

ipsogen[®] BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit rokasgrāmata



1. versija

IVD

Kvantitatīvā analīze *in vitro* diagnostikā

Lietošanai ar Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI
PRISM[®] un LightCycler[®] instrumentiem



REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R3 **MAT** 1072509LV



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ir tādu inovatīvu paraugu un analīžu tehnoloģiju vadošais piegādātājs, kuras nodrošina jebkādu bioloģisko paraugu satura izolēšanu un noteikšanu. Mūsu mūsdienīgie augstas kvalitātes izstrādājumi un pakalpojumi garantē sekmīgu parauga apstrādi un rezultāta ieguvu.

QIAGEN nosaka tālāk norādīto procesu standartus.

- DNS, RNS un olbaltumvielu izdalīšana
- Nukleīnskābju un olbaltumvielu analīzes
- mikroRNS izpēte un RNSi
- Paraugu un analīžu tehnoloģiju automatizācija

Mūsu misija ir radīt jums iespēju sasniegt izcilus panākumus un izdarīt lielus atklājumus. Lai iegūtu sīkāku informāciju, apmeklējiet vietni **www.qiagen.com**.

Saturs

Paredzētais lietojums	5
Kopsavilkums un skaidrojums	5
Pamatinformācija par HML	5
Slimības uzraudzība	5
Procedūras princips	7
Nodrošinātie materiāli	9
Komplekta saturs	9
Nepieciešamie, bet komplektā neietvertie materiāli	10
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	11
Vispārējie piesardzības pasākumi	11
Reaģentu glabāšana un lietošana	12
Paraugu lietošana un glabāšana	12
Procedūra	13
RNS paraugu sagatavošana	13
Protokols:	
■ atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot SuperScript III Reverse Transcriptase	13
■ qPCR instrumentā Rotor Gene Q MDx 5plex HRM vai Rotor-Gene Q 5plex HRM ar 72 stobriņu rotoru	16
■ qPCR instrumentā Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS un LightCycler 480	20
■ qPCR instrumentā LightCycler 1.2, 1.5, un 2.0	26
Rezultātu interpretācija	30
Datu analīzes princips	30
Uz neapstrādātiem datiem attiecināmās standartu līknes un kvalitātes kritēriji	31
Normalizēto kopiju skaits (Normalized Copy Number, NCN)	33
IS konversija un MMR ziņošana	34
Kopsavilkums par kvalitātes kritērijiem	35
Problēmu novēršana	35
Kvalitātes kontrole	36
Ierobežojumi	36
Veiktspējas raksturojums	36

Tukšo paraugu robežvērtība un noteikšanas robeža	37
Linearitāte	37
Ievades	37
Precizitāte	37
Atbilstības pētījums: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienas plazmīdas (IRMM) un <i>ipsogen</i> vienas plazmīdas (QIAGEN) standartu salīdzinājums	38
Atsauces	40
Simboli	41
Kontaktinformācija	41
Informācija par pasūtīšanu	42

Paredzētais lietojums

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit komplekts ir paredzēts, lai kvantitatīvi noteiktu BCR-ABL p210 b2a2 vai b3a2 transkriptu daudzumu kaulu smadzeņu vai perifērisko asiņu paraugos, kas ņemti no akūtas limfoblastu leukēmijas (ALL) vai hroniskas mieloīdu leukēmijas (HML) pacientiem, kuriem iepriekš diagnosticēts BCR-ABL MbcR hibrīdgēna (HG) notikums. Tests paredzēts, lai novērtētu molekulārās reakcijas līmeni; rezultātus var izmantot minimālās atlikušās slimības novērošanai.

Kopsavilkums un skaidrojums

Pamatinformācija par HML

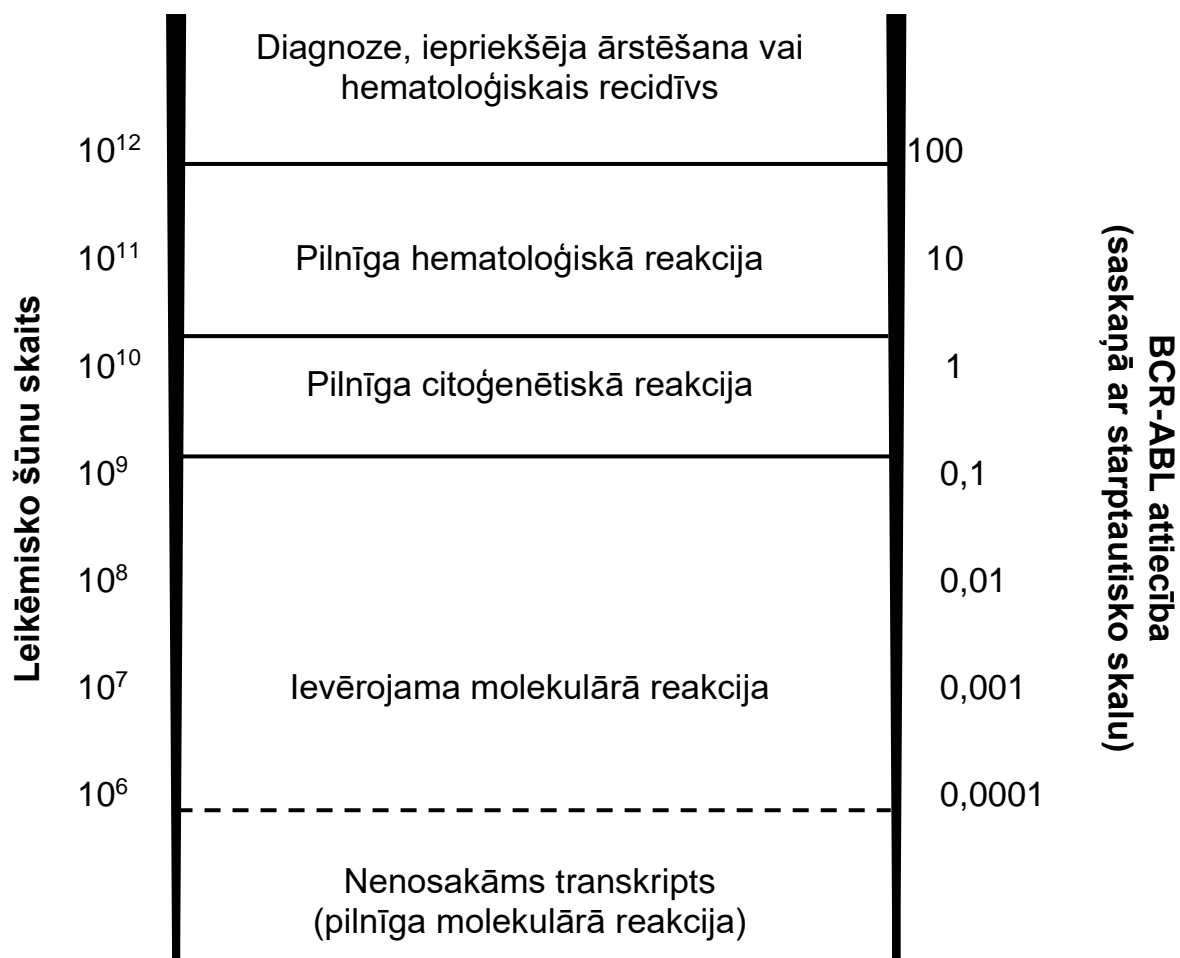
HML pieder mieloproliferatīvo neoplazmu grupai, un > 90% gadījumu to raksturo Filadelfijas hromosomas (Philadelphia chromosome, Ph) klātbūtne.

Šo hromosomu veido reciproka translokācija starp 9. un 22. hromosomas, t(9;22), garajiem pleciem, turklāt BCR (pārrāvumu klasteru reģions) atrodas 22. hromosomā un c-ABL onkogēns atrodas 9. hromosomā. Attiecīgais apvienotais gēns, BCR-ABL, tiek transkribēts 8,5 kb mRNS virknē kopā ar 2 krustojuma variantiem b2a2 (40% gadījumu) un b3a2 (55% gadījumu). Tas šifrē hibrīdu proteīnu, p210, ar palielinātu tirozīnkināzes aktivitāti. b2a3 un b3a3 transkripts mēdz būt mazāk nekā 5% gadījumu. Pieaugušiem ALL pacientiem 35% gadījumu var tikt novērota arī Ph hromosoma.

HML sastopamība gadā ir aptuveni 1–2 gadījumi uz 100 000 cilvēku, un HML veido 20% pieaugušo leukēmiju. Klīniski tā tiek izteikta kā pārmērīgs skaits mieloīdu šūnu, kas normāli diferencējas un funkcionē. HML pacienti 90–95% gadījumu tiek diagnosticēti hroniskā vai stabilā slimības fāzē. Kā novērots, vidēji 4 līdz 6 gadu laikā pacienti sasniedza paātrināto fāzi, izraisot blastu krīzi un akūtu leukēmiju, kas vienmēr ir letāla. Imatiniba un pēdējā laikā arī otrās paaudzes tirozīnkināzes inhibitoru (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKI) izmantošana ievērojami mainīja slimības ierasto gaitu: lielākajai daļai pacientu tagad ir remisija un viņiem ir nepieciešama ilgstoša novērošana un slimības uzraudzība.

Slimības uzraudzība

Šobrīd HML terapijas mērķis ir panākt 100% izdzīvošanu un Ph hromosomas negatīvu rādītāju. Līdz ar to ir būtiska slimības uzraudzība, lai novērtētu atbildes reakciju uz ārstēšanu un noteiktu agrīnu recidīvu katram pacientam. Veicot TKI terapiju, pacienti no hematoloģiskās remisijas parasti pāriet uz citoģenētisko un pēc tam — uz molekulāro remisiju, kas atbilst leukēmisko šūnu un BCR-ABL transkriptu skaita samazinājumam, kā norādīts 1. attēlā.



1. attēls. Pielāgots no 1. atsaucēs.

