

ipsogen[®] BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR rinkinio vadovas



1 versija

IVD

Quantitative in vitro diagnostics

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q“, „Applied Biosystems[®]“, „ABI PRISM[®]“ ir „LightCycler[®]“ prietaisais



REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
VOKIETIJA

R3 **MAT** 1072509LT



„QIAGEN Sample and Assay Technologies“

Bendrovė QIAGEN yra pirmaujanti novatoriškų mėginių ėmimo ir tyrimo technologijų, užtikrinančių bet kokio biologinio mėginio turinio išskyrimą ir aptikimą, tiekėja. Mūsų pažangūs, aukštos kokybės produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio paėmimo iki gauto rezultato.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų išskyrimas
- Nukleorūgštis ir baltymų tyrimai
- Mikro RNR ir RNR interferencijų tyrinėjimas
- Mėginių ėmimo ir tyrimo technologijų automatizavimas

Mūsų misija yra padėti jums pasiekti išskirtinės sėkmės ir laimėjimų. Daugiau informacijos rasite apsilankę [**www.qiagen.com**](http://www.qiagen.com).

Turinys

Paskirtis	5
Santrauka ir paaiškinimas	5
CML (lėtinės mieloidinės leukemijos) aprašymas	5
Ligos stebėjimas	5
Procedūros principas	7
Pateiktos medžiagos	9
Rinkinio sudėtis	9
Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos	10
Įspėjimai ir atsargumo priemonės	11
* Užtikrinkite, kad prietaisai būtų patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.	11
Bendrosios atsargumo priemonės	12
Reagento saugojimas ir naudojimas	12
Mėginio naudojimas ir saugojimas	13
Procedūra	13
Mėginio RNR paruošimas	13
Protokolai	
■ Reversinė transkripcija naudojant „SuperScript III Reverse Transcriptase“	13
■ qPCR ant „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ arba „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ prietaisų su 72 mėgintuvėlių rotoriumi	17
■ qPCR „Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System“, „ABI PRISM 7900HT SDS“ ir „LightCycler 480“ prietaisuose	21
■ qPCR „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisuose	27
Rezultatų aiškinimas	31
Duomenų analizės principas	31
Standartinės kreivės ir kokybės kriterijai, taikomi neapdorotiems duomenims	32
Normalizuotas kopijos numeris (NCN)	34
IS konversija ir MMR ataskaitos	35
Kokybės kriterijų santrauka	36
Trikčių šalinimas	36
Kokybės kontrolė	37

Apribojimai	37
Eksploatavimo charakteristikos	37
Tuščios vietos ir aptikimo ribos	38
Nuokrypis nuo tiesiškumo	38
Jvestys	38
Tikslumas	38
Atitikimo tyrimas: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienos plazmidės (IRMM) standartas, palyginti su ipsogen vienos plazmidės (QIAGEN) standartu	39
Nuorodos	41
Simboliai	42
Kontaktinė informacija	42
Užsakymo informacija	43

Paskirtis

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR rinkinys yra skirtas BCR-ABL p210 b2a2 arba b3a2 transkriptų kiekio nustatymui kaulų čiulpų arba periferinio kraujo mėginiuose iš pacientų, sergančių ūmia limfoblastine leukemija (ALL) arba lėtine mieloidine leukemija (CML), kuriems anksčiau buvo diagnozuotas BCR-ABL Mbcr hibridinio geno (FG) atvejis. Testas yra skirtas įvertinti molekulinės reakcijos lygį; rezultatai gali būti naudojami minimaliam likutiniam ligos sekimui.

Santrauka ir paaiškinimas

CML (lėtinės mieloidinės leukemijos) aprašymas

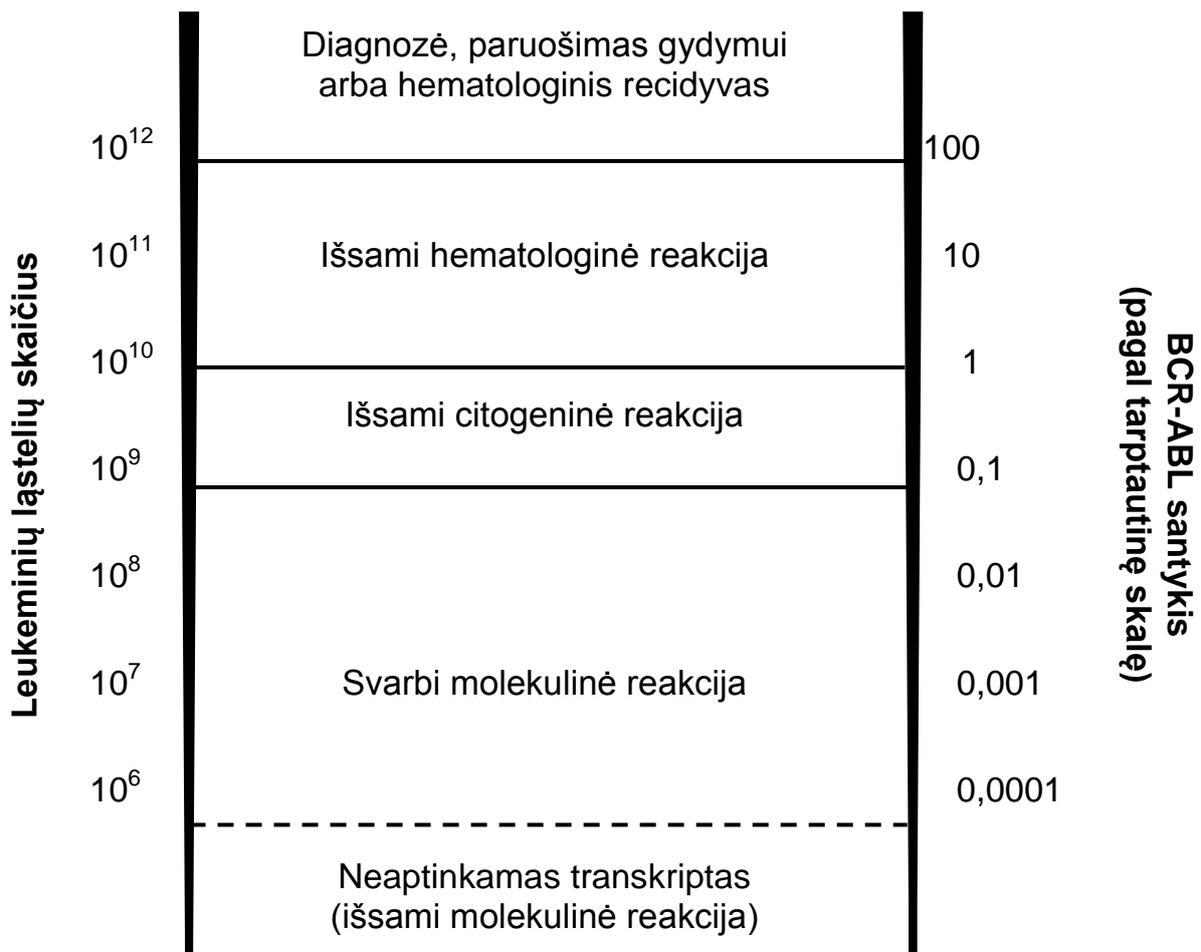
CML priklauso mieloproliferacinių neoplazmų grupei ir >90 % atvejų yra charakterizuojama Filadelfijos chromosomos (Ph chromosomos) buvimu.

Ši chromosoma susidaro dėl 9 ir 22 chromosomų ilgųjų pečių translokacijos, t(9;22), BCR (breakpoint cluster region) genas patenka į 22 chromosomą, o c-ABL onkogenas pereina iš 9 chromosomos. Atitinkamas hibridinis genas, BCR-ABL, transkribuojamas į 8,5 kb mRNR, su 2 susijungimo variantais b2a2 (40 % atvejų) ir b3a2 (55 % atvejų). Jis užkoduoja chimerinį baltymą p210 su padidėjusiu tirozino kinazės aktyvumu. b2a3 ir b3a3 transkriptai sudaro mažiau kaip 5 % atvejų. Ph chromosoma taip pat gali būti aptinkama 35 % VISŲ suaugusių pacientų.

CML pasitaiko maždaug 1-2 atvejais iš 100.000 per metus, o CML priskiriama 20 % suaugusių leukemijos atvejų. Kliniškai tai nustatoma dėl mieloidinių ląstelių pertekliaus, kurios išsiskiria ir veikia normaliai. CML pacientai bus diagnozuojami 90-95 % atvejų lėtinėje arba stabilioje ligos fazėje. Istoriskai, vidutiniškai nuo 4 iki 6 metų laikotarpiu, pacientai perėjo į pagreitintą fazę, sukeliančią blastinę krizę ir ūmią leukemiją, kuri visada baigiasi mirtimi. Imatinibo ir, dar vėliau, antrosios kartos tirozino kinazės inhibitorių (TKI) pasirodymas dramatiškai pakeitė natūralią ligos eigą: dabar daugeliui pacientų pasireiškia remisija ir jiems priklauso ilgalaikė priežiūra bei ligos stebėjimas.

Ligos stebėjimas

Iki šios dienos CML terapijos tikslas yra pasiekti 100 % išgyvenamumą ir Ph chromosomos neigiamumą. Todėl ligos stebėjimas yra esminė priemonė, vertinant reakciją į gydymą ir aptinkant kiekvieno atskiro paciento ankstyvą recidyvą. Taikant TKI terapiją paprastai pacientai progresuoja nuo hematologinės iki citogenetinės, po to molekulinės remisijos, atitinkančios sumažėjusį leukeminių ląstelių ir BCR-ABL transkriptų skaičių, kaip pavaizduota žemiau pateiktame 1 paveikslėlyje.



1 pav. Pritaikyta pagal 1 nuorodą.

Standartinis būdas vertinti auglių kiekį pacientams su CML yra įprasta kaulų čiulpų (BM) metafazės citogenetinė analizė (G dažymas). Citogenetinė reakcija yra vertinama su ne mažiau kaip 20 čiulpų metafazių. Citogenetinės reakcijos lygis vertinamas pagal Ph chromosomų teigiamų metafazių procentinę reikšmę (žr. 1 lentelę, 2 nuorodą). Tačiau šis įvertinimas priklausys nuo laboratorijos veiklos ir yra mažo jautrumo, 5 % kai analizuojama 20 metafazių.

