

ipsogen[®] BCR-ABL1 mbc komplekta rokasgrāmata



1. versija

IVD

Kvantitatīvā analīze in vitro diagnostikā

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



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R2

MAT

1072506LV



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN nosaka tālāk norādīto procesu standartus.

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

Mūsu mērķis ir nodrošināt iespēju iegūt izcilus rezultātus un sasniegumus. Lai iegūtu vairāk informācijas, apmeklējiet www.qiagen.com.

Saturs

Paredzētais lietojums	4
Kopsavilkums un skaidrojums	4
Procedūras princips	5
Komplektā ietvertie materiāli	7
Komplekta saturs	7
Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā	8
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	9
Vispārējie piesardzības pasākumi	9
Reaģentu uzglabāšana un lietošana	10
Procedūra	11
RNS paraugu sagatavošana	11
Protokoli	
■ Ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze	11
■ qPCR instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM vai Rotor-Gene Q 5plex HRM ar 72 stobriņu rotoru	14
■ qPCR instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS un LightCycler 480	18
■ qPCR instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0	23
■ qPCR instrumentā SmartCycler	27
Rezultātu interpretēšana	30
Datu analīzes princips	30
Results (Rezultāti)	31
Problēmu novēršanas ceļvedis	33
Kvalitātes kontrole	36
Ierobežojumi	37
Veiktspējas raksturojums	37
Neklīniskie pētījumi	37
Klīniskie pētījumi	40
Atsauces	43
Simboli	45
Kontaktinformācija	45
Informācija par pasūtīšanu	46

Paredzētais lietojums

Ipsogen BCR-ABL1 mbcR komplekts ir paredzēts BCR-ABL p190 transkriptu kvantitatīvai noteikšanai kaulu smadzenēs vai perifēro asiņu paraugos pacientiem ar Ph pozitīvu akūtu limfoblastisku leukēmiju (ALL), kuriem iepriekš diagnosticēts BCR-ABL mbcR apvienotā gēna (fusion gene, FG) notikums. Iegūtie rezultāti ir paredzēti, lai uzraudzītu ārstēšanas efektivitāti pacientiem terapijas laikā un minimālās atlikušās slimības (minimal residual disease, MRD) novērošanai, lai uzraudzītu slimības recidīvu.

Kopsavilkums un skaidrojums

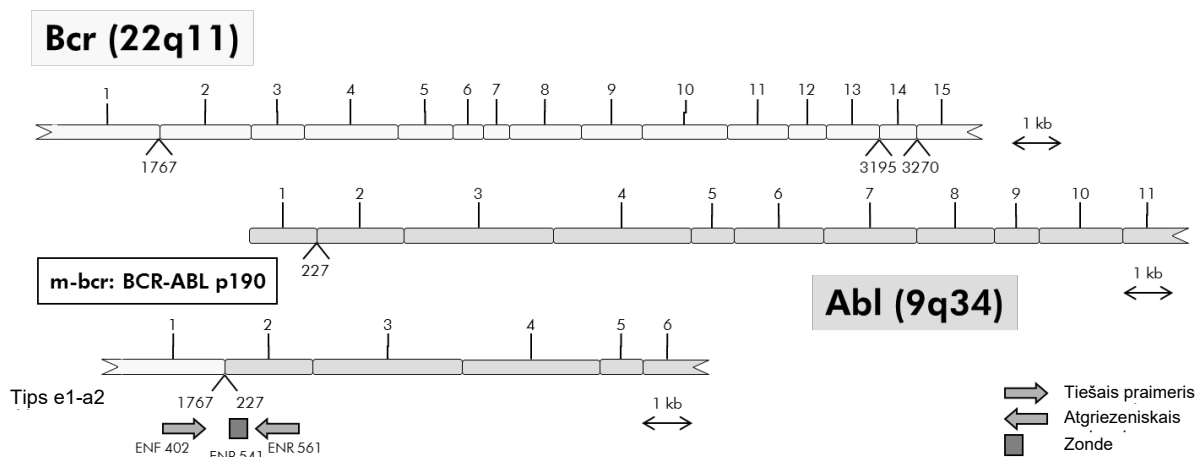
Filadelfijas (Ph) hromosoma ir visizplatītākā kariotipa novirze pieaugušajiem ar ALL. Kopumā tā parādās 20–30% pieaugušo pacientu ar ALL, un pacientiem, kas vecāki par 50 gadiem, tās izplatība pieaug līdz vairāk nekā 50% pacientu.

Šajā translokācijā ABL proto-onkogēna 3' segments 9. hromosomā ir pretstatīts BCR gēna 5' segmentam 22. hromosomā. BCR-ABL FG ir Ph hromosomas produkts, un tas ir konstitutīvi aktīvs tirozīna kināzes proteīns.

ABL gēna pārtraukumi parasti parādās pirmajā intronā. Pārrāvumi BCR gēnā parasti notiek vienā no šiem 3 reģioniem: 5,8 kb reģions, kas aptver 12.–16. eksonus, ko sauc par galveno pārtraukuma punktu klastera reģionu (MbcR), pirmā introna 55 kb sekvenca, ko sauc par mazo pārtraukuma punktu klastera reģionu (mbcR) un mikro pārtraukuma punktu klastera reģionu (μ -bcR).

Pārtraukuma punkti, kas rodas mbcR, savieno 1. eksonu (e1) ar ABL gēna otro eksonu (a2), kā rezultātā veidojas mazāks saplūšanas transkripts e1a2, kas kodē 190 kDa (p190) himērisko proteīnu (1. attēls). P190 BCR-ABL proteīns tiek novērots tikai Ph+ ALL, savukārt p210 BCR-ABL proteīns ir izplatīts 20–40% pacientu ar Ph+ ALL un gandrīz visiem pacientiem ar Ph+ hronisku mieloleikozi (HML).

Visām BCR-ABL saplūšanas proteīnu formām ir paaugstināta un deregulēta tirozīna kināzes aktivitāte, un ir pierādīts, ka p190 formai ir lielāks transformācijas potenciāls nekā p210. Turklāt šķiet, ka šis himēriskais proteīns deregulē normālos no citokīna atkarīgo signālu transdukcijas ceļus, izraisot apoptozes vai augšanas faktora neatkarīgas augšanas kavēšanu.



1. attēls. BCR-ABL mbcR FG transkripta shematiskā diagramma, ko aptver qPCR praimeris un zondes komplekts: ENF402–ENP541–ENR561. Skaitlis zem praimeriem un zondes norāda uz to nukleotīdu stāvokli normāla gēna transkriptā.

Ph+ ALL pacientu terapija ir optimizēta, ieviešot tirozīna kināzes inhibitorus, kas būtiski uzlaboja šo pacientu izdzīvošanas rādītāju (pārskatu skatīt 1. atsaucē). Šiem pacientiem ir nepieciešama MRD uzraudzība. Pašreizējā MRD līmeņa mērīšanas metodoloģija ietver reāllaika kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas (qPCR) izmantošanu, saskaņā ar kuru BCR-ABL transkripta numuri ir saistīti ar kontroles gēna transkripta numuriem. *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kit ir balstīts uz šo paņēmieni.

