

Temmuz 2020

therascreen[®] IDH1/2 RGQ PCR Kit El Kitabı



Sürüm 1

Gliomada 12 *IDH1* ve *IDH2* mutasyonunun saptanması içindir

IVD

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM cihazı ile kullanım içindir

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R5 **MAT**

1119896TR

Sample to Insight



İçerik

Kullanım Amacı	5
Özet ve Açıklama	6
Prosedür Prensipleri	8
Sağlanan Materyaller.....	10
Kit içeriği.....	10
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller	12
Uyarılar ve Önlemler.....	14
Güvenlik Bilgileri.....	14
Genel önlemler.....	14
Reaktif Saklama ve Kullanma	16
Sevkiyat koşulları	16
Saklama	16
Stabilite	16
Numune Kullanımı ve Saklama	17
Prosedür	18
DNA ekstraksiyonu ve hazırlanması	18
Protokol: <i>IDH1/2</i> mutasyonlarının saptanması	22
Sonuçların Yorumlanması	27
Su kontrolleri	27
Kontrollerin C_T değerlerini kullanarak kalite kontrolü	27
Örnek girdisi doğrulaması	30
Örnek sonuçları.....	30

Sorun giderme kılavuzu	36
Kalite Kontrol	39
Sınırlamalar	40
Performans Özellikleri	42
Kör sınırı (LOB)	42
Tespit sınırı (LOD).....	42
DNA girdisinin etkisi	44
Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik	44
Yöntem karşılaştırması	47
Referanslar	50
Semboller	52
Sipariş Bilgileri	54
Belge Revizyon Geçmişi.....	56

Kullanım Amacı

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) insan beyin dokusundan ekstrakte edilen DNA içinde, *IDH1* geninin 7 mutasyonunun, *IDH2* geninin ise 5 mutasyonunun kalitatif olarak saptanmasına ve 3 majör mutasyonun doğrudan tanımlanmasına yönelik PCR teknolojisine dayanan bir in vitro tanı amaçlı testtir.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit'in, gliomaların sınıflandırılmasında yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır.

Özet ve Açıklama

IDH1 ve *IDH2* izositrat dehidrogenaz (isocitrate dehydrogenase, IDH) genlerindeki mutasyonlar, yetişkin Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) derece II ve III gliomalarda ve WHO derece IV sekonder glioblastomalarda (glioblastomas, GBM) sıklıkla görülür. Diagnostik değerine ek olarak, *IDH1/2* mutasyonlarının varlığı glioma hastalarında olumlu prognoz ile ilişkilendirilmiştir (1-13).

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit, 12 spesifik *IDH1/2* mutasyonunun saptanmasına yönelik bir tahlildir: *IDH1* genine ait kodon 132 içinde 6, *IDH2* genine ait homolog kodon 172 içinde 5 ve *IDH1* genine ait kodon 100 içinde 1 adet (Tablo 1). Kit ayrıca, majör *IDH1* R132H, *IDH1* R132C ve *IDH2* R172K değişimlerine yol açan majör *IDH1* ve *IDH2* mutasyonlarını da doğrudan tanımlar.

Tablo 1. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit kullanılarak saptanan IDH1 ve IDH2 mutasyonları

Gen	Mutasyon	Baz deęiřimi	COSMIC ID*
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 ID'ler Kanserdeki Somatik Mutasyonlar Kataloęundan (Catalog of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) alınmıştır.

Prosedür Prensipleri

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit, 12 mutasyonun saptanmasına yönelik 9 ayrı amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirme amaçlı reaktifler sağlar (Tablo 1):

- *IDH1* genine ait 132 ve 100 kodonlarının ve *IDH2* genine ait kodon 172'nin 3 total amplifikasyon reaksiyonu
- *IDH1* genine ait 132 ve 100 kodonlarının ve *IDH2* genine ait kodon 172'nin 3 mutasyon amplifikasyon reaksiyonu
- *IDH1* R132H, *IDH1* R132C ve *IDH2* R172K mutasyonlarının 3 adet mutasyona özgü amplifikasyon reaksiyonu

Total reaksiyon karışımları

Total Primerler ve Prob Karışımları (PPM-Total), hem mutasyona uğramış hem de doğal fenotip hedef sekanslarını amplifiye etmeye yönelik primerler ve probalar kullanır (Şekil 1).

Mutasyon saptama reaksiyon karışımları

Mutasyon saptama primerleri ve prob karışımları, hem mutasyona uğramış hem de doğal fenotip hedef sekansları amplifiye etmeye yönelik primerler ve probalar ile elongasyonu engelleme amaçlı bir fosfat grubunun eklenmesiyle bloke olan (PCR kenetlenme), doğal fenotip hedef sekansına özgü olan 3' oligonükleotidi bir araya getirir.

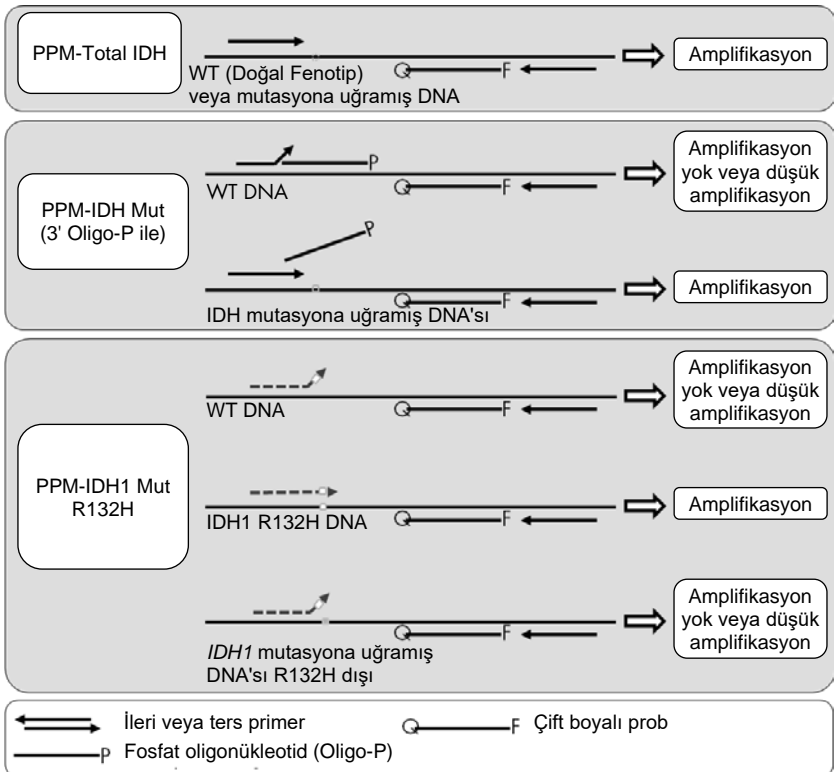
PCR şablonu doğal fenotip sekansı içerdiğinde 3' fosfat oligonükleotid, daha yüksek afinite nedeniyle PCR primer bağlanmasından daha baskın olur. DNA polimerazı tarafından uzama görülmez veya az miktarda uzama görülür ve amplifikasyon yoktur veya düşük amplifikasyon gözlemlenir.

Mutasyona uğramış bir sekans bulunduğu PCR primer bağlanması, 3'-oligonükleotid bağlanmasından daha baskın olur ve amplifikasyon devam eder (Şekil 1).