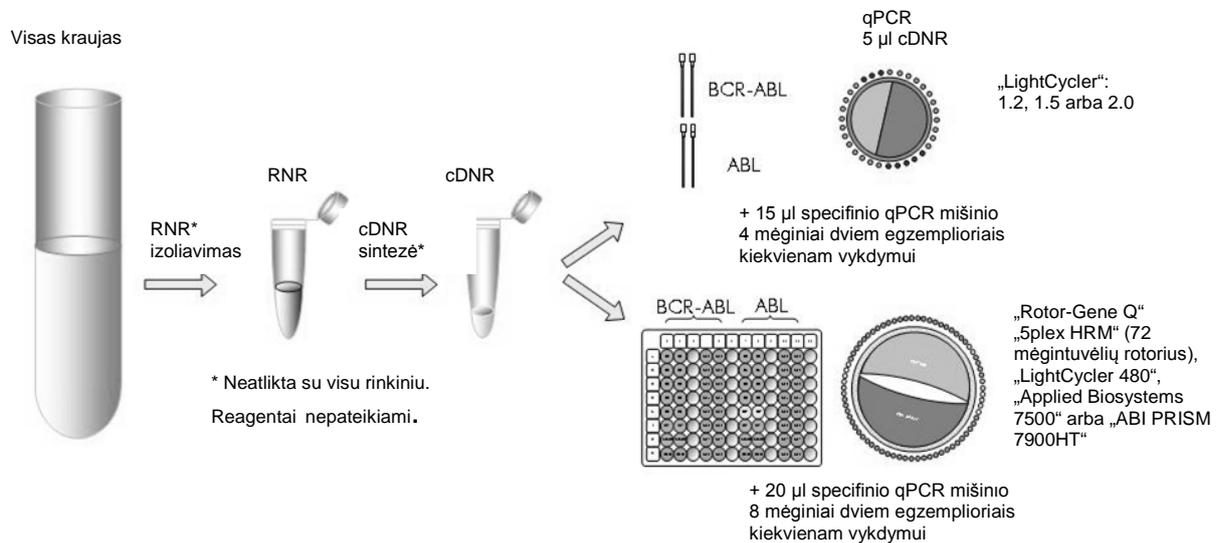
Tikrojo laiko kiekinė polimerazinė grandininė reakcija (qPCR), nustatanti BCR-ABL MbcR mRNR kiekį periferinio kraujo (PB) mėginiuose, dabar yra ligos stebėjimo technikos dalis gydant CML. Šis būdas yra mažiau invazinis, nei įprasta kaulų čiulpų metafazės citogenetika, ir jautresnis.

CML ligos stebėjimo rekomendacijos neseniai taip pat buvo atnaujintos, įtraukiant naujus klinikinius įrodymus iš klinikinių bandymų, o taip pat atnaujintus ligos stebėjimo tikslus ir priemones. Naujausias reakcijos apibrėžties ir imatinibą vartojančių pacientų stebėjimo rekomendacijas pateikia ELN ekspertai (2).

Techniniu požiūriu tarptautiniai ekspertai įdėjo pastangų, harmonizuodami BCR-ABL MbcR testavimą ir ataskaitų teikimą (3-5). Papildomai remiant PSO

nesenai buvo patvirtintas etaloninis skydas, kad būtų galima supaprastinti BCR-ABL kiekio nustatymo standartizavimą (6).

Procedūros principas



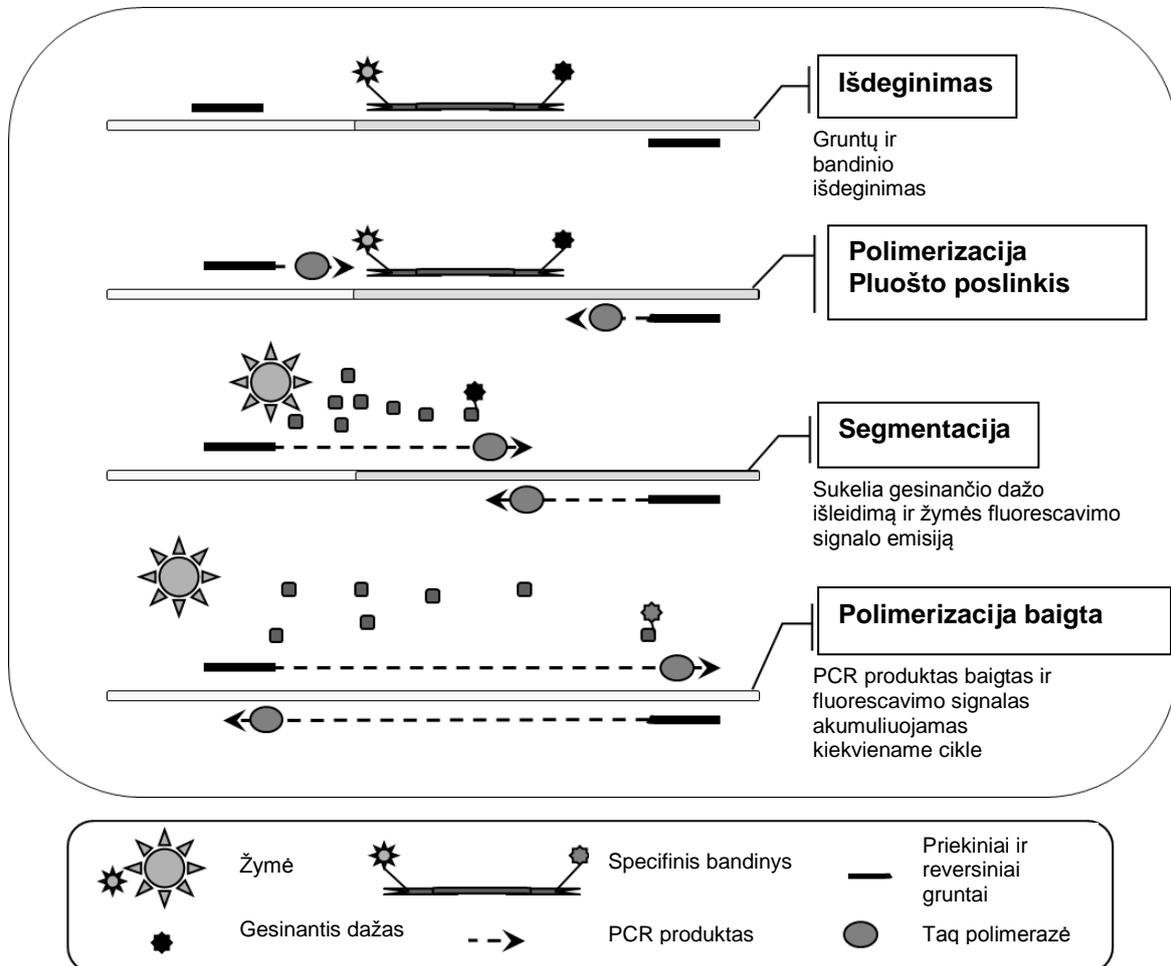
2 pav. RNR izoliavimas, cDNR sintezė ir qPCR.

qPCR leidžia tiksliai nustatyti PCR produktų kiekį PCR amplifikavimo proceso eksponentinės fazės metu. Kiekiniai PCR duomenys gali būti greitai gauti, be paskesnio PCR apdorojimo, realiuoju laiku aptinkant fluorescencinius signalus PCR ciklą metu ir (arba) po jų, tokiu būdu drastiškai sumažinant PCR produkto užteršimo riziką. Šiuo metu naudojami 3 pagrindiniai qPCR technikos tipai: qPCR analizė naudojant „SYBR[®] Green I Dye“, qPCR analizė naudojant hidrolizės bandinius, ir qPCR analizė naudojant hibridizavimo bandinius.

Šiame tyrime naudojamas qPCR dvigubo dažymo oligonukleotidų hidrolizės principas. PCR metu priekiniai ir reversiniai gruntai hibridizuojami pagal specifinę seką. Dvigubo dažymo oligonukleoditas yra tame pačiame mišinyje. Šis bandinys, kurį sudaro oligonukleotidas, pažymėtas 5' žymės dažais, ir žemiau, 3' gesinantis dažas, hibridizuojasi su tiksline seka PCR produkte. qPCR analizė su hidrolizės bandiniais atliekama pasinaudojant *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNR polimerazės 5'→3' egzonukleazės veikimu. Kai bandinys yra nepalietas, dėl žymės dažo artumo gesinančiam dažui panaikinamas žymės fluorescavimas, visų pirma dėl Förster tipo energijos perdavimo.

PCR metu, jeigu yra dominantis tikslas, bandinys specifiškai išdeginamas tarp priekinio ir reversinio grunto vietų. 5'→3' egzonukleazinė DNR polimerazės veikla skelia bandinį į žymę ir gesinimą tik tuo atveju, jeigu bandinys hibridizuojasi su tikslu. Paskui bandinio fragmentai perkelti iš tikslo ir pluošto polimerizacija tęsiama. Bandinio 3' galas užblokuojamas, siekiant užkirsti kelią bandinio plėtimuisi PCR metu (3 pav.). Šis procesas vyksta kiekvieno ciklo metu ir nekludo eksponentinei produkto akumuliacijai.

Fluorescavimo signalo padidėjimas aptinkamas tik jeigu tikslinė seka papildo bandinį ir tokiu būdu amplifikuojamas PCR metu. Dėl šių reikalavimų, nespecifinis amplifikavimas neaptinkamas. Tokiu būdu fluorescavimo padidėjimas yra tiesiogiai proporcingas tiksliniam amplifikavimui PCR metu.



3 pav. Reakcijos principas. Visa RNR yra reversiškai transkribuojamas, o sugeneruota cDNR yra amplifikuojama PCR naudojant porą specifinių gruntų ir specifinį vidinį dvigubo dažymo bandinį (FAM™–TAMRA™). Bandinys susiriša su amplikonu kiekvieno PCR išdeginimo žingsnio metu. Kai *Taq* išplinta iš prie amplikono prisirišusio bandinio, jis perkelia bandinio 5' galą, kuris po to yra sumažinamas dėl *Taq* DNR polimerazės 5'→3' egzozonukleazės veiklos. Segmentacija tęsiama, kol likusi bandinio dalis nusilydo nuo amplikono. Šio proceso metu į tirpalą išleidžiamas fluoroforas ir gesinantis dažas, juos erdviškai atskiriant ir dėl to padidinant fluorescavimą iš FAM ir sumažinant fluorescavimą iš TAMRA.

Pateiktos medžiagos

Rinkinio sudėtis

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
Katalogo Nr.		670723
Reakcijų skaičius		24
High Positive RNA Control (Itin teigiama RNR kontrolė)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibratorius)		3 x 10 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR ir ABL vieno plazmido standartinis skiedimas) (10^1 kopijos / 5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR ir ABL vieno plazmido standartinis skiedimas) (10^2 kopijos / 5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR ir ABL vieno plazmido standartinis skiedimas) (10^3 kopijos / 5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR ir ABL vieno plazmido standartinis skiedimas) (10^4 kopijos / 5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR ir ABL vieno plazmido standartinis skiedimas) (10^5 kopijos / 5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (MbcR ir ABL vieno plazmido standartinis skiedimas) (10^6 kopijos / 5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL* (Gruntų ir bandinio mišinys ABL)	PPC-ABL 25x	110 µl

* Specifinių reversinių ir priekinių gruntų mišinys, skirtas ABL kontroliniam genui, ir specifinis FAM–TAMRA bandinys.

Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene [†] (Gruntų ir bandinio mišinys BCR-ABL Mbc hibridinis genas) [□]	PPF-Mbc 25x	110 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit Handbook</i> (anglų k.)		1

[†] Specifinių reversinių ir priekinių gruntų mišinys, skirtas BCR-ABL Mbc hibridiniam genui, ir specifinis FAM–TAMRA bandinys.

Pastaba: prieš naudodami atsargiai sumaišykite ir trumpai centrifuguokite standartus (SP1–SP6) ir grunto bei bandinio mišinius.

Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos

Dirbdami su chemikalais visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS), kuriuos gausite iš gaminio tiekėjo.