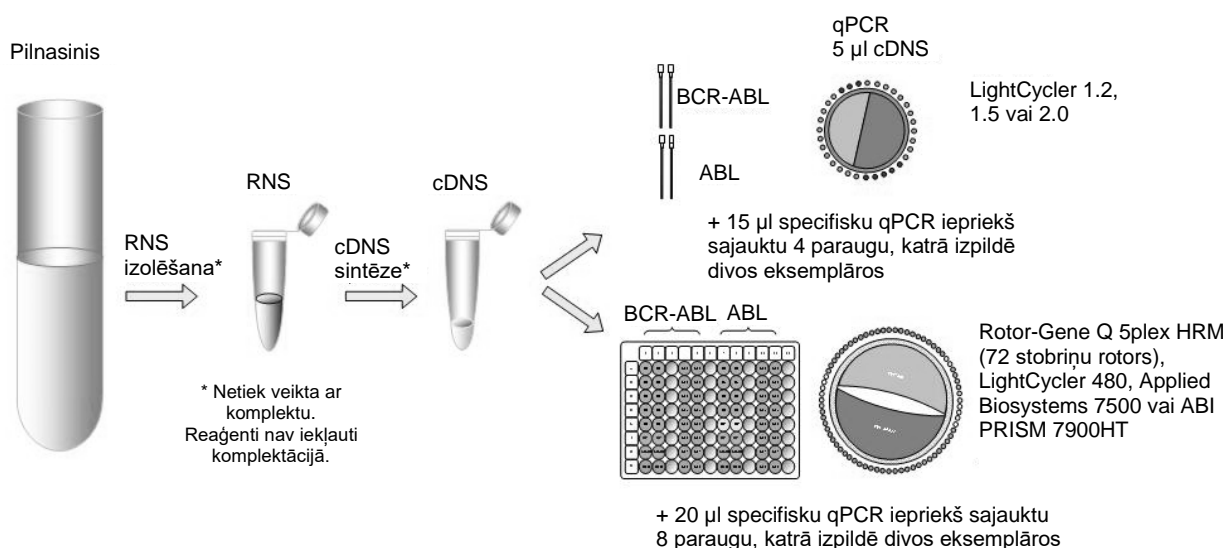
Standarta metode audzēja masas noteikšanai HML pacientiem ir kaulu smadzeņu (Bone Marrow, BM) metafāžu parastā citoģenētiskā analīze (G joslas). Citoģenētiskā reakcija tiek novērtēta vismaz 20 kaulu smadzeņu metafāzēm. Citoģenētiskās reakcijas līmenis tiek noteikts, ņemot vērā Ph hromosomas pozitīvo metafāžu procentuālo daudzumu (skatīt 1. tabulu, 2. atsauci). Tomēr šis novērtējums ir atkarīgs no laboratorijas rezultātiem un tam ir zema jutība — 5%, analizējot 20 metafāzes.

Tagad reāllaika kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR), ar kuru perifērisko asiņu (Peripheral Blood, PB) parauga materiālos nosaka BCR-ABL Mbc r mRNS daudzumu, ir daļa no slimības uzraudzības metodēm HML ārstēšanā. Šī metode ir ne tik invazīva kā standarta kaulu smadzeņu metafāžu citoģenētika, kā arī tā ir jutīgāka.

Nesen tika atjaunināti arī ieteikumi HML slimības uzraudzībai, lai iekļautu jaunus klīnisko pētījumu klīniskos pierādījumus, kā arī iekļautu uzlabotus slimības uzraudzības mērķus un palīgīdzekļus. Jaunākos ieteikumus par reakcijas definēšanu un pacientu, kuri saņem imatiniba terapiju, uzraudzību sniedz ELN (European Leukaemia Net — Eiropas Leikozes tīkls) eksperti (2).

Tehniskajā ziņā starptautiskie eksperti ir centušies saskaņot BCR-ABL MbcR testēšanu un ziņošanu (3–5). Turklāt neseno PVO aizbildnībā tika apstiprināts atsaucis panelis, lai varētu vienkārši standartizēt BCR-ABL daudzuma noteikšanu (6).

Procedūras princips



2. attēls. RNS izolēšana, cDNS sintēze un qPCR.

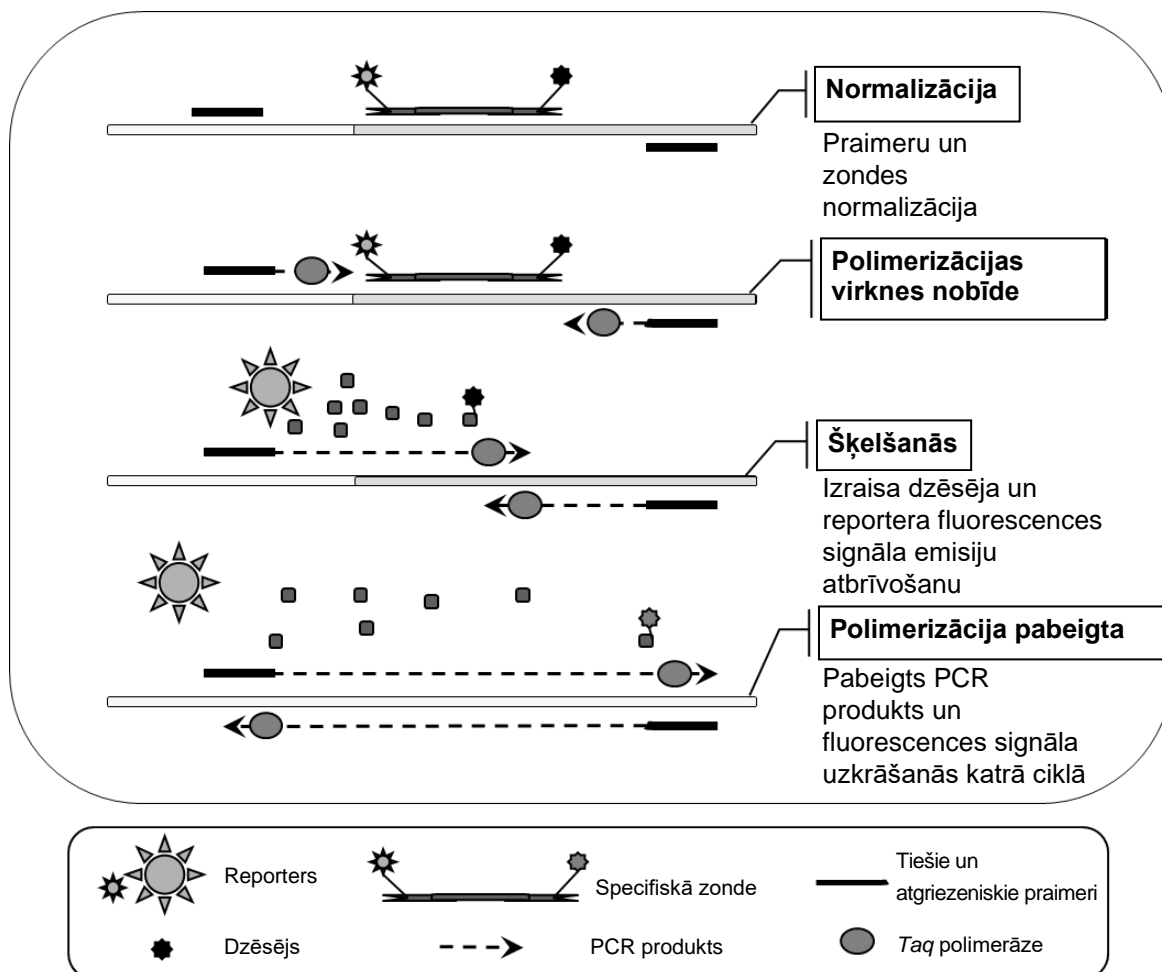
qPCR ļauj precīzi noteikt PCR produktu daudzumu PCR amplifikācijas procesa eksponenciālajā fāzē. Kvantitatīvos PCR datus var ātri iegūt bez apstrādes pēc PCR, veicot reāllaika fluorescējošo signālu noteikšanu PCR cikla laikā un/vai pēc tā un tādējādi ievērojami samazinot PCR produkta kontaminācijas risku. Pašlaik ir pieejami 3 galvenie qPCR metožu tipi: qPCR analīze, izmantojot SYBR® Green I Dye, qPCR analīze, izmantojot hidrolīzes zondes, un qPCR analīze, izmantojot hibridizācijas zondes.

Šajā analīzē tiek izmantots qPCR divu krāsvielu oligonukleotīdu hidrolīzes princips. PCR laikā tiešie un atgriezeniskie praimeru hibridizējas noteiktā sekvencē. Tajā pašā maisījumā ir divu krāsvielu oligonukleotīds. Šī zonde, kuras sastāvā ir oligonukleotīds, kas ir iezīmēts ar 5' reportera krāsvielu un pakārtotu, 3' dzēsēja krāsvielu, hibridizējas ar mērķa sekvenci PCR produktā. qPCR analīze ar hidrolīzes zondēm izmanto *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāti. Ja zonde ir neskarta, reportera krāsas klātbūtnē dzēsēja krāsa samazina reportera fluorescenci, ko galvenokārt izraisa Förster veida enerģijas pārnese.

Ja PCR laikā ir pieejams interesējošais mērķis, zonde normalizējas īpaši starp tiešā un atgriezeniskā praimera vietām. DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte sašķeļ zondi starp reporteru un dzēsēju tikai tad, ja zonde hibridizējas ar mērķi. Pēc tam zondes fragmenti tiek novirzīti no mērķa, un turpinās virknes polimerizācija. Zondes 3' gals tiek bloķēts, lai nepieļautu zondes pagarināšanos

PCR laikā (3. attēls). Šis process notiek katrā ciklā, un tas nekavē eksponenciālu produkta uzkrāšanos.

Fluorescences signāla pieaugums tiek noteikts tikai tad, ja mērķa sekvenca ir komplementāri saistīta ar zondi un tādējādi tiek amplificēta PCR laikā. Šo prasību dēļ nespecifiskā amplifikācija netiek noteikta. Līdz ar to fluorescences pieaugums ir tieši proporcionāls mērķa amplifikācijai PCR laikā.



3. attēls. Reakcijas princips. Summārajai RNS tiek veikta atgriezeniskā transkriptāze, un PCR amplificē ģenerēto cDNS, izmantojot specifisku praimeru pāri un specifisku iekšējo divu krāsvielu zondi (FAMTM–TAMRATM). Katras PCR normalizācijas darbības laikā zonde saistās ar amplikonu. Kad Taḡ pagarinās no amplikonam piesaistītā praimera, tā nobīda zondes 5' galu, kuru pēc tam noārda Taḡ DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte. Šķelšanās turpinās līdz brīdim, kad atlikusī zonde izkausē amplikonu. Šis process šķīdumā atbrīvo fluoroforu un dzēsēju, telpiski tos atdalot un līdz ar to izraisot FAM fluorescences pieaugumu un TAMRA fluorescences samazinājumu.

Nodrošinātie materiāli

Komplekta saturs

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
Kataloga nr.		670723
Reakciju skaits		24
High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators)		3 x 10 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) (10 ¹ kopijas/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) (10 ² kopijas/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) (10 ³ kopijas/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) (10 ⁴ kopijas/5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) (10 ⁵ kopijas/5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) (10 ⁶ kopijas/5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL (ABL gēnam paredzēts praimeru un zondes maisījums)*	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene (BCR-ABL MbcR apvienotajam gēnam paredzēts praimeru un zondes maisījums)†	PPF-MbcR 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit rokasgrāmata (angliski)		1

* ABL kontrolgēnam paredzēts maisījums no specifiskiem atgriezeniskiem un tiešiem praimeriem un specifiskas FAM–TAMRA zondes.

† BCR-ABL MbcR apvienotajam gēnam paredzēts maisījums no specifiskiem atgriezeniskiem un tiešiem praimeriem un specifiskas FAM–TAMRA zondes.