Mutasyon tanımlama reaksiyon karışımları

Allele özgü amplifikasyon, DNA polimerazının, PCR primerinin 3' ucundaki eşleşme ve uyumsuzluk durumları arasında ayırım yapma yetisini kullanan ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi) tarafından gerçekleştirilir.

PCR primeri tam olarak eşleştiğinde, amplifikasyon tam verimlilikle ilerler. 3' baz eşleşmesi olmadığında, yalnızca düşük seviyeli arka plan amplifikasyonu gerçekleşir (Şekil 1).



Şekil 1. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'teki primerler ve prob karışımları ile elde edilen sonuçlar. *IDH1* R132H'yi saptadığı ortaya konan prensip, *IDH1* R132C ve *IDH2* R172K için de geçerlidir.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalog numarası		873011
Reaksiyon sayısı		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Total <i>IDH1/R132</i> 'nin saptanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı) (Doğal Fenotip ve Mutasyona Uğramış)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Total <i>IDH2/R172</i> 'nin saptanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı) (Doğal Fenotip ve Mutasyona Uğramış)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Total <i>IDH1/R100</i> 'ün saptanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı) (Doğal Fenotip ve Mutasyona Uğramış)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Mutasyona uğramış <i>IDH1/R132</i> 'nin saptanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı (Oligo-P dahil))	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> (Mutasyona uğramış <i>IDH2/R172</i> 'nin saptanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı (Oligo-P dahil))	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> (Mutasyona uğramış <i>IDH1/R100</i> 'ün saptanmasına yönelik Primerler ve Prob karışımı (Oligo-P dahil))	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H (<i>IDH1</i> Mut R132H'nin tanımlanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı)	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Kit içeriği (devamı)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalog numarası		873011
Reaksiyon sayısı		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C (<i>IDH1</i> Mut R132C'nin tanımlanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı)	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> Mut R172K (<i>IDH2</i> Mut R172K'nin tanımlanmasına yönelik Primerler ve Prob Karışımı)	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (<i>IDH1/IDH2</i> Yabani Tip Genomik DNA)	IDH1/IDH2 WT Kontrol	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control (<i>IDH1/IDH2</i> Mutasyonlu Pozitif Kontrol)	IDH1/IDH2 Pozitif Kontrol	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (<i>Taq</i> DNA Polimeraz, dNTP'ler, MgCl ₂ ve qPCR tamponu karışımı)	qPCR Master Karışım 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water (Nükleaz İçermeyen Su)	Nükleaz İçermeyen Su	5 x 525 µl
therascreen <i>IDH1/2</i> RGQ PCR Kit El Kitabı (İngilizce)		1

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun.

Önemli: Bu prosedürde kullanılan cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

Reaktifler (manuel DNA ekstraksiyonu)

- DNA ekstraksiyon kiti: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. no. 56404)
- RNase A (17,500 U) (kat. no. 19101)
- Xylene veya Histolemon™ (Carlo Erba, kat. no. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (%96 ila 100)
- 1x TE tamponu, pH 8,0

Reaktifler (otomatik DNA ekstraksiyonu)

- DNA ekstraksiyon kiti: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236)
- Buffer ATL (kat. no. 19076 veya 939016)
- RNase A (kat. no. 19101)
- Xylene veya Histolemon (Carlo Erba, kat. no. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (%96 ila 100)
- 1x TE tamponu, pH 8,0

Sarf Malzemeleri

- Neşter
- Nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril hidrofobik filtreli PCR pipeti uçları
- 2,0 ml veya 1,5 ml nükleaz içermeyen tüp

- Rotor-Gene için Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (kat. no. 981103 veya 981106)
- Buz

Otomatik DNA ekstraksiyonu için ilave sarf malzemeleri

- Sample Prep Cartridges, 8-well (kat. no. 997002)
- 8-Rod Covers (kat. no. 997004)
- Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (kat. no. 990332) ve Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (kat. no. 997024)
- Elution Microtubes CL (kat. no. 19588)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, kat. no. 72.693, www.sarstedt.com)

Ekipman

- Ksilen/Histolemon ve etanol için lam askısı ve 2 adet uyumlu lam banyosu
- PCR için özel mikrolitre pipetler* (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- 0,5 ml/1,5 ml reaksiyon tüpleri ve mikroplakalar için rotorlu masaüstü santrifüj (13.000-14.000 rpm hıza ulaşabilen)
- Masaüstü tüp karıştırıcı
- Real-time PCR cihazı: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ve ilgili spesifik materyal
- Rotor-Gene Q MDx yazılım sürümü 2.1.0 veya üzeri
- Biyofotometre
- Termomikser, ısıtmalı orbital inkübatör, ısıtma bloğu veya 56°C ve 90°C dahilinde inkübasyon sağlayabilen su banyosu

Otomatik saflaştırma için ilave ekipman

- QIASymphony SP cihazı
- QIASymphony SP yazılım sürümü 4.0 veya üzeri

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

Güvenlik Bilgileri

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrimiçi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve burada her QIAGEN kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilirsiniz.

Kullanılan saflaştırma kiti için güvenlik bilgisi açısından ilgili kit el kitabına bakın. Cihazlar ile ilgili güvenlik bilgisi için ilgili cihaz kullanım kılavuzuna bakın.

Genel önlemler

- Test, tamponlu formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) cerrahi kazıma doku numuneleriyle kullanım içindir.
- Tüm kimyasallar ve biyolojik materyaller potansiyel olarak tehlikeli maddedir. Numuneler ve örnekler potansiyel olarak bulaşıcıdır ve bunlara biyotehlikeli madde olarak davranılmalıdır.
- Örneği ve tahlil atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit için kullanılan reaktifler, en uygun biçimde seyreltilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için reaktifleri daha fazla seyreltmeyin. 25 µl'den daha az reaksiyon hacmi (reaksiyon karışımı ve örnek) ile işlem yapmayın.
- *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ile tedarik edilmiş tüm reaktifler, yalnızca aynı kit ile tedarik edilen diğer reaktiflerle birlikte kullanıma yöneliktir. Performansı etkileyebileceği için *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'ler arasında hiçbir reaktifi birbiri yerine kullanmayın.

-
- İlave uyarılar, önlemler ve prosedürler için Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı kullanım kılavuzuna başvurun.
 - İnkübasyonun ve sıcaklıkların değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir.
 - Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
 - Primerler ve prob karışımları ışığa maruz kalırsa değişikliğe uğrayabilir.
 - Karışımların pozitif kontrol reaktifi içinde bulunan sentetik maddelerle kontamine olmasını önlemek için çok dikkatli olun.
 - Şablon DNA'nın bozulmasına yol açabilecek DNase kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.
 - Reaksiyon karışımlarını kurmak ve şablonları eklemek için birbirinden ayrı pipetler kullanın.
 - Reaksiyon karışımlarını, şablonların eklenmesi için kullanılan alandan başka bir alanda karıştırın ve dağıtın.
 - Çalışma bitinceye kadar Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazını açmayın.
 - Çalışma bittikten sonra Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tüplerini açmayın.
 - Doğru örnek testi yapabilmek için yanlış örnek girişi, yükleme hatası ve pipetleme hatası gibi durumlara karşı dikkatli olunmalıdır.