Reagentai

- Reagentai RNR gryninimui: patvirtinti reagentai: „RNeasy[®] Midi Kit“ (QIAGEN, kat. nr. 75144) arba „TRIzol[®] Reagent“ („Thermo Fisher Scientific Inc.“, kat. nr. 15596018 arba 15596026)
- PGR kategorijos vanduo be nukleazės
- Buferis ir *Taq* DNR polimerazė: patvirtinti reagentai: „*Premix Ex Taq*[™] DNA Polymerase“ („Perfect Real Time“) („TaKaRa“, kat. nr. RR039A) ir „*Premix Ex Taq* DNA Polymerase“ („Probe qPCR“) („TaKaRa“, kat. nr. RR390A). Abiejų sudėtyje yra 2× *Taq* DNR polimerazės pagrindiniai mišiniai ir ROX[™] etaloniniai dažai
- Reagentai reversinei transkripcijai: patvirtinti reagentai: *ipsogen* RT rinkinys, kurio sudėtyje yra reversinė transkriptazė, 5× RT buferis, 100 mM DTT, RNase inhibitorius, atsitiktinai parinktas gruntas ir dNTPs (QIAGEN, kat. nr. 679923); arba „SuperScript[®] III Reverse Transcriptase“, kurios sudėtyje yra reversinė transkriptazė, 5× pirmosios gijos buferis ir 100 mM DTT („Thermo Fisher Scientific Inc.“, kat. nr. 18080044)
- Naudojant „Superscript III“, reikalingi šie papildomi reagentai:
 - RNase inhibitorius: patvirtintas reagentas: „RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor“ („Thermo Fisher Scientific Inc.“, kat. nr. 10777019)
 - dNTP rinkinys, PGR lygio
 - Atsitiktinai parinktas devynių monomerų polimeras

Vartojimo reikmenys

- Atsparūs aerosoliui ir sterilūs PCR pipetės antgaliai be nukleazės su hidrofobiniais filtrais
- 0,5 ml arba 0,2 ml PCR mėgintuvėliai be RNase ir DNase
- Ledas

Įranga

- Mikrolitrinės pipetės*, skirtos PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl)
- Stalinė centrifuga* su rotoriumi 0,2 ml / 0,5 ml reakcijų mėgintuvėliais (galinti pasiekti 10.000 aps./min.)
- Tikrojo laiko PCR prietaisas:* „Rotor-Gene Q 5plex HRM ar kitas „RotorGene“ prietaisas; „LightCycler“ 1.2, 1.5, 2.0 arba 480; „Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System“; „ABI PRISM 7900HT SDS“; ir susijusios specifinės medžiagos
- Termocikleris* arba vandens vonelė* (reversinės transkripcijos žingsnis)

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta naudoti diagnostikai *in vitro*

Dirbdami su chemikalais visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami žiniatinklyje patogiu ir kompaktišku PDF formatu adresu www.qiagen.com/safety, kur galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jo komponento SDS.

Mėginį ir bandymo atliekas šalinkite laikydamiesi vietinių saugos reglamentų.

* Užtikrinkite, kad prietaisai būtų patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Bendrosios atsargumo priemonės

qPCR testams atlikti reikalinga gera darbo laboratorijoje praktika, taip pat mokėjimas atlikti įrangos techninę priežiūrą, kuri yra skirta molekulinei biologijai ir atitinka galiojančius teisės aktus bei susijusius standartus.

Šis rinkinys yra skirtas naudoti diagnostikai *in vitro*. Šiame rinkinyje pateikti reagentai ir instrukcijos buvo patvirtinti, taip užtikrinant optimalų veikimą. Papildomas reagentų skiedimas arba inkubavimo trukmės ir temperatūros keitimas gali sąlygoti klaidingus arba prieštarigus duomenis. PPC ir PPF reagentai gali pasikeisti veikiant šviesai. Visi reagentai sukurti specialiai naudoti su šiuo testu. Užtikrinant optimalų testo veikimą, jokių medžiagų pakeisti negalima.

Kai transkripto lygis nustatomas naudojant qPCR, reikalinga tiek mRNR reversinė transkripcija, tiek PCR sugeneruotos cDNR amplifikavimas. Todėl visa tyrimo procedūra turi būti atlikta sąlygomis, kai nėra RNase-/DNase.

Būkite išskirtinai atsargūs, kad apsisaugotumėte nuo:

- RNase/DNase užteršimas, dėl kurio gali būti sugadinta šablono mRNR ir sugeneruota cDNR
- MRNR arba PCR perkelia užteršimo, dėl kurio bus gautas klaidingai teigiamas signalas

Todėl rekomenduojame toliau išdėstytus dalykus.

- Naudokite laboratorijos įrangą (pvz., pipetes, pipečių antgalius, reakcijų mėgintuvėlius) be nukleazės ir atlikdami tyrimą mūvėkite pirštines.
- Atlikdami visus veiksmus su pipetėmis naudokite šviežius aerzoliui atsparius pipečių galiukus, kad išvengtumėte mėginių ir reagentų tarpusavio užteršimo.
- Išankstinį PCR pagrindinį mišinį su tam skirtomis medžiagomis (pipetėmis, antgaliais ir t. t.) ruoškite specialioje srityje, kur nėra DNR matricų (cDNR, DNR, plazmidų). Atskiroje vietoje (pageidautina, atskiroje patalpoje) padėkite šabloną su specialiomis medžiagomis (pipetėmis, antgaliais ir t. t.).
- Su standartais (SP1–SP6) dirbkite atskirame kambaryje.

Reagento saugojimas ir naudojimas

Rinkiniai yra siunčiami ant sausojo ledo ir gavus turi būti saugomi temperatūroje nuo -30 °C iki -15 °C.

- Iki minimumo sumažinkite šviesos poveikį gruntui ir bandinių mišiniams (PPC ir PPF mėgintuvėliai).
- Prieš atidarydami mėgintuvėlius atsargiai juos pamaišykite ir centrifuguokite.

- Visus rinkinio komponentus laikykite originaliose talpose.

Šios laikymo sąlygos taikomos tiek atidarytiems, tiek neatidarytiems komponentams. Kitomis, nei nurodyta etiketėse, sąlygomis laikomų komponentų savybės gali tapti netinkamos ir tai gali neigiamai paveikti tyrimo rezultatus.

Kiekvieno reagento galiojimo datos nurodytos atskiro komponento etiketėse. Tinkamomis saugojimo sąlygomis gaminio savybės bus išsaugotos iki galiojimo datos, išspausdintos etiketėje.

Nėra akivaizdžių požymių, rodančių šio gaminio nestabilumą. Tačiau teigiamos ir neigiamos kontrolės turi būti vykdomos lygiagrečiai su nežinomais mėginiais.

Mėginio naudojimas ir saugojimas

Viso kraujo mėginiai turi būti apsaugoti nuo krešėjimo naudojant kalio EDTA ir saugomi 2 °C–8 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 5 dienas iki RNR ekstrakcijos.

Procedūra

Mėginio RNR paruošimas

RNR iš paciento mėginių (kraujo arba kaulų čiulpų) turi būti ruošiama laikantis patvirtintos procedūros. Tyrimo kokybė labai priklauso nuo įvedamos RNR kokybės. Todėl prieš analizę[†] rekomenduojame nustatyti išgrynintos RNR kokybę taikant agarozės* gelio elektroforezę, naudojant „Agilent[®] Bioanalyzer[®]“ arba spektrofotometriją. □

Protokolas: Reversinė transkripcija naudojant „SuperScript III Reverse Transcriptase“

Šis protokolas yra skirtas reversinei transkripcijai atlikti naudojant „SuperScript III Reverse Transcriptase“. Kai naudojamas *ipsogen* RT rinkinys, laikykitės *ipsogen RT rinkinio vadove* pateikto protokolo.

Ką reikia atlikti prieš pradėdant

- Paruoškite dNTP, po 10 mM kiekvienas. Laikykite -20 °C temperatūroje, bandiniuose.

* Dirbdami su chemikalais visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius.

† Optinis tankis, išmatuotas 260 ir 280 nm: 1,0 OD esant 260 nm atitinka maždaug 40 µg/ml vienos gijos RNR. A_{260}/A_{280} santykis nuo 1,8 iki 2,1 nurodo itin išgrynintą RNR.

Procedūra

1. Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.
2. Gerai sumaišykite (nesukiodami) ir trumpai centrifuguokite (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje). Po to padėkite ant ledo.
3. Sulygiuokite RNR mėginius iki 0,1 µg/µl. Įlašinkite 10 µl (1 µg) kiekvieno RNR mėginio į atskirus, pažymėtus mėgintuvėlius. Įlašinkite 10 µl itin teigiamos RNR kontrolės, 10 µl IS-MMR kalibratoriaus ir 10 µl vandens be nukleazės (kaip RT neigiamą kontrolę) į atskirus, pažymėtus mėgintuvėlius, ir apdorokite juos lygiagrečiai su RNR mėginiais, kaip aprašyta žemiau.
4. Inkubuokite kiekvieną mėginį, kontrolę ir kalibratorių (po 10 µl kiekvieną) 5 min 65 °C temperatūroje ir nedelsdami atvėsinkite 5 min padėję ant ledo.
5. Trumpai centrifuguokite (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje). Po to padėkite ant ledo.
6. Paruoškite toliau nurodytą RT mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių, kontrolių ir kalibratorių skaičių (1 lentelė).

1 lentelė. RT mišinio paruošimas

Komponentas	Kiekis mėginyje (μl)	Galutinė koncentracija
Pirmosios gijos buferis, 5x (teikiamas su „SuperScript III Reverse Transcriptase“)	5,0	1x
dNTP (po 10 mM kiekviename, turi būti paruošta iš anksto ir laikoma -20 °C temperatūroje, bandiniuose)	2,0	0,8 mM
Atsitiktinai parinktas devynių monomerų polimeras (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 (teikiama su „SuperScript III Reverse Transcriptase“)	1,25	–
Šildomas RNR mėginys, kontrolė arba IS-MMR kalibratorius (turi būti pridėta 7 žingsnyje)	10,0	40 ng/μl
Galutinis tūris	25,0	–

- Įlašinkite 15 μl RT mišinio į kiekvieną PCR mėgintuvėlį. Po to įdėkite 10 μl (1 μg) mėginio RNR, kontrolės arba kalibratoriaus (nuo 4 žingsnio).
- Atsargiai sumaišykite (nesukiodami) ir trumpai centrifuguokite (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).
- Užprogramuokite termocikleryje reversinės transkripcijos programą, kaip nurodyta 2 lentelėje.

2 lentelė. Temperatūros profilis

Reversinė transkripcija 1	Temperatūra: 25 °C Trukmė: 10 min
Reversinė transkripcija 2	Temperatūra: 50 °C Trukmė: 60 min
Išaktyvinimas	Temperatūra: 85 °C Trukmė: 5 min
Vėsinimas	Temperatūra: 4 °C Trukmė: 5 min

10. Sudėkite mėgintuvėlius į termociklerį ir paleiskite šiluminio ciklo programą, kaip pavaizduota 2 lentelėje.
11. Pasibaigus programai, trumpai centrifuguokite mėgintuvėlius (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje). Sudėkite mėgintuvėlius ant ledo arba -20 °C, kol atliekama qPCR, laikydamiesi toliau nurodytų protokolų, pagal savo qPCR prietaisą.

Pastaba: „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisams, kiekvienas RT paruošimas suteikia cDNR dviems qPCR vykdymams.

Protokolas: qPCR ant „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ arba „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ prietaisų su 72 mėgintuvėlių rotoriumi

Kai naudojamas šis prietaisas rekomenduojame, kad visi matavimai būtų atliekami du kartus, kaip nurodyta 3 lentelėje. Rinkinys yra skirtas 8 skirtingiems cDNR mėginiams testuoti 3 kartus to paties eksperimento metu.