Piezīme. Standarti (SP1–SP6) un praimeru un zondes maisījumi pirms lietošanas ir uzmanīgi jāsamaja un uz īsu brīdi jācentrifugē.

Nepieciešamie, bet komplektā neietvertie materiāli

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Reaģenti

- RNS izdalīšanai paredzētie reaģenti: apstiprinātie reaģenti ir RNeasy® Midi Kit (QIAGEN, kat. nr. 75144) vai TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, kat. nr. 15596018 vai 15596026)
- PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes
- Buferšķīdums un *Taq* DNS polimerāze: apstiprinātie reaģenti ir *Premix Ex Taq*™ DNA Polymerase (Perfect Real Time) (TaKaRa, kat. nr. RR039A) un *Premix Ex Taq* DNA Polymerase (Probe qPCR) (TaKaRa, kat. nr. RR390A). Abos ir 2x *Taq* DNS polimerāzes galvenais maisījums un ROX™ atsaucē krāsvielas
- Atgriezeniskajai transkriptāzei paredzētie reaģenti: apstiprinātie reaģenti ir *ipsogen* RT Kit komplekts, kurā ietilpst atgriezeniskā transkriptāze, 5x RT buferšķīdums, 100 mM DTT, RNāzes inhibitors, nejaušs praimeris un dNTPs (QIAGEN, kat. nr. 679923); vai SuperScript® III Reverse Transcriptase, kurā ietilpst atgriezeniskā transkriptāze, 5x pirmās virknes buferšķīdums un 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. nr. 18080044)
- Izmantojot SuperScript III, ir nepieciešami tālāk norādītie papildu reaģenti.
 - RNāzes inhibitors: apstiprinātais reaģents ir RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. nr. 10777019)
 - dNTP komplekts, PCR kategorijas
 - Nejaušs nonamērs

Palīgmateriāli

- Nukleāzi nesaturoši, pret aerosolu izturīgi sterili PCR pipešu uzgaļi ar hidrofobiem filtriem
- 0,5 ml vai 0,2 ml PCR stobriņi bez RNāzes un DNāzes
- Ledus

Aprīkojums

- Mikrolitru pipetes*, kas paredzētas PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Galda centrifūga* ar rotoru 0,2 ml/0,5 ml reakcijas stobriņiem (ar centrifugēšanas jaudu 10 000 apgr./min)

* Nodrošiniet, ka instrumenti tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

- Real-time PCR instruments:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM vai cits Rotor-Gene instruments; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 vai 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS un saistītais specifiskais materiāls
- Termiskais ciklotājs* vai ūdens vanna* (atgriezeniskās transkriptāzes darbība)

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai *in vitro* diagnostikā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimodus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (DDL). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas vietnē www.qiagen.com/safety, kur DDL skatīšanai un izdrukāšanai ir pieejamas katram QIAGEN komplektam un tā komponentiem.

Izmetiet paraugu un analīžu atkritumus atbilstoši vietējiem drošības noteikumiem.

Vispārējie piesardzības pasākumi

qPCR testiem nepieciešama laba laboratorijas prakse, tostarp aprīkojuma apkope, kas ir veltīta molekulārajai bioloģijai un atbilst piemērojamajiem noteikumiem un attiecīgajiem standartiem.

Šis komplekts ir paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. Šajā komplektā iekļautie reaģenti un instrukcijas ir apstiprinātas, lai nodrošinātu optimālu darbību. Tālāka reaģentu atšķaidīšana vai inkubācijas laika un temperatūras maiņa var radīt kļūdainus vai pretrunīgus datus. Ja PPC un PPF reaģenti tiek pakļauti gaismas iedarbībai, to struktūra var izmainīties. Visi reaģenti ir izstrādāti lietošanai tieši šajā testā. Lai iegūtu optimālus testa rezultātus, nedrīkst neko aizvietot.

Lai noteiktu transkriptu līmeņus, izmantojot qPCR, ir nepieciešama gan mRNS atgriezeniskā transkriptāze, gan ģenerētās cDNS amplifikācija ar PCR. Līdz ar to visa analīzes procedūra jāveic bez RNāzes/DNāzes.

Ievērojiet īpašu piesardzību, lai novērstu tālāk minētās situācijas.

- RNāzes/DNāzes kontaminācija, kas var izraisīt matricas mRNS un ģenerētās cDNS noārdīšanos
- mRNS vai PCR kontaminācijas pārnese, izraisot viltus pozitīvu signālu

* Nodrošiniet, ka instrumenti tiek pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

Līdz ar to mēs iesakām veikt tālāk minētās darbības.

- Veicot analīzi, izmantojiet laboratorijas aprīkojumu bez nukleāzes (piem., pipešu uzgaļus, reakcijas flakonus) un cimdus.
- Lai izvairītos no paraugu un reaģentu krusteniskās kontaminācijas, visās pipetēšanas darbībās izmantojiet jaunus piepešu uzgaļus, kas ir izturīgi pret aerosolu.
- Sagatavojiet pirms PCR paredzēto Master maisījumu ar tam paredzētajiem materiāliem (pipetēm, uzgaļiem u. c.) tam paredzētajā vietā, kur nav nevienas DNS matricas (cDNS, DNS, plazmīda). Atsevišķā zonā (vēlams atsevišķā telpā) ar konkrētu materiālu (pipetēm, uzgaļiem u. c.) pievienojiet matricu.
- Darbu ar standarta atšķaidījumiem (SP1–SP6) veiciet atsevišķā telpā.

Reaģentu glabāšana un lietošana

Komplekti tiek piegādāti uz sausa ledus, un tie pēc saņemšanas ir jāglabā no –30 °C līdz –15 °C temperatūrā.

- Samaziniet gaismas iedarbību uz praimeru un zondes maisījumiem (PPC un PPF stobriņiem).
- Pirms atvēršanas stobriņus uzmanīgi sajauciet un centrifugējiet.
- Glabājiet visus komplekta komponentus oriģinālajos iepakojumos.

Šie glabāšanas apstākļi attiecas gan uz atvērtiem, gan uz neatvērtiem komponentiem. Ja komponenti tiek glabāti apstākļos, kas nav norādīti uz etiķetēm, tie var darboties nepareizi un var nelabvēlīgi ietekmēt analīzes rezultātus.

Katra reaģenta derīguma termiņš ir norādīts uz katra komponenta etiķetes. Pareizos glabāšanas apstākļos izstrādājums saglabās veikspēju līdz derīguma termiņa beigām, kas uzdrukāts uz etiķetes.

Nav acīmredzamu pazīmju, kas norādītu uz šī izstrādājuma nestabilitāti. Tomēr pozitīvo un negatīvo kontroles materiālu apstrāde jāveic vienlaikus ar nezināmiem parauga materiāliem.

Paraugu lietošana un glabāšana

Pilnasiņu paraugus pirms RNS ekstrahēšanas vajadzētu antikoagulēt ar kālija EDTA un glabāt 2–8 °C temperatūrā ne ilgāk kā 5 dienas.

Procedūra

RNS paraugu sagatavošana

RNS sagatavošana no pacienta (asins vai kaulu smadzeņu) paraugiem ir jāveic ar apstiprinātu procedūru. Analīzes kvalitāte ir lielākoties atkarīga no izmantojamās RNS kvalitātes. Līdz ar to mēs iesakām pirms analīzes veikšanas pārbaudīt izdalītās RNS kvalitāti ar agarozes* gela elektroforēzi, izmantojot Agilent® Bioanalyzer® vai spektrofotometriju.†

Protokols: atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot SuperScript III Reverse Transcriptase

Šis protokols ir paredzēts atgriezeniskajai transkripcijai, izmantojot SuperScript III atgriezenisko transkriptāzi (Reverse Transcription, RT). Kad izmantojat *ipsogen* RT Kit komplektu, izpildiet protokolu, kas aprakstīts *ipsogen RT Kit rokasgrāmātā*.

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Sagatavojiet dNTP, katru 10 mM. Glabājiet –20 °C temperatūrā alikvotās daļās.

Procedūra

1. **Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
2. **Kārtīgi samaisiet (bez virpuļmaisīšanas) un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā). Pēc tam glabājiet uz ledus.**
3. **Koriģējiet RNS paraugus uz 0,1 µg/µl. No katra RNS parauga 10 µl (1 µg) pipetējiet atsevišķos, marķētos stobriņos. Pipetējiet 10 µl augsti pozitīvās RNS kontroles, 10 µl IS-MMR kalibratora un 10 µl ūdens, kas nesatur nukleāzi (kā RT negatīvo kontroli), atsevišķos, marķētos stobriņos un apstrādājiet tos paralēli RNS paraugiem tālāk aprakstītajā veidā.**
4. **Katru paraugu, kontroli un kalibratoru (10 µl no katra) inkubējiet 5 min temperatūrā 65 °C un nekavējoties atdzesējiet uz ledus 5 min.**
5. **Uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā). Pēc tam glabājiet uz ledus.**
6. **Sagatavojiet tālāk aprakstīto RT maisījumu atbilstoši apstrādājamo paraugu, kontroļu un kalibratoru skaitam (1. tabula).**

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles.

† Optiskais blīvums (OB), mērīts pie 260 un 280 nm: OB 1,0 pie 260 nm ir ekvivalents aptuveni 40 µg/ml vienas virknes RNS. A_{260}/A_{280} attiecība no 1,8 līdz 2,1 norāda uz augsti attīrītu RNS.

1. tabula. RT maisījuma sagatavošana

Komponents	Katra parauga tilpums (µl)	Gala koncentrācija
Pirmās virknes buferšķīdums, 5x (piegādāts ar SuperScript III Reverse Transcriptase)	5,0	1x
dNTP (katrs 10 mM, iepriekš sagatavots un glabāts –20 °C temperatūrā alikvotās daļās)	2,0	0,8 mM
Nejaušs nonamērs (100 µM)	5,25	21 µM
RNaseOUT (40 U/µl)	0,5	0,8 U/µl
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1,0	8 U/µl
DTT (piegādāts ar SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Uzsildīts RNS paraugs, kontrole vai IS-MMR kalibrators (pievienošanai 7. darbībā)	10,0	40 ng/µl
Gala tilpums	25,0	–

- 7. Pipetējiet 15 µl RT maisījumu katrā PCR stobriņā. Pēc tam pievienojiet 10 µl (1 µg) parauga RNS, kontroli vai kalibratoru (no 4. darbības).**
- 8. Uzmanīgi samaisiet (bez virpuļmaisīšanas) un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā).**
- 9. Ieprogramējiet termiskajam ciklotājam atgriezeniskās transkriptāzes programmu, kā norādīts 2. tabulā.**

2. tabula. Temperatūras profils

Atgriezeniskā transkripcija 1	Temperatūra: 25 °C Laiks: 10 min
Atgriezeniskā transkripcija 2	Temperatūra: 50 °C Laiks: 60 min
Inaktivēšana	Temperatūra: 85 °C Laiks: 5 min
Dzesēšana	Temperatūra: 4 °C Laiks: 5 min

10. Ievietojiet stobriņus termiskajā ciklotājā un startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 2. tabulā.
11. Kad programma ir pabeigta, centrifugējiet stobriņus uz īsu brīdi (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā). Līdz qPCR veikšanai glabājiet stobriņus uz ledu vai – 20 °C temperatūrā saskaņā ar tālāk norādītajiem protokoliem un atbilstoši savam qPCR instrumentam.