Reaktifli Saklama ve Kullanma

Sevkiyat koşulları

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit kuru buz üzerinde sevk edilir. Teslimat esnasında *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'in herhangi bir bileşenin donmuş olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu, el kitabı veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz lütfen QIAGEN Teknik Servisleriyle veya yerel distribütörlerden biriyle iletişime geçin (bkz. www.qiagen.com).

Saklama

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit, teslim alınmasından hemen sonra -30 ila -15°C sabit sıcaklıkta bir dondurucuda saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

Stabilite

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit, belirtilen saklama koşullarında saklandığı zaman belirtilen son kullanma tarihine kadar stabil kalır.

Bir kez açıldığında, reaktifler -30°C ila -15°C sıcaklıkta orijinal ambalajı içinde saklanırsa ambalaj üzerindeki son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Tekrarlanan çözdürme ve dondurma işlemlerinden kaçınılmalıdır. En fazla 5 dondurma-çözdürme döngüsünü aşmayın.

Numune Kullanımı ve Saklama

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit, beyin kanseri hastası olan gönüllülerden alınan cerrahi kazımalardan elde edilen formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) tümör dokusundan ekstrakte edilen DNA örnekleri ile kullanıma yöneliktir. Tüm doku örneklerine tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.

- Doku numunesi, %4-10 oranında nötr tamponlu formalinde (neutral buffered formalin, NBF) fikse edilmelidir.
- Parafin bloğundan 10 µm'lik seri kesitler kesilmeli ve cam lamlar üzerine yerleştirilmelidir.
- Eğitimli bir görevli (örn. bir patolog), Hematoksin ve Eozin (H&E) ile boyanmış bitişik bir kesiti, tümör içeriği ve alan bakımından değerlendirmelidir. DNA ekstraksiyonu için seri kesitler kullanın.
- Yalnızca \geq %40 tümör içeriğine sahip kesitler test için uygundur.
- 50 mm² altında doku alanına sahip kesitlerde, toplam doku alanını en az 50 mm² (QIASymphony SP üzerinde otomatik ekstraksiyon için 100 mm²) değerine çıkarmak için yeterli sayıda kesitin işlenmesini öneririz.
- Tümör numunelerini, blokları, lamları ve ekstraksiyona hazır örnekleri kontrollü bir şekilde ve yerel prosedürlere uygun olarak etiketleyin, kullanın ve saklayın.
- FFPE bloklarını ve lamları oda sıcaklığında saklayın. Lamlar, *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ile kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonundan önce en fazla 4 hafta boyunca ortam sıcaklığında saklanabilir.
- Ekstraksiyondan sonra genomik DNA, 2–8°C'de 1 haftaya kadar veya -25 ila -15°C'de 8 haftaya kadar saklanabilir.


Prosedür

DNA ekstraksiyonu ve hazırlanması

Genomik DNA'nın, FFPE beyin kanseri numunelerinden hazırlanan örneklerden saflaştırılması için QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat. no. 56404) veya QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) kullanın.

Not: *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit yalnızca, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit veya QIASymphony DSP DNA Mini Kit ile kullanım için doğrulanmıştır. Başka bir DNA ekstraksiyon ürünü kullanmayın.

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'in Kullanımı

<p>DİKKAT</p> 	<p>QIAamp protokolüne uygulanması gereken aşağıdaki modifikasyonları lütfen dikkatlice okuyun.</p>
--	--


- Örneklerin, deparafinizasyon ve DNA ekstraksiyonu öncesinde hazırlanması için *QIAamp DNA FFPE Tissue El Kitabı* (QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook) belgesinde "Başlangıç materyali" başlığına ve bu el kitabında sayfa 17, başlığına bakın.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit yalnızca manuel kullanım içindir.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue El Kitabı* içinde açıklanan RNase adımı gerçekleştirilmelidir.
- QIAGEN Deparaffinization Solution kullanmayın. Deparafinizasyon için yalnızca "QIAamp DNA FFPE Tissue Kit kullanılırken lam deparafinizasyon prosedürü", alt içinde açıklanan ksilen/etanol yöntemini kullanın. Ksilen yerine Histolemon (ksilen ikamesi) kullanılabilir.
- Proteinaz K sindirimi 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.
- Örnekler, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit içindeki 30 µl elüsyon tamponu (Buffer ATE) içinde iki kez elüsyona tabi tutulmalıdır.

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit kullanılırken lam deparafinizasyon prosedürü

1. Lamları belirli bir lam askısına yerleştirin.
2. Lam askısını, 2 dakika boyunca ksilen veya Histolemon içeren bir lam banyosunda tutun. 2 veya 3 kez ileri geri hareket ettirerek karıştırın.
3. Askıyı, 2 dakika boyunca, etanol (%96-100) içeren ikinci bir lam banyosunda tutun. 2 veya 3 kez ileri geri hareket ettirerek karıştırın.
4. Lamları 15-37°C'de kurutun. Bu işlem birkaç dakika alır.
5. Her bir örnek için 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri etiketleyin ve her bir tüpe, 180 µl Buffer ATL (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'te bulunur) ekleyin.
6. Lamlarda bulunan doku kesitlerinin üzerine birkaç damla Buffer ATL damlatın (doku yüzeyini kaplamaya yetecek kadar).
7. Doku alanını steril bir neşterle kazıyın ve kazınan dokuyu, uygun etiketli mikrosantrifüj tüpüne ekleyin.
8. Her bir tüpe 20 µl proteinaz K (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'te bulunur) ekleyin ve vorteksleyerek karıştırın.
9. 1 saat boyunca 56°C'de inkübe edin.

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit protokolündeki 90°C'de inkübasyon adımı (Haziran 2012 tarihli *QIAamp DNA FFPE Tissue El Kitabı*, sayfa 13'te yer alan adım 12) ile devam edin.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit'in Kullanımı

DİKKAT 	QIASymphony SP Protokol Sayfasına uygulanması gereken aşağıdaki modifikasyonları lütfen dikkatlice okuyun: Tissue_LC_200_V7_DSP.
--	---

- Örneklerin deparafinizasyondan ve DNA ekstraksiyonundan önce hazırlanmasına ilişkin olarak sayfa 17, "Numune Kullanımı ve Saklama" başlığına bakın.
- QIASymphony SP Protokol Sayfasında açıklanan RNase adımı gerçekleştirilmelidir.
- QIAGEN Deparaffinization Solution kullanmayın. Deparafinizasyon için yalnızca QIASymphony DSP DNA Mini Kit kullanılırken lam deparafinizasyon prosedürü alt içinde açıklanan ksilen/etanol yöntemini kullanın. Ksilen yerine Histolemon (ksilen ikamesi) kullanılabilir.
- Proteinaz K sindirimi 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.
- Dokunmatik ekranda 50 µl elüsyon hacmi seçilmelidir.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit kullanılırken lam deparafinizasyon prosedürü

Deparafinizasyon işlemini, QIASymphony SP Protokol Sayfasında bulunan protokolden farklı olan aşağıdaki adımlar doğrultusunda gerçekleştirin: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Lamları belirli bir lam askısına yerleştirin.
2. Lam askısını, 2 dakika boyunca ksilen veya Histolemon içeren bir lam banyosunda tutun. 2 veya 3 kez ileri geri hareket ettirerek karıştırın.
3. Askıyı, 2 dakika boyunca, etanol (%96-100) içeren ikinci bir lam banyosunda tutun. 2 veya 3 kez ileri geri hareket ettirerek karıştırın.
4. Lamları 15-37°C'de kurutun. Bu işlem birkaç dakika alır.
5. Her bir örnek için 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri etiketleyin ve her bir tüpe, 220 µl Buffer ATL ekleyin.