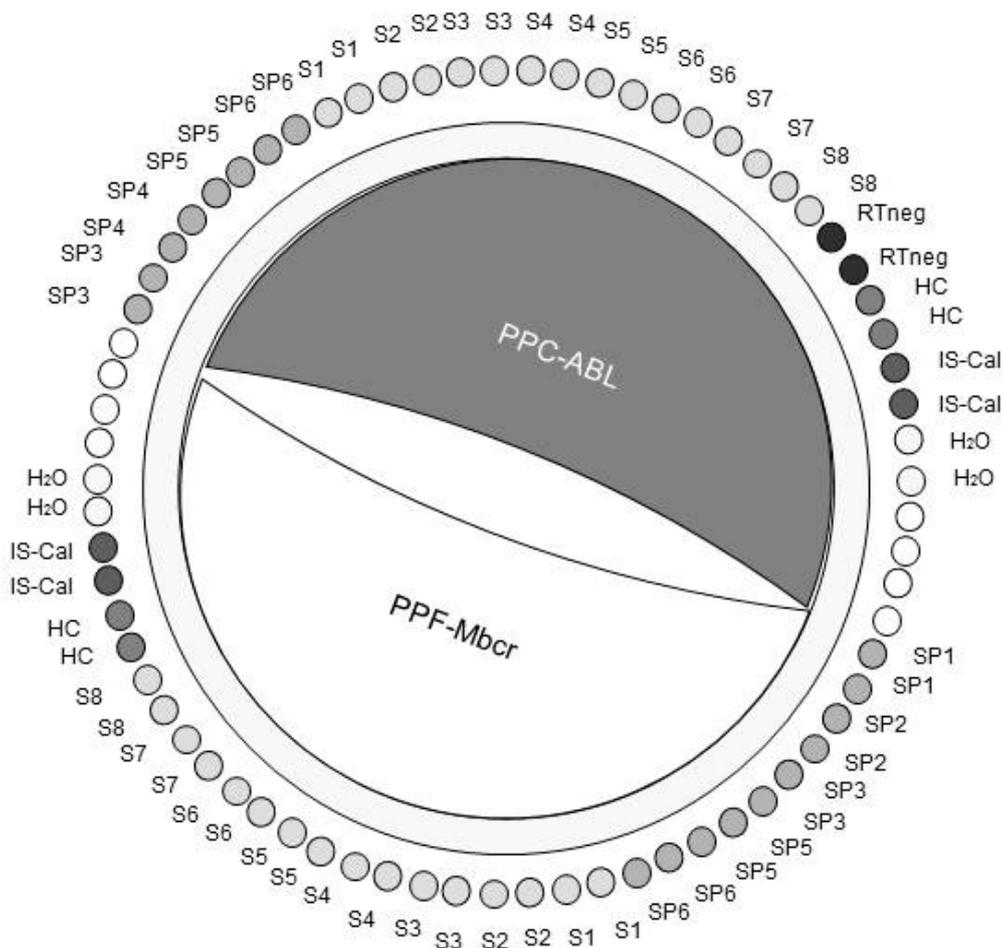
3 lentelė. „Rotor-Gene Q“ prietaisų su 72 mėgintuvėlių rotoriumi reakcijų skaičius

Mėginiai	Reakcijos
Su ABL gruntais ir bandinio mišiniu (PPC-ABL) (32 reakcijos)	
8 cDNR mėginiai	8 x 2 reakcijos
1 cDNR itin teigiama kontrolė	2 reakcijos
1 cDNR IS-MMR kalibratorius	2 reakcijos
Vieno plazmido standartai	2 x 4 reakcijos (SP3, SP4, SP5 ir SP6, kiekvienas testuotas du kartus)
RT neigiama kontrolė	2 reakcijos
Vandens kontrolė	2 reakcijos
Su BCR-ABL Mbcr gruntais ir bandinio mišiniu (PPF-Mbcr) (32 reakcijos)	
8 cDNR mėginiai	8 x 2 reakcijos
1 cDNR itin teigiama kontrolė	2 reakcijos
1 cDNR IS-MMR kalibratorius	2 reakcijos
Vieno plazmido standartai	2 x 5 reakcijos (SP1, SP2, SP3, SP5 ir SP6, kiekvienas testuotas du kartus)
Vandens kontrolė	2 reakcijos

Mėginių apdorojimas „Rotor-Gene Q“ prietaisais su 72 mėgintuvėlių rotoriumi

Rekomenduojame to paties eksperimento metu testuoti ne mažiau kaip 8 cDNR mėginius, kad būtų optimizuotas standartų ir gruntų bei bandinio mišinių

naudojimas. 4 paveikslėlyje pavaizduotoje rotoriaus schemoje pateiktas tokio eksperimento pavyzdys.



4 pav. Siūlomas rotoriaus išdėstymas atliekant kiekvieną eksperimentą su *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR rinkiniu. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr ir ABL standartai; **HC:** Itin cDNR teigiama kontrolė; **IS-Cal:** IS-MMR kalibratorius; **RTneg:** RT neigiama kontrolė; **S:** cDNR mėginys; **H₂O:** vandens kontrolė.

Pastaba: visada pasirūpinkite, kad tiriamas mėginys būtų rotoriaus padėtyje 1. Priešingu atveju kalibravimo veiksmo metu prietaisas neatliks kalibravimo ir bus gauti neteisingi fluorescavimo duomenys.

Užpildykite visas kitas pozicijas tuščiais mėgintuvėliais.

qPCR „Rotor-Gene Q“ prietaisuose su 72 mėgintuvėlių rotoriumi

Pastaba: visus veiksmus atlikite ant ledo.

Procedūra

1. Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.

2. Pasukiokite standartus, PPF-Mbcr ir PPC-ABL mėgintuvėlius ir trumpai centrifuguokite (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).
3. Paruoškite toliau nurodytą qPCR mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių.

Visos koncentracijos nurodytos galutiniam reakcijos tūriui.

4 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipečių schema ruošiant vieno reagento mišinį, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 25 µl galutinis reakcijos tūris. Išankstinis mišinys gali būti paruoštas, atsižvelgiant į reakcijų skaičių, naudojant tą patį gruntų ir bandinio mišinį (PPC-ABL arba PPF-Mbcr). Kompensuojant lašinimo iš pipetės klaidą gali būti įtraukti papildomi tūriai.

4 lentelė. qPCR mišinio paruošimas

Komponentas	1 reakcija (µl)	ABL: 32+1 reakcijos (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reakcijos (µl)	Galutinė koncentracija
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Gruntų ir bandinio mišinys, 25x	1	33	33	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	6,5	214,5	214,5	–
Mėginys (turi būti įdėtas 5 veiksmėse)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	25	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	–

4. Supilkite į kiekvieną mėgintuvėlį po 20 µl qPCR paruošiamojo mišinio.
5. Kitoje laboratorijos vietoje ir naudodami specialiai tam skirtą įrangą įdėkite 5 µl RT produkto (cDNR, 200 ng RNR atitiktis), gauto atliekant reversinę transkripciją (žr. „Protokolas: Reversinė transkripcija naudojant „SuperScript III Reverse Transcriptase““, 13 psl.) atitinkame mėgintuvėlyje (bendras tūris 25 µl).
6. Atsargiai sumaišykite, lašindami pipete viršuje ir apačioje.
7. Uždarykite visus mėgintuvėlius ir sudėkite juos į termociklerį laikydamiesi gamintojo rekomendacijų.

- Užprogramuokite „Rotor-Gene Q“ prietaisą nustatę šiluminio ciklo programą, kaip nurodyta 5 lentelėje.

5 lentelė. Temperatūros profilis

Analizės būdas	Kiekio nustatymas
Palaikymas 1	Temperatūra: 95 °C Trukmė: 10 s
Ciklai	50 kartų 95 °C 5 s 60°C 30 s įgaunant FAM fluorescavimą Žaliame kanale: Vienas
Palaikymas 2	Temperatūra: 36 °C Trukmė: 1 min

- Dialogo lange „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys) spustelėkite „Gain Optimisation“ (Gavimo optimizavimas), kad atidarytumėte dialogo langą „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Automatinio gavimo optimizavimo nustatymas). Nustatykite žalio kanalo intervalą nuo „5 FI“, skirtą „Min Reading“ (Min. rodmeniui), iki „10 FI“, skirtą „Max Reading“ (Maks. rodmeniui), ir priimtina gavimo intervalą nuo –10 iki 10.
- Pažymėkite langelį „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą) ir uždarykite dialogo langą „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Automatinio gavimo optimizavimo nustatymas).
- Paleiskite šiluminio ciklo programą.
- Analizei pasirinkite „Slope Correct“ (Teisingas nuolydis). Rekomenduojame slenkstį nustatyti ties 0,03.

Protokolas: qPCR „Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System“, „ABI PRISM 7900HT SDS“ ir „LightCycler 480“ prietaisuose

Naudojant 96 šulinėlių lėkštės qPCR prietaisą rekomenduojame, kad visi matavimai būtų atliekami du kartus, kaip nurodyta 6 lentelėje. Rinkinys yra skirtas 8 skirtingiems cDNR mėginiams testuoti 3 kartus to paties eksperimento metu.

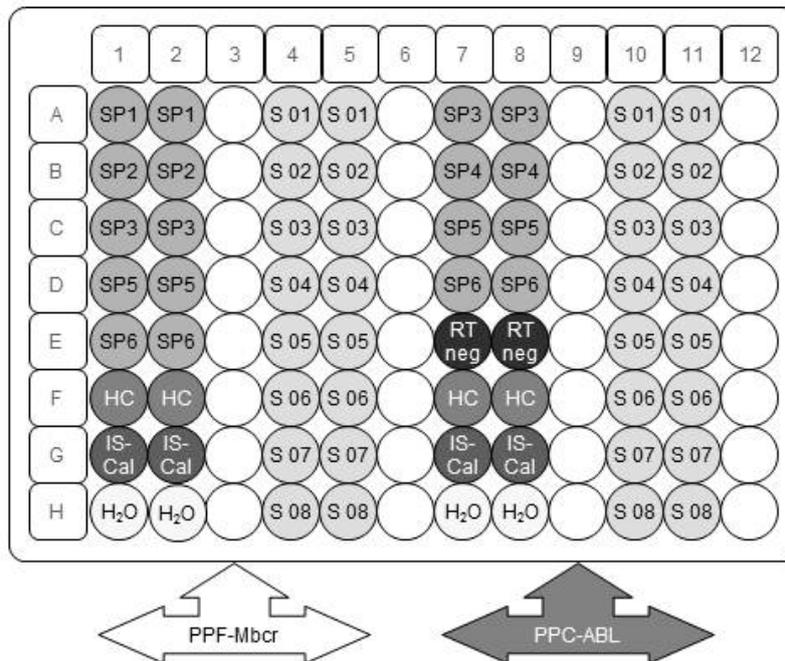
6 lentelė. Reakcijų skaičius naudojant 96 šulinėlių lėkštės qPCR prietaisą

Mėginiai	Reakcijos
Su ABL gruntais ir bandinio mišiniu (PPC-ABL) (32 reakcijos)	
8 cDNR mėginiai	8 x 2 reakcijos
1 cDNR itin teigiama kontrolė	2 reakcijos
1 cDNR IS-MMR kalibratorius	2 reakcijos
Vieno plazmido standartai	2 x 4 reakcijos (SP3, SP4, SP5 ir SP6, kiekvienas testuotas du kartus)
RT neigiama kontrolė	2 reakcijos
Vandens kontrolė	2 reakcijos
Su BCR-ABL Mbcr gruntais ir bandinio mišiniu (PPF-Mbcr) (32 reakcijos)	
8 cDNR mėginiai	8 x 2 reakcijos
1 cDNR itin teigiama kontrolė	2 reakcijos
1 cDNR IS-MMR kalibratorius	2 reakcijos
Vieno plazmido standartai	2 x 5 reakcijos (SP1, SP2, SP3, SP5 ir SP6, kiekvienas testuotas du kartus)
Vandens kontrolė	2 reakcijos

Mėginių apdorojimas „Applied Biosystems“, „ABI PRISM“ ir „LightCycler 480“ prietaisuose

Rekomenduojame to paties eksperimento metu testuoti ne mažiau kaip 8 cDNR mėginius, kad būtų optimizuotas standartų ir gruntų bei bandinio mišinių

naudojimas. 5 paveikslėlyje pavaizduotoje lėkštės schemoje pateiktas tokio eksperimento pavyzdys.