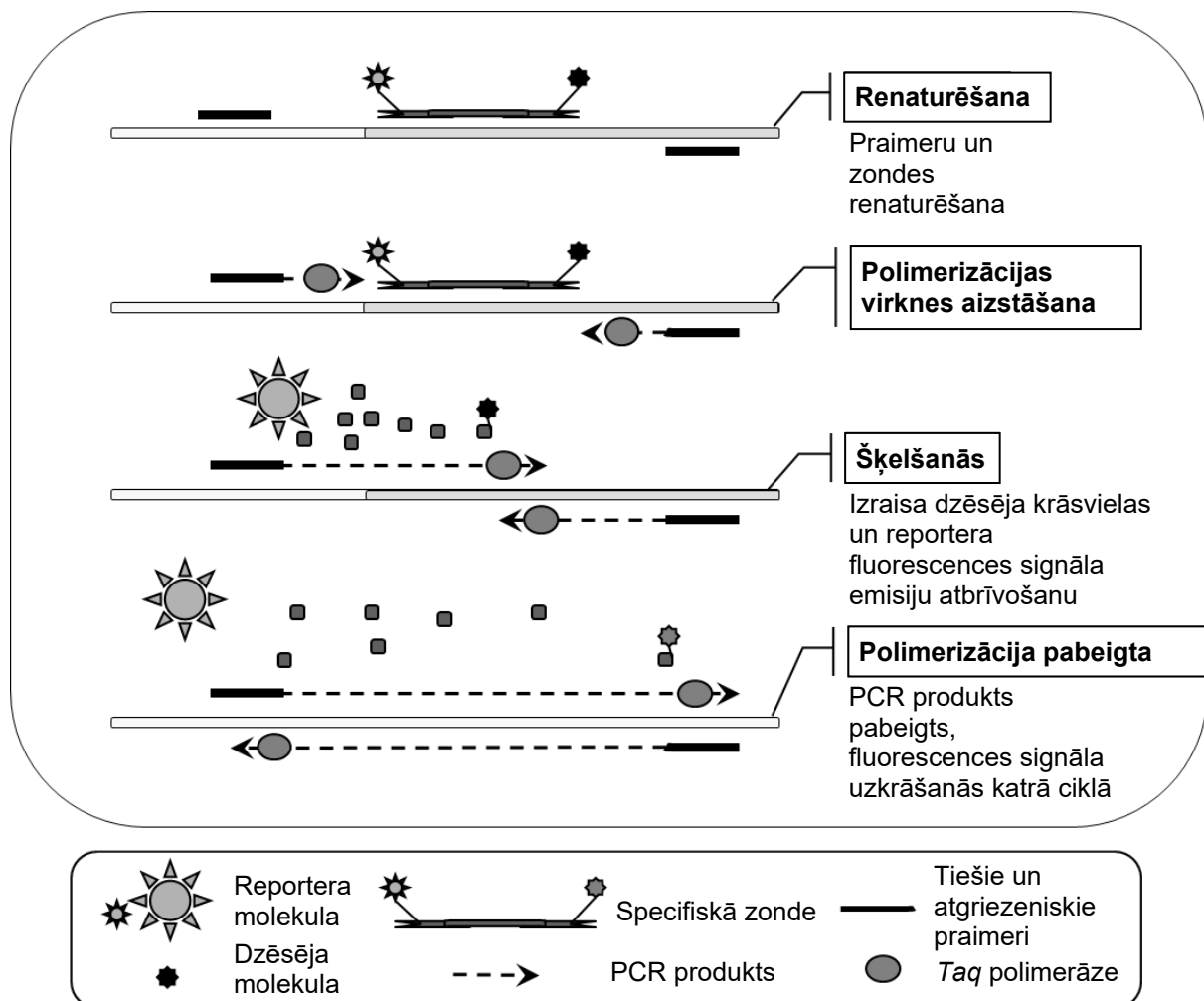
Procedūras princips

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

Šajā analīzē tiek izmantots qPCR divu krāsvielu oligonukleotīdu hidrolīzes princips. PCR laikā tiešie un atgriezeniskie praimeris hibridizējas ar noteiktu sekvenci. Tajā pašā maisījumā ir divu krāsvielu oligonukleotīds. Šī zonde, kuras sastāvā ir oligonukleotīds, kas ir iezīmēts ar 5' reportera krāsvielu un pakārtotu, 3' dzēsēja krāsvielu, hibridizējas ar mērķa sekvenci PCR produktā. qPCR analīze ar hidrolīzes zondēm izmanto *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāti. Ja zonde ir neskarta, reportera krāsvielas tuvums dzēsēja krāsvielai izraisa reportera fluorescences slāpēšanu, galvenokārt Förster tipa enerģijas pārnese dēļ.

Ja PCR laikā ir pieejams interesējošais mērķis, zonde normalizējas īpaši starp tiešā un atgriezeniskā praimera vietām. DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte sašķēļ zondi starp reporteru un dzēsēju tikai tad, ja zonde hibridizējas ar mērķi. Pēc tam zondes fragmenti tiek pārvietoti no mērķa un turpinās virknes polimerizācija. Zondes 3' gals tiek bloķēts, lai novērstu zondes pagarināšanos PCR laikā (2. attēls). Šis process notiek katrā ciklā, un tas nekavē eksponenciālu produkta uzkrāšanos.

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



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

Komplektā ietvertie materiāli

Komplekta saturs

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Kataloga Nr.		670023
Reakciju skaits		24
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrolgēna standarta atšķaidījums) (10 ³ kopijas/5 μl)	C1-ABL	50 μl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrolgēna standarta atšķaidījums) (10 ⁴ kopijas/5 μl)	C2-ABL	50 μl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrolgēna standarta atšķaidījums) (10 ⁵ kopijas/5 μl)	C3-ABL	50 μl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ¹ kopijas/5 μl)	F1-BCR- ABL e1a2 mbcr	50 μl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ² kopijas/5 μl)	F2-BCR- ABL e1a2 mbcr	50 μl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ³ kopijas/5 μl)	F3-BCR- ABL e1a2 mbcr	50 μl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁵ kopijas/5 μl)	F4-BCR- ABL e1a2 mbcr	50 μl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁶ kopijas/5 μl)	F5-BCR- ABL e1a2 mbcr	50 μl
Primers and Probe Mix ABL (ABL gēnam paredzēts praimeru un zondes maisījums)*	PPC-ABL 25x	90 μl
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene†	PPF-mbc 25x	110 μl
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit rokasgrāmata (latviešu valodā)		1

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

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

Piezīme. Pirms lietošanas uz īsu brīdi centrifugējiet standarta atšķaidījumus un praimeru un zondes maisījumus.

Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Reāģenti

- PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes
- Atgriezeniskajai transkriptāzei paredzētie reāģenti: Apstiprinātais reāģents ir Superscript® II (vai Superscript) Reverse Transcriptase, tas ietver 5x pirmās virknes buferšķīdumu, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. Nr. 18064-022)
- RNāzes inhibitors: Apstiprinātais reāģents ir RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. Nr. 10777-019)
- dNTP komplekts, PCR kategorijas
- Nejaušs heksamērs
- MgCl₂
- Buferšķīdums un Taq DNS polimerāze: Apstiprinātie reāģenti ir TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. Nr. 4304437) un LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. Nr. 04535286001)

Palīgmateriāli

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

Aprīkojums

- Mikrolitru pipete*, kas paredzēta PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Galda centrifūga* ar rotoru 0,2 ml/0,5 ml reakcijas stobriņiem (ar centrifugēšanas jaudu 10 000 apgr./min)
- Real-time PCR instruments: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM vai cits Rotor-Gene instruments; LightCycler 1.2, 2.0 vai 480; ABI PRISM 7000, 7700 vai 7900HT SDS vai SmartCycler instruments un saistīts specifisks materiāls
- Termiskais ciklotājs* vai ūdens vanna* (atgriezeniskās transkriptāzes darbība)

* Nodrošiniet, lai instrumenti tiktu pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

Papildu reaģenti

- *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit (kat. Nr. 670091), kas sastāv no šūnu līnijām ar BCR-ABL mbc apvienotā gēna negatīvu, augsti un zemi pozitīvu ekspresiju, lai veiktu RNS ekstrakcijas un atgriezeniskās transkriptāzes kvalitatīvu validāciju

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai in vitro diagnostikā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapās (Safety Data Sheet, SDS). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas vietnē www.qiagen.com/safety, kur ir pieejamas DDL skatīšanai un izdrukāšanai katram QIAGEN komplektam un tā komponentiem.

Izmetiet paraugu un analīžu atkritumus atbilstoši vietējiem drošības noteikumiem.

Vispārējie piesardzības pasākumi

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

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

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

Ievērojiet īpašu piesardzību, lai novērstu tālāk minētās situācijas.

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

Līdz ar to mēs iesakām veikt tālāk minētās darbības.

- Veicot analīzi, izmantojiet laboratorijas aprīkojumu bez nukleāzes (piem., pipešu uzgaļus, reakcijas flakonus) un cimdus.
- Lai izvairītos no paraugu un reaģentu savstarpējās kontaminācijas, visās pipetēšanas darbībās izmantojiet jaunus pipešu uzgaļus, kas ir izturīgi pret aerosolu.

- Sagatavojiet pirms PCR paredzēto Master maisījumu ar tam paredzētajiem materiāliem (pipetēm, uzgaļiem u. c.) tam paredzētajā vietā, kur nav nevienas DNS matricas (cDNS, DNS, plazmīda). Pievienojiet matricu atsevišķā zonā (vēlams atsevišķā telpā) ar specifisku materiālu (pipetēm, uzgaļiem utt.).
- Darbu ar standarta atšķaidījumiem (C1–3 un F1–5) veiciet atsevišķā telpā.