Piezīme. LightCycler 1.2, 1.5 un 2.0 instrumentiem katra RT sagatave nodrošina cDNS divām qPCR izpildes reizēm.

Protokols: qPCR instrumentā Rotor Gene Q MDx 5plex HRM vai Rotor-Gene Q 5plex HRM ar 72 stobriņu rotoru

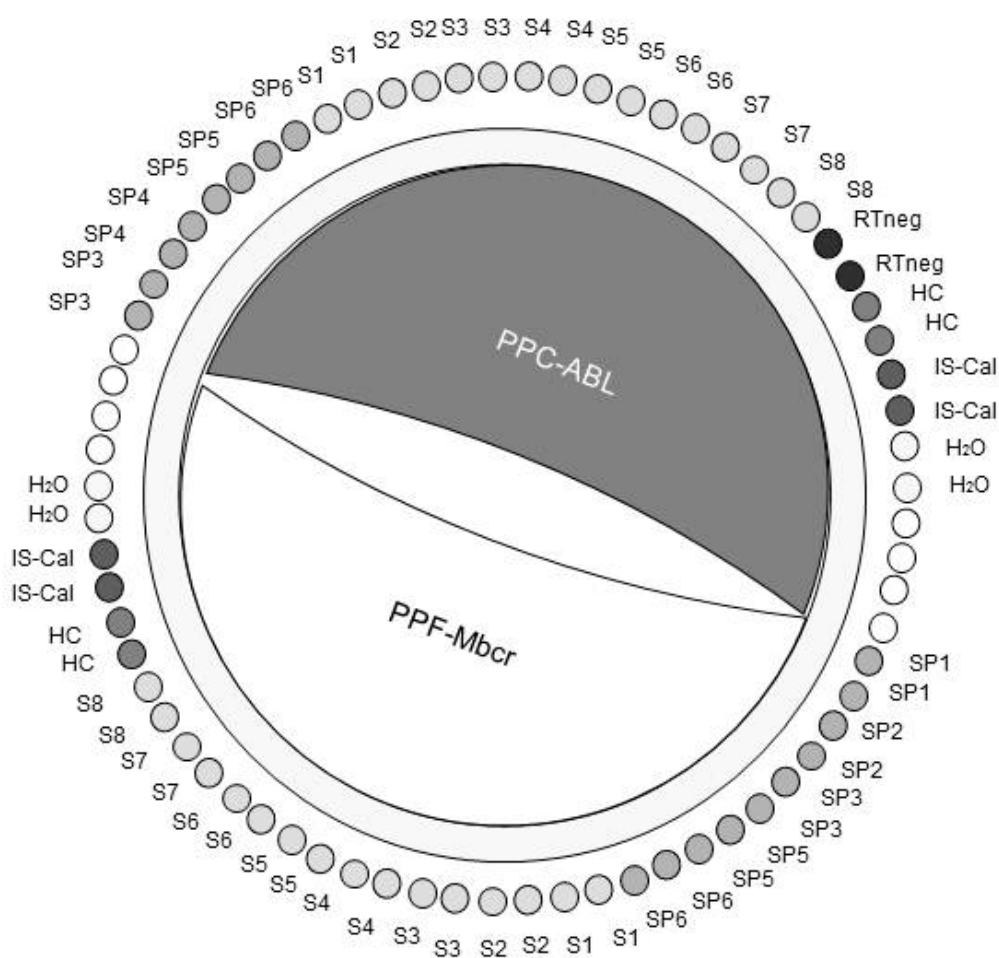
Izmantojot šo instrumentu, mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros, kā norādīts 3. tabulā. Šis komplekts ir paredzēts astoņu dažādu cDNS paraugu testēšanai vienā eksperimentā trīs reizes.

3. tabula. Reakciju skaits Rotor-Gene Q instrumentiem ar 72 stobriņu rotoru

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL) (32 reakcijas)	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNS augsti pozitīva kontrole	2 reakcijas
1 cDNA IS-MMR kalibrators	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	2 x 4 reakcijas (SP3, SP4, SP5 un SP6, katra tiek testēta divos eksemplāros)
RT negatīvā kontrole	2 reakcijas
Ūdens kontrole	2 reakcijas
Ar BCR-ABL Mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbcr) (32 reakcijas)	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNS augsti pozitīva kontrole	2 reakcijas
1 cDNA IS-MMR kalibrators	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	2 x 5 reakcijas (SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6, katra tiek testēta divos eksemplāros)
Ūdens kontrole	2 reakcijas

Paraugu apstrāde Rotor-Gene Q instrumentos ar 72 stobriņu rotoru

Mēs iesakām vienā eksperimentā testēt vismaz 8 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Rotoru shēmā 4. attēlā ir parādīts šāda eksperimenta piemērs.



4. attēls. Ieteicamais rotora iestatījums katram eksperimentam ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr un ABL standarti; HC: augsta cDNS pozitīvā kontrole; IS-Cal: IS-MMR kalibrators; RTneg: RT negatīvā kontrole; S: cDNA paraugs; H₂O: ūdens kontrole.

Piezīme. Vienmēr atcerieties ievietot testējamo paraugu rotora 1. pozīcijā. Pretējā gadījumā kalibrācijas laikā instruments kalibrāciju neveiks un tiks iegūti nepareizi fluorescences dati.

Aizpildiet visas pārējās pozīcijas ar tukšiem stobriņiem.

qPCR, kas veicams Rotor-Gene Q instrumentos ar 72 stobriņu rotoru

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Ar virpuļmaisīšanu samaisiet standartus, PPF-Mbcr un PPC-ABL stobriņus un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā).**

3. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

4. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu 25 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

4. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (µl)	ABL: 32+1 reakcija (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reakcija (µl)	Gala koncentrācija
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	33	33	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	214,5	214,5	–
Paraugs (pievienošanai 5. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	25	Katrā 25	Katrā 25	–

- 4. Pievienojiet katrā stobriņā 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.**
- 5. Citā laboratorijas zonā un ar speciāli atvēlētu aprīkojumu pievienojiet attiecīgajā stobriņā 5 µl RT produkta (cDNS, 200 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (sk. sadaļu “Protokols: atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot SuperScript III Reverse Transcriptase” 13. lpp.) (kopējais tilpums 25 µl).**
- 6. Nedaudz samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.**
- 7. Aizveriet visus stobriņus un ievietojiet stobriņus termiskajā ciklotājā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.**
- 8. Ieprogramējiet Rotor-Gene Q instrumentam termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 5. tabulā.**

5. tabula. Temperatūras profils

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Kvantitatīvā noteikšana
Hold 1 (1. glabāšana)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 s
Cycling (Ciklošana)	50 reizes 95 °C uz 5 s 60 °C uz 30 s, iegūstot FAM fluorescenci kanālā Green: Single (Viens)
Hold 2 (2. glabāšana)	Temperatūra: 36 °C Laiks: 1 min

9. Dialoglodziņā “New Run Wizard” (Jaunas izpildes vednis) noklikšķiniet uz “Gain Optimisation” (Pastiprinājuma optimizēšana), lai atvērtu dialoglodziņu “Auto-Gain Optimisation Setup” (Automātiskā pastiprinājuma optimizēšanas iestatīšana). Kanālam Green diapazonu iestatiet no “5 FI” vienumam “Min Reading” (Min. rādījums) līdz “10 FI” vienumam “Max Reading” (Maks. rādījums), un pieņemamo pastiprinājuma diapazonu iestatiet no –10 līdz 10.
10. Atzīmējiet izvēles rūtiņu “Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Veikt optimizēšanu pirms 1. iegūšanas) un aizveriet dialoglodziņu “Auto-Gain Optimisation Setup” (Automātiskā pastiprinājuma optimizēšanas iestatīšana).
11. Startējiet termiskās ciklošanas programmu.
12. Atlasiet vienumu “Slope Correct” (Slīpuma koriģēšana) analīzei. Mēs iesakām iestatīt robežvērtību 0,03.

Protokols: qPCR instrumentā Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS un LightCycler 480

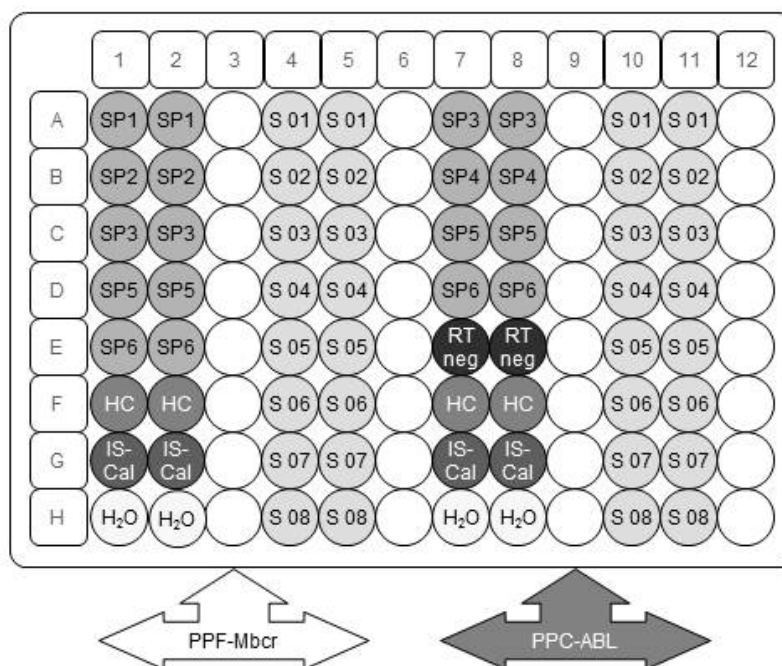
Izmantojot qPCR iekārtu ar 96 iedobju plati, mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros, kā norādīts 6. tabulā. Šis komplekts ir paredzēts astoņu dažādu cDNS paraugu testēšanai vienā eksperimentā trīs reizes.