5 pav. Siūlomas lėkštės išdėstymas atliekant vieną eksperimentą su *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR rinkiniu. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr ir ABL standartai; **HC:** Itin cDNR teigiama kontrolė; **IS-Cal:** IS-MMR kalibratorius; **RTneg:** RT neigiama kontrolė; **S:** cDNR mėginys; **H₂O:** vandens kontrolė.

qPCR „Applied Biosystems“, „ABI PRISM“ arba „LightCycler 480“ prietaisuose

Pastaba: visus veiksmus atlikite ant ledo.

Procedūra

1. **Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.**
2. **Pasukiokite standartus, ROX, PPF-Mbcr ir PPC-ABL mėgintuvėlius ir trumpai centrifuguokite (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).**
3. **Paruoškite toliau nurodytą qPCR mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių. Naudojant 96 šulinėlių lėkštės qPCR įrangą, rekomenduojame visus matavimus atlikti du kartus.**

Visos koncentracijos nurodytos galutiniam reakcijos tūriui.

7 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipečių schema „Applied Biosystems“ ir „ABI PRISM“ instrumentams, ruošiant vieno reagento mišinį, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 25 µl galutinis reakcijos tūris. 8 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipečių schema ruošiant vieno reagento mišinį „LightCycler

480“ prietaisui, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 25 µl galutinis reakcijos tūris. Išankstinis mišinys gali būti paruoštas, atsižvelgiant į reakcijų skaičių, naudojant tą patį gruntų ir bandinio mišinį (PPC-ABL arba PPF-Mbcr). Kompensuojant lašinimo iš pipetės klaidą gali būti įtraukti papildomi tūriai.

7 lentelė. qPCR mišinio ruošimas „Applied Biosystems“ ir „ABI PRISM“ prietaisams

Komponentas	1 reakcija (µl)	ABL: 32+1 reakcijos (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reakcijos (µl)	Galutinė koncentracija
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Gruntų ir bandinio mišinys, 25x	1	33	33	1x
ROX I dažas, 50x („ABI PRISM 7900HT“) arba ROX II dažas, 50x („Applied Biosystems 7500“)	0,5	16,5	16,5	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	6	198	198	–
Mėginys (turi būti įdėtas 5 veiksme)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	25	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	–

8 lentelė. qPCR mišinio ruošimas „LightCycler 480“

Komponentas	1 reakcija (µl)	ABL: 32+1 reakcijos (µl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reakcijos (µl)	Galutinė koncentracija
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Gruntų ir bandinio mišinys, 25x	1	33	33	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	6,5	214,5	214,5	–
Mėginys (turi būti įdėtas 5 veiksme)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	25	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	–

4. Supilkite į kiekvieną šulinėlį po 20 µl qPCR paruošiamojo mišinio.
5. Kitoje laboratorijos vietoje ir naudodami specialiai tam skirtą įrangą įdėkite 5 µl RT produkto (cDNR, 200 ng RNR atitikmens), gauto atliekant reversinę transkripciją (žr. „Protokolas: Reversinė transkripcija naudojant „SuperScript III Reverse Transcriptase““, 13 psl.) atitinkame šulinėlyje (bendras tūris 25 µl).
6. Atsargiai sumaišykite, lašindami pipete viršuje ir apačioje.
7. Uždarykite lėkštę ir trumpai centrifuguokite (300 x g, maždaug 10 s).
8. Įdėkite lėkštę į termociklerį atsižvelgdami į gamintojo rekomendacijas. Užprogramuokite termociklerį nustatę šiluminio ciklo programą, kaip pavaizduota 9 lentelėje „Applied Biosystems“ ir „ABI PRISM“ prietaisams, arba 10 lentelėje „LightCycler 480“ prietaisui.

9 lentelė. Temperatūros profilis „Applied Biosystems“ ir „ABI PRISM“ prietaisams

Analizės būdas	Standartinė kreivė – Absoliutinis kiekio nustatymas
Palaikymas 1	Temperatūra: 95 °C Trukmė: 10 s
Ciklai	50 kartų 95 °C 5 s 60 °C 30 s įgaunant FAM fluorescavimą: Vienas; gesinantis dažas: TAMRA
Palaikymas 2	Temperatūra: 36 °C Trukmė: 1 min

10 lentelė. „LightCycler 480“ prietaiso temperatūros profilis

Analizės būdas	Absoliutinis kiekio nustatymas („Abs Quant“)
Aptikimo formatai	Pasirinkite „Simple Probe“ (paprastas bandinys) lange „Detection formats“ (aptikimo formatai)
Palaikymas 1	Temperatūra: 95 °C Trukmė: 10 s
Ciklai	50 kartų 95 °C 5 s 60 °C 30 s įgaunant FAM fluorescavimą, atitinkantį (483-533 nm) LC versijai 01 ir (465-510 nm) LC versijai 02
Palaikymas 2	Temperatūra: 36 °C Trukmė: 1 min

- 9. Jei naudojami „Applied Biosystems 7500“ ir „ABI PRISM 7900HT SDS“, vykdykite 9a žingsnį. Jei naudojamas „LightCycler 480“ prietaisas, vykdykite 9b veiksmą.**
- 9a. „Applied Biosystems“ ir „ABI PRISM“: rekomenduojame prietaiso analizės žingsnyje nustatyti 0,1 slenkstį. Pradėkite ciklo programą, kaip nurodyta 9 lentelėje.**
- 9b. „LightCycler 480“ prietaisas: rekomenduojame Nustatyto taško analizės režimą su fonine reikšme 2,0 ir slenksčiu 2,0. Pradėkite šiluminio ciklo programą, kaip nurodyta 10 lentelėje.**

Protokolas: qPCR „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisuose

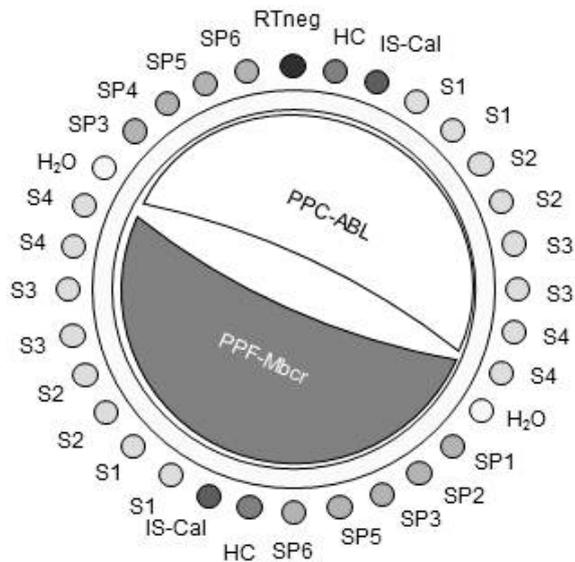
Kai naudojami kapiliariniai prietaisai rekomenduojame, kad matuoti visus mėginius du kartus, o kontroles tik kartą, kaip nurodyta 11 lentelėje. Rinkinys yra skirtas 4 skirtingiems cDNR mėginiams to paties mėginių eksperimento metu testuoti 6 kartus.

11 lentelė. „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisų reakcijų skaičius

Mėginiai	Reakcijos
Su ABL gruntais ir bandinio mišiniu (PPC-ABL) (16 reakcijos)	
4 cDNR mėginiai	4 x 2 reakcijos
1 cDNR itin teigiama kontrolė	1 reakcija
1 cDNR IS-MMR kalibratorius	1 reakcija
Vieno plazmido standartai	1 x 4 reakcijos (SP3, SP4, SP5 ir SP6)
RT neigiama kontrolė	1 reakcija
Vandens kontrolė	1 reakcija
Su BCR-ABL MbcR gruntais ir bandinio mišiniu (PPF-MbcR) (16 reakcijos)	
4 cDNR mėginiai	4 x 2 reakcijos
1 cDNR itin teigiama kontrolė	1 reakcija
1 cDNR IS-MMR kalibratorius	1 reakcija
Vieno plazmido standartai	1 x 5 reakcijos (SP1, SP2, SP3, SP5 ir SP6)
Vandens kontrolė	1 reakcija

Mėginių apdorojimas „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisuose

Rekomenduojame to paties eksperimento metu testuoti ne mažiau kaip 4 cDNR mėginius, kad būtų optimizuotas standartų ir gruntų bei bandinio mišinių naudojimas. 6 paveikslėlyje pavaizduotoje kapiliarinėje schemoje pateiktas eksperimento pavyzdys.



6 pav. Siūlomas rotoriaus išdėstymas atliekant kiekvieną eksperimentą su *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR rinkiniu. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr ir ABL standartai; HC: Itin cDNR teigiama kontrolė; IS-Cal: IS-MMR kalibratorius; RTneg: RT neigiama kontrolė; S: cDNR mėginys; H₂O: vandens kontrolė.

qPCR „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisuose

Pastaba: visus veiksmus atlikite ant ledo.

Procedūra

1. Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.
2. Pasukiokite standartus, PPF-Mbcr ir PPC-ABL mėgintuvėlius ir trumpai centrifuguokite (maždaug 10 s, 10.000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).
3. Paruoškite toliau nurodytą qPCR mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių.

Visos koncentracijos nurodytos galutiniam reakcijos tūriui.

12 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipetės schema ruošiant vieno reagento mišinį, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 20 µl galutinis reakcijos tūris.

Išankstinis mišinys gali būti paruoštas, atsižvelgiant į reakcijų skaičių, naudojant tą patį gruntų ir bandinio mišinį (PPC-ABL arba PPF-Mbcr).

Kompensuojant lašinimo iš pipetės klaidą gali būti įtraukti papildomi tūriai.

12 lentelė. qPCR mišinio „LightCycler“ 1.2, 1.5 ir 2.0 prietaisams paruošimas

Komponentas	1 reakcija (µl)	ABL: 16+1 reakcijos (µl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reakcijos (µl)	Galutinė koncentracija
Premix Ex Taq, 2x	10	170	170	1x
Gruntų ir bandinio mišinys, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	4,2	71,4	71,4	–
Mėginys (turi būti įdėtas 5 veiksmė)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	20	Po 20 kiekv.	Po 20 kiekv.	–

4. Supilkite į kiekvieną kapiliarą po 15 µl qPCR paruošiamojo mišinio.
5. Kitoje laboratorijos vietoje ir naudodami specialiai tam skirtą įrangą įdėkite 5 µl RT produkto (cDNR, 200 ng RNR atitiktens), gauto atliekant reversinę transkripciją (žr. „Protokolas: Reversinė transkripcija naudojant „SuperScript III Reverse Transcriptase““, 13 psl.) atitinkame kapiliare (bendras tūris 20 µl).
6. Atsargiai sumaišykite, lašindami pipete viršuje ir apačioje.
7. Sudėkite kapiliarus į su aparatu pateiktus adapterius ir trumpai centrifuguokite (700 x g, maždaug 10 s).
8. Sudėkite kapiliarus į termociklerį atsižvelgdami į gamintojo rekomendacijas.
9. Užprogramuokite „LightCycler“ 1.2, 1.5 arba 2.0 prietaisą nustatę šiluminio ciklo programą, kaip nurodyta 13 lentelėje.

