jos DNA:n määrä on edelleen riittämätön, uuta lisää kudospäätettä, jos sitä on saatavilla (katso Vianmääritys, sivu 37).

Näytetulokset

IDH1/2-mutaation havaitseminen

Laske seuraavasti kullekin näytteelle ΔC_T -arvot, jotka on saatu kustakin mutaatioiden havaitsemistestistä (PPM-IDH1/R132-mut., PPM-IDH2/R172-mut., PPM-IDH1/R100-mut.).

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132-mut.}} = C_{T \text{ IDH1/R132-mut.}} - C_{T \text{ kokonais-IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172-mut.}} = C_{T \text{ IDH2/R172-mut.}} - C_{T \text{ kokonais-IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100-mut.}} = C_{T \text{ IDH1/R100-mut.}} - C_{T \text{ kokonais-IDH1/R100}}$$

Jos mutaation havaitsemismääritykselle ei ole C_T -arvoa, näyte on luokiteltava kyseisin mutaation osalta mutaationegatiiviseksi.

Näytteet luokitellaan mutaatioposiivisiksi, jos ΔC_T -arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin vastaavan mutaatioiden havaitsemistestin ΔC_T -raja-arvo, ks. raja-arvot taulukosta 8.

Taulukko 8. Mutaatioiden havaitsemistestien raja-arvot

Mutaatiotesti	Raja-arvo (ΔC_T)
IDH1/R132-mut.	5,34
IDH2/R172-mut.	6,42
IDH1/R100-mut.	4,65

IDH1/2-mutaation tunnistus

Laske seuraavasti kullekin näytteelle ΔC_T -arvot, jotka on saatu kustakin mutaatioiden tunnistustestistä (PPM-IDH1-mut. R132H, PPM-IDH1-mut. R132C, PPM-IDH2-mut. R172K).

$$\Delta C_T \text{ IDH1-mut. R132H} = C_T \text{ IDH1-mut. R132H} - C_T \text{ kokonais-IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1-mut. R132C} = C_T \text{ IDH1-mut. R132C} - C_T \text{ kokonais-IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2-mut. R172K} = C_T \text{ IDH2-mut. R172K} - C_T \text{ kokonais-IDH2/R172}$$

Jos mutaation tunnistusmääritykselle ei ole C_T -arvoa, näyte on luokiteltava mutaationegatiiviseksi.

Näytteen mutaatio tunnistetaan, jos ΔC_T -arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin vastaavan mutaatioiden tunnistustestin ΔC_T -raja-arvo, ks. raja-arvot taulukosta 9. Esimerkkejä ΔC_T -arvojen tulkinnoista on taulukossa 10 ja taulukossa 11.

Taulukko 9. Mutaatioiden tunnistustestien raja-arvot

Mutaatiotesti	Raja-arvo (ΔC_T)
IDH1-mut. R132H	6,87
IDH1-mut. R132C	7,14
IDH2-mut. R172K	8,49

Taulukko 10. Esimerkki *IDH1/2*-mutaation havaitsemisesta

Arvo	Näyte 1	Näyte 2
C_T kokonais-IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1/R132-mut.	33,86	28,29
ΔC_T IDH1/R132-mut.	7,47	1,97
C_T kokonais-IDH2/R172	26,79	25,79
C_T IDH2/R172-mut.	35,13	35,21
ΔC_T IDH2/R172-mut.	8,34	9,42
C_T kokonais-IDH1/R100	27,20	27,37
C_T IDH1/R100-mut.	33,83	33,76
ΔC_T IDH1/R100-mut.	6,63	6,39
Mutaation havaitseminen	Mutaatiota ei havaittu	R132-mutaatio havaittu

Taulukko 11. Esimerkki *IDH1/2*-mutaation tunnistamisesta

Arvo	Näyte 1	Näyte 2
C_T kokonais-IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1-mut. R132H	33,82	28,27
ΔC_T IDH1-mut. R132H	7,43	1,95
C_T kokonais-IDH1/R132	26,39	26,32
C_T IDH1-mut. R132C	37,94	Ei löytynyt
ΔC_T IDH1-mut. R132C	11,55	Ei oleellinen
C_T kokonais-IDH2/R172	26,79	25,79
C_T IDH2-mut. R172K	Ei löytynyt	Ei löytynyt
ΔC_T IDH2-mut. R172K	Ei oleellinen	Ei oleellinen
Mutaation tunnistaminen	Mutaatiota ei havaittu	R132H:n mutaatio havaittu

IDH1/2-mutaatioiden tulkinta

IDH1/2-mutaatiotyyppin määrittämiseen käytetty menettely näytteille, jotka ovat positiivisia IDH1/2-mutaation osalta, esitetään taulukossa 12. Esimerkki tulkinnasta esitetään taulukossa 13.