6. tabula. Reakciju skaits, izmantojot qPCR iekārtu ar 96 iedobīšu plati

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL) (32 reakcijas)	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNS augsti pozitīva kontrole	2 reakcijas
1 cDNA IS-MMR kalibrators	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	2 x 4 reakcijas (SP3, SP4, SP5 un SP6, katra tiek testēta divos eksemplāros)
RT negatīvā kontrole	2 reakcijas
Ūdens kontrole	2 reakcijas
Ar BCR-ABL Mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbcr) (32 reakcijas)	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNS augsti pozitīva kontrole	2 reakcijas
1 cDNA IS-MMR kalibrators	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	2 x 5 reakcijas (SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6, katra tiek testēta divos eksemplāros)
Ūdens kontrole	2 reakcijas

Paraugu apstrāde instrumentos Applied Biosystems, ABI PRISM un LightCycler 480

Mēs iesakām vienā eksperimentā testēt vismaz 8 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Plates shēmā 5. attēlā parādīts šāda eksperimenta paraugs.



5. attēls. Ieteicamais plates iestatījums vienam eksperimentam ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr un ABL standarti; **HC:** augsta cDNS pozitīvā kontrole; **IS-Cal:** IS-MMR kalibrators; **RTneg:** RT negatīvā kontrole; **S:** cDNA paraugs; **H₂O:** ūdens kontrole.

qPCR instrumentos Applied Biosystems, ABI PRISM vai LightCycler 480

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Ar virpuļmaisīšanu samaisiet standartus, ROX, PPF-Mbcr un PPC-ABL stobriņus un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā).**
- 3. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita. Ja tiek izmantota qPCR iekārta ar 96 iedobju plati, mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

7. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai instrumentiem Applied Biosystems un ABI PRISM, un šī procedūra ir aprēķināta tā, lai iegūtu 25 µl gala reakcijas tilpumu. 8. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai instrumentam LightCycler 480, un šī procedūra ir aprēķināta tā, lai iegūtu 25 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

7. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana instrumentiem Applied Biosystems un ABI PRISM

Komponents	1 reakcija (µl)	ABL: 32+1 reakcija (µl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reakcija (µl)	Gala koncentrācija
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	33	33	1x
ROX I krāsviela, 50x (ABI PRISM 7900HT) vai ROX II krāsviela, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6	198	198	–
Paraugs (pievienošanai 5. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	25	Katrā 25	Katrā 25	–

8. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana instrumentam LightCycler 480

Komponents	1 reakcija (µl)	ABL: 32+1 reakcija (µl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reakcija (µl)	Gala koncentrācija
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	33	33	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	214,5	214,5	–
Paraugs (pievienošanai 5. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	25	Katrā 25	Katrā 25	–

4. Pievienojiet katrā iedobē 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
5. Citā laboratorijas zonā un ar speciāli atvēlētu aprīkojumu pievienojiet attiecīgajā iedobē 5 µl RT produkta (cDNS, 200 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (sk. sadaļu “Protokols: atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot SuperScript III Reverse Transcriptase” 13. lpp.) (kopējais tilpums 25 µl).
6. Nedaudz samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.
7. Aizveriet plati un uz īsu brīdi centrifugējiet (300 x g, aptuveni 10 s).
8. Ievietojiet plati termiskajā ciklotājā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem. Ieprogramējiet termiskajam ciklotājam termiskās cirkulācijas programmu, kā norādīts 9. tabulā instrumentiem Applied Biosystems un ABI PRISM vai 10. tabulā instrumentam LightCycler 480.

9. tabula. Temperatūras profils instrumentiem Applied Biosystems un ABI PRISM

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Standarta līkne — absolūtā daudzuma noteikšana
Hold 1 (1. glabāšana)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 s
Cycling (Ciklošana)	50 reizes 95 °C uz 5 s 60 °C uz 30 s, iegūstot FAM fluorescenci: Single (Viens); dzesētājs: TAMRA
Hold 2 (2. glabāšana)	Temperatūra: 36 °C Laiks: 1 min

10. tabula. Temperatūras profils instrumentam LightCycler 480

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Absolūtā daudzuma noteikšana (“Abs Quant”)
Detection formāts (Noteikšanas formāti)	Logā Detection formāts (Noteikšanas formāti) atlasiet “Simple Probe” (Vienkāršā zonde)
Hold 1 (1. glabāšana)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 s
Cycling (Ciklošana)	50 reizes 95 °C uz 5 s 60 °C uz 30 s, iegūstot FAM fluorescenci, kas atbilst (483–533 nm) LC versijai 01 un (465–510 nm) LC versijai 02
Hold 2 (2. glabāšana)	Temperatūra: 36 °C Laiks: 1 min

- 9. Instrumentiem Applied Biosystems 7500 un ABI PRISM 7900HT SDS veiciet 9a. darbību. Instrumentam LightCycler 480 veiciet 9b. darbību.**
- 9a. Applied Biosystems un ABI PRISM: instrumenta analīzes darbībā iesakām robežvērtību iestatīt uz 0,1. Palaidiet ciklošanas programmu, kā norādīts 9. tabulā.**
- 9b. LightCycler 480 instruments: mēs iesakām izmantot analīzes režīmu Fit point (Atbilstības punkts) ar fona vērtību 2,0 un robežvērtību 2,0. Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 10. tabulā.**

Protokols: qPCR instrumentā LightCycler 1.2, 1.5, un 2.0

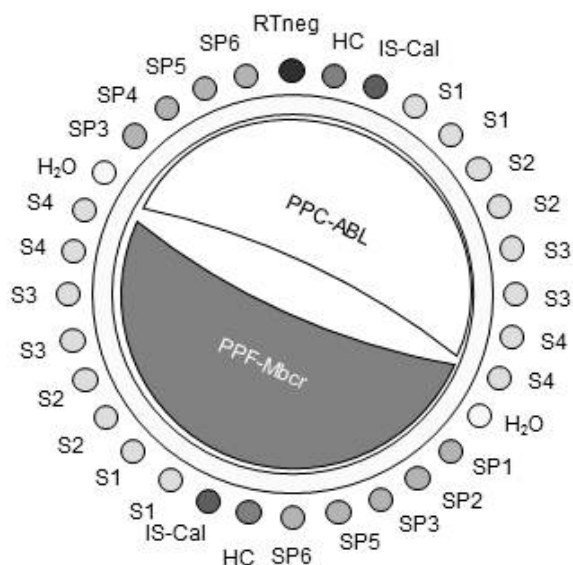
Izmantojot kapilāru instrumentus, mēs iesakām mērīt paraugus divos eksemplāros un kontroles — tikai vienā eksemplārā, kā norādīts 11. tabulā. Šis komplekts ir paredzēts četru dažādu cDNS paraugu testēšanai vienā eksperimentā sešas reizes.

11. tabula. Reakciju skaits instrumentiem LightCycler 1.2, 1.5 un 2.0

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL) (16 reakcijas)	
4 cDNS paraugi	4 x 2 reakcijas
1 cDNS augsti pozitīva kontrole	1 reakcija
1 cDNA IS-MMR kalibrators	1 reakcija
Vienas plazmīdas standarti	1 x 4 reakcijas (SP3, SP4, SP5 un SP6)
RT negatīvā kontrole	1 reakcija
Ūdens kontrole	1 reakcija
Ar BCR-ABL Mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbcr) (16 reakcijas)	
4 cDNS paraugi	4 x 2 reakcijas
1 cDNS augsti pozitīva kontrole	1 reakcija
1 cDNA IS-MMR kalibrators	1 reakcija
Vienas plazmīdas standarti	1 x 5 reakcijas (SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6)
Ūdens kontrole	1 reakcija

Paraugu apstrāde instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 un 2.0

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz 4 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Kapilāru shēmā 6. attēlā parādīts šāda eksperimenta piemērs.



6. attēls. Ieteicamais rotora iestatījums katram eksperimentam ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr un ABL standartu; HC: augsta cDNS pozitīvā kontrole; IS-Cal: IS-MMR kalibrators; RTneg: RT negatīvā kontrole; S: cDNA paraugs; H₂O: ūdens kontrole.

qPCR instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 no 2.0

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

1. **Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
2. **Ar virpuļmaisīšanu samaisiet standartus, PPF-Mbcr un PPC-ABL stobriņus un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 s ar 10 000 apgr./min, lai šķidrumu savāktu stobriņa apakšdaļā).**
3. **Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

12. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu 20 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

12. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana instrumentiem LightCycler 1.2, 1.5 un 2.0

Komponents	1 reakcija (μl)	ABL: 16+1 reakcija (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reakcija (μl)	Gala koncentrācija
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	10	170	170	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	4,2	71,4	71,4	–
Paraugs (pievienošanai 5. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	20	Katrā 20	Katrā 20	–

4. Pievienojiet katrā kapilārā 15 μ l iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
5. Citā laboratorijas zonā un ar speciāli atvēlētu aprīkojumu pievienojiet attiecīgajā kapilārā 5 μ l RT produkta (cDNS, 200 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (sk. sadaļu “Protokols: atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot SuperScript III Reverse Transcriptase” 13. lpp.) (kopējais tilpums 20 μ l).
6. Nedaudz samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.
7. Ievietojiet kapilārus adapteros, kas iekļauti iekārtas komplektācijā, un uz īsu brīdi centrifugējiet (700 x g, aptuveni 10 s).
8. Ievietojiet kapilārus termiskajā ciklotājā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
9. Ieprogramējiet instrumentam LightCycler 1.2, 1.5 vai 2.0 termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 13. tabulā.

13. tabula. Temperatūras profils

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Daudzuma noteikšana
Hold 1 (1. glabāšana)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 s Paātrinājums: 20
Cycling (Ciklošana)	50 reizes 95 °C uz 5 s; paātrinājums: 20 60 °C uz 30 s; paātrinājums: 20; iegūstot FAM fluorescenci: Single (Viens)
Hold 2 (2. glabāšana)	Temperatūra: 36 °C Laiks: 1 min Paātrinājums: 20

10. Instrumentam LightCycler 1.2 un 1.5 veiciet 10a. darbību.

Instrumentam LightCycler 2.0 veiciet 10b. darbību.

10a. LightCycler 1.2 un 1.5: ieteicams izmantot F1/F2 un režīmu “2nd derivative analysis” (Otrā derivāta analīze). Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 13. tabulā.

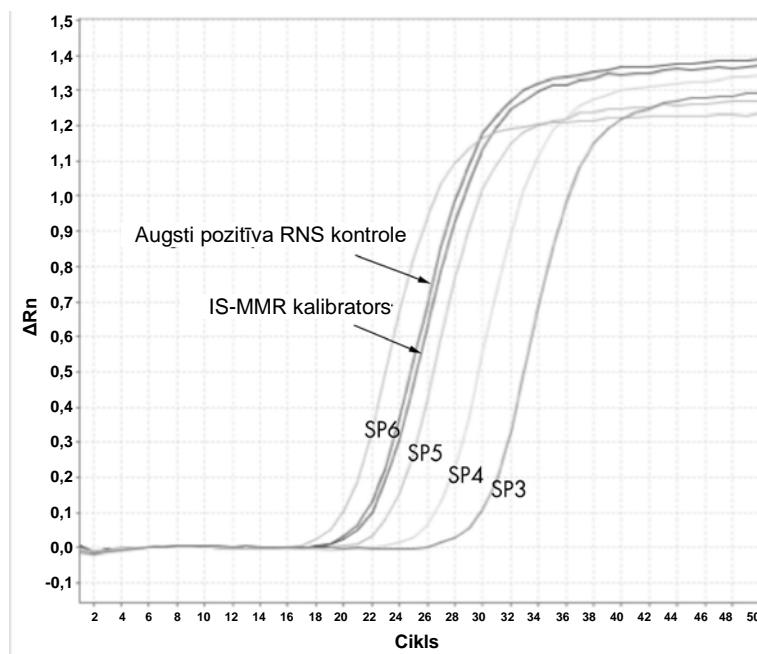
10b. LightCycler 2.0: lai iegūtu reproducējamus rezultātus, mēs iesakām LightCycler 2.0 programmatūras versijā 4.0 izmantot Automated (Automatizēts) (F''maks.) analīzi. Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 13. tabulā.