13 lentelė. Temperatūros profilis

Analizės būdas	Kiekio nustatymas
Palaikymas 1	Temperatūra: 95 °C Trukmė: 10 s Trapas: 20
Ciklai	50 kartų 95 °C 5 s; trapas 20 60 °C 30 s; trapas 20; įgaunant FAM fluorescavimą: Vienas
Palaikymas 2	Temperatūra: 36 °C Trukmė: 1 min Trapas: 20

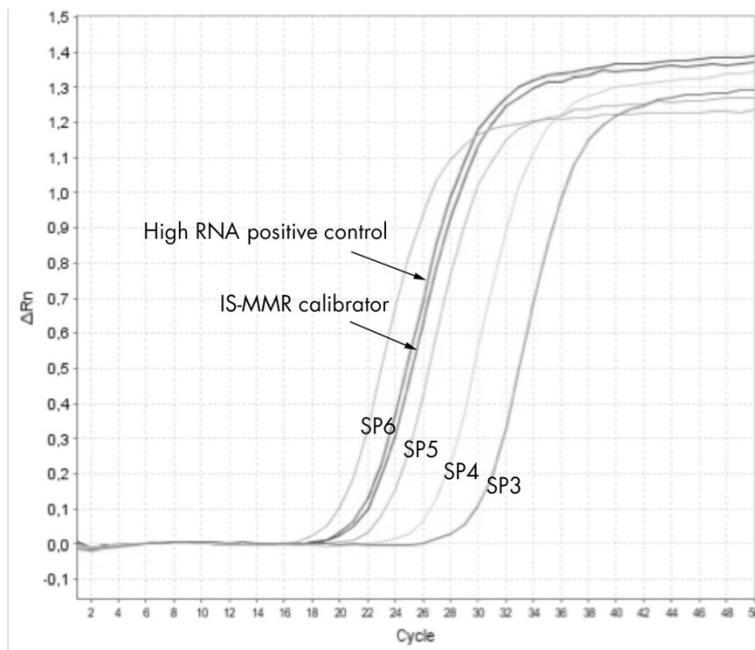
10. „LightCycler 1.2 ir 1.5 vykdykite 10a veiksmą. „LightCycler“ 2,0 vykdykite 10b veiksmą.
- 10a. „LightCycler“ 1.2 ir 1.5: rekomenduojame F1/F2 ir „2nd derivative analysis“ (2-a išvestinė analizė) režimą. Pradėkite šiluminio ciklo programą, kaip nurodyta 13 lentelėje.
- 10b. „LightCycler“ 2.0: rekomenduojame naudoti „Automated (F’max) analysis“ (automatizuotą F’max analizę) „LightCycler“ 2.0 programinės įrangos versijoje 4.0, kad būtų gauti atkuriami rezultatai. Pradėkite šiluminio ciklo programą, kaip nurodyta 13 lentelėje.

Rezultatų aiškinimas

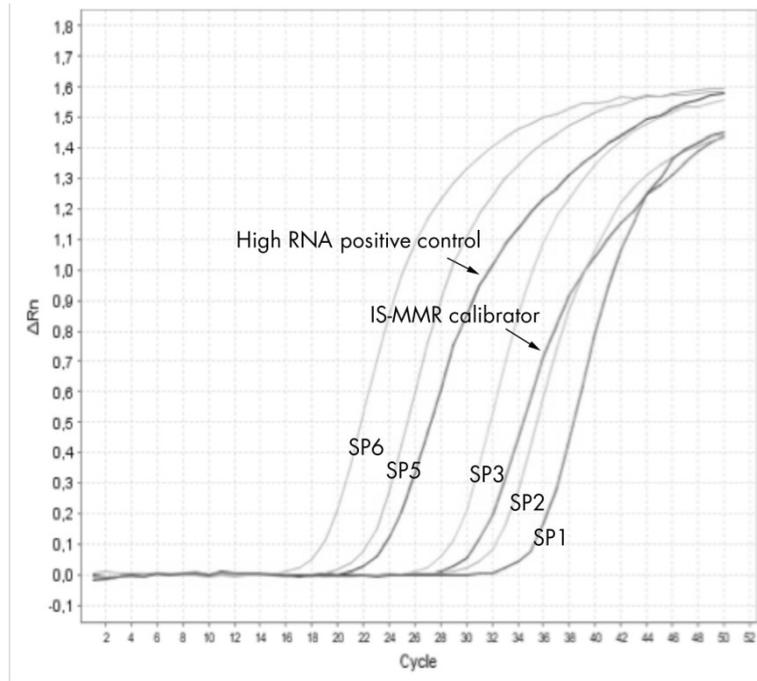
Duomenų analizės principas

Naudojant „TaqMan[®]“ technologiją PCR ciklų skaičius, kurių reikia signalui virš slenksčio aptikti, vadinamas slenksčio ciklu (C_T) ir yra tiesiogiai proporcingas reakcijos pradžioje esančių tikslų kiekiui.

Jei naudojami standartai su žinomu molekulių skaičiumi, galima nustatyti standarto kreivę ir apibrėžti tikslų skaičių tikslų, esančių tiriamajame mėginyje. *ipsogen* standarto kreivės yra pagrįstos plazmidais. Siekdami užtikrinti, kad standartų kreivės būtų tikslios, mes naudojame 4 standartų skiedimus ABL, ir 5 standartų skiedimus Mbc. Rinkinyje taip pat yra IS-MMR kalibratorius, leidžiantis konvertuoti rezultatus į tarptautinę skalę. 7 ir 8 paveikslėliuose pateikti „TaqMan“ standartams gautų amplifikavimo kreivių, IS-MMR kalibratoriaus ir itin teigiamos RNR kontrolės su *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR rinkiniu, pavyzdžiai.



7 pav. ABL aptikimas naudojant SP3, SP4, SP5 ir SP6 standartus. 10^3 , 10^4 , 10^5 ir 10^6 kopijos / 5 μ l.



8 pav. BCR-ABL MbcR aptikimas naudojant SP1, SP2, SP3, SP5 ir SP6 standartus. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopijos / 5 μ l.

Standartinės kreivės ir kokybės kriterijai, taikomi neapdorotiems duomenims

Atkuriamumas kartojimuose

C_T reikšmių kitimas pasikartojimuose turi būti <2 , tai atitinka keturiskart didesnį kopijų skaičiaus reikšmių pasikeitimą.

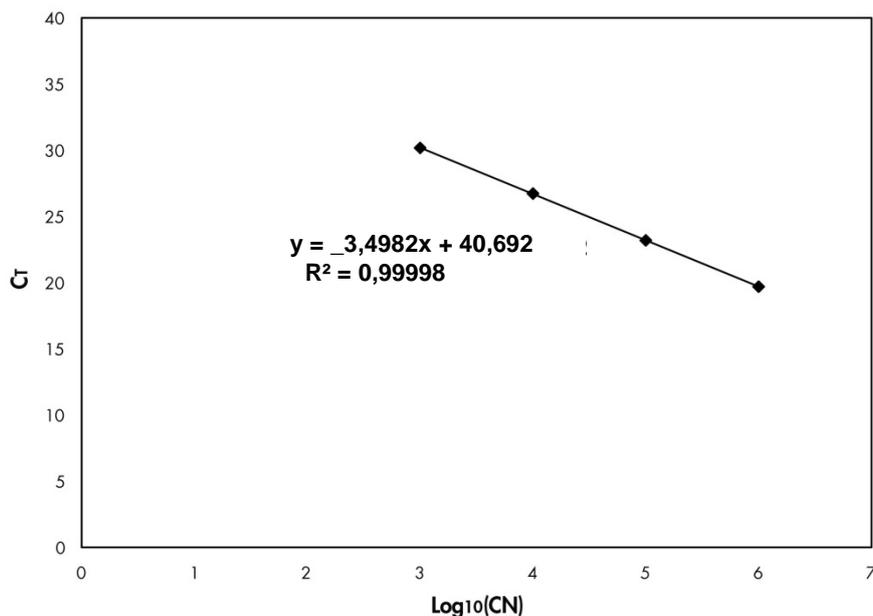
C_T reikšmių kitimas pasikartojimuose paprastai yra $<1,5$, jeigu vidutinė pasikartojimų C_T reikšmė yra <36 (7).

Pastaba: kiekvienas naudotojas turėtų individualiai išmatuoti atkuriamumą savo laboratorijoje.

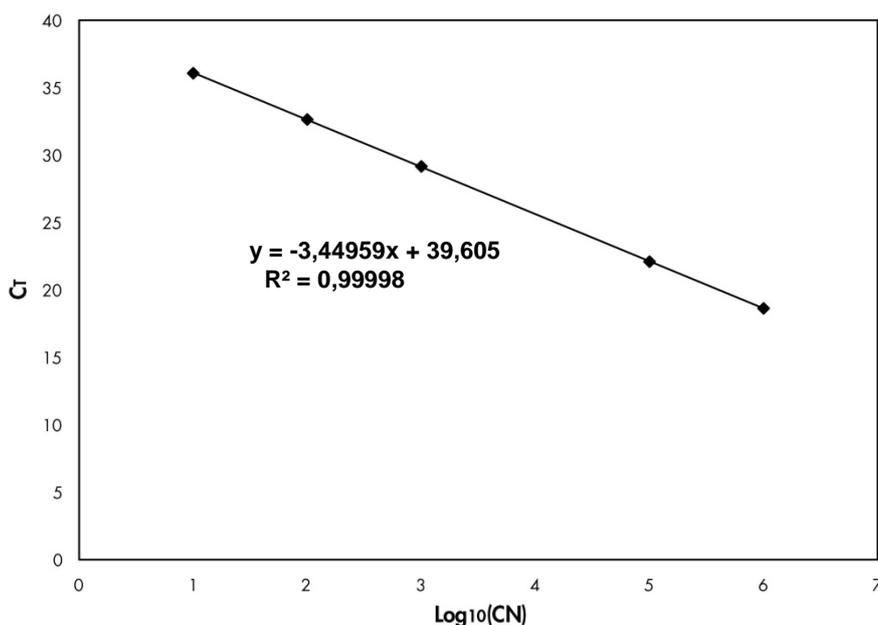
Standartinės kreivės

Neapdoroti duomenys gali būti įkelti į „Excel[®]“ failą analizei.

Kiekvienam genui (ABL ir BCR-ABL) neapdorotos C_T reikšmės, gautos iš plazmidų standartinių skiedimų, yra braižomi atitinkamai pagal žurnalo kopijos numerį (3, 4, 5 ir 6 – SP3, SP4, SP5 ir SP6; 1, 2, 3, 5 ir 6 – SP1, SP2, SP3, SP5 ir SP6). 9 pav. pateiktas teorinės ABL standartinės kreivės, apskaičiuotos pagal 4 standartinius skiedimus, pavyzdys. 10 pav. pateiktas teorinės BCR-ABL standartinės kreivės, apskaičiuotos pagal 5 standartinius skiedimus, pavyzdys.



9. pav. Teorinė standartinė ABL kreivė, apskaičiuota pagal 4 standartinius skiedimus. Tiesinė mažėjimo kreivė ($y = ax + b$) yra apskaičiuota, kai a yra linijos nuolydis, o b yra y ašis, esanti taško, kuriame linija kerta y ašį, y koordinatė. Jos lygtis ir nustatymo koeficientas (R^2) yra išspausdinti grafike.