Taulukko 12. Tulkintaopas

		Mutaation tunnistaminen			
		IDH1-mut. R132H havaittu	IDH1-mut. R132C havaittu	IDH2-mut. R172K havaittu	Mutaatiota ei havaittu
Mutaation havaitseminen	R132-mutaatio havaittu	R132H-mutaatio havaittu	R132C-mutaatio havaittu	–	R132-mutaatio, mutta ei R132H eikä R132C
	R172-mutaatio havaittu	–	–	R172K-mutaatio havaittu	R172-mutaatio, mutta ei R172K
	R100-mutaatio havaittu	–	–	–	R100
	Mutaatiota ei havaittu	Mutaation R132H vähäinen pitoisuus havaittu (välillä 1–2 %)*	Mutaation R132C vähäinen pitoisuus havaittu (välillä 1–4 %)*	Mutaation R172K vähäinen pitoisuus havaittu (noin 1 %)*	Mutaatiota ei havaittu

* Tällaisia tapauksia voi ilmetä harvoin, ja kaikki näytteet ja tekniset hyväksyntäkriteerit on tarkistettava, erityisesti kasvainsolusisältö. Jos kaikki kriteerit täyttyvät, näyte on testattava uudelleen.

Taulukko 13. Esimerkki *IDH1/2*-mutaation raportoinnista ja tulkinnasta

	Näyte 1	Näyte 2
Mutaation havaitseminen	Mutaatiota ei havaittu	R132-mutaatio havaittu
Mutaation tunnistaminen	Mutaatiota ei havaittu	R132H:n mutaatio havaittu
Tulosten tulkitseminen	Mutaatiota ei havaittu eikä tunnistettu	R132H mutatoitunut

Huomautus: Jos näytteen ΔC_T -arvoista kaksi tai useampi on pienempiä tai yhtä suuria kuin ΔC_T -raja-arvot, tällöin mutanttistatus annetaan mutaatiolle, jonka ΔC_T -raja-arvon ja sen saadun arvon välinen ero on suurin. Katso esimerkki taulukossa 14.

Taulukko 14. Esimerkki tulkinnasta saataessa useita positiivisia tuloksia

	Näyte 3	Näyte 4
ΔC_T <small>IDH1/R132-mut.</small>	1,24	5,24
ΔC_T -raja-arvo <small>IDH1/R132-mut.</small>	5,34	5,34
$(\Delta C_T$ -raja-arvo - $\Delta C_T)$ <small>IDH1/R132-mut.</small>	4,10	0,10
ΔC_T <small>IDH2/R172-mut.</small>	5,32	5,95
ΔC_T -raja-arvo <small>IDH2/R172-mut.</small>	6,42	6,42
$(\Delta C_T$ -raja-arvo - $\Delta C_T)$ <small>IDH2/R172-mut.</small>	1,10	0,47
Tulosten tulkitseminen	R132 mutatoitunut	R172 mutatoitunut

Vianmääritys

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja saat osoitteesta www.qiagen.com.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Tukkeutunut sarake DNA:n eristämisen aikana

Puutteellinen lyysi

Sentrifugoi uudelleen.

Jäljellä oleva lysaatti voidaan siirtää uuteen sarakkeeseen.

Toista eristämisojo käyttämällä pienempää määrää FFPE-kudosta.

DNA:ta liian vähän eristyseluaatissa

Riittämätön FFPE-kudosalue

Toista eristämisojo käyttämällä suurempaa määrää FFPE-kudosaloja.

IDH1/2 -villityypin kontrollia ei havaittu

a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois; putken tai kuopan järjestyksen vaihtuminen

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.