Reaģentu uzglabāšana un lietošana

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

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

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

Katra reaģenta derīguma termiņa datums ir norādīts uz konkrēto komponentu etiķetēm. Pareizos glabāšanas apstākļos izstrādājums saglabās veiktspēju līdz derīguma termiņa beigām, kas uzdrukāts uz etiķetes.

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

Procedūra

RNS paraugu sagatavošana

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

Protokols: leteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

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

Procedūra

1. **Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
2. **Inkubējiet 1 µg RNS (1–4 µl) 10 minūtes 70 °C temperatūrā un uzreiz atdzesējiet uz ledus 5 minūtes.**
3. **Uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 sekundes ar 10 000 apgr./min., lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā). Pēc tam glabājiet uz ledus.**
4. **Sagatavojiet tālāk minēto RT maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita (1. tabula).**

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

1. tabula. RT maisījuma sagatavošana

Komponents	Katra parauga tilpums (µl)	Galīgā koncentrācija
Pirmās virknes buferšķīdums (piegādāts ar Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (katrs 10 mM, iepriekš sagatavots un glabāts -20 °C temperatūrā alikvotās daļās)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, piegādāts ar Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
RNāzes inhibitors (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Nejaušs heksamērs (100 mM)	5,0	25 µM
Superscript II vai Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Uzsildīts RNS paraugs (pievienošanai 5. darbībā)	1,0–4,0	50 ng/µl
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes (pievienošanai 5. darbībā)	0,0–3,0	–
Gala tilpums	20,0	–

5. Pipetējiet 16 µl RT maisījumu katrā PCR stobriņā. Pēc tam pievienojiet 1–4 µl (1 µg) RNS (no 3. darbības) un pielāgojiet tilpumu līdz 20 µl ar PCR kategorijas ūdeni bez nukleāzes (skatiet 2. tabulu).

2. tabula. Atgriezeniskās transkriptāzes reakcijas sagatavošana

Komponents	Tilpums (µl)
RT maisījums	16
Uzsildīts RNS paraugs (1 µg)	1–4
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	0–3
Gala tilpums	20

6. Kārtīgi sajauciet un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 sekundes ar 10 000 apgr./min., lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā).
7. Inkubējiet 20 °C temperatūrā 10 minūtes.
8. Inkubējiet termālā amplifikatorā 42 °C temperatūrā 45 minūtes un pēc tam uzreiz 99 °C temperatūrā 3 minūtes.
9. Atdzesējiet uz ledu (lai apturētu reakciju) 5 minūtes.
10. Uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 sekundes ar 10 000 apgr./min., lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā). Pēc tam glabājiet uz ledu.
11. Atšķaidiet gala cDNS ar 30 µl PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes tā, lai gala tilpums būtu 50 µl.
12. Veiciet PCR saskaņā ar tālāk norādītajiem protokoliem un savu qPCR instrumentu.

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

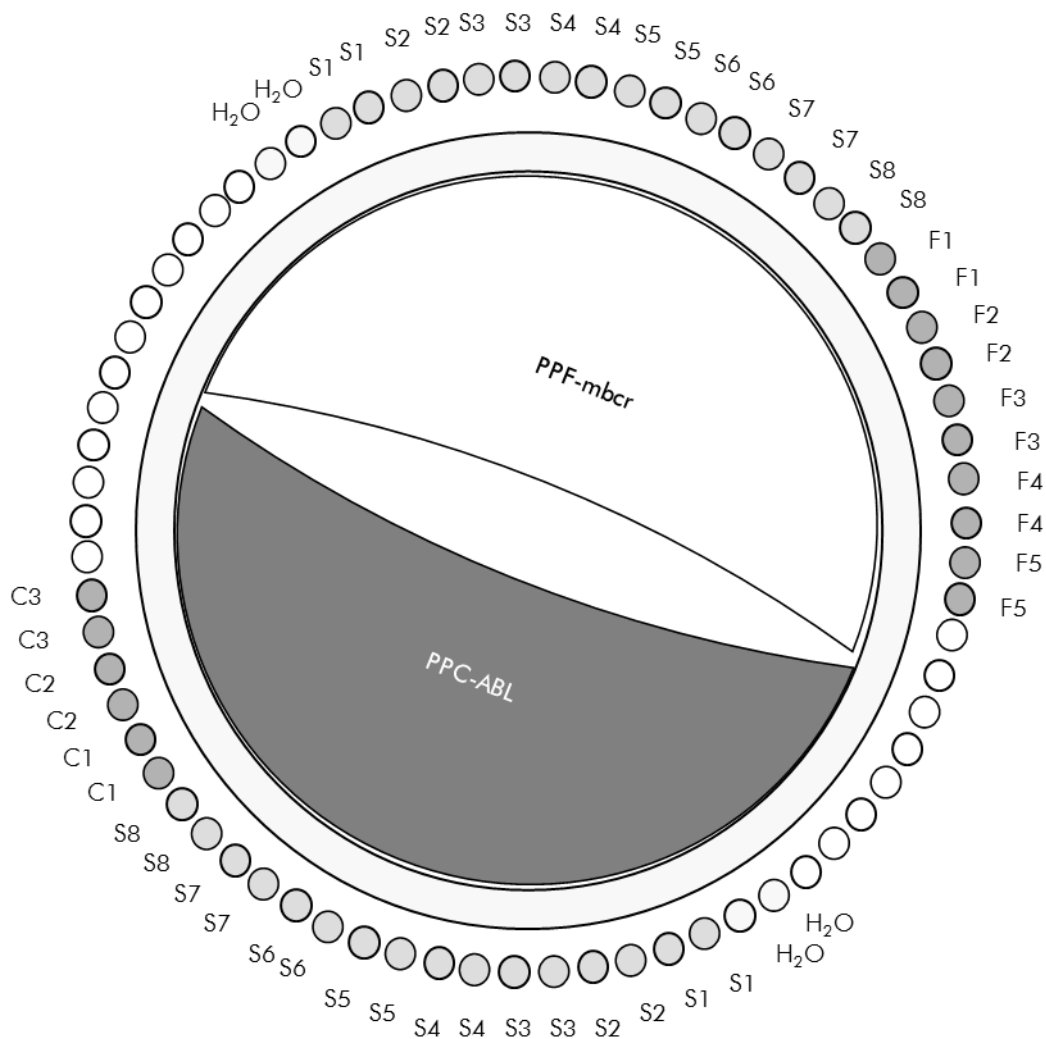
Izmantojot šo instrumentu, mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros, kā norādīts 3. tabulā.

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

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	2 x 3 reakcijas (3 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontrole	2 reakcijas
Ar BCR-ABL mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-mbcr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
mbcr standarts	2 x 5 reakcijas (5 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontrole	2 reakcijas

Paraugu apstrāde Rotor-Gene Q instrumentos ar 72 stobriņu rotoru

Mēs iesakām vienā eksperimentā testēt vismaz 8 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu.



3. attēls. Ieteicamais rotora iestatījums katram eksperimentam ar *ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit*. F1–5: BCR-ABL mbcr standarti; C1–3: ABL standarti; S: cDNS paraugs; H₂O: ūdens kontrole.

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

Aizpildiet visas pārējās pozīcijas ar tukšiem stobriņiem.

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

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas galīgajam tilpumam.

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

4. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (µl)	ABL: 24+1 reakcija (µl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 reakcijas (µl)	Galīgā koncentrācija
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	25	29	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	162,5	188,5	–
Paraugs (pievienošanai 4. solī)	5	5 katram	5 katram	–
Kopējais tilpums	25	25 katram	25 katram	–

- Pievienojiet katrā stobriņā 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
- Pievienojiet 5 µl RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt "Protokols: leteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze", 11) attiecīgajā stobriņā (kopējais tilpums 25 µl).
- Uzmanīgi samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.
- Ievietojiet stobriņus termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Ieprogramējiet Rotor-Gene Q instrumentam termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 5. tabulā.

5. tabula. Temperatūras profils

Analīzes režīms	Kvantitatīvā noteikšana
Glabāšana	Temperatūra: 50 grādi Laiks: 2 min.
Hold 2 (2. glabāšana)	Temperatūra: 95 grādi Laiks: 10 min.
Ciklošana	50 reizes 95 grādi 15 sekundes 60 grādi 1 min., iegūstot FAM fluorescenci kanālā Green: Single (Viens)

8. Izmantojot Rotor-Gene Q instrumentus, analīzei atlasiet “Slope Correct” (Slīpums pareizs). Mēs iesakām iestatīt robežvērtību 0,03. Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 5. tabulā.