10. pav. Teorinė standartinė BCR-ABL kreivė, apskaičiuota pagal 5 standartinius skiedimus. Tiesinė mažėjimo kreivė ($y = ax + b$) yra apskaičiuota, kai a yra linijos nuolydis, o b yra y ašis, esanti taško, kuriame linija kerta y ašį, y koordinatė. Jos lygtis ir nustatymo koeficientas (R^2) yra išspausdinti grafike.

Kadangi standartai yra dešimteriopi skiedimai, teorinis kreivės nuolydis yra $-3,3$. Nuolydis nuo $-3,0$ iki $-3,9$ yra priimtinas, kol R^2 yra $>0,95$ (7). Tačiau tam, kad rezultatai būtų tikslūs, pageidautina $R^2 >0,98$ reikšmė (3).

Pastaba: turi būti aptiktas ir įtrauktas į BCR-ABL standartinę kreivę SP1 standartinis skiedimas (BCR-ABL plazmidas, 10 kopijų).

Visų ABL reikšmių kokybės kontrolė

Prasta RNR kokybė arba problemos qPCR žingsnių metu pasireiškia nedideliu ABL kopijų skaičiumi (ABL_{CN}). Optimalus jautrumas gaunamas su mėginiais, užtikrinančiais $ABL_{CN} \geq 10.000$ kopijų. Šis ABL_{CN} kriterijus taip pat taikomas itin teigiamai RNR kontrolei ir IS-MMR kalibratoriumi.

RT neigiamas ir vandens kontrolės

Nė viena šablono kontrolė (NTC) PCR žingsniui (vandens kontrolė) ir reversinės transkripcijos žingsniui (RT neigiama kontrolė) neturi gauti nulį CN tiek ABL, tiek BCR-ABL M_{bcr}. Teigiamas šių NTC rezultatas rodo tarpusavio užteršimą reversinės transkripcijos ir (arba) qPCR metu.

Normalizuotas kopijos numeris (NCN)

ABL standartinė kreivės lygtis turi būti naudojama transformuoti neapdorotas C_T reikšmes (gautas naudojant PPC-ABL) nežinomiems mėginiams paversti ABL kopijų numeriais (ABL_{CN}).

BCR-ABL standartinė kreivės lygtis turi būti naudojama transformuoti neapdorotas C_T reikšmes (gautas naudojant PPF-M_{bcr}) nežinomiems mėginiams paversti BCR-ABL kopijų numeriais ($BCR-ABL M_{bcr_{CN}}$).

Šių CN reikšmių santykis suteikia normalizuotą kopijos numerį (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL M_{bcr_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Apskaičiuokite itin teigiamos RNR kontrolės (NCN_{HC}), IS-MMR kalibratoriaus (NCN_{cal}) ir kiekvieno mėginio (NCN_{sample}) NCN rezultata.

Itin teigiama RNR kontrolė ir IS-MMR kalibratorius

Šios kontrolės leidžia stebėti ABL ir BCR-ABL M_{bcr} reversinės transkripcijos ir amplifikavimo žingsnius transkripcijos kiekio nustatymo metu.

NCN_{cal} rezultato kokybės kontrolė

Pastaba: IS-MMR kalibratoriumi gautas NCN rezultatas, išbandytas naudojant *ipsogen* BCR-ABL M_{bcr} IS-MMR rinkinį kartu su patvirtintais reagentais ir prietaisais (žr. „Pateiktos medžiagos“, 9 psl., ir „Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos“, 10 psl.), turi būti 0,05-0,3 intervale. Priešingu atveju NCN reikšmių nepavyks konvertuoti į tarptautinę skalę. Be to, visas eksperimentas turi būti atmestas, jeigu neaptinkama itin teigiama RNR kontrolė.

IS konversija ir MMR ataskaitos

Pastaba: prieš rezultatų aiškinimą pasižiūrėkite reikšmę, nurodytą IS-MMR kalibratoriaus mėgintuvėlio etiketėje arba su rinkiniu pateiktame analizės sertifikate.

Normalizuotam kopijos numeriui tarptautinėje skalėje apskaičiuoti (IS-NCN_{sample}) naudokite eksperimento IS-MMR kalibratoriaus NCN rezultatą (NCN_{cal}) ir jam priskirtą reikšmę (IS-Cal reikšmė), nurodytą analizės sertifikate.

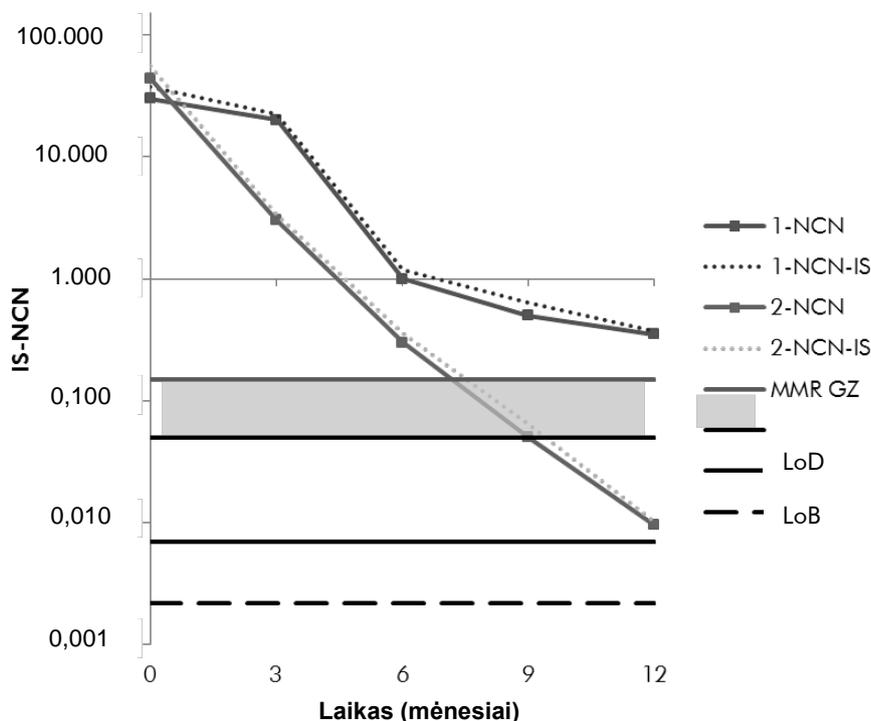
$$\text{IS-NCN}_{\text{sample}} = \frac{\text{NCN}_{\text{sample}} \times \text{IS-Cal reikšmė}}{\text{NCN}_{\text{cal}}}$$

Nustatykite kiekvieno mėginio MMR būseną pagal toliau nurodytus kriterijus.

- **IS-NCN_{sample} ≤ 0,05:** svarbi molekulinė reakcija
- **0,05 < IS-NCN_{sample} < 0,15:** pilkoji zona aplink MMR ribinį mėginį, negalutinis rezultatas
- **IS-NCN_{sample} ≥ 0,15:** nėra svarbios molekulinės reakcijos

IS-NCN_{HC} rezultatui (NCN tarptautinėje skalėje itin teigiamai RNR kontrolei) neturi būti svarbios molekulinės reakcijos.

11 pav. pateiktas paciento stebėjimo naudojant NCN ir IS-NCN rezultatus pavyzdys.



11 pav. Paciento MMR būsenos kreivių stebėjimas naudojant *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc_r IS-MMR rinkinį. NCN: normalizuotas kopijos numeris; NCN-IS: normalizuoto kopijos numerio tarptautinė skalė; MMR GZ: MMR pilkosios zonos (GZ) negalutinis rezultatas; LoD: aptikimo riba; LoB: bazinis lygis.

Kokybės kriterijų santrauka

14 lentelėje pateikta įvairių kokybės kriterijų ir susijusių reikšmių arba rezultatų santrauka.

14 lentelė. Kokybės kriterijų santrauka

Kriterijai	Priimtinos reikšmės / rezultatai
C_T reikšmių kitimas kartojimuose	$\leq 2 C_T$, jeigu vidutinė C_T reikšmė > 36 $\leq 1,5 C_T$, jeigu vidutinė C_T reikšmė ≤ 36
Standartinių kreivių nuolydis	Nuo -3,0 iki -3,9
R^2 standartinėms kreivėms	Ne mažiau kaip $> 0,95$, geriau jeigu $> 0,98$
SP1 standartinis skiedimas (BCR-ABL 10 kopijų plazmidas)	Turi būti aptiktas ir įtrauktas į standartinę kreivę
Paciento mėginių, itin teigiamos RNR kontrolės ir IS-MMR kalibratoriaus ABL_{CN} reikšmės kokybės kontrolė	$ABL_{CN} > 10.000$ kopijų ABL, kad būtų pasiektas optimalus jautrumas
PCR (vanduo) ir reversinės transkripcijos (RT neigiama) kontrolės	Kiekvienai $ABL_{CN} = 0$ ir $Mbcr_{CN} = 0$
NCN gauta IS-MMR kalibratoriumi (NCN_{cal})	Turi būti 0,05-0,3 intervale
Itin teigiama RNR kontrolė	Turi būti aptikta
Itin teigiamai RNR kontrolei gauta NCN, paversta į tarptautinę skalę (IS- NCN_{HC})	Būklė: nėra svarbios molekulinės reakcijos

Trikčių šalinimas

Norėdami gauti daugiau informacijos skaitykite dažnai užduodamų klausimų puslapį mūsų techninės pagalbos centre:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninių tarnybų mokslininkai visuomet mielai atsakys į bet kokius klausimus, kurie gali jums kilti tiek dėl šiamo vadove pateiktos, tiek su mėginiais ir tyrimo technologijomis susijusios

informacijos bei protokolų (kontaktinę informaciją rasite „Kontaktinė informacija“, 42 psl.).

Kokybės kontrolė

Šis rinkinys pagamintas laikantis ISO 13485:2003 standarto reikalavimų. Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR“ rinkinio partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę. Svetainėje www.qiagen.com/support/ užsakius galima gauti analizės sertifikatą.

Apribojimai

Prieš naudodamiesi šiuo prietaisu naudotojai turi būti išmokyti ir susipažinę su šia technologija.

Visi sugeneruoti diagnostiniai rezultatai turi būti aiškinami kartu su kitais gautais klinikiniais arba laboratoriniais duomenimis. Naudotojas atsako už sistemos tinkamumo patvirtinimą bet kokioms jo laboratorijoje atliekamoms procedūroms, kurioms nebuvo atlikti QIAGEN tinkamumo tyrimai.

Reikia atkreipti dėmesį į galiojimo pabaigos datas, išspausdintas ant visų komponentų dėžių ir etikečių. Nenaudokite komponentų, kurių naudojimo laikas pasibaigęs.

Pastaba: rinkinys buvo sukurtas pagal tyrimus „Europa prieš vėžį“ (“Europe Against Cancer” (EAC)) (8, 9) ir atitinka atnaujintas tarptautines rekomendacijas. Rinkinyje yra IS-MMR kalibratorius, standartizuotas pagal tarptautinę skalę, leidžiantis konvertuoti NCN rezultatus į tarptautinę skalę ir pranešti MMR (svarbios molekulinės reakcijos) būklę.

Kiekvienai IS-MMR kalibratoriaus partijai yra priskirta reikšmė, išvesta tiesiogiai iš kalibravimo pagal NIBSC WHO sertifikuotą pagrindinę etaloninę medžiagą („International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR“ (1st I.S.), ref. 09/138).

Su kiekvienu rinkiniu pateikiamas analizės sertifikatas, kuriame nurodyta priskirta IS-MMR kalibratoriaus reikšmė.

Rinkinys turi būti naudojamas laikantis šiame vadove pateiktų instrukcijų, derinant su patvirtintais reagentais ir prietaisais (žr. „Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos“, 10 psl.). Jei šis gaminys naudojamas nesilaikant nurodymų ir (arba) pakeičiami jo komponentai, QIAGEN nebeprisims už jį atsakomybės.