Suorita PCR-ajo uudelleen.

b) Sarjan osien väärä säilytys

Säilytä *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa $-30...-15^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa ja pidä aluke- ja koetinseokset valolta suojattuna. Katso Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 17.

Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään 5.

c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit on vanhentunut

Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja käytä tarvittaessa uutta *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa.

IDH1/2 -positiivista kontrollia ei havaittu

a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois; putken tai kuopan

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.

Huomautuksia ja ehdotuksia

- järjestyksen vaihtuminen Suorita PCR-ajo uudelleen.
- b) Sarjan osien väärä säilytys Säilytä *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa -30...-15°C:n lämpötilassa ja pidä aluke- ja koetinseokset valolta suojattuna. Katso Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 17.
- Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään 5.
- c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit on vanhentunut Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja käytä tarvittaessa uutta *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa.

Ei signaalia, ei myöskään kontrollien signaalia

- a) Rotor-Gene Q MDx -laitteen paikassa 1 ei ole reaktioputkea Muista asettaa näyte aina roottorin paikkaan 1. Muutoin laite ei tee kalibrointia ja testistä saadaan virheellisiä fluoresenssitietoja.
- b) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois; putken tai kuopan järjestyksen vaihtuminen Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
- Suorita PCR-ajo uudelleen.
- c) Sarjan osien väärä säilytys Säilytä *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa -30...-15°C:n lämpötilassa ja pidä aluke- ja koetinseokset valolta suojattuna. Katso Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 17.
- Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään 5.
- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit on vanhentunut Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja käytä tarvittaessa uutta *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa.
- e) Väärä tunnistuskanava valittu Aseta tunnistuskanavaksi Cycling Green tai 530 nm/640 nm.
- f) Tiedonkeruuhjelmaa ei ole Tarkista sykliohjelma. Katso Taulukko 5, sivu 27.
- Valitse keruumenetelmäksi **Single** (Yksittäinen) PCR-ohjelman kunkin

Huomautuksia ja ehdotuksia

pariutumissegmentin lopussa.

Fluoresenssin voimakkuus vaihtelee.

Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois; putken tai kuopan järjestyksen vaihtuminen

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.

Suorita PCR-ajo uudelleen.

Fluoresenssin voimakkuus ei riitä

a) Sarjan osien väärä säilytys

Säilytä *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa $-30...-15^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa ja pidä aluke- ja koetinseokset valolta suojattuna. Katso Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 17.

Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään 5.

b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit on vanhentunut

Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja käytä tarvittaessa uutta *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa.

c) Kohde-DNA:n hyvin pieni määrä

Tarkista aina DNA:n pitoisuus ennen aloittamista. Katso DNA:n uuttaminen ja valmistelu, sivu 19.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Negatiivinen kontrolli (H₂O) antaa positiivisen tuloksen

Ristikontaminaatio, reagenssin kontaminaatio, laitevirhe, kuopan tai kapillaarin järjestyksen vaihtuminen tai koettimen pilaantuminen	Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit tai käytä uutta <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa. Käsittele näytteitä, sarjan osia ja tarvikkeita aina hyvien käytäntöjen mukaisesti, jotta niiden välistä kontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Pidä aluke- ja koetinseokset suojattuna valolta. Tarkista, näkykö fluoresenssikäyrissä virheellisiä positiivisia tuloksia. Tarkista reaktion järjestely. Katso Protokolla: IDH1/2-mutaatioiden havaitseminen, sivu 23.
---	--

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi. Analyysin sertifikaatit ovat saatavana pyydettäessä osoitteessa www.qiagen.com/support/.

Rajoitukset

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja tämän nimenomaisen tekniikan tuntevat henkilöt.

Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun, kohdassa Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen sivulla 12 esitetyn laitteen kanssa.

Kaikkien osien sarjoihin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit on validoitu vain puskuroidulle formaaliiniinnitetylle ja parafiinivaletulle aivokudokselle.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit on validoitu vain QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan tai QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan kanssa käytettäväksi.

Vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (PCR-ajoa varten) ja QIASymphony SP (näytteen valmistelua varten) on validoitu.