Protokols: qPCR instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS un LightCycler 480

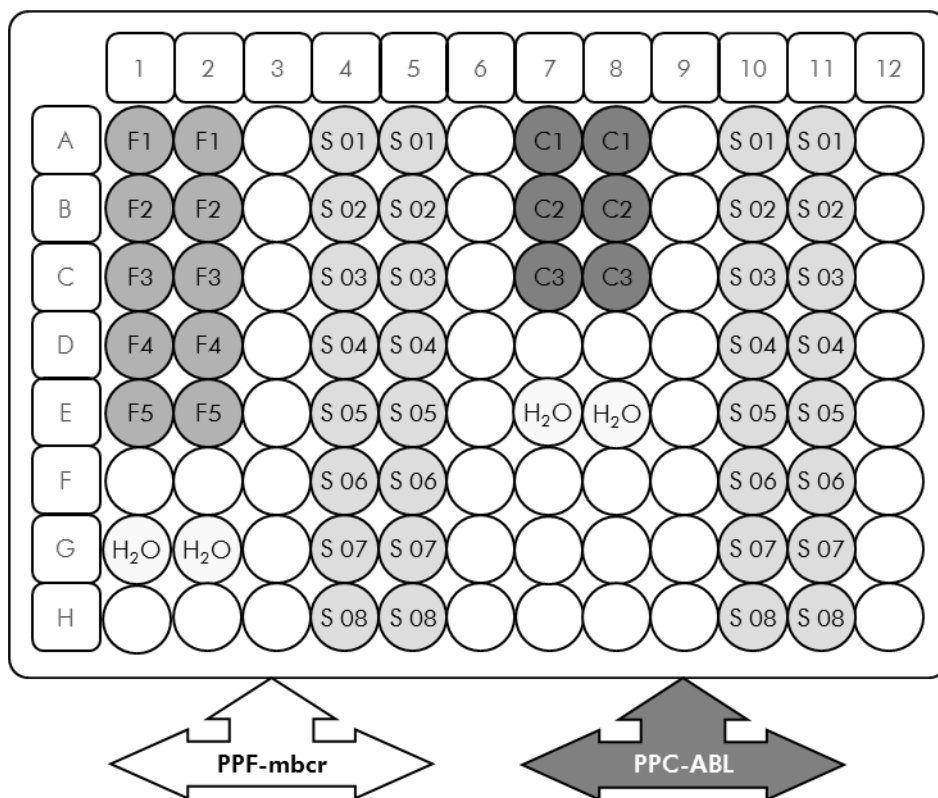
Izmantojot qPCR iekārtu ar 96 iedobju plati, mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros, kā norādīts 6. tabulā.

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

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	2 x 3 reakcijas (3 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontrole	2 reakcijas
Ar BCR-ABL mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-mbcr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
mbcr standarts	2 x 5 reakcijas (5 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontrole	2 reakcijas

Paraugu apstrāde instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900 SDS un LightCycler 480

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



4. attēls. Ieteicamais plates iestatījums vienam eksperimentam. S: cDNS paraugs; **F1–5:** BCR-ABL mbcr standarti; **C1–3:** ABL standarti; **H₂O:** ūdens kontrole.

qPCR instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900 SDS un LightCycler 480

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita. Ja tiek izmantota qPCR iekārta ar 96 iedobju plati, mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas galīgajam tilpumam.

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

7. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (µl)	ABL: 24+1 reakcija (µl)	BCR-ABL mbc: 28+1 reakcijas (µl)	Galīgā koncentrācija
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	25	29	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	162,5	188,5	–
Paraugs (pievienošanai 4. solī)	5	5 katram	5 katram	–
Kopējais tilpums	25	25 katram	25 katram	–

3. Pievienojiet katrā iedobē 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
4. Pievienojiet 5 µl RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt "Protokols: Ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze", 11) attiecīgajā iedobē (kopējais tilpums 25 µl).
5. Uzmanīgi samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.
6. Aizveriet plati un uz īsu brīdi centrifugējiet (300 x g, aptuveni 10 sekundes).
7. Ievietojiet plati termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem. Ieprogramējiet termālajam amplifikatoram termālā cikla programmu, kā norādīts 8. tabulā attiecībā uz ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS vai 9. tabulā instrumentam LightCycler 480.

8. tabula. Temperatūras profils instrumentiem ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS

Analīzes režīms	Standarta līkne — absolūtā daudzuma noteikšana
Glabāšana	Temperatūra: 50 °C Laiks: 2 minūtes
2. glabāšana	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes
Ciklošana	50 reizes 95 °C 15 sek. 60 °C 1 min., iegūstot FAM fluorescenci; dzēsējs: TAMRA

9. tabula. Temperatūras profils instrumentam LightCycler 480

Analīzes režīms	Absolūtā daudzuma noteikšana (“Abs Quant”)
Noteikšanas formāti	Logā Detection formāts (Noteikšanas formāti) atlasiet “Simple Probe” (Vienkāršā zonde)
Glabāšana	Temperatūra: 50 °C Laiks: 2 minūtes
2. glabāšana	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes
Ciklošana	50 reizes 95 °C 15 sek. 60 °C 1 min., iegūstot FAM fluorescenci, kas atbilst (483–533 nm) LC versijai 01 un (465–510 nm) LC versijai 02

8. Instrumentiem ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS veiciet 8a. darbību. Instrumentam LightCycler 480 veiciet 8b. darbību.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS: mēs iesakām iestatīt robežvērtību uz 0,1, kā norādīts EAC protokola analīzes darbībā ar ABI PRISM SDS, un sākumstāvokli iestatiet starp 3. un 15. ciklu. Palaidiet ciklošanas programmu, kā norādīts 8. tabulā.

8b. LightCycler 480 instruments: mēs iesakām izmantot analīzes režīmu Fit point (Atbilstības punkts) ar fona vērtību 2,0 un robežvērtību 2,0. Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 9. tabulā.

Protokols: qPCR instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0

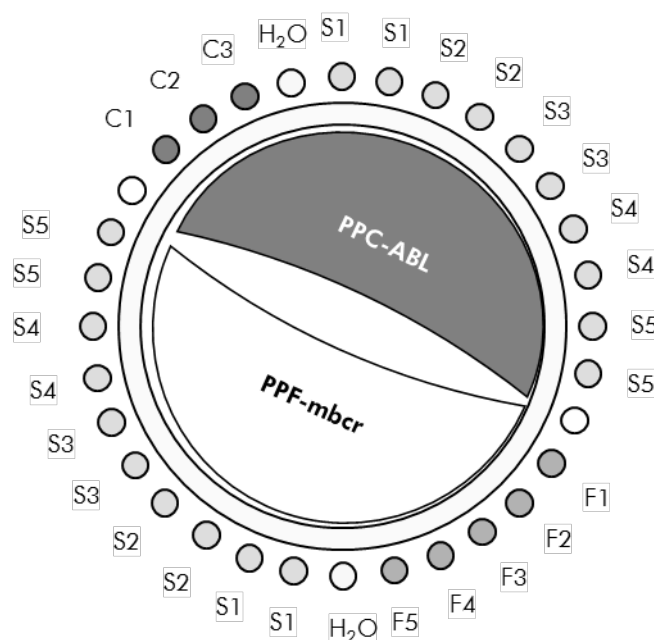
Izmantojot kapilāru instrumentus, mēs iesakām izmērīt paraugus divreiz un kontroles materiālus izmērīt vienreiz, kā norādīts 10. tabulā.

10. tabula. Reakciju skaits instrumentiem LightCycler 1.2 un 2.0

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	1 x 3 reakcijas (3 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontrole	1 reakcija
Ar BCR-ABL mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-mbcr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
mbcr standarts	1 x 5 reakcijas (5 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontrole	1 reakcija

Paraugu apstrāde instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz 5 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Kapilāru shēmā 5. attēlā parādīts šāda eksperimenta piemērs.