6. Lamlarda bulunan doku kesitlerinin üzerine birkaç damla Buffer ATL damlatın (doku yüzeyini kaplamaya yetecek kadar).
7. Doku alanını steril bir neşterle kazıyın ve kazınan dokuyu, uygun etiketli mikrosantrifüj tüpüne ekleyin.
8. Her bir tüpe 20 µl proteinaz K (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'te bulunur) ekleyin ve vorteksleyerek karıştırın.

QIASymphony SP Protokol Sayfası: Tissue_LC_200_V7_DSP protokolündeki 56°C'de inkübasyon adımı (Nisan 2012 tarihli "Ksilen kullanılarak deparafinizasyon" protokolünde bulunan adım 12) ile devam edin. 1 saat boyunca 56°C'de inkübe edin.

Genomik DNA

Ekstraksiyondan sonra genomik DNA'yı, 1 haftaya kadar 2-8°C'de veya -25 ila -15°C'de 8 haftaya kadar saklayın.

DNA miktarı, örneğin 260 nm'deki optik yoğunluğu (Optical Density, OD) ölçülerek belirlenmelidir.

DNA'yı, pH değeri 8,0 olan 1x TE tamponunda, konsantrasyonu 5 ng/µl oluncaya kadar seyreltin.

PCR reaksiyonu 25 ng saflaştırılmış genomik DNA içeren örnekler için optimize edilmiştir.

Protokol: *IDH1/2* mutasyonlarının saptanması

Başlamadan önce önemli noktalar

- *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR Kit'in optimum şekilde kullanılması için örnekler 4'lü gruplar halinde gruplandırılmalıdır. Daha küçük gruplar, *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR Kit ile daha az örneğin test edilebileceği anlamına gelir.
- Tüm örneklerin, Tablo 2'de gösterildiği şekilde PCR çalışması başına bir kez ve Tablo 3 ve Şekil 2'de gösterilen yükleme bloğu ve rotor kurulumu ile test edilmesini öneririz.

Tablo 2. 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q MDx cihazlarında reaksiyon sayısı

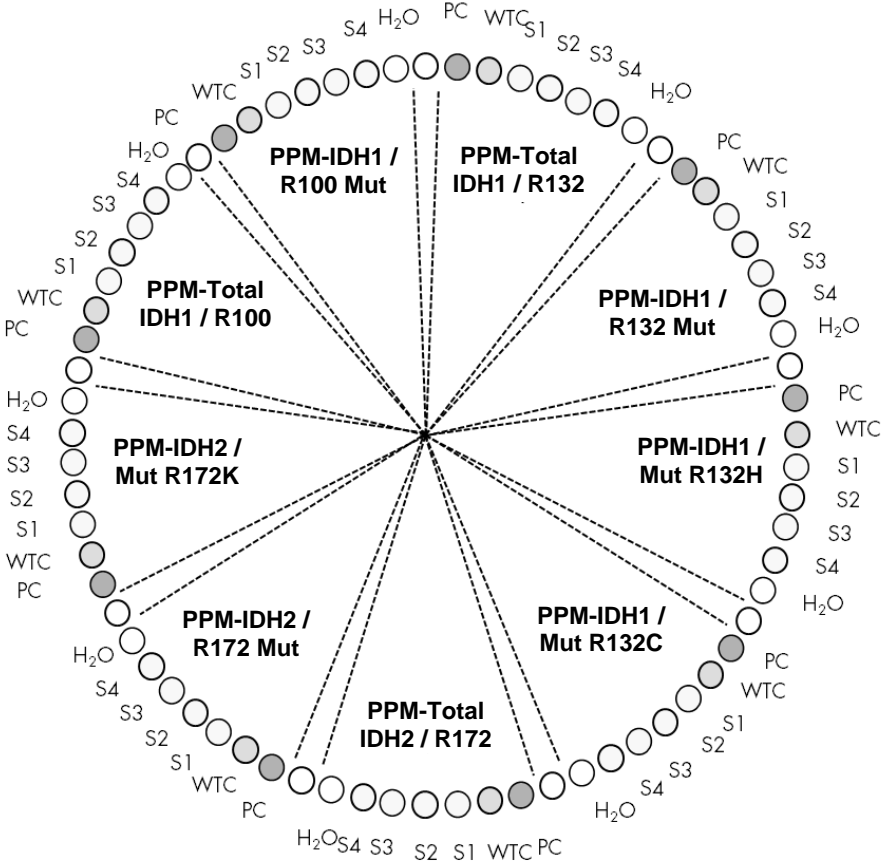
Örnekler	Reaksiyonlar
n DNA örneği	n x 1 reaksiyon
2 DNA kontrolü	2 reaksiyon: Pozitif ve WT kontroller, her biri PCR çalışması başına bir kez test edilir
Su kontrolü	1 reaksiyon

Tablo 3. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ile deney için önerilen yüklenme bloğu

Örnek	Total IDH1/ R132 Mut	IDH1/ R132H Mut	IDH1 Mut R132C	Total IDH2/ R172 Mut	IDH2/ R172 Mut	IDH2 Mut R172K	Total IDH1/ 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
Boş tüp	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* PC: Pozitif kontrol.

† WTC: Doğal fenotip kontrol.



Şekil 2. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ile deney için önerilen rotor kurulumu.

Önemli: Her zaman test edilecek örneği rotorun 1. konumuna yerleştirin. Aksi takdirde cihaz kalibrasyonu gerçekleştirmez ve yanlış floresans verileri elde edilir.

Prosedür

1. Tüm gerekli bileşenleri çözdürün ve buza yerleştirin.
2. Aşağıdaki PCR karışımlarını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Not: Tüm konsantrasyonlar nihai reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 4, 25 µl nihai reaksiyon hacmi elde etmek üzere hesaplanmış bir reaktif karışımı hazırlamaya yönelik pipetleme planını açıklamaktadır. Her bir PPM için, reaksiyon sayısına göre bir ön karışım hazırlanabilir. Pipetleme hatalarını telafi etmek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 4. PCR karışımlarının hazırlanması

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	Ön karışım: 7 + 1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
qPCR Master Karışım, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Nükleaz İçermeyen Su	6,5	52	–
Örnek veya kontrol† (adım 4'te eklenecek)	5	Her biri 5	–
Toplam hacim	25	Her biri 25	–

* Kit ile birlikte verilen PPM'lerin her biri ile bir adet olmak üzere 9 ön karışım hazırlayın.

† Pozitif kontrol, negatif kontrol veya su kontrolü.

3. Rotor-Gene tüpü başına 20 µl ön karışım çözeltisi dağıtın (Tablo 3).
4. Kantifiye edilecek materyalden (25 ng örnek genomik DNA veya kontrol) 5 µl miktarını karşılık gelen tüpe ekleyin (toplam hacim 25 µl; Tablo 3).
5. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.
6. Tüpleri, cihazla birlikte verilen adaptöre yerleştirin (Şekil 2).
Not: Kullanılmayan konumlar boş tüplerle doldurulmalıdır.
7. Dolu adaptörü Rotor-Gene Q MDx cihazına yükleyin.
8. Rotor-Gene Q MDx cihazını Tablo 5'te belirtildiği şekilde termal cycling (döngü) programıyla programlayın.