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

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

Testi on suunniteltu seitsemän mutaation havaitsemiseen *IDH1*-geenin kodoneissa 132 ja 100 ja viiden mutaation havaitsemiseen *IDH2*-geenin kodonissa 172. Näytteissä, joiden tuloksiksi on raportoitu "mutaatiota ei havaittu", saattaa olla *IDH1*- tai *IDH2*-mutaatioita, joita testi ei ole havainnut.

Mutaatioiden havaitsemiseen vaikuttaa näytteen eheys, kasvaimen sisältö ja näytteessä oleva monistettava DNA.

Tuotteella saadut tulokset on tulkittava kaikki asianmukaiset kliiniset ja laboratoriolöydökset huomioiden.

Suorituskykyominaisuudet

Tyhjän raja (Limit of Blank, LOB)

LOB-arvo määritettiin (CLSI/NCCLS EP17-A guideline; 14 -ohjeen mukaisesti) negatiivisista näytteistä (FFPE normaali aivo, 8 näytettä, 64 mittausta/reagenssiera, 2 erää).

LOB-tulokset esitetään taulukossa 15.

Taulukko 15. Tyhjän raja (Limit of blank, LOB)

Määrittäminen	LOB	Lopullinen LOB
R132 Mut	Validointierä 1: 6,57 Validointierä 2: 6,32	6,32
R132H-mut.	Validointierä 1: 7,91 Validointierä 2: 8,22	7,91
R132C-mut.	Validointierä 1: 8,04 Validointierä 2: 8,20	8,04
R172-mut.	Validointierä 1: 7,74 Validointierä 2: 7,59	7,59
R172K-mut.	Validointierä 1: 9,93 Validointierä 2: 10,58	9,93
R100-mut.	Validointierä 1: 6,52 Validointierä 2: 5,19	5,17

Havaitsemisraja (Limit of Detection, LOD)

Havaitsemisraja (LOD tai analyttinen herkkyys) määritettiin tarkkuusprofiilimenetelmällä, joka on kuvattu ohjeessa CLSI/NCCLS EP17-A (14). Viittä heikosti positiivista näytettä (plasmidi-DNA lisättynä gliooman villityypin DNA:han) käytettiin mutaatiota kohti (30–110 mittausta mutaatiotyyppejä ja mutaatioprosenttia kohti).

LOD-tulokset esitetään taulukossa 16.

Taulukko 16. Havaitsemiss raja (Limit of Detection, LOD)

Määrittely	Mutaatiot	LOD	Testin raja-arvo	Herkkyys (%)
R132H-mut.	R132H	6,87	6,87	0,78
R132C-mut.	R132C	7,14	7,14	1,19
R172K-mut.	R172K	8,49	8,49	0,61
R132 Mut	R132H	5,50	5,34	2,32
	R132C	5,34		4,35
	R132L	5,42		2,30
	R132G	5,61		2,23
	R132S	5,42		2,75
	R132V	5,56		2,24
R172-mut.	R172K	6,42	6,42	1,06
	R172G	6,58		3,00
	R172M	6,66		3,31
	R172S	6,42		14,93
	R172W	6,68		2,36
R100-mut.	R100Q	4,65	4,65	3,45

Mutaatio havaitaan, jos ΔC_T on pienempi tai yhtä suuri kuin LOD.

Lähtö-DNA:n vaikutus

DNA eristettiin neljästä eri glioomakasvainnäytteestä: kahdesta villityypin *IDH1/2* sisältävästä ja kahdesta *IDH1* R132H (395G>A) -mutaation sisältävästä.

Lähtö-DNA:n vaikutus kvalitatiivisiin tuloksiin arvioitiin testaamalla kolme eri DNA-määrää (mukaan lukien protokollalle suositeltu määrä). Tulokset osoittivat, että lähtö-DNA:lla ei ollut vaikutusta kvalitatiivisiin tuloksiin. Enemmän teknisiä virheitä (C_T kokonais-laadunvalvontavirheitä) havaittiin kuitenkin lähtö-DNA:n osalta, jota oli vähemmän kuin suositeltu määrä (<25 ng DNA). Tämän vuoksi testin suorittamiseksi DNA:ta suositellaan syötettäväksi 5 µl:n määrään 25 ng.