5. attēls. Ieteicamais rotora iestatījums katram eksperimentam ar *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. F1–5: BCR-ABL mbcr standarti; C1–3: ABL standarti; S: nezināms analizējams DNS paraugs; H₂O: ūdens kontrole.

qPCR instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0

Piezīme. Īpašu tehnoloģisko prasību dēļ LightCycler eksperimenti jāveic, izmantojot specifiskus reaģentus. Lai sagatavotu Master Mix 5x, mēs iesakām izmantot LightCycler TaqMan Master un ievērot ražotāja norādījumus.

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas galīgajam tilpumam.

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

11. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (μ l)	ABL: 14+1 reakcijas (μ l)	BCR-ABL mbc: 16+1 reakcijas (μ l)	Galīgā koncentrācija
Tikko sagatavots LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60	68,0	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	0,8	12	13,6	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	10,2	153	173,4	–
Paraugšs (pievienošanai 4. solī)	5,0	5 katram	5,0 katrs	–
Kopējais tilpums	20,0	20 katrs	20,0 katrs	–

- Pievienojiet katrā kapilārā 15 μ l iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
- Pievienojiet 5 μ l RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt "Protokols: leteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze", 11) attiecīgajā stobriņā (kopējais tilpums 20 μ l).
- Uzmanīgi samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.
- Ievietojiet kapilārus adapteros, kas iekļauti komplektācijā ar iekārtu, un uz īsu brīdi centrifugējiet (700 x g, aptuveni 10 sekundes).
- Ievietojiet kapilārus termiskajā ciklotājā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Ieprogramējiet instrumentiem LightCycler 1.2 vai 2.0 termālā cikla programmu, kā norādīts 12. tabulā.

12. tabula. Temperatūras profils

Analīzes režīms	Daudzuma noteikšana
Glabāšana	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes Paātrinājums: 20
Ciklošana	50 reizes 95 °C 10 sek.; paātrinājums: 20 60 °C 1 min.; paātrinājums: 20; iegūstot FAM fluorescenci: Single (Viens)
2. glabāšana	45 °C 1 min.; paātrinājums: 20

9. Instrumentam LightCycler 1.2 veiciet 9a. darbību. Instrumentam LightCycler 2.0 veiciet 9b. darbību.
- 9a. LightCycler 1.2: Ieteicams izmantot F1/F2 un režīmu “2nd derivative analysis” (Otrā derivāta analīze). Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 12. tabulā.
- 9b. LightCycler 2.0: Lai iegūtu reproducējamus rezultātus, mēs iesakām LightCycler 2.0 programmatūras versijā 4.0 izmantot Automated (Automatizēts) (F''maks.) analīzi. Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 12. tabulā.

Protokols: qPCR instrumentā SmartCycler

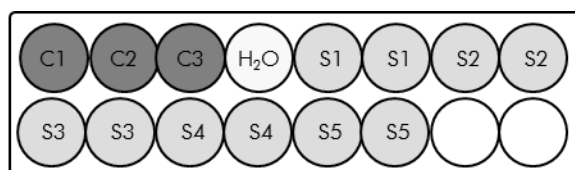
Izmantojot šo instrumentu, mēs iesakām mērīt paraugus divreiz un kontroles materiālus vienreiz, kā norādīts 13. tabulā.

13. tabula. Reakciju skaits instrumentam SmartCycler

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	1 x 3 reakcijas (3 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontrole	1 reakcija
Ar BCR-ABL mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-mbcr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
mbcr standarts	1 x 5 reakcijas (5 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontrole	1 reakcija

Paraugu apstrāde instrumentā SmartCycler

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz 5 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Divu bloku shēmā 6. attēlā parādīts piemērs.



Visas analīzes pirmajā blokā tiek veiktas ar PPC-ABL.



Visas analīzes otrajā blokā tiek veiktas ar PPF-mbcr.

6. attēls. Ieteicamais plates iestatījums vienam eksperimentam. S: cDNS paraugs; F1–5: BCR-ABL mbcr standarti; C1–3: ABL standarti; H₂O: ūdens kontrole.

qPCR instrumentā SmartCycler

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

1. **Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
2. **Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas galīgajam tilpumam.

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

14. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (µl)	ABL: 14+1 reakcijas (µl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reakcijas (µl)	Galīgā koncentrācija
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	15	17	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	97,5	110,5	–
Paraugs (pievienošanai 4. solī)	5	5 katram	5 katram	–
Kopējais tilpums	25	25 katram	25 katram	–

3. **Pievienojiet katrā iedobē 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.**
4. **Pievienojiet 5 µl RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt "Protokols: leteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze", 11) attiecīgajā stobriņā (kopējais tilpums 25 µl).**
5. **Uzmanīgi samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.**

6. Ievietojiet paraugus termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
7. Ieprogramējiet instrumentam SmartCycler termālā cikla programmu, kā norādīts 15. tabulā.

15. tabula. Temperatūras profils

Glabāšana	Temperatūra: 50 °C Laiks: 2 minūtes
2. glabāšana	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes
Ciklošana	50 reizes 95 °C 15 sek. 60 °C 1 min. ar fluorescences iegūšanu: Single (Viens)

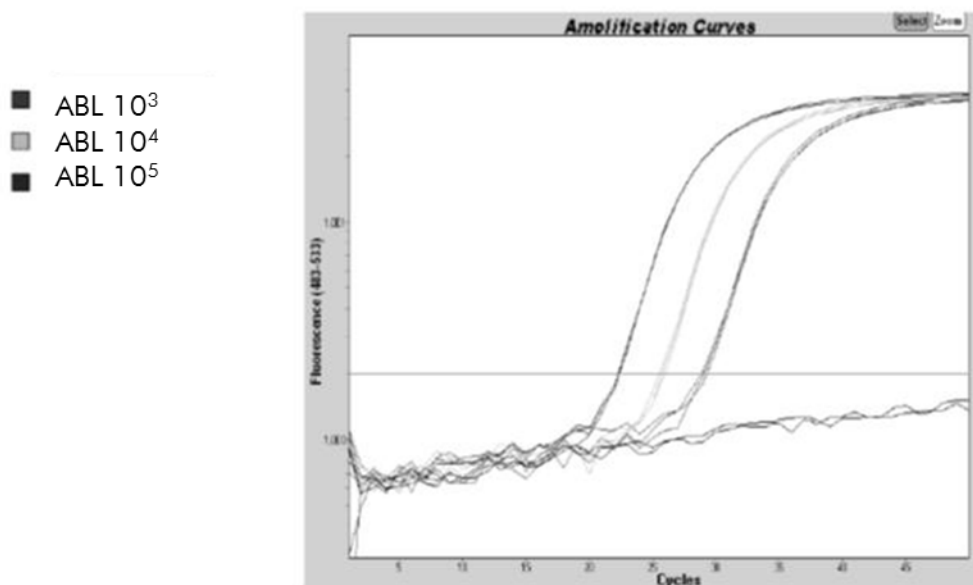
8. Mēs iesakām iestatīt robežvērtību uz 30. Startējiet termiskās ciklošanas programmu, kā norādīts 15. tabulā.

Rezultātu interpretēšana

Datu analīzes princips

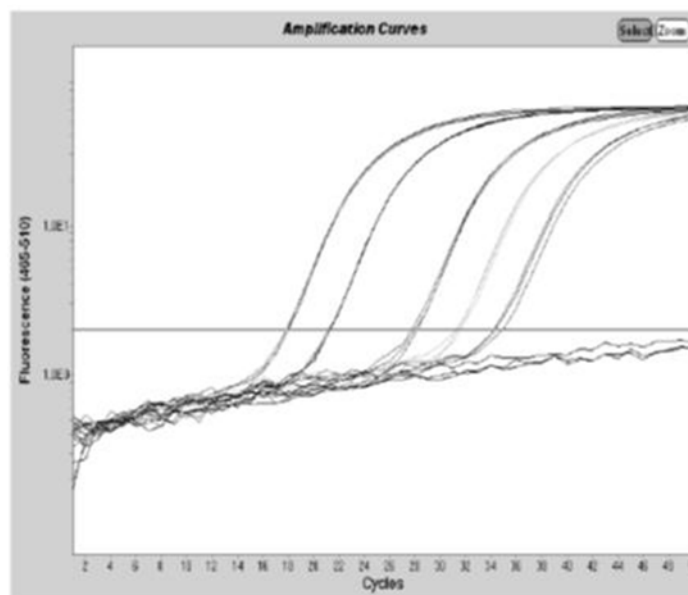
Izmantojot TaqMan tehnoloģiju, PCR ciklu skaitu, kas nepieciešams signāla noteikšanai virs robežvērtības, sauc par robežvērtības ciklu (C_T), un tas ir tieši proporcionāls mērķa daudzumam reakcijas sākumā.