Tablo 5. Sıcaklık profili

Hold (Tutma)	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dk
Cycling (Döngü)	40 kez 15 saniye boyunca 95°C 60 saniye boyunca 60°C, Yeşil kanalında FAM™ floresans alımı ile: Single (Tek)

9. Auto-Gain Optimisation Setup (Otomatik Optimizasyon Sağlama Kurulumu) iletişim kutusunu açmak için New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusundaki **Gain Optimisation** (Optimizasyon Sağlama) ögesine tıklayın. Yeşil kanal için aralığı, **Min Reading** (Minimum Değer) için **2FI**, **Max Reading** (Maksimum Değer) için ise **10FI** aralığından belirleyin.
10. **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Optimizasyonu İlk Taramadan Önce Gerçekleştir) onay kutusunun işaretleyin ve Auto-Gain Optimisation Setup (Otomatik Optimizasyon Sağlama Kurulumu) iletişim kutusunu kapatın.
11. Isıl cycling programını başlatın.
12. Isıl cycling sona erdiğinde aşağıdakileri gerçekleştirin.
 - 12a. **Options > Crop Start Cycles** (Seçenekler > Ürün Başlangıç Döngüleri) ögelerini seçin. Varsa artefaktları ortadan kaldırmak için verileri **10** döngüsünden önce kaldırın.
 - 12b. Raporda "left threshold = 10.00" (sol eşik = 10,00) olarak belirtilen **Analysis > Cycling A. Green from 10** (Analiz > Döngü A. 10'dan itibaren Yeşil) ögelerini seçin.
 - 12c. Normalizasyon yöntemi olarak **Dynamic Tube** (Dinamik Tüp) ögesini seçin ve gürültü eđimini düzeltmek için **Slope Correct** (Eđim Düzeltme) ögesini seçin.
 - 12d. **Outlier Removal** (Aykırı Değer Çıkarma) seçeneğini **0%** (%0) olarak ayarlayın (NTC eşiğine karşılık gelen).
 - 12e. **Reaction Efficiency Threshold** (Reaksiyon Etkinliđi Eşiği) seçeneğini devre dışı olarak ayarlayın.
 - 12f. Eşiği **0.03** (0,03) değerinde tanımlayın.
 - 12g. Grafiđi doğrusal ölçeğe ayarlayın.
 - 12h. **Digital Filter:** (Dijital Filtre:) **Light** (Işık) ögesini seçin.

Sonuçların Yorumlanması

Su kontrolleri

Su kontrolleri (şablonsuz kontroller), tüm primerler ve prob karışımları için sıfır C_T değerleri vermelidir.

Bir su kontrolüyle pozitif bir C_T değeri elde edilmişse bu durum çapraz kontaminasyonla sonuçlanır. Bir çözüm bulmak için sayfa 36, "Sorun giderme kılavuzu" başlığına bakın.

Kontrollerin C_T değerlerini kullanarak kalite kontrolü

IDH1/2 doğal fenotip kontrolü (WTC) ve mutasyona uğramış *IDH1/2* pozitif kontrolü (Mut-PC), deneyin validasyonunu sağlar.

- C_t değeri yoksa kontrol, ilgili saptama tahlili için mutasyon-negatif olarak sınıflandırılır.
- C_t değerleri saptanırsa her kontrol için ΔC_T değerini aşağıdaki gibi hesaplayın

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132 Mut} = C_T \text{ IDH1/R132 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172 Mut} = C_T \text{ IDH2/R172 Mut} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100 Mut} = C_T \text{ IDH1/R100 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

ΔC_T değerleri, Tablo 6'da listelenen ilgili ΔC_T kesme değerlerinden düşük veya bu değerlere eşitse kontroller mutasyon pozitif olarak sınıflandırılır. ΔC_T değeri eşik değerinden yüksekse kontrol, değerlendirilen mutasyon tahlili için mutasyon-negatif olarak sınıflandırılır.

Tablo 6. Her mutasyon tahlili için eşik değerler

Mutasyon tahlili	Eşik değeri (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* doğal fenotip kontrol, her bir mutasyon tahlili için mutasyon negatif olarak saptanmalıdır (Tablo 7).
- Mutasyona uğramış *IDH1/2* pozitif kontrol, her bir mutasyon tahlili için mutasyon pozitif olarak saptanmalıdır (Tablo 7).

Bir koşulun veya her iki koşulun da karşılanmaması halinde deney tamamen reddedilir.

Tablo 7. Kontroller üzerinde çalışma doğrulaması örneği

Değer	Su (NTC)	IDH1/IDH2 WT Kontrol	IDH1/IDH2 Pozitif Kontrol
C _T Total IDH1/R132	Saptanmadı	25,45	23,95
C _T IDH1/R132 Mut	Saptanmadı	34,32	25,76
ΔC_T IDH1/R132 Mut	Saptanmadı	8,87	1,81
C _T Total IDH2/R172	Saptanmadı	25,42	24,93
C _T IDH2/R172 Mut	Saptanmadı	34,36	26,36
ΔC_T IDH2/R172 Mut	Saptanmadı	8,94	1,43
C _T Total IDH1/R100	Saptanmadı	26,30	24,69
C _T IDH1/R100 Mut	Saptanmadı	33,04	26,39
ΔC_T IDH1/R100 Mut	Saptanmadı	6,74	1,70
C _T IDH1 Mut R132H	Saptanmadı	35,20	26,48
ΔC_T IDH1 Mut R132H	Saptanmadı	9,75	2,53
C _T IDH1 Mut R132C	Saptanmadı	37,16	27,07
ΔC_T IDH1 Mut R132C	Saptanmadı	11,71	3,12
C _T IDH2 Mut R172K	Saptanmadı	Saptanmadı	27,97
ΔC_T IDH2 Mut R172K	Saptanmadı	Uygulanamaz	3,04

Örnek girdisi doğrulaması

Yorumlamadan önce bir örnek girdisi doğrulanmalıdır.

Bir örnek için her bir PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ ve $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) ile elde edilen C_T değeri, 32,00'dan düşük olmalıdır. $\geq 32,00$ olan $C_{T \text{ Total}}$ değerleri DNA'nın düşük kalitede olmasından kaynaklıdır. Örnek tekrar test edilmelidir. DNA miktarı halen yetersizse mümkünse daha fazla tümör dokusu alın (bkz. "Sorun giderme kılavuzu", sayfa 36).

Örnek sonuçları

IDH1/2 mutasyon saptaması

Her bir örnek için, her saptama mutasyon tahlilinden (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) elde edilen ΔC_T değerlerini aşağıdaki şekilde hesaplayın.

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} = C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$$

Bir mutasyon saptama tahlilinde C_t değeri yoksa örnek, değerlendirilen mutasyon için mutasyon-negatif olarak sınıflandırılmalıdır.

ΔC_T değeri, Tablo 8'de listelenen ilgili mutasyon saptama tahlilinin ΔC_T kesme değerinden düşük veya bu değere eşitse örnekler mutasyon pozitif olarak sınıflandırılır.

Tablo 8. Her mutasyon saptama tahlili için eşik değerler

Mutasyon tahlili	Eşik değer (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65

IDH1/2 mutasyon tanımlaması

Her bir örnek için, her tanımlama mutasyon tahlilinden (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K) elde edilen ΔC_T değerlerini aşağıdaki şekilde hesaplayın.