Eksplotavimo charakteristikos

Pastaba: eksploataavimo charakteristikos buvo nustatytos naudojant „Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System“ derinant su *ipsogen* BCR-ABL

Mbcr IS-MMR rinkiniu ir patvirtintais papildomais reagentais (žr. „Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos“, 10 psl.).

Tuščios vietos ir aptikimo ribos

Tuščios vietos riba (LoB) ir aptikimo riba (LoD) buvo nustatytos laikantis CLSI/NCCLS EP17-A taisyklių.

Bazinis lygis (LoB) buvo nustatytas pagal sveikų donorų neigiamų mėginių (11 mėginių, 69 matavimų), ir buvo lygus 0.0022 BCR-ABL Mbcr NCN.

Aptikimo riba (LoD arba analitinis jautrumas) buvo nustatyta pagal žinomus mažai neigiamus mėginius (n = 8, 74 matavimų), ir buvo lygi 0.0069 BCR-ABL Mbcr NCN.

- **NCN ≤LoB:** BCR-ABL Mbcr neaptikta
- **LoB <NCN <LoD:** BCR-ABL Mbcr aptikta, bet kiekis nenustatytas
- **NCN ≥LoD:** BCR-ABL Mbcr kiekis nustatytas

Nuokrypis nuo tiesiškumo

Nuokrypis nuo tiesiškumo buvo nustatytas pagal CLSI/NCCLS EP6-A taisykles.

Buvo atliktas tyrimas su teigiamos ir neigiamos RNR, gautos iš ląstelių linijų, mišinių. Vienuolika skirtingų lygių buvo testuoti tris kartus. Iš šių mėginių gauti rezultatai rodo, kad *ipsogen* BCR-ABL Mbcr IS-MMR tyrimas yra tiesinis intervale nuo 0.003 iki 65 BCR-ABL Mbcr NCN.

Įvestys

Tyrimui buvo pasirinktos penkios skirtingos RNR su įvairiais NCN BCR-ABL Mbcr lygiais. Buvo ištirti skirtingi RNR ir cDNR kiekiai, siekiant įvertinti įvesties poveikį NCN rezultatams. Rezultatai atskleidė, kad RNR įvesties kitimo poveikis NCN rezultatams buvo nedidelis, kai tuo tarpu cDNR įvestis buvo reikšmingesnis faktorius naudojant daugiau arba mažiau medžiagos. Todėl testui vykdyti rekomenduojama 1 µg RNR ir 5 µl cDNR įvestis.

Tikslumas

Tikslumas buvo nustatytas pagal CLSI/NCCLS EP5-A2 taisykles.

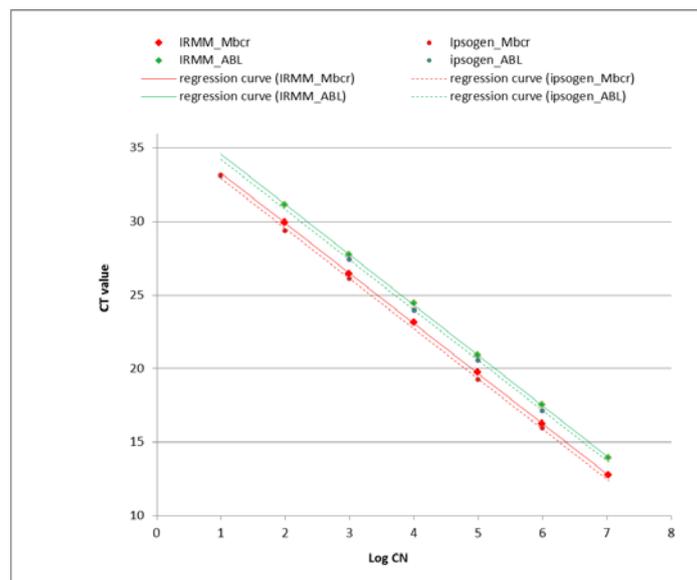
Buvo atliktas tikslumo tyrimas su 13 skirtingų mėginių, išbandytų 42 kartus dviem egzemplioriais (n = 84). Šie mėginiai buvo paimti iš pacientų mėginių su skirtingu BCR-ABL Mbcr išraiškos lygiu netoli MMR reikšmės ir virš jos. Buvo nustatyta, kad bendras kitimo koeficientas netoli MMR reikšmės yra lygus 25 %.

Atitikimo tyrimas: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienos plazmidės (IRMM) standartas, palyginti su ipsogen vienos plazmidės (QIAGEN) standartu

Naujausius BCR-ABL1 Mbcr molekulinio atsako CML darbinius apibrėžimus pateikė ELN/EUTOS „Molecular Monitoring Steering Group“, rekomendavusi naudoti ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmidę (IRMM, Belgija): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Laikydamosi šios rekomendacijos, bendrovė QIAGEN atliko atitikimo tyrimą ir palygino *ipsogen* kelių paskirčių vieną plazmidę, naudojamą „*ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR“ rinkinyje (24) CE (kat. Nr. 670723), su ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmide (IRMM).

Palyginimas buvo grindžiamas BCR-ABL1 Mbcr/ABL1 normalizuoto kopijų skaičiaus santykiu (NCN), įvertintu naudojant bet kurį iš dviejų standartų skiedinių (*ipsogen* arba ERM-AD623 BCR-ABL1) ir kontrolinius mėginius, pateikiamus *ipsogen* rinkiniuose, ir sertifikuotą etaloninę medžiagą iš 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.

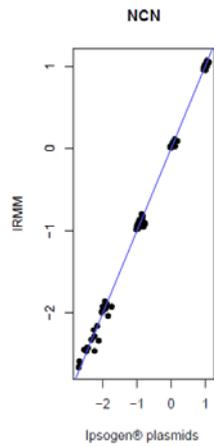


regresijos kreivė

C_T reikšmė

Log CN

12 pav. *ipsogen* ir ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmidžių standarto kreivės yra sulygiuotos.



NCN

IRMM

ipsogen® plazmidės

„*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR“ rinkinys.

13 pav. ERM-AD623 BCR-ABL1 reikšmės, palyginti su *ipsogen* NCN reikšmėmis.

QIAGEN tyrimu nustatyta, kad statistinio skirtumo nėra: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienos plazmidės ir *ipsogen* vienos plazmidės standartai pateikia lygiaverčius rezultatus.

Nuorodos

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.

Simboliai

Toliau pateikti simboliai gali būti nurodyti ant pakuotės ir etiketėse:

 Σ <N>	Sudėtyje yra reagentų, kurių pakanka <N> reakcijoms
	Naudoti iki
	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisas
	Kataloginis numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris
	Visuotinis prekinio vieneto numeris
	Temperatūros apribojimas
	Gamintojas
	Žiūrėkite naudojimo taisykles

Kontaktinė informacija

Norėdami gauti techninės pagalbos ir išsamesnės informacijos apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support, skambinkite 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš QIAGEN techninių tarnybų arba vietinių platintojų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Užsakymo informacija

Gaminys	Turinys	Kat. nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (24)	24 reakcijoms: Mbcr ir ABL vieno plazmido standartai, itin RNR teigiama kontrolė, IS-MMR kalibratorius, grunto ir bandinio mišinys ABL, grunto ir bandinio mišinys BCR-ABL Mbcr hibridinis genas	670723
„Rotor-Gene Q MDx“ – IVD patvirtintai tikrojo laiko PCR analizei klinikinėse programose		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Tikrojo laiko PCR cikleris ir didelės raiškos lydymo analizatorius su 5 kanalais (žalias, geltonas, oranžinis, raudonas, tamsiai raudonas) ir HRM kanalas, nešiojamas kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Tikrojo laiko PCR cikleris ir didelės raiškos lydymo analizatorius su 5 kanalais (žalias, geltonas, oranžinis, raudonas, tamsiai raudonas) ir HRM kanalas, nešiojamas kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, montavimas ir mokymai	9002033
<i>ipsogen</i> RT rinkinys – reversinei transkripcijai		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Reversinė transkriptazė, atsitiktinai parinktas gruntas, DTT, dNTP, RNase inhibitorius, RT buferis	679923
RNeasy rinkiniai – visos RNR grynimui		
RNeasy Midi Kit(50)	50 RNR preparatai: 50 „RNeasy Midi Spin“ kolonų, ėmimo mėgintuvėliai (15 ml), reagentai ir buferiai be RNase	75144

Norėdami sužinoti naujausią licenzijos informaciją ir konkrečiam gaminiui taikomus atsisakymus skaitykite atitinkamo QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. QIAGEN rinkinio vadovus ir naudotojo vadovus galima rasti

adresu **www.qiagen.com** arba jų galima prašyti iš QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

Šis gaminys skirtas naudoti diagnostikai *in vitro*. *ipsogen* gaminių negalima pakartotinai parduoti, keisti, pritaikant pakartotinam pardavimui, arba naudoti komercinių produktų gamybai negavus rašytinio QIAGEN patvirtinimo.

Šiame dokumente pateikta informacija gali būti pakeista be įspėjimo. QIAGEN neprisiima atsakomybės už bet kokias šiame dokumente galinčias pasitaikyti klaidas. Laikoma, kad šis dokumentas yra išsamus ir tikslus publikavimo metu. Jokiu atveju QIAGEN nebus laikoma atsakinga už atsitiktinę, specialiąją, daugybinę arba pasekinę žalą, susijusią arba kilusią iš šio dokumento naudojimo.

Garantuojama, kad *ipsogen* gaminiai atitinka nurodytus techninius duomenis. Tuo atveju, jei gaminys neveikia kaip numatyta, vienintelis QIAGEN įsipareigojimas ir vienintelė kliento kompensacija apribojama nemokamu gaminių pakeitimu.

Prekių ženklai: „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.“).

Ribotoji licencinė sutartis

Naudodamas šį gaminių bet kuris *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR rinkinio pirkėjas arba naudotojas sutinka su nurodytomis sąlygomis:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR rinkinys gali būti naudojamas tik laikantis *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR rinkinio vadovas* nurodymų ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia licencijos teisių pagal jokią savo intelektinę nuosavybę naudoti arba įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su bet kokiais į rinkinį neįtrauktais komponentais, išskyrus atvejus, aprašytus *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR rinkinio vadovas* ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com.
2. Išskyrus tai, kas aiškiai nurodyta licencijose, QIAGEN negarantuoja, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Licenzija suteikiama vienkartiniam šio rinkinio ir jo komponentų naudojimui ir jį negali būti panaudoti pakartotinai, konstrukciškai modifikuoti arba perparduoti.
4. QIAGEN atsisako visų kitų licenzijų, tiesiogiai išreikštų arba numatomų, išskyrus aiškiai nurodytas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka neatlikti arba neleisti kam nors kitam atlikti jokių žingsnių, dėl kurių būtų įvykdyti aukščiau uždrausti veiksmai arba palengvėtų jų įvykdymas. QIAGEN gali kreiptis į bet kurį teismą užtikrindama šios ribotos licencinės sutarties draudimų laikymąsi ir jai bus atlygintos visos tyrimo ir teismo išlaidos, įskaitant advokato honorarus, patirtos bet kokiuose teisiniuose veiksmuose, kurių ji bus priversta imtis užtikrindama šios ribotos licencinės sutarties arba bet kokių joje nurodytų intelektinės nuosavybės teisių, susijusių su rinkiniu ir (arba) jo komponentais, vykdymą.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, visos teisės saugomos.

www.qiagen.com