Izmantojot standartus ar zināmu molekulu skaitu, var izveidot standarta līkni un noteikt precīzu mērķa daudzumu testa paraugā. *ipsogen* standarta līknes ir atkarīgas no plazmīdām; mēs izmantojam 3 plazmīdu standarta atšķaidījumus CG gēnam un 5 standarta atšķaidījumus FG gēnam, lai nodrošinātu precīzas standarta līknes. Ar *ipsogen* BCR-ABL mbc Kit iegūto TaqMan amplifikācijas līkņu piemērs parādīts 7. un 8. attēlā.



7. attēls. ABL standartu noteikšana (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 un 10^5 kopijas/5 μ l.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6



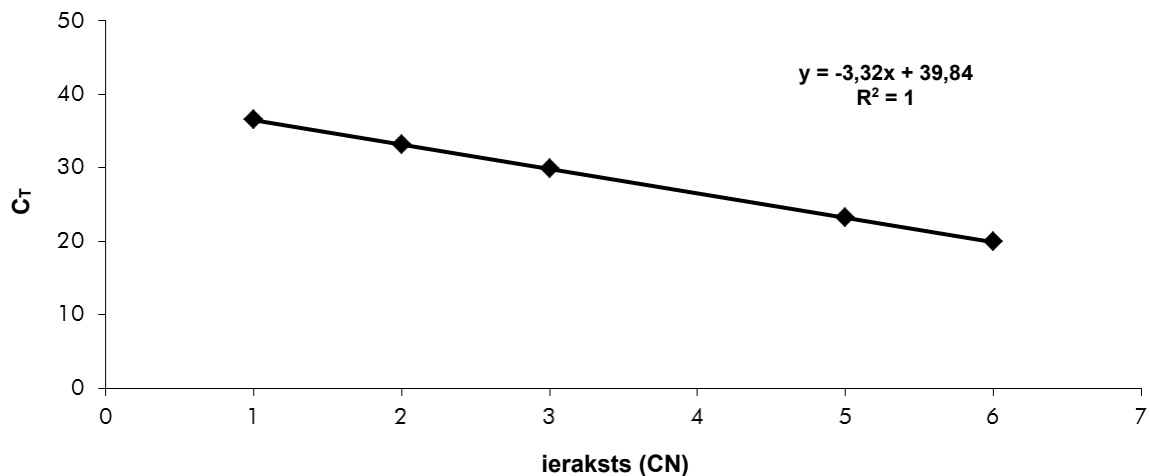
8. att. BCR-ABL mbc r standartu noteikšana (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopijas/5 μ l.

Results (Rezultāti)

Standarta līkne un kvalitātes kritēriji

Neapstrādātos datus var iekopēt Excel[®] failā analīzei.

Diagrammā atkarībā no ieraksta kopijas numura (3, 4 un 5 cikliem C1, C2 un C3; 1, 2, 3, 5 un 6 cikliem F1, F2, F3, F4 un F5) katram gēnam (ABL un BCR-ABL) tiek attēlotas C_T vērtības, kas iegūtas no plazmīdu standarta atšķaidījumiem. 9. attēlā parādīts teorētiskās līknes piemērs, kas aprēķināta ar 5 standarta atšķaidījumiem.



9. attēls. Teorētiskā līkne, kas aprēķināta ar 5 standarta atšķaidījumiem. Katram gēnam (ABL un BCR-ABL) tiek aprēķināta lineārā regresijas līkne ($y = ax + b$), kur a ir līnijas slīpums un b ir y krustojums, kas ir y koordināta punktam, kur līnija šķērso y asi. Tās vienādojums un noteikšanas koeficients (R^2) tiek uzdrukāts diagrammā.

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

Normalizēto kopiju skaits (Normalized Copy Number, NCN)

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

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

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

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

MRD vērtība

Minimālā atlikušās slimības (MRD) vērtība ir attiecība starp CG normalizēto FG ekspresiju pēcpārbaudē $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ un diagnostikas paraugos $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

Jutība

Jutība (SENS_v) tiek aprēķināta, ņemot vērā FG relatīvo ekspresiju diagnozes noteikšanas laikā (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} un CG ekspresiju (CG_{CN,FUP}) novērošanas paraugā.

$$\text{Jutība (SENS}_v\text{)} = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

Kvalitātes kontrole ABL vērtībām

Zemas kvalitātes RNS vai qPCR darbību laikā radušos problēmu dēļ ABL_{CN} var būt zems. Mēs iesakām atņemt rezultātus no paraugiem, kuru ABL_{CN} < 1318 (zemāka 95 % TI vērtība no pacienta paraugiem EAC pētījumā, 4. atsauce).

Reproducējamība starp atkārtojumiem

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

C_T vērtību variācijas starp atkārtojumiem parasti ir < 1,5, ja vidējā atkārtojumu C_T vērtība ir < 36 (2).

Piezīme. Katram lietotājam ir jāizmēra reproducējamība savā laboratorijā.

Ūdens kontroles

Negatīvās kontroles materiāliem jābūt nulle CN.

Pozitīvs ūdens kontroles materiāls rodas krusteniskās kontaminācijas rezultātā. Risinājumu skatiet tālāk sniegtajā sadaļā "Problēmu novēršanas ceļvedis"

Problēmu novēršanas ceļvedis

Šie norādījumi par problēmu novēršanu var palīdzēt novērst iespējamās problēmas. Sīkāku informāciju skatiet arī lapā "Biežāk uzdotie jautājumi", kas pieejama mūsu tehniskā atbalsta centra vietnē:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbildēs uz jūsu jautājumiem par informāciju un protokolu šajā rokasgrāmatā, kā arī paraugu un analīžu metodēm (kontakinformāciju skatiet sadaļā "Kontakinformācija", 45).

Komentāri un ieteikumi

Negatīvs rezultāts kontroles gēnam (ABL) un BCR-ABL mbcR visos paraugos — standarta kārtībā

- a) Zema RNS kvalitāte Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (Augsti pozitīva kontrole *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, kat. Nr. 670091).
- b) Kļūda atgriezeniskās transkriptāzes darbības laikā Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, kat. Nr. 670091).

Kontrolgēnam (ABL) paraugos negatīvs rezultāts — ar standartu viss ir kārtībā

- a) Zema RNS kvalitāte Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, kat. Nr. 670091).
- b) Kļūda atgriezeniskās transkriptāzes darbības laikā Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, kat. Nr. 670091).

Negatīvs standarta signāls

- a) Pipetēšanas kļūda Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu.
Atkārtojiet PCR izpildi.
- b) Neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana Glabājiet *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kit temperatūrā no –15 °C līdz –30 °C un sargājiet praimeru un zondes maisījumus (PPC un PPF) no gaismas. Skatīt "Reaģentu uzglabāšana un lietošana", 10.
Nesalsdējiet un neatkausējiet atkārtoti.
Glabāšanas nolūkā sadaliet reaģentus alikvotās daļās.

Komentāri un ieteikumi

Negatīvie kontroles materiāli ir pozitīvi

Krusteniskā kontaminācija

Nomainiet visus kritiskos reaģentus.

Atkārtojiet eksperimentu ar jaunajām visu reaģentu alikvotajām daļām.

Lai novērstu pārneses kontamināciju, vienmēr lietojiet paraugus, komplekta komponentus un palīgmateriālus saskaņā ar vispārpieņemto praksi.

Nav signāla, pat standarta kontrolēs

- a) Pipetēšanas kļūda vai izlaisti reaģenti
- Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu.
- Atkārtojiet PCR izpildi.
- b) Parauga materiālam ir inhibējoša iedarbība nepietiekamas izdalīšanas dēļ
- Atkārtojiet RNS sagatavošanu.
- c) LightCycler: izvēlēts nepareizs noteikšanas kanāls
- Iestatiet Channel Setting (Kanāla iestatījums) uz F1/F2 vai 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: nav ieprogrammēta datu iegūšana
- Pārbaudiet cikla programmas.
- PCR programmas katra normalizācijas segmenta beigās atlasiet datu iegūšanas režīmu "single" (viens).