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

Bir mutasyon tanımlama tahlilinde C_t değeri yoksa örnek, mutasyon-negatif olarak sınıflandırılmalıdır.

ΔC_T değeri, Tablo 9'da listelenen ilgili mutasyon tanımlama tahlilinin ΔC_T kesme değerinden düşük veya bu değere eşitse örnek mutasyonu tanımlanır. Tablo 10 ve Tablo 11'de ΔC_T yorumlama örnekleri gösterilmektedir.

Tablo 9. Her mutasyon tanımlama tahlili için eşik değerler

Mutasyon tahlili	Eşik değer (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

Tablo 10. IDH1/2 mutasyon saptama örneği

Değer	Örnek 1	Örnek 2
C _T Total 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 Total 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 Total IDH1/R100	27,20	27,37
C _T IDH1/R100 Mut	33,83	33,76
ΔC_T IDH1/R100 Mut	6,63	6,39
Mutasyon saptama	Mutasyon saptanmadı	R132 mutasyonu saptandı

Tablo 11. IDH1/2 mutasyon tanımlama örneği

Değer	Örnek 1	Örnek 2
C _T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1 Mut R132H	33,82	28,27
Δ C _T IDH1 Mut R132H	7,43	1,95
C _T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1 Mut R132C	37,94	Saptanmadı
Δ C _T IDH1 Mut R132C	11,55	Uygulanamaz
C _T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C _T IDH2 Mut R172K	Saptanmadı	Saptanmadı
Δ C _T IDH2 Mut R172K	Uygulanamaz	Uygulanamaz
Mutasyon tanımlaması	Mutasyon saptanmadı	R132H için mutasyon saptandı

IDH1/2 mutasyonlarının yorumlanması

IDH1/2 mutasyon tipini, bir IDH1/2 mutasyonu yönünden pozitif olan örnekler için kullanılan prosedür Tablo 12'de gösterilmektedir. Tablo 13'te bir yorumlama örneği gösterilmektedir.

Tablo 12. Yorumlama kılavuzu

		Mutasyon tanımlaması			
		IDH1 Mut R132H saptandı	IDH1 Mut R132C saptandı	IDH2 Mut R172K saptandı	Mutasyon saptanmadı
Mutasyon saptama	R132 mutasyonu saptandı	R132H mutasyonu saptandı	R132C mutasyonu saptandı	–	R132 mutasyonu ancak R132H veya R132C değil
	R172 mutasyonu saptandı	–	–	R172K mutasyonu saptandı	R172 mutasyonu ancak R172K değil
	R100 mutasyonu saptandı	–	–	–	R100
	Mutasyon saptanmadı	Düşük R132H mutasyon içeriği saptandı (%1 ile %2 arasında)*	Düşük R132C mutasyon içeriği saptandı (%1 ile %4 arasında)*	Düşük R172K mutasyon içeriği saptandı (yaklaşık %1)*	Mutasyon saptanmadı

* Bu durumlar nadiren görülebilir ve tüm örnekler ile teknik kabul kriterleri, özellikle tümör hücresi içeriği bakımından kontrol edilmelidir. Tüm kriterlerin karşılanması durumunda örnek tekrar test edilmelidir.

Tablo 13. IDH1/2 mutasyon raporlama ve yorumlama örneği

	Örnek 1	Örnek 2
Mutasyon saptama	Mutasyon saptanmadı	R132 mutasyonu saptandı
Mutasyon tanımlaması	Mutasyon saptanmadı	R132H için mutasyon saptandı
Sonuçları yorumlama	Hiçbir mutasyon saptanmadı veya tanımlanmadı	R132H mutasyona uğradı

Not: Örnekte, ΔC_T eşik değerlerinin altında veya bu değere eşit olan 2 veya daha fazla ΔC_T değeri bulunuyorsa mutant durumu, eşik değer ile elde edilen ΔC_T değeri arasındaki farkı en yüksek olan mutasyona atanır. Tablo 14'teki örneğe bakın.

Tablo 14. Birden fazla pozitif sonuç durumunda yorumlama örneği

	Örnek 3	Örnek 4
ΔC_T IDH1/R132 Mut	1,24	5,24
ΔC_T eşik IDH1/R132 Mut	5,34	5,34
(ΔC_T eşik – ΔC_T) IDH1/R132 Mut	4,10	0,10
ΔC_T IDH2/R172 Mut	5,32	5,95
ΔC_T eşik IDH2/R172 Mut	6,42	6,42
(ΔC_T eşik – ΔC_T) IDH2/R172 Mut	1,10	0,47
Sonuçları yorumlama	R132 mutasyona uğradı	R172 mutasyona uğradı

Sorun giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için www.qiagen.com adresini ziyaret edin.

Yorum ve öneriler

DNA ekstraksiyonu sırasında tıkalı kolon

Tam olmayan lizis	Santrifüjleme işlemini tekrarlayın. Kalan lizat yeni bir kolona aktarılabilir. Ekstraksiyon çalışmasını daha az FFPE dokusuyla tekrarlayın.
-------------------	---

Ekstraksiyon elüatında yetersiz DNA

Yetersiz FFPE doku alanı	Ekstraksiyon çalışmasını daha fazla FFPE doku kesitiyle tekrarlayın.
--------------------------	--

IDH1/2 WT kontrolü saptanmadı

a) Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
b) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması	<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit, -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın; primerleri ve prob karışımlarını ışığa maruz bırakmayın. Bkz. "Reaktifli Saklama ve Kullanma", sayfa 16. En fazla 5 dondurma-çözdürme döngüsünü aşmayın.
c) <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit'in son kullanma süresi geçmiştir	Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit kullanın.

IDH1/2 pozitif kontrolü saptanmadı

- a) Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması
- therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın; primerleri ve prob karışımlarını ışığa maruz bırakmayın.
Bkz. "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 16.
En fazla 5 dondurma-çözdürme döngüsünü aşmayın.
- c) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'in son kullanma süresi geçmiştir
- Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit kullanın.

Sinyal yok, kontroller dahil

- a) Rotor-Gene Q MDx cihazının 1. konumunda reaksiyon tüpü yok
- Her zaman test edilecek örneği rotorun 1. konumuna yerleştirin.
Aksi takdirde cihaz kalibrasyonu gerçekleştirmez ve yanlış floresans verileri elde edilir.
- b) Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın.
- c) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması
- therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın; primerleri ve prob karışımlarını ışığa maruz bırakmayın.
Bkz. "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 16.
En fazla 5 dondurma-çözdürme döngüsünü aşmayın.
- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'in son kullanma süresi geçmiştir
- Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit kullanın.

- e) Seçilen saptama kanalı yanlış Saptama kanalını Cycling Green veya 530 nm/640 nm olarak ayarlayın.
- f) Veri edinme programı yok Döngü programını kontrol edin. Bkz. Tablo 5, sayfa 26.
- PCR programının her birleştirme segmentinin sonunda **Single** (Tek) edinim modunu seçin.

Floresans yoğunluğu değişiyor

Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş

Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.

PCR çalışmasını tekrarlayın.