Toistettavuus ja uusittavuus

Tarkkuustutkimus tehtiin neljälle eri näytteelle (plasmidi-DNA lisättyä gliooman villityypin DNA:han, mikä edusti villityyppi (Wild-Type, WT)-, mutanti- ja raja-arvonäytettä), jotka testattiin 40 kertaa duplikaattina (n = 80 mittausta).

Keskiahjonnot (Standard Deviation, SD) ja variaatiokertoimet (Coefficient of Variation, CV) esitetään taulukossa 17.

Taulukko 17. Tarkkuustulokset

Määrittäminen	Näyte	ΔC_T -keskiarvo	SD_R^*	SD_{ajo}^\dagger	$SD_{kokonais}^\ddagger$	$CV_{kokonais}(\%)^\ddagger$	Oikeiden tulosten määrä
R132C-mut.	WT	11,58	1,08	0,00	1,11	10	100% (78/78)
	5%	5,19	0,26	0,23	0,46	9	100% (76/76)
	10%	4,37	0,27	0,14	0,48	11	100% (78/78)
	30%	2,62	0,20	0,21	0,46	18	100% (78/78)
R132H-mut.	WT	10,87	1,48	0,00	1,48	14	100% (78/78)
	5%	4,46	0,27	0,05	0,31	7	100% (78/78)
	10%	3,57	0,28	0,14	0,31	9	100% (76/76)
	30%	1,86	0,21	0,20	0,30	16	100% (72/72)
R172K-mut.	WT	12,20	0,31	0,17	0,39	3	100% (66/66)
	5%	6,19	0,50	0,00	0,63	10	100% (76/76)
	10%	5,23	0,32	0,20	0,48	9	100% (76/76)
	30%	3,68	0,18	0,11	0,36	10	100% (76/76)

* R: Repeatability (Toistettavuus).

† Ajo: Ajojen toistettavuuden välillä.

‡ Kokonais: Kokonaistarkkuus (mukaan lukien laitteiden, käyttäjien ja erien välinen tarkkuus).

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko 17. Tarkkuustulokset (jatkoa)

Määrittäminen	Näyte	ΔC_T -keskiarvo	SD_R^*	SD_{ajo}^\dagger	$SD_{kokonais}^\ddagger$	$CV_{kokonais}$ (%) [‡]	Oikeiden tulosten määrä
R100-mut.	WT	7,21	0,41	0,27	0,52	7	100% (70/70)
	5%	3,68	0,27	0,16	0,33	9	100% (76/76)
	10%	2,93	0,24	0,15	0,32	11	100% (76/76)
	30%	1,56	0,25	0,07	0,26	17	100% (76/76)
R132-mut.	WT	8,01	0,76	0,00	0,78	10	100% (152/152)
	R132H 5 %	4,29	0,30	0,15	0,48	11	99% (151/152)
	R132C 5 %	4,44	0,30	0,00	0,56	13	
	R132H 10%	3,49	0,27	0,22	0,46	13	99% (151/152)
	R132C 10%	3,69	0,27	0,23	0,53	14	
	R132H 30%	1,87	0,21	0,02	0,33	18	100 % (152 %152)
	R132C 30%	2,00	0,26	0,28	0,59	29	
R172-mut.	WT	9,47	0,91	0,87	1,45	15	100% (66/66)
	5%	4,45	0,35	0,12	0,56	13	100% (76/76)
	10%	3,55	0,29	0,02	0,53	15	100% (76/76)
	30%	2,05	0,18	0,15	0,47	23	100% (76/76)

* R: Repeatability (Toistettavuus).

† Ajo: Ajojen toistettavuuden välillä.

‡ Kokonais: Kokonaistarkkuus (mukaan lukien laitteiden, käyttäjien ja erien välinen tarkkuus).

Menetelmien vertailu

Vertailu immunohistokemiaan (immunohistochemistry, IHC) *IDH1/R132H*:n havaitsemisessa.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjalla ja IHC:n (Anti-human IDH1R132H antibody clone H09, DIANOVA [anti-ihmis-IDH1R132H-vasta-ainekloonin H09, DIANOVA]) avulla saadun mutaatiostatuksen yhdenmukaisuuden osoittamista varten tehtiin tutkimus.