Paraugos trūkstošs vai zems signāls, bet ar standarta kontroles materiāliem viss ir kārtībā

- a) Zema RNS kvalitāte vai zema koncentrācija
- Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
- Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. Nr. 670091).
- b) Kļūda atgriezeniskās transkriptāzes darbības laikā
- Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
- Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, kat. Nr. 670091).

Komentāri un ieteikumi

Fluorescences intensitāte ir pārāk zema

- a) Neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana
Glabājiet *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kit temperatūrā no –15 °C līdz –30 °C un sargājiet praimeru un zondes maisījumus (PPC un PPF) no gaismas. Skatīt "Reaģentu uzglabāšana un lietošana", 10.
Nesasaldējiet un neatkausējiet atkārtoti.
Glabāšanas nolūkā sadaliet reaģentus alikvotās daļās.
- b) Ļoti zems mērķa RNS sākotnējais daudzums
Palieliniet parauga RNS daudzumu.
Piezīme. Atkarībā no izvēlētās RNS sagatavošanas metodes var rasties inhibējoša iedarbība.

LightCycler: Fluorescences intensitāte mainās

- a) Pipetēšanas kļūda
Pipetēšanas kļūdas izraisīto mainīgumu var mazināt, analizējot datus režīmā F1/F2 vai 530 nm/640 nm.
- b) Nepietiekama kapilāru centrifugēšana
Sagatavotais PCR maisījums joprojām var atrasties kapilāra augšējā vadā, vai arī kapilāra galā varētu būt gaisa burbulis.
Vienmēr centrifugējiet ar reakcijas maisījumu piepildītos kapilārus, kā aprakstīts konkrētās iekārtas lietošanas rokasgrāmatā.
- c) Kapilāra gala ārējā virsma ir netīra
Rīkojoties ar kapilāriem, vienmēr izmantojiet cimdus.

LightCycler: standarta līknes kļūda

- Pipetēšanas kļūda
Pipetēšanas kļūdas izraisīto mainīgumu var mazināt, analizējot datus režīmā F1/F2 vai 530 nm/640 nm.

Kvalitātes kontrole

Visa komplekta kvalitātes kontrole tika veikta instrumentā LightCycler 480. Šis komplekts ir ražots saskaņā ar standartu ISO 13485:2003. Analīzes sertifikāti ir pieejami pēc pieprasījuma vietnē www.qiagen.com/support/.

Ierobežojumi

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

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

Pievērsiet uzmanību derīguma termiņa datumiem, kas norādīti uz kastītes un visu komponentu etiķetēm. Nedrīkst izmantot komponentus, kam beidzies derīguma termiņš.

Piezīme. Komplekts ir izstrādāts saskaņā ar “Eiropa pret vēzi” (Europe Against Cancer, EAC) pētījumiem (4), un tas atbilst atjauninātajiem starptautiskajiem ieteikumiem (3, 5). Tas jāizmanto, ievērojot šajā rokasgrāmatā sniegtos norādījumus, kombinācijā ar apstiprinātiem reaģentiem un instrumentiem (skatīt “Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā”, 8). Jebkura šī produkta izmantošana un/vai sastāvdaļu modificēšana ārpus etiķetē sniegtajiem norādījumiem anulēs QIAGEN atbildību.

Veiktspējas raksturojums

Neklīniskie pētījumi

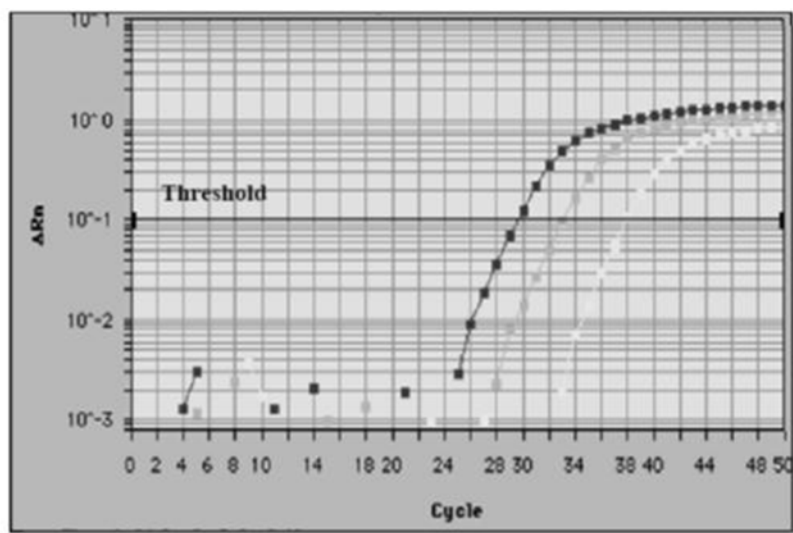
Materiāli un metodes

Iekārtā ABI PRISM 7700 SDS kopā ar sadaļā “Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā”, 8 uzskaitītajiem reaģentiem tika veikts veiktspējas novērtējums. Ekvivalences pētījumos tika apstiprināts tās lietojums šādos instrumentos: ABI PRISM 7000 un 7900HT SDS, LightCycler 1.2 un 480 instrumentā, Rotor-Gene 3000 un SmartCycler instrumentā (6).

Tika veikti neklīniski pētījumi, lai noteiktu ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit analītisko veiktspēju. Šie neklīniskie laboratorijas pētījumi tika veikti ar kopējo RNS no TOM1 šūnu līnijas, kas atšķaidīta ar MV4-11 šūnu līnijas kopējās RNS nemainīgu galīgo daudzumu.

Lai noteiktu analīzes atkārtojamību, vienā izpildes reizē veicot 5 atkārtojumus un veicot 4 dažādas izpildes, tika analizētas 5 dažādas TOM1 kopējās RNS koncentrācijas (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg un 5 pg), kas atšķaidītas MV4-11 kopējā RNS, ar nemainīgu galīgo kopējo daudzumu 1000 ng (10. attēls).

- TOM1 5×10^{-3}
- TOM1 5×10^{-4}
- TOM1 5×10^{-5}



10. attēls. 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) un 5×10^{-5} (0,05 ng) TOM1 kopējās RNS atšķaidījumu amplifikācijas diagrammas MV4-11 negatīvajā kopējā RNS.

Analītiskie dati

16.–19.. tabulā parādītas startestu analīzes ar vidējo robežvērtības ciklu (C_T), standartnovirzi (standard deviation, SD), paraugu skaitu (n), variācijas koeficientu (coefficient of variation, CV), vidējo kopiju skaitu (copy number, CN) un vidējo normalizēto kopiju skaitu (normalized copy number, NCN).

16. tabula. Starptestu analīze — šūnu līnijas mbcr un ABL

Šūnu līnija	Atšķaidījums	Vidējais C_T	SN	n	VK (%)
mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	29,19	0,26	20	0,88
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	33,70	0,48	20	1,47
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

17. tabula. Starptestu analīze — plazmīdas

Gēns	Plazmīda	Vidējais C _T	SN	n	VK (%)
mbcr	F1 (10 ¹ kopija)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² kopijas)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ kopijas)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ kopijas)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ kopijas)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ kopijas)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ kopijas)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ kopijas)	22,53	0,42	12	1,86

18. tabula. Starptestu analīze — šūnu līnijas BCR-ABL mbcr un ABL (vidējais CN)

Šūnu līnija	Atšķaidījums	Vidējais CN	SN	n	VK (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	—	22 038,22	9459,17	100	42,92

19. tabula. Starptestu analīze — šūnu līnija BCR-ABL mbcr (vidējais NCN)

Šūnu līnija	Atšķaidījums	Vidējais NCN*	SN	n	VK (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	267,46	93,22	20	34,85
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	23,54	7,36	20	31,28
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	2,60	2,80	20	107,66

* Tikai šiem pētījuma rezultātiem NCN tiek
sniegts kā

$$\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000.$$

Klīniskie pētījumi

Iekārtā ABI PRISM 7700 SDS kopā ar sadaļā “Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā”, 8 uzskaitītajiem reaģentiem tika veikts veikspējas novērtējums. Ekvivalences pētījumos tika apstiprināts tās lietojums šādos instrumentos: ABI PRISM 7000 un 7900HT SDS, LightCycler 1.2 un 480 instrumentā, Rotor-Gene 3000 un SmartCycler instrumentā (6).