Floresans yoğunluğu çok düşük

- a) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın; primerleri ve prob karışımlarını ışığa maruz bırakmayın. Bkz. "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 16.
- En fazla 5 dondurma-çözdürme döngüsünü aşmayın.
- b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'in son kullanma süresi geçmiştir Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit kullanın.
- c) Hedef DNA'nın miktarı çok düşük Başlatmadan önce her zaman DNA konsantrasyonunu kontrol edin. Bkz. "DNA ekstraksiyonu ve hazırlanması", sayfa 18.

Negatif kontrol (H₂O) pozitif sonuç veriyor

Çapraz kontaminasyon, reaktif kontaminasyonu, cihaz hatası, kuyu veya kapiller inversiyon ya da prob bozulması

Tüm kritik reaktifleri değiştirin veya yeni bir *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit kullanın.

Taşınma kontaminasyonunu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini yaygın olarak kabul edilen uygulamalar çerçevesinde kullanın.

Primerler ve prob karışımlarını ışıktan korunmuş olarak tutun.

Floresans eğrilerinde yanlış pozitif açısından kontrol yapın.

Reaksiyon kurulumunu kontrol edin. Bkz. "Protokol: IDH1/2 mutasyonlarının saptanması", sayfa 22.

Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit'in her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir. Analiz sertifikaları talep üzerine www.qiagen.com/support/ adresinden alınabilir.

Sınırlamalar

Kit, profesyonel kullanım için üretilmiştir.

Ürün yalnızca özel eğitim almış, moleküler biyoloji teknikleri konusunda öğrenim görmüş ve bu teknolojiyle ilgili bilgi sahibi olan personel tarafından kullanılmalıdır.

Bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır (bakınız "Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller", sayfa 12).

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihleri geçmiş bileşenleri kullanmayın.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit yalnızca, tamponlu formalinle fikse edilmiş parafine gömülü beyin dokusu için doğrulanmıştır.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit yalnızca, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit veya QIASymphony DSP DNA Mini Kit ile kullanım için doğrulanmıştır.

Sadece Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (PCR için) ve QIASymphony SP (örnek hazırlama için) doğrulanmıştır.

Bu ürünün etiket dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN'in yükümlülüğünü ortadan kaldırır

Laboratuvarlarında kullanılan ve QIAGEN performans çalışmalarının kapsamında olmayan herhangi bir prosedür için sistem performansını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Test, *IDH1* genine ait 132 ve 100 kodonlarında 7 mutasyon ve *IDH2* genine ait kodon 172'de 5 mutasyon saptamak üzere tasarlanmıştır. "Mutasyon saptanmadı" olarak bildirilen sonuçlara sahip örnekler, tahlilin saptamadığı *IDH1* veya *IDH2* mutasyonlarını barındırabilir.

Mutasyonların saptanması, örneğin bütünlüğüne, tümör içeriğine ve numune içinde bulunan çoğaltılabilir DNA'ya bağlıdır.

Ürün ile elde edilmiş herhangi bir tanı amaçlı sonucun diğer klinik veya laboratuvar bulguları ile birlikte yorumlanması gerekir.

Performans Özellikleri

Kör sınırı (LOB)

Kör sınırı (Limit of Blank, LOB), negatif örnekler ile (FFPE normal beyin, 8 örnek, 64 ölçüm/lot, 2 lot) belirlenmiştir (CLSI/NCCLS EP17-A kılavuzu; 14 doğrultusunda).

LOB sonuçları Tablo 15'te sunulmaktadır.

Tablo 15. Kör sınırı (LOB)

Tahlil	LOB	Nihai LOB
R132 Mut	Doğrulama lotu 1: 6,57 Doğrulama lotu 2: 6,32	6,32
R132H Mut	Doğrulama lotu 1: 7,91 Doğrulama lotu 2: 8,22	7,91
R132C Mut	Doğrulama lotu 1: 8,04 Doğrulama lotu 2: 8,20	8,04
R172 Mut	Doğrulama lotu 1: 7,74 Doğrulama lotu 2: 7,59	7,59
R172K Mut	Doğrulama lotu 1: 9,93 Doğrulama lotu 2: 10,58	9,93
R100 Mut	Doğrulama lotu 1: 6,52 Doğrulama lotu 2: 5,19	5,17

Tespit sınırı (LOD)

Tespit sınırı (Limit of Detection, LOD veya analitik duyarlılık), CLSI/NCCLS EP17-A kılavuzunda (14) tanımlanan "precision profile approach" (kesinlik profili yaklaşımı) baz alınarak belirlenmiştir. Mutasyon başına beş adet düşük pozitif örnek (glioma doğal fenotip DNA'sı içine eklenen plazmid DNA'sı) kullanılmıştır (mutasyon tipi ve mutasyon yüzdesi başına 30 ila 110 ölçüm).

LOD sonuçları Tablo 16'da sunulmaktadır.

Tablo 16. Tespit sınırı (LOD)

Tahlil	Mutasyonlar	LOD	Tahlil eşik değeri	Duyarlılık (%)
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

ΔC_T değeri LOD'nin altında veya bu değere eşitse bir mutasyon saptanır.

DNA girdisinin etkisi

DNA, 4 farklı glioma tümör örneğinden ekstrakte edilmiştir: 2'si doğal fenotip *IDH1/2* ile ve 2'si *IDH1* R132H (395G>A) mutasyonuna sahip olan.

DNA girdisinin kalitatif sonuçlar üzerindeki etkisini değerlendirmek için üç farklı DNA miktarı (protokol için önerilen de dahil) test edilmiştir. Sonuçlar, DNA girdisinin kalitatif sonuçlar üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, önerilen girdinin altında DNA girdilerinde (<25 ng DNA) daha fazla teknik hata (C_T Total QC hataları) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, testi çalıştırmak için 5 µl hacimde 25 ng DNA girdisi önerilmektedir.

Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

Kesinlik çalışması, 40 defa iki tekrarlı olarak (n = 80 ölçüm) test edilen 4 farklı örnek (doğal fenotipi (Wild-Type, WT) temsil eden glioma doğal fenotip DNA içine eklenen plazmid DNA, mutant ve eşik örneği) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Standart sapmalar (Standard Deviations, SD) ve varyasyon katsayıları (Coefficients of Variation, CV) Tablo 17'de sunulmaktadır.

Tablo 17. Kesinlik sonuçları

Tahlil	Örnek	Ortalama ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	$CV_{Total}(\%)^\ddagger$	Doğru sonuç oranı
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: Tekrarlanabilirlik.

† Run: Çalışmalar arası yeniden üretilebilirlik.

‡ Total: Toplam kesinlik (cihazlar arası, operatörler arası ve lotlar arası dahil).

Tablonun devamı bir sonraki sayfada

Tablo 17. Kesinlik sonuçları (devamı)

Tahlil	Örnek	Ortalama ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV_{Total} (%) [‡]	Doğru sonuç oranı
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: Tekrarlanabilirlik.

† Run: Çalışmalar arası yeniden üretilebilirlik.

‡ Total: Toplam kesinlik (cihazlar arası, operatörler arası ve lotlar arası dahil).

Yöntem karşılaştırması

IDH1/R132H'nin saptanması için immünohistokimya (IHC) ile karşılaştırma.

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit ile IHC tarafından (Anti-human *IDH1R132H* antikor klonu H09, DIANOVA) değerlendirilen mutasyon durumları arasındaki uyumu ortaya koymak adına bir çalışma yürütülmüştür.

Toplam 103 klinik glioma örneği seçilmiştir. En eski blok 10 yıllıktır.