Rezultātu interpretācija

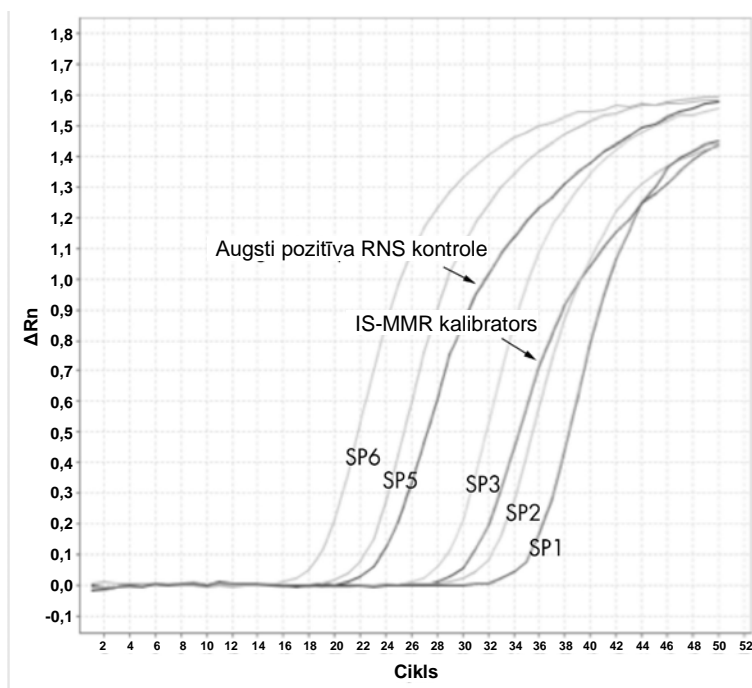
Datu analīzes princips

Izmantojot TaqMan® tehnoloģiju, PCR ciklu skaitu, kas ir nepieciešams, lai noteiktu virs robežvērtības esošu signālu, sauc par robežvērtības ciklu (C_T , threshold cycle), un tas ir tieši proporcionāls mērķa daudzumam reakcijas sākumā.

Izmantojot standartus ar zināmu molekulu skaitu, var izveidot standarta līkni un noteikt precīzu mērķa daudzumu testa paraugā. *ipsogen* standarta līknes ir atkarīgas no plazmīdām. Lai nodrošinātu, ka standarta līknes ir precīzas, mēs izmantojam standarta atšķaidījumus darbā ar ABL un 5 standarta atšķaidījumus darbā ar Mbc. Komplektā ir arī IS-MMR kalibrators, sniedzot iespēju rezultātus konvertēt uz starptautisko skalu. Tālāk 7. un 8. attēlā ir redzami TaqMan amplifikācijas līkņu piemēri, kas standartiem, IS-MMR kalibratoram un augsti pozitīvajai RNS kontrolei iegūti ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit komplektu.



7. attēls. ABL noteikšana ar standartiem SP3, SP4, SP5 un SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 un 10^6 kopijas/5 μ l.



8. attēls. BCR-ABL MbcR noteikšana ar standartiem SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopijas/5 μ l.

Uz neapstrādātiem datiem attiecināmās standartu līknes un kvalitātes kritēriji

Reproducējamība starp atkārtojumiem

C_T vērtību variācijas starp atkārtojumiem jābūt < 2 , kas atbilst četrkārtīgām kopiju skaita vērtību izmaiņām.

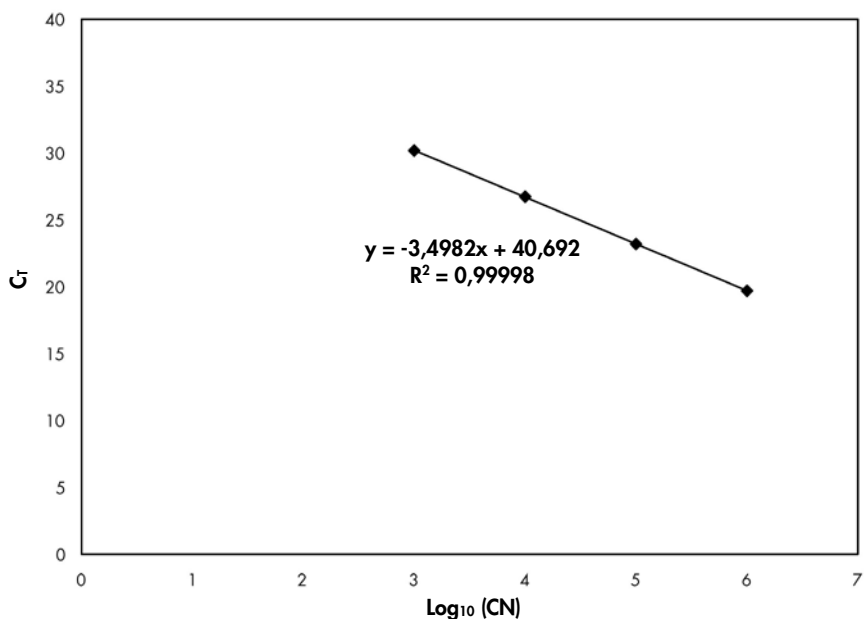
C_T vērtību variācijas starp atkārtojumiem parasti ir $< 1,5$, ja vidējā atkārtojumu C_T vērtība ir < 36 (7).

Piezīme. Katram lietotājam ir jāizmēra reproducējamība savā laboratorijā.

Standartu līknes

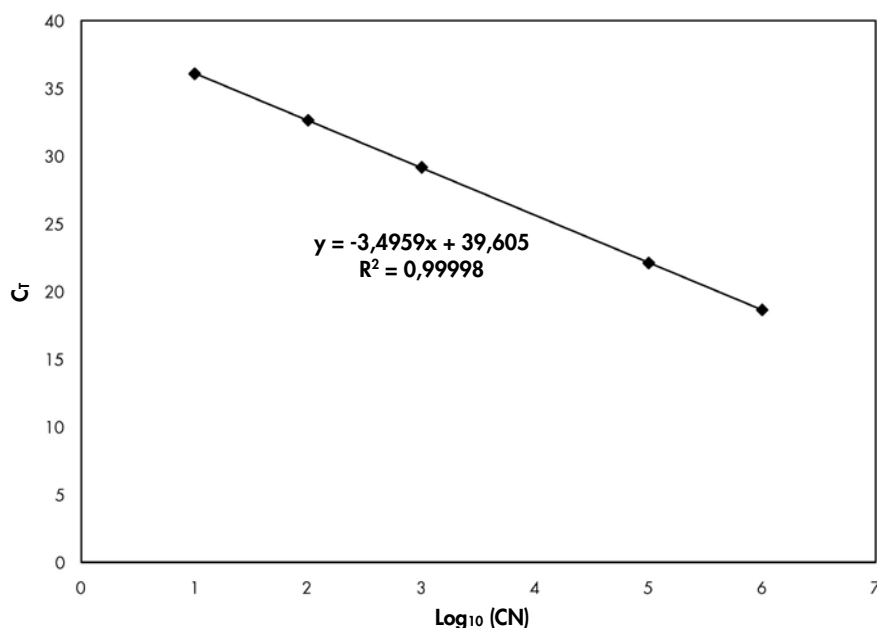
Neapstrādātos datus var iekopēt Excel® failā analīzei.

Katram gēnam (ABL un BCR-ABL) neapstrādātās C_T vērtības, kas iegūtas no plazmīdu standartu atšķaidījumiem, diagrammā tiek attēlotas atbilstoši log kopijas numuram (10^3 , 10^4 , 10^5 un 10^6 standartiem SP3, SP4, SP5 un SP6; 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 un 10^6 standartiem SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6). 9. attēla piemērā redzama teorētiska ABL standarta līkne, kas aprēķināta četriem standarta atšķaidījumiem. 10. attēla piemērā redzama teorētiska BCR-ABL standarta līkne, kas aprēķināta ar pieciem standarta atšķaidījumiem.



9. attēls. Teorētiska ABL standarta līkne, aprēķināta no 4 standarta atšķaidījumiem.

Tiek aprēķināta lineāras regresijas līkne ($y = ax + b$), kur a ir līnijas slīpums un b ir krustošanās ar y asi, t.i., y koordināte tam punktam, kurā līnija šķērso y asi. Tās vienādojums un noteikšanas koeficients (R^2) tiek uzdrukāts diagrammā.



10. attēls. Teorētiska BCR-ABL standarta līkne, aprēķināta no 5 standarta atšķaidījumiem.

Tiek aprēķināta lineāras regresijas līkne ($y = ax + b$), kur a ir līnijas slīpums un b ir krustošanās ar y asi, t.i., y koordināte tam punktam, kurā līnija šķērso y asi. Tās vienādojums un noteikšanas koeficients (R^2) tiek uzdrukāts diagrammā.

Tā kā standarti ir desmitkārtīgi atšķaidījumi, līknes teorētiskais slīpums ir $-3,3$. Slīpums no $-3,0$ līdz $-3,9$ ir pieņemams, ja R^2 ir $> 0,95$ (7). Tomēr, lai iegūtu precīzus rezultātus, ieteicamā vērtība ir $R^2 > 0,98$ (3).

Piezīme. Ir jānosaka SP1 standarta atšķaidījums (BCR-ABL plazmīda, 10 kopijas), un tas ir jāiekļauj BCR-ABL standarta līknē.

Kvalitātes kontrole visām ABL vērtībām

Ja RNS kvalitāte ir slikta vai qPCR darbību laikā rodas problēmas, ABL kopiju skaits (ABL_{CN}) var būt zems. Optimāls jutīgums ir panākts ar paraugiem, no kuriem iegūtā vērtība $ABL_{CN} \geq 10\,000$ kopijas. Šis kritērijs vērtībai ABL_{CN} attiecas arī uz augsti pozitīvo RNS kontroli un IS-MMR kalibratoru.