Tutkimukseen valittiin yhteensä 103 kliinistä glioomanäytettä. Vanhin lohko oli 10 vuotta vanha.

Kaikki näytteet läpäisivät laadunvarmistuksen sekä *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* -sarjan että IHC:n osalta.

Tulokset osoittivat positiiviseksi prosentuaalisen yhtäpitävyydeksi (Positive Percentage Agreement, PPA) 100 %, negatiiviseksi prosentuaaliseksi yhtäpitävyydeksi (Negative Percent Agreement, NPA) 98 % ja kokonaisyhtäpitävyydeksi (Overall Agreement, OA) 99 % (taulukko 18).

Taulukko 18. *therascreen* RGQ PCR Kit -sarjan ja IHC:n yhtäpitävyyden analyysi

Yhtäpitävyyden arvio	Tiheys (%)	95 %:n luottamusväli
PPA	45/45 (100 %)	[92;100]
NPA	57/58 (98 %)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

Vertailu kaksisuuntaiseen sekvensointiin

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjalla ja kaksisuuntaisella sekvensoinnilla saadun mutaatiostatuksen yhdenmukaisuuden osoittamista varten tehtiin tutkimus.

Tutkimukseen valittiin yhteensä 103 glioomapotilailta saatua kliinistä kasvainnäytettä. Vanhin lohko oli 10 vuotta vanha.

Kaikki 103 näytettä läpäisivät *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjan laadunvarmistukset, ja 101 näytettä antoi tulokset kaksisuuntaisessa sekvensoinnissa.

Tulokset osoittivat positiiviseksi prosentuaalisen yhtäpitävyydeksi (Positive Percentage Agreement, PPA) 100 %, negatiiviseksi prosentuaaliseksi yhtäpitävyydeksi (Negative Percent Agreement, NPA) 92 % ja kokonaisyhtäpitävyydeksi (Overall Agreement, OA) 96 % (taulukot 19 ja 20).

Taulukko 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit vs. kaksisuuntainen sekvensointi

		Sangerin kaksisuuntainen sekvensointi				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 tarkoittaa, että näyte havaittiin mutatoituneeksi R132-mutaation osalta, mutta ei R132H:n tai R132C:n osalta.

† R172 tarkoittaa, että näyte havaittiin mutatoituneeksi R172-mutaation osalta, mutta ei R172K:n osalta.

Taulukko 20. Yhtäpitävyyden arviointi kaksisuuntaisen sekvensoinnin kanssa

Yhtäpitävyyden arvio	Tiheys (%)	95 %:n luottamusväli
PPA	50/50 (100 %)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

Lähdeviitteet

1. Louis, D.N. et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97.
2. Parsons, D.W. et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807.
3. Yan, H. et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**, 765.
4. Hartmann, C. et al. (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* **118**, 469.
5. Ichimura, K. et al. (2009) IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology* **11**, 341.
6. Von Deimling, A., Korshunov, A., and Hartmann, C. (2011) The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* **21**, 74.
7. Hartmann, C. et al. (2010) Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* **120**, 707.
8. Sanson, M. et al. (2009) Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4150.

-
9. Houillier, C. et al. (2010) IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* **75**, 1560.
 10. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **174**, 1149.
 11. Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6002.
 12. Weller, M. et al. (2009) Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5743.
 13. Riemenschneider, M.J., Jeuken, J.W.M., Wesseling, P., and Reifenberger, G. (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* **120**, 567.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbolit

Seuraava taulukko sisältää merkinnät, joita saattaa esiintyä etiketeissä tai tässä asiakirjassa.