Programmas “Eiropa pret vēzi” (Europe Against Cancer, EAC) saskaņotās rīcības ietvaros organizētā 26 laboratoriju grupa no 10 Eiropas valstīm izmantoja IPSOGEN piedāvātās plazmīdas, lai izveidotu standartizētu protokolu, kas paredzēts galveno, ar leukēmiju saistīto apvienoto gēnu qPCR analīzei klīniskajā vidē. BCR-ABL p190 transkripts bija viens no pētījumā iekļautajiem kodolsintēzes gēniem (FG). Šeit ir pieejams šī apstiprinājuma pētījuma kopsavilkums; visi rezultāti ir publicēti 2003 (4, 7).

Starplaboratoriju reproducējamība CG un FG plazmīdu standartiem

Vienpadsmit laboratorijas veica starplaboratoriju reproducējamības eksperimentu, lai novērtētu mainīgumu CG un FG plazmīdu standarta atšķaidījumos. Atšķaidījumi tika veikti divreiz katrā iestādē. 20. tabulā norādīts vidējais rādītājs, standartnovirze un CV (%) katram atšķaidījumam.

20. tabula. Starplaboratoriju reproducējamība CG un FG plazmīdu standartiem

Gēns	Atšķaidījums	Vidēji	C _T SD	VK (%)
ABL kontrolgēns	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
BCR-ABL mbcr apvienotais gēns	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

BCR-ABL mbcr FG transkripta ekspresijas vērtības

21. un 22. tabulā parādītas BCR-ABL mbcr FG transkripta un ABL CG ekspresijas vērtības TOM1 šūnu līnijai, ALL pacientiem diagnozes noteikšanas laikā un normāliem pacientiem.

21. tabula. BCR-ABL mbcr FG transkripta un ABL CG ekspresijas vērtības — C_T vērtības

	C _T vērtības (95 % diapazons)	
	BCR-ABL mbcr	ABL
TOM1 šūnu līnija	22,8	21,8
ALL pacientu paraugi		
BM (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
PB (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Negatīvie pacientu paraugi		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

22. tabula. BCR-ABL mbcr FG transkripta un ABL CG ekspresijas vērtības — CC un NCN vērtības

	CN vērtības (95 % diapazons)		NCN vērtības (95 % diapazons)
	BCR-ABL mbcr	ABL	CN BCR-ABL mbcr/CN ABL
ALL pacientu paraugi			
BM (n = 17)	9550 (1738–97 724)	11 912 (5012–70 795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91 201 (1905–208 930)	134 896 (4786–114 815)	0,68 (0,4–1,82)
Negatīvie pacientu paraugi			
BM (n = 26)	–	19 201 (12 922–25 480)	–
PB (n = 74)	–	21 136 (17 834–24 437)	–

ABL C_T vērtības neatšķirās ne starp parastiem un leukēmiskiem paraugiem, ne starp paraugu veidiem (PB vai BM) vai leukēmijas paraugiem (ALL, AML, CML).

Viltus pozitīvās un viltus negatīvās vērtības

Viltus negatīvās un viltus pozitīvās vērtības tika aprēķinātas, izmantojot tālāk norādītos kontroles materiālus.

- Pozitīvās kontroles materiāli: TOM1 šūnas — šūnu līnijas, kas BCR-ABL p190 apvienotajam gēnam parasti rada pozitīvus rādītājus; pacienta paraugi ir jau novērtēti attiecībā uz p190 pozitīvajiem rādītājiem
- Negatīvās kontroles materiāli: Negatīvi RNS paraugi, nav neviena amplifikācijas kontroles materiāla (no amplification controls, NAC), kas tiktu izgatavots no *E. coli* RNS, nevis cilvēka RNS, lai pārbaudītu PCR kontamināciju, kā arī nav neviena veidnes kontroles materiāla (no template controls, NTC), kas cilvēka RNS vietā saturētu ūdeni

FG RNS paraugu amplifikācija tika veikta trīs reizes un CG - divas reizes.

Viltus negatīvs paraugs tika definēts kā pozitīvs RNS paraugs ar mazāk nekā 50 % pozitīvo iedobju (0/2, 0/3 vai 1/3).

Viltus pozitīvs paraugs tika definēts kā negatīvs paraugs ar vismaz 50 % pozitīvu iedobju (1/2, 2/3 vai 3/3).

23. tabulā parādīts viltus negatīvu un viltus pozitīvu paraugu skaits un procentuālais daudzums.

23. tabula. Viltus negatīvi un viltus pozitīvi paraugi

Viltus negatīvi rādītāji		Viltus pozitīvi rādītāji	
10 ⁻³	10 ⁻⁴	FG negatīvas kontroles materiāls	NAC/NTC
0 % (0/54)	4 % (3/75)	4,8 % (6/126)	5,8 % (7/120)

Atsauces

QIAGEN uztur plašu atjauninātu tiešsaistes zinātnisku publikāciju par QIAGEN produktiem datu bāzi. Vispusīgas meklēšanas iespējas ļauj meklēt nepieciešamos rakstus, vai nu vienkārši norādot atslēgas vārdu, vai norādot procedūru, izpētes jomu, nosaukumu utt.

Lai iegūtu pilnīgu atsauču sarakstu, apmeklējiet QIAGEN atsauču datu bāzi vietnē www.qiagen.com/RefDB/search.asp vai sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu vai vietējo izplatītāju.

Citētās atsauces

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program **2007**, 435.
2. 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.
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. 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.
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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. Leukemia **19**, 305.
7. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia **17**, 2474.

Simboli

Uz iepakojuma un marķējuma var būt tālāk norādītie simboli.



<N>

Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām



Izlietot līdz



In vitro diagnostikas medicīniskā ierīce



Kataloga numurs



Partijas numurs



Materiāla numurs



Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs



Temperatūras ierobežojums



Ražotājs



Skatīt lietošanas instrukcijas

Kontaktinformācija

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

Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. Nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	24 reakcijām: ABL kontrolgēna standarti, BCR-ABL mbc apvienotā gēna standarti, praimera un zondes maisījums ABL, praimera un zondes maisījums BCR-ABL mbc apvienotajam gēnam	670023
Rotor-Gene Q MDx — IVD apstiprinātajai real-time PCR analīzei klīniskajos lietojumos		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cikleris un augstas izšķirtspējas kušanas analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, tumšsarkans) un HRM kanālu, klēpjdatore, programmatūra, piederumi, 1 gada garantija daļām un darbam, bet instalēšana un apmācība nav iekļauta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cikleris un augstas izšķirtspējas kušanas analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, tumšsarkans) un HRM kanālu, klēpjdatore, programmatūra, piederumi, 1 gada garantija daļām un darbam, instalēšana un apmācība	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit — RNS ekstrakcijas un BCR-ABL mbc apvienotā gēna atgriezeniskās transkriptāzes kvalitatīvai validācijai		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Šūnu līnijas ar negatīvo, augsti un zemi pozitīvo BCR-ABL mbc apvienotā gēna ekspresiju	670091

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

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

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

ipsogen produktiem tiek garantēta atbilstība noteiktajām specififikācijām. QIAGEN vienīgais pienākums un klienta vienīgais tiesiskās aizsardzības līdzeklis ir produkta nomaņa bez maksas, ja produkti nedarbojas, kā norādīts.

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

Ierobežots licences līgums

Šī izstrādājuma izmantošana apliecina katru *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

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

Atjauninātos licences nosacījumus skatiet vietnē www.qiagen.com.

HB-1357-002-LV © 2013–2015 QIAGEN, visas tiesības paturētas.

www.qiagen.com

Austrālija ■ techservice-au@qiagen.com

Austrija ■ techservice-at@qiagen.com

Beļģija ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazīlija ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Kanāda ■ techservice-ca@qiagen.com

Ķīna ■ techservice-cn@qiagen.com

Dānija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Somija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Francija ■ techservice-fr@qiagen.com

Vācija ■ techservice-de@qiagen.com

Honkonga ■ techservice-hk@qiagen.com

Indija ■ techservice-india@qiagen.com

Īrija ■ techservice-uk@qiagen.com

Itālija ■ techservice-it@qiagen.com

Japāna ■ techservice-jp@qiagen.com

Koreja (dienvidi) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luksemburga ■ techservice-bnl@qiagen.com

Meksika ■ techservice-mx@qiagen.com

Nīderlande ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norvēģija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapūra ■ techservice-sg@qiagen.com

Zviedrija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Šveice ■ techservice-ch@qiagen.com

Apvienotā Karaliste ■ techservice-uk@qiagen.com

ASV ■ techservice-us@qiagen.com