Tüm örnekler, hem *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*'in hem de IHC'nin kalite kontrollerinden geçmiştir.

Sonuçlar, %100 pozitif uyumluluk oranı (positive percentage agreement, PPA), %98 negatif uyumluluk oranı (negative percent agreement, NPA) ve %99 genel uyum (overall agreement, OA) sergilemiştir (Tablo 18).

Tablo 18. theascreen RGQ PCR Kit ile IHC arasındaki uyumun analizi

Uyum ölçütü	Sıklık (%)	%95 Güven aralığı
PPA	45/45 (%100)	[92;100]
NPA	57/58 (%98)	[91;100]
OA	102/103 (%99)	[96;100]

İki yönlü sekanslama ile karşılaştırma

theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit ile iki yönlü sekanslama ile değerlendirilen mutasyon durumları arasındaki uyumu ortaya koymak adına bir çalışma yürütülmüştür.

Glioma hastalarından toplam 103 klinik tümör örneği seçilmiştir. En eski blok 10 yıllıktır.

103 örneğin tümü, *theascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit için kalite kontrollerinden geçmiş ve 101 örnek, iki yönlü sekanslama için sonuç vermiştir.

Sonuçlar, %100 pozitif uyumluluk oranı (positive percentage agreement, PPA), %92 negatif uyumluluk oranı (negative percent agreement, NPA) ve %96 genel uyum (overall agreement, OA) sergilemiştir (Tablo 19 ve 20).

Tablo 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit / iki yönlü sekanslama

		Sanger iki yönlü sekanslaması				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
<i>therascreen</i> 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, örneğin bir R132 mutasyonu için mutasyona uğramış olduğu ancak mutasyonun R132H veya R132C olmadığı anlamına gelir.

† R172, örneğin bir R172 mutasyonu için mutasyona uğramış olduğu ancak mutasyonun R172K olmadığı anlamına gelir.

Tablo 20. İki yönlü sekanslama ile uyum analizi

Uyum ölçütü	Sıklık (%)	%95 Güven aralığı
PPA	50/50 (%100)	[93;100]
NPA	47/51 (%92)	[81;97]
OA	97/101 (%96)	[90;98]

Referanslar

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).

Semboller

Aşağıdaki tablo etiketlerde veya bu belgede görülebilecek sembolleri tanımlamaktadır.



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son kullanma tarihi



İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası (yani bileşen etiketlemesi)



Bileşenler (örn. ürüne dahil edilenlerin listesi)



İçindekiler (içerik)



Sayı (ör. flakon, şişe)

Rn

R harfi El Kitabı revizyonunu, n harfi ise revizyon numarasını temsil eder



Küresel Ticaret Parça Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatlarına bakın



Dikkat

Sipariş Bilgileri

Ürün	İçerik	Kat. no.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	20 reaksiyon için: 9 Primer ve Prob Karışımı, WT Kontrol, Pozitif Kontrol, Master Karışım, Nükleaz İçermeyen Su	873011
Rotor-Gene Q MDx ve aksesuarları		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) ve HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 250 strip	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit - genomik DNA'nın parafine gömülü dokulardan saflaştırılması için		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNA hazırlığı için: 50 QIAamp MinElute® Column, Proteinaz K, Tamponlar, Collection Tubes (2 ml)	56404
QIASymphony DSP DNA Mini Kit - DNA'nın 1-96 örnekten otomatik olarak saflaştırılması için		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	192 hazırlık için, her biri 200 µl: 2 reaktif kartuşu ve enzim askıları ve aksesuarları içerir	937236

Ürün	İçerik	Kat. no.
QIASymphony SP ve aksesuarları		
QIASymphony SP System	QIASymphony örnek hazırlama modülü: kurulum ve eğitim, 1 yıllık parça ve işçilik garantisi içerir	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony örnek hazırlama modülü: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8 kuyulu örnek hazırlama kartuşları, QIASymphony SP ile kullanım için	997002
8-Rod Covers (144)	QIASymphony SP ile kullanım için 8-Rod Cover'lar	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, askılanmış; (8 x 128). QIAcube ve QIASymphony SP/AS cihazlarıyla kullanım içindir	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Disposable Filter-Tips, askılanmış; (8 x 128). QIASymphony SP/AS cihazları ile kullanım için	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Steril olmayan polipropilen tüpler (0,85 ml maksimum kapasite, 0,7 ml'den az saklama kapasitesi, 0,4 ml elüsyon kapasitesi); 96'lık raflarda 2304 adet; kapak şeritleri dahil	19588
Reaktifler		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 birim/ml, solüsyon)	19101
Buffer ATL (200 ml)	1000 hazırlama için 200 ml Doku Lizis Tamponu	19076

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne özgü ret beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Belge Revizyon GemiŖi

Tarih	DeęiŖiklikler
R5, Temmuz 2020	<p>Ct değeri saptamasına göre kontroller ve örneklerin sınıflandırılmasıyla ilgili bilgileri dahil etmek için Sonuçların Yorumlanması bölümü revize edildi</p> <p>C_T IDH Mut R172K ve ΔC_T IDH2 Mut R172K için Tablo 7'deki IDH1/IDH2 WT Kontrol sütünü revize edildi</p> <p>C_T IDH1 Mut R132C, ΔC_T IDH1 Mut R132C, C_T IDH2 Mut R172K, ve ΔC_T IDH2 Mut R172K için Tablo 11'deki örnek 1 ve örnek 2 stnları revize edildi</p>

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımını herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmiş veya optimize edilmiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenden dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. www.qiagen.com.

Bu ürün in vitro tanı amaçlı kullanım içindir. QIAGEN ürünleri tekrar satılamaz, yeniden satış için değiştirilemez veya QIAGEN'in yazılı izni olmadan ticari ürünler üretmek üzere kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgiler önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilecek herhangi bir hata için hiçbir sorumluluk kabul etmez. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. Hiçbir durumda QIAGEN size karşı bu belgenin kullanımıyla ilgili veya bundan doğan rastantsal, özel, çoklu veya dolaylı zarar için yükümlü olmaz.

QIAGEN ürünleri belirtilen özellikleri karşılamak üzere garanti edilmiştir. QIAGEN'in yegane yükümlülüğü ve müşterinin yegane telafi hakkı ürünlerin garanti edildiği şekilde uygulanmaması durumunda ürünlerin ücretsiz olarak değiştirilmesi ile sınırlıdır.

Bu ürünü satın alan kullanıcı, insana yönelik in vitro tanı amacıyla tanınal hizmetlerden yararlanabilir. Alımdan kazanılan bu özel kullanım hakkı dışında genel patent veya hiçbir türde başka lisans burada verilmemektedir.

IDH1/2 mutasyonları ve kullanımları, Avrupa patent uygulamaları EP2326735 ve EP2546365, ABD patent uygulamaları US2011229479 ve US2012202207 ile yabancı karşılıkları dahil patent haklarıyla korunmaktadır.

Bu ürünün satın alınması *IDH1/2* hedefli ilaçlar için klinik çalışmalarda kullanılması açısından herhangi bir hak vermez. QIAGEN bu tür kullanımlar için spesifik lisans programları geliştirir. Lütfen hukuk bölümümüzle irtibat kurun: idhlicenses@qiagen.com.

Ticari markalar: QIAGEN®, QIAamp®, QIASymphony® MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM7™ (Life Technologies Corporation); Histolemon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