RT negatīvās un ūdens kontroles

Kontrolēm bez matricas (No Template Control, NTC) šai PCR darbībai (ūdens kontrolei) un atgriezeniskās transkripcijas (Reverse Transcription, RT) darbībai vajadzētu uzrādīt nulles CN gan ABL gadījumā, gan BCR-ABL MbcR gadījumā. Ja šo NTC rezultāts ir pozitīvs, tas nozīmē, ka atgriezeniskās transkripcijas un/vai qPCR laikā ir notikusi krusteniskā kontaminācija.

Normalizēto kopiju skaits (Normalized Copy Number, NCN)

ABL standarta līknes vienādojums jāizmanto, lai nezināmo paraugu iegūtās C_T vērtības (iegūtas ar PPC-ABL) pārveidotu par ABL kopiju skaitu (ABL_{CN}).

BCR-ABL standarta līknes vienādojums ir jāizmanto, lai nezināmiem paraugiem iegūtās neapstrādātās C_T vērtības (iegūtas ar PPF-MbcR) pārveidotu par BCR-ABL kopiju skaitu ($BCR-ABL_{MbcR_{CN}}$).

Šo CN vērtību attiecība sniedz normalizēto kopiju skaitu (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL_{MbcR_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Aprēķiniet NCN rezultātu augsti pozitīvajai RNS kontrolei (NCN_{HC}), IS-MMR kalibratoram (NCN_{cal}) un katram paraugam ($NCN_{paraugs}$).

Augsti pozitīva RNS kontrole un IS-MMR kalibrators

Šīs kontroles sniedz iespēju novērot ABL un BCR-ABL MbcR atgriezeniskās transkripcijas un amplificēšanas darbības transkripcijas kvantitatīvās noteikšanas laikā.

Kvalitātes kontrole NCN_{cal} rezultātam

Piezīme. NCN rezultātam, kas iegūts IS-MMR kalibratoram, testēts ar *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit komplektu kombinācijā ar apstiprinātajiem reaģentiem un instrumentiem (sk. sadaļu “Nodrošinātie materiāli” 9. lpp. un sadaļu “Nepieciešamie, bet komplektā neietvertie materiāli” 10. lpp.), ir jāatrodas intervālā 0,05–0,3. Ja tā nav, NCN vērtības nevar konvertēt uz starptautisko skalu. Turklāt, ja augsti pozitīvā RNS kontrole netiek noteikta, viss eksperiments ir jānoraida.

IS konversija un MMR ziņošana

Piezīme. Pirms skaidrošanas apskatiet, kāda vērtība tiek uzrādīta IS-MMR kalibratora stobriņa etiķetē vai komplekta komplektācijā iekļautajā analīzes sertifikātā.

Izmantojiet eksperimentālo IS-MMR kalibratora NCN rezultātu (NCN_{cal}) un tā piešķirto vērtību (IS-Cal vērtību), kas norādīta analīzes sertifikātā, lai normalizēto kopiju skaitu aprēķinātu starptautiskajā skalā ($IS-NCN_{paraugs}$).

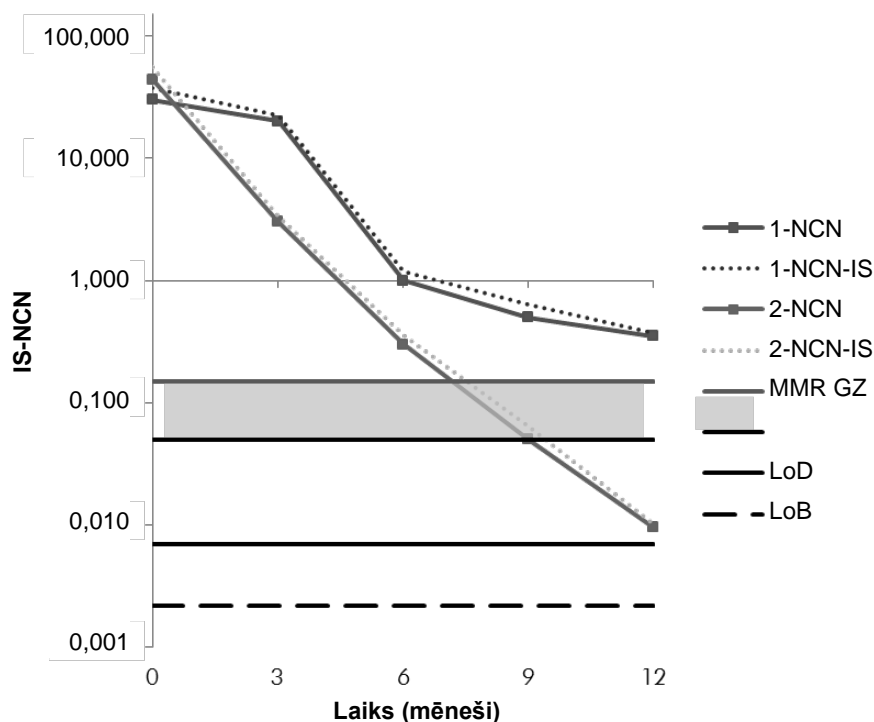
$$IS-NCN_{paraugs} = \frac{NCN_{paraugs} \times IS-Cal \text{ vērtība}}{NCN_{cal}}$$

Nosakiet katra parauga MMR statusu saskaņā ar tālāk norādītajiem kritērijiem.

- **$IS-NCN_{paraugs} \leq 0,05$** : ievērojama molekulārā reakcija
- **$0,05 < IS-NCN_{paraugs} < 0,15$** : Pelēkā zona ap MMR robežvērtību, neviennozīmīgs rezultāts
- **$IS-NCN_{paraugs} \geq 0,15$** : nav ievērojamas molekulārās reakcijas

$IS-NCN_{HC}$ rezultātam (NCN starptautiskajā skalā šai augsti pozitīvajai RNS kontrolei) nevajadzētu dot ievērojamu molekulāro reakciju.

11. attēla piemērā parādīta pacienta monitorēšana, izmantojot NCN un $IS-NCN$ rezultātus.



11. attēls. Monitoringa līknes pacienta MMR statusam ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit komplektu. **NCN**: normalizēto kopiju skaits; **NCN-IS**: normalizēto kopiju skaits starptautiskajā skalā; **MMR GZ**: MMR pelēkā zona (Gray Zone, GZ), neviennozīmīgs rezultāts; **LoD**: noteikšanas robeža; **LoB**: fona līmenis.

Kopsavilkums par kvalitātes kritērijiem

14. tabulā ir sniegts kopsavilkums par dažādiem kvalitātes kritērijiem un saistītajām vērtībām vai rezultātiem.

14. tabula. Kvalitātes kritēriju kopsavilkums

Kritēriji	Pieņemamās vērtības/rezultāti
C_T vērtību variācijas starp atkārtojumiem	$\leq 2 C_T$, ja vidējā C_T vērtība > 36 $\leq 1,5 C_T$, ja vidējā C_T vērtība ≤ 36
Slīpums standarta līknēm	No $-3,0$ līdz $-3,9$
R^2 standarta līknēm	Vismaz $> 0,95$, labāk, ja $> 0,98$
SP1 standarta atšķaidījums (BCR-ABL 10 kopiju plazmīda)	Jābūt noteiktam un iekļautam standarta līknē
Kvalitātes kontrole ABL_{CN} vērtībai pacientu paraugiem, augsti pozitīvai RNS kontrolei un IS-MMR kalibratoram	$ABL_{CN} > 10\ 000$ kopijas ABL, lai sasniegtu optimālo jutīgumu
PCR (ūdens) un atgriezeniskās transkripcijas (RT negatīva) kontroles	Katrai šūnu līnijai $ABL_{CN} = 0$ un $Mbcr_{CN} = 0$
NCN vērtība, kas iegūta IS-MMR kalibratoram (NCN_{cal})	Jāiekļaujas diapazonā $0,05-0,3$
Augsti pozitīva RNS kontrole	Ir jābūt noteiktai
NCN vērtība, kas iegūta augsti pozitīvajai RNS kontrolei, konvertēta starptautiskajai skalai (IS- NCN_{HC})	Statuss: nav ievērojamas molekulārās reakcijas

Problēmu novēršana

Plašāku informāciju skatiet lapā “Frequently Asked Questions” (Bieži uzdotie jautājumi), kas pieejama mūsu tehniskā atbalsta centra vietnē: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbildēs uz jūsu jautājumiem par informāciju un protokolu šajā rokasgrāmatā vai arī paraugu un analīžu metodēm (kontakta informāciju skatiet šeit: “Kontaktinformācija” 41. lpp.).

Kvalitātes kontrole

Saskaņā ar ISO prasībām sertificēto QIAGEN kvalitātes vadības sistēmu katra *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit komplektu partija tiek testēta, salīdzinot ar iepriekš noteiktām specifikācijām, lai nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti. Analīzes sertifikāti ir pieejami pēc pieprasījuma vietnē www.qiagen.com/support/.

Ierobežojumi

Pirms šīs ierīces izmantošanas lietotājiem jābūt apmācītiem un jāpārzina šī tehnoloģija.

Visi iegūtie diagnostikas rezultāti jāinterpretē kopā ar citiem klīniskiem vai laboratoriskiem konstatējumiem. Lietotāja pienākums ir pārbaudīt sistēmas veiktspēju attiecībā uz visām viņu laboratorijā izmantotajām procedūrām, kas nav ietvertas QIAGEN veiktspējas pētījumos.

Pievērsiet uzmanību derīguma termiņiem, kas norādīti uz kastītes un visu komponentu etiķetēm. Komponentus, kam beidzies derīguma termiņš, izmantot nedrīkst.

Piezīme. Komplekts ir izstrādāts saskaņā ar “Eiropa pret vēzi” (Europe Against Cancer, EAC) pētījumiem (8, 9), un tas atbilst atjauninātajiem starptautiskajiem ieteikumiem. Komplektā ir IS-MMR kalibrators, standartizēts atbilstoši starptautiskajai skalai, tādēļ NCN rezultātus var konvertēt pēc starptautiskās skalas un ziņot ievērojamas molekulārās reakcijas (Major Molecular Response, MMR) statusu.

Katrai IS-MMR kalibratoru partijai ir piešķirta vērtība, kas tieši atvasināta no kalibrēšanas pret NIBSC WHO sertificētā primārās atsauces materiāla (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138).

Katrā komplektā ir iekļauts analīzes sertifikāts, kurā norādīta IS-MMR kalibratora piešķirtā vērtība.

Komplekts ir jāizmanto, ievērojot šajā rokasgrāmatā sniegtās instrukcijas un kombinācijā ar apstiprinātiem reaģentiem un instrumentiem (sk. sadaļu “Nepieciešamie, bet komplektā neietvertie materiāli” 10. lpp.). Jebkura šī izstrādājuma izmantošana un/vai sastāvdaļu modifikācija ārpus etiķetē sniegtajiem norādījumiem anulēs QIAGEN atbildību.