<N>

Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon



Viimeinen käyttöpäivämäärä



Diagnostinen in vitro -lääkintälaite



Tuotenumero



Eränumero



Materiaalinumero (ts. komponentin merkintä)



Komponentit (ts. luettelo sisällöstä)



Sisältö



Määrä (esim. pullojen määrä)

Rn

R tarkoittaa käsikirjan versiota ja n on versionumero



GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet



Huomio

Tilastiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	20 reaktioon: yhdeksän aluke- ja koetinseosta, villityypin kontrolli, positiivinen kontrolli, pääseos, nukleasiton vesi	873011
Rotor-Gene Q MDx ja lisävarusteet		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR -sykləri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viinipunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR -sykləri, jossa on viisi kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, ei sisällä asennusta ja koulutusta	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 kpl 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – genomisen DNA:n puhdistukseen parafiiniin valetuista kudoksenäytteistä		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50:een DNA:n valmistelukertaan: 50 QIAamp MinElute® Column -putkia, proteinaasi K, puskureita, Collection Tubes (2 ml)	56404

Tuote	Sisältö	Tuotenumero
QIASymphony DSP DNA Mini Kit – DNA:n automaattiseen puhdistamiseen 1–96 näytteestä		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	192 valmisteluun (kukin 200 µl): sisältää 2 reagenssisylinteriampullia, entsyymitelineet ja lisävarusteet	937236
QIASymphony SP ja lisävarusteet		
QIASymphony SP System	QIASymphony-näytteenpreparointimoduuli sisältää asennuksen ja koulutuksen sekä 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalle.	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony-näytteenvalmistelumoduuli: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Sample Prep Cartridges, 8-well, QIASymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod Covers QIASymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 x 128). Käytettäväksi QIACube- ja QIASymphony SP/AS -instrumenttien kanssa	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 x 128). Käytettäväksi QIASymphony SP-/AS -laitteiden kanssa	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Ei-steriilit polypropyleeniputket (enimmäiskapasiteetti 0,85 ml, säilytyskapasiteetti vähemmän kuin 0,7 ml, eluutiokapasiteetti 0,4 ml); 2 304 kpl 96 kpl:n telineissä; sisältää korkkiliuskat	19588

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Reagenssit		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 yksikköä/ml, liuos)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml kudoslyysauspuskuria 1000 valmisteluun	19076

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Päivämäärä	Muutokset
R5, heinäkuu 2020	<p>Päivitetty Tulosten tulkinta -osio lisäämällä tietoa kontrollien ja näytteiden luokittelusta C_T-arvon havaitsemisen mukaan.</p> <p>Päivitetty IDH1/IDH2 -villityypin kontrollin sarake taulukossa 7 arvoon C_T IDH-mut. R172K ja ΔC_T IDH2-mut. R172K</p> <p>Päivitetty Näyte 1 ja Näyte 2 sarakkeet taulukossa 11 arvoihin C_T IDH1-mut R132C, ΔC_T IDH1-mut. R132C, C_T IDH2-mut. R172K, ja ΔC_T IDH2-mut R172K</p>

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit -sarjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus

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

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käyttöoppaassa ja lisämateriaalissa mainittaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laittomaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin nimenomaisesti ilmoitettujen käyttöoikeuksien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä sarja ja/tai sen käyttö eivät loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa nyhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi kääntyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannaakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asiantajapalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

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 julkaisuhetkenään kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, moninkertaisista 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 rajoittuvat tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuussa kerrotulla tavalla.

Hankittuaan tämän tuotteen ostajalla on oikeus käyttää sitä diagnostisiin palveluihin ihmisten in vitro -diagnostiikassa. Tämän erityisen käyttöoikeuden lisäksi osto ei oikeuta mihinkään muuhun yleiseen patenttiin tai käyttöoikeuteen.

IDH1/2-mutaatiot ja niiden käyttö on suojattu patenttioikeuksilla, mukaan lukien eurooppalaiset patenttihakemukset EP2326735 ja EP2546365, yhdysvaltalaiset patenttihakemukset US2011229479 and US2012202207 ja niiden ulkomaiset vastineet.

Tämän tuotteen ostaminen ei anna oikeutta sen käyttöön IDH1/2-mutaatiota varten tarkoitettujen lääkkeiden kliinisissä lääketutkimuksissa. QIAGEN kehittää nimenomaisia lisenssiohjelmia tällaisia tarkoituksia varten. Lakiosastomme palvelee osoitteessa idlhcenses@qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN®, QIAamp®, QIAAsymphony® MinElute®, Rotor-Gene®, theascreen® (QIAGEN Group); FAM™ (Life Technologies Corporation); Histolemon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