Veiktspējas raksturojums

Piezīme. Veiktspējas raksturojums tika noteikts, izmantojot Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System kombinācijā ar *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit komplektu un apstiprinātiem papildu reaģentiem (sk. sadaļu “Nepieciešamie, bet komplektā neietvertie materiāli” 10. lpp.).

Tukšo paraugu robežvērtība un noteikšanas robeža

Tukšo paraugu robežvērtība (Limit of Blank, LoB) un noteikšanas robeža (Limit of Detection, LoD) tika noteikta, ievērojot CLSI/NCCLS EP17-A vadlīnijas.

Fona līmenis (LoB) tika noteikts negatīviem paraugiem, kas bija iegūti no veseliem donoriem (11 paraugi, 69 mērījumi), un tika konstatēts kā vienāds ar 0,0022 BCR-ABL MbcR NCN.

Noteikšanas robeža (LoD jeb analītiskais jutīgums) tika noteikts zināmiem zemi pozitīviem paraugiem ($n = 8$, 74 mērījumi), un tika konstatēts kā vienāds ar 0,0069 BCR-ABL MbcR NCN.

- **NCN \leq LoB:** BCR-ABL MbcR nav konstatēts
- **LoB $<$ NCN $<$ LoD:** BCR-ABL MbcR konstatēts, bet nav kvantificēts
- **NCN \geq LoD:** BCR-ABL MbcR kvantificēts

Linearitāte

Linearitāte tika noteikta, ievērojot CLSI/NCCLS EP6-A vadlīnijas.

Šis pētījums tika veikts, izmantojot no šūnu līnijām ekstrahētas pozitīvas un negatīvas RNS maisījumu. Vienpadsmit dažādi līmeņi tika testēti trīs eksemplāros. No šiem paraugiem iegūti rezultāti liecina, ka *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR analīze ir lineāra diapazonā no 0,003 līdz 65 BCR-ABL MbcR NCN.

Ievades

Pētījumam tika izvēlētas piecas dažādas RNS ar dažādiem NCN BCR-ABL MbcR līmeņiem. Tika testēti dažādi RNS un cDNS daudzumi, lai novērtētu ievades ietekmi uz NCN rezultātiem. Rezultāti uzrādīja, ka RNS ievades variācijai bija ierobežota ietekme uz NCN rezultātiem; kamēr cDNS ievade izrādījās jutīgāks faktors, lietojot lielāku vai mazāku daudzumu materiāla. Līdz ar to testa veikšanai ieteicams izmantot 1 μ g RNS un 5 μ l cDNS.

Precizitāte

Precizitāte tika noteikta, ievērojot CLSI/NCCLS EP5-A2 vadlīnijas.

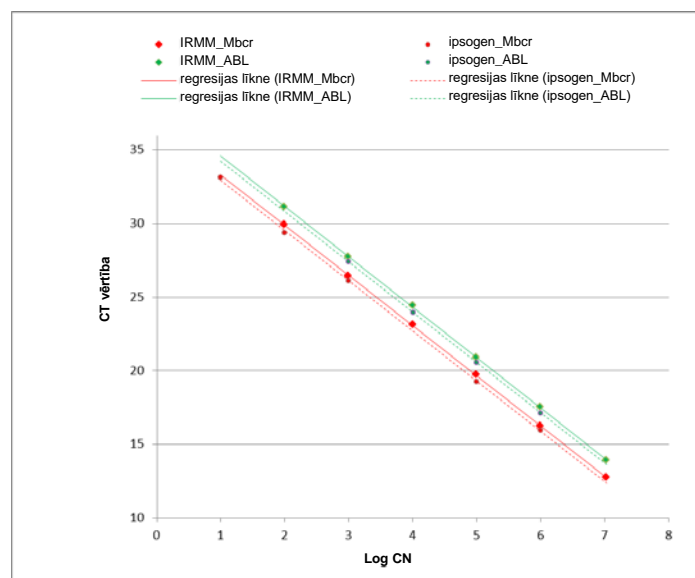
Precizitātes pētījums tika veikts ar 13 dažādiem paraugiem, kuri tika testēti 42 reizes divos eksemplāros ($n = 84$). Šie paraugi reprezentēja atšķirīgo BCR-ABL MbcR ekspresijas līmeni pacientu paraugos ap MMR vērtību un virs tās. Globālais variācijas koeficients ap MMR vērtību tika noteikts kā vienāds ar 25%.

Atbilstības pētījums: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienas plazmīdas (IRMM) un *ipsogen* vienas plazmīdas (QIAGEN) standartu salīdzinājums

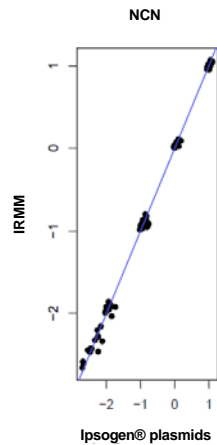
Visjaunākās darba definīcijas par BCR-ABL1 Mbcr molekulāro reakciju HML gadījumos ir devusi apvienība ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, iesakot izmantot ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmīdu (IRMM, Belgium): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Lai ievērotu šo ieteikumu, QIAGEN veica atbilstības pētījumu, *ipsogen* vairākmērķu vienu plazmīdu, kas tiek izmantota komplektā *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (24) CE (kat. nr. 670723), salīdzinot ar ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmīdu (IRMM).

Šis salīdzinājums bija balstīts uz BCR-ABL1 Mbcr/ABL1 normalizēto kopiju skaita attiecību (normalized copy number ratio, NCN), kuras novērtēšanai kāds no abiem standarta atšķaidījumiem (*ipsogen* vai ERM-AD623 BCR-ABL1) tika izmantots *ipsogen* komplektos iekļautajiem kontroles paraugiem un sertificētam atsauces materiālam no NIBSC; White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.



12. attēls. *ipsogen* un ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmīdu standartu līknes saskan.



ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit.

13. attēls. ERM-AD623 BCR-ABL1 un *ipsogen* NCN vērtību salīdzinājums.

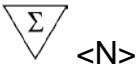




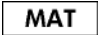




QIAGEN pētījumā tika secināts, ka statistiskās atšķirības nav: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienas plazmīdas un *ipsogen* vienas plazmīdas standarti uzrāda ekvivalentus rezultātus.

Atsauces

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. 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.
9. 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.

Simboli

Uz iepakojuma un marķējuma var būt šādi simboli:

	Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām
	Izlietot līdz
	<i>In vitro</i> diagnostikas medicīnas ierīce
	Kataloga numurs
	Partijas numurs
	Materiāla numurs
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
	Temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Skatīt lietošanas instrukcijas

Kontaktinformācija

Lai saņemtu tehnisku palīdzību un papildu informāciju, apmeklējiet mūsu tehniskā atbalsta centra vietni www.qiagen.com/Support, zvaniet pa tālruni 00800-22-44-6000 vai sazinieties ar kādu no QIAGEN tehnisko pakalpojumu dienesta nodaļām vai vietējiem izplatītājiem (skatiet aizmugurējo vāku vai apmeklējiet vietni www.qiagen.com).

Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	24 reakcijām: MbcR un ABL vienas plazmīdas standarti, augsti pozitīva RNS kontrole, IS-MMR kalibrators, praimeru un zondes maisījums ABL, praimeru un zondes maisījums BCR-ABL MbcR hibrīdgēnam	670723
Rotor-Gene Q MDx — IVD apstiprinātajai real-time PCR analīzei klīniskajos lietojumos		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR ciklotājs un augstas izšķirtspējas kušanas analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, sārts) un HRM kanālu, klēpjdatore, programmatūra, piederumi, 1 gada garantija daļām un darbam, bet instalēšana un apmācība nav iekļauta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR ciklotājs un augstas izšķirtspējas kušanas analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, sārts) un HRM kanālu, klēpjdatore, programmatūra, piederumi, 1 gada garantija daļām un darbam, instalēšana un apmācība	9002033
<i>ipsogen</i> RT Kit — atgriezeniskajai transkripcijai		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Atgriezeniskā transkriptāze, nejaušs praimeris, DTT, dNTP, RNāzes inhibitors, RT buferšķīdums	679923
RNeasy Midi Kit — summārās RND izdalīšanai		
RNeasy Midi Kit (50)	50 RNS sagatavēm: 50 RNeasy Midi centrifūgas stobriņi, paraugu ņemšanas stobriņi (15 ml), reaģenti un buferšķīdumi bez RNāzes	75144

Jaunāko informāciju par licencēšanu un produktu juridiskās atrunas skatiet attiecīgajā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja rokasgrāmatā. QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē www.qiagen.com, un tās var pieprasīt arī no QIAGEN tehniskā atbalsta dienesta vai vietējiem preču izplatītājiem.

Šis izstrādājums ir paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. *ipsogen* izstrādājumus nedrīkst pārdot tālāk, izmainīt tālākpārdošanai vai izmantot, lai ražotu komerciālus izstrādājumus, bez QIAGEN rakstiskas atļaujas.

Šajā dokumentā pieejamā informācija var tikt mainīta bez iepriekšēja paziņojuma. QIAGEN neuzņemas atbildību par jebkādām kļūdām, kas var būt šajā dokumentā. Tiek uzskatīts, ka publicēšanas brīdī šis dokuments ir pilnīgs un precīzs. QIAGEN nekādā gadījumā nav atbildīgs par nejausiem, tīšiem, daudzkārtīgiem vai izrietošiem zaudējumiem, kas ir saistīti ar šī dokumenta izmantošanu vai rodas no tā izmantošanas.

ipsogen izstrādājumiem tiek garantēta atbilstība noteiktajām specifikācijām. QIAGEN vienīgais pienākums un klienta vienīgais tiesiskās aizsardzības līdzeklis ir izstrādājuma nomaiņa bez maksas, ja izstrādājumi nedarbojas, kā norādīts.

Preču zīmes: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™, TRIZOL® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); *Premix Ex Taq*™ (Takara Bio, Inc.).

Ierobežots licences līgums

Šī izstrādājuma izmantošana apliecina katra *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit komplekta pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit komplektu drīkst izmantot tikai saskaņā ar norādījumiem *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit rokasgrāmatā* un tikai ar komplektā iekļautajiem komponentiem. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā iekļautos komponentus izmantotu kopā ar jebkādiem komponentiem, kas nav iekļauti šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti *BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit rokasgrāmatā* un papildu protokolos, kas pieejami vietnē www.qiagen.com.
2. Uzņēmums QIAGEN nesniedz citas garantijas, izņemot skaidri norādītās licences, ka šis komplekts un/vai tā lietošana neaizskar trešo personu tiesības.
3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencētas vienreizējai lietošanai, un tās nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādām citām tiesībām vai netiesībām licencēm, izņemot tās, kuras ir skaidri norādītas.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un aņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā sastāvdaļām.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet vietnē www.qiagen.com.

HB-1362-003 © 2013-2016 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

www.qiagen.com

