

November 2017

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *ipsogen*[®] PML-RARA bcr1



Έκδοση 1

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το σύστημα Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR και τα όργανα LightCycler[®] και SmartCycler[®]

IVD

CE

REF



R5 MAT

672123

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden
Γερμανία

1108718EL

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περίληψη και ερμηνεία	4
Αρχές της διαδικασίας	7
Υλικά που παρέχονται	10
Περιεχόμενα του κιτ.....	10
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται.....	11
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	13
Γενικές προφυλάξεις.....	13
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	15
Διαδικασία	16
Προετοιμασία RNA δείγματος.....	16
Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC	16
Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή Rotor-Gene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων	19
Πρωτόκολλο: qPCR στο ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480	24
Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0	30
Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο SmartCycler.....	34
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	38
Αρχή της ανάλυσης δεδομένων.....	38
Αποτελέσματα	39
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	43

Ποιοτικός έλεγχος	46
Περιορισμοί	47
Χαρακτηριστικά απόδοσης	48
Μη κλινικές μελέτες	48
Κλινικές μελέτες.....	51
Βιβλιογραφία	56
Σύμβολα	57
Πληροφορίες παραγγελίας	59

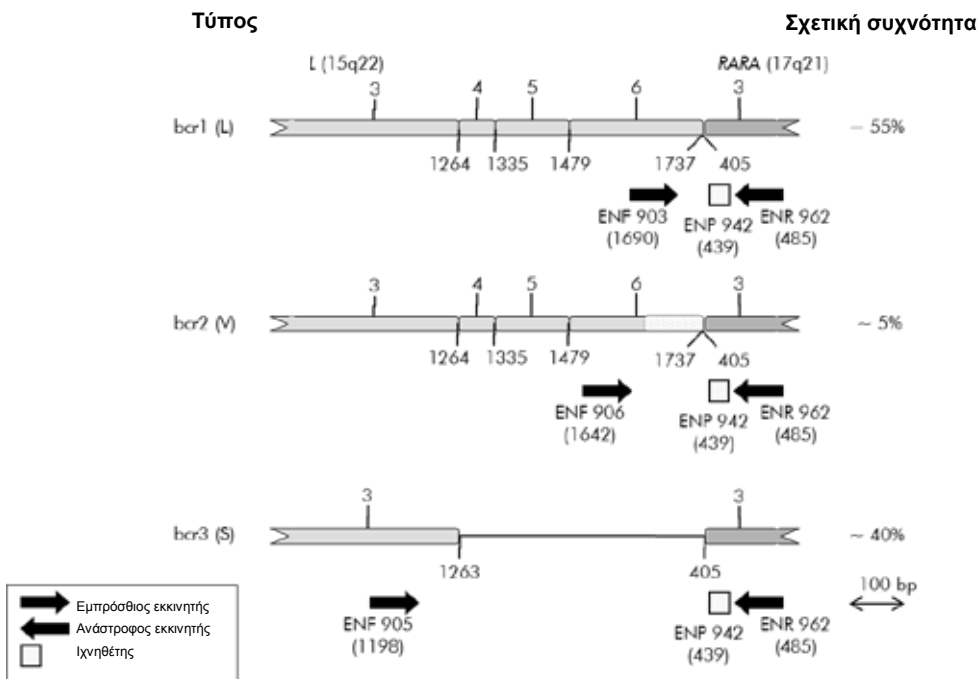
Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 προορίζεται για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων σύντηξης bcr1 τύπου PML-RARA σε δείγματα μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος σε μια υποομάδα ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ, AML) που διαγνώστηκαν με κυτταρομορφολογία M3 και μετάθεση t(15;17)(q22;q21), με σημείο διακοπής στο ιντρόνιο 6 του PML. Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα προορίζονται για να χρησιμοποιούνται ως ένα βοήθημα για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία, καθώς και για την παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) για την παρακολούθηση της υποτροπής της νόσου.

Περίληψη και ερμηνεία

Τα μεταγραφήματα του γονιδίου σύντηξης (FG) PML-RARA, τα οποία είναι το μοριακό αποτέλεσμα της μετάθεσης t(15;17)(q22;q21), συσχετίζονται με την πλειονότητα των περιπτώσεων οξείας προκοκκιοκυτταρικής λευχαιμίας (APL) (>90%), ένα διακριτό υποσύνολο της ΟΜΛ με κυτταρομορφολογία M3 που αποτελεί το 10–15% όλων των περιπτώσεων ΟΜΛ. Η ισορροπημένη αμοιβαία μετάθεση t(15;17) οδηγεί στη σύντηξη του γονιδίου προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (PML) με τον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος άλφα (RARA) παράγοντας την πρωτεΐνη σύντηξης PML-RARA. Η χιμαιρική πρωτεΐνη PML-RARA είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας. Η έκφρασή της συσχετίζεται με μειωμένη μυελοειδή διαφοροποίηση, λόγω αυξημένης συγγένειας για το σύμπλοκο πυρηνικής πρωτεΐνης καταστολέα (NcoR), αλλοίωσης της δομής της χρωματίνης από την ιστόνη αποακετυλασών (HDAC), και αναστολής της μεταγραφής. Η θεραπεία με all-trans ρετινοϊκό οξύ (ATRA) είναι ιδιαίτερος αποτελεσματική στην APL και δρα ως διαφοροποιητικός παράγοντας προάγοντας την απελευθέρωση του συμπλόκου NCoR/HDAC, αποκαθιστώντας έτσι τη φυσιολογική μεταγραφή.

Τα σημεία διακοπής του RARA πάντα συμβαίνουν στο ιντρόνιο 2. Ανάλογα με τη θέση των σημείων διακοπής εντός της θέσης PML, μπορεί να σχηματιστούν το ιντρόνιο 6, εξόνιο 6 και ιντρόνιο 3, οι αντίστοιχοι υποτύποι μεταγραφήματος PML-RARA που αναφέρονται ως μακρύ (L ή *bcr1*), παραλλαγή (V ή *bcr2*), και βραχύ (S ή *bcr3*) (Εικόνα 1). Αυτοί οι υποτύποι μεταγραφήματος αντιπροσωπεύουν το 55%, 5% και 40% των περιπτώσεων, αντίστοιχα.



Εικόνα 1. Σχηματικό διάγραμμα του μεταγραφήματος PML-RARA FG που καλύπτεται από τους εκκινητές και σύνολο ανιχνευτών EAC qPCR. Για τον τύπο *bcr1* (L): ENF903–ENP942–ENR962. Για τον τύπο *bcr2* (V): ENF906–ENP942–ENR962. Για τον τύπο *bcr3* (S): ENF905–ENP942–ENR962. Ο αριθμός κάτω από τους εκκινητές και τον ανιχνευτή αναφέρεται στη θέση του νουκλεοτιδίου στο μεταγράφημα του φυσιολογικού γονιδίου. Η σχετική συχνότητα αναφέρεται στην αναλογία κάθε τύπου μεταγραφημάτων FG μεταξύ των παραλλαγών PML-RARA.

Η συνδυασμένη θεραπεία με χημειοθεραπεία με βάση ανθρακυκλίνη και ATRA είναι ιδιαίτερα επιτυχής στην APL, παρέχοντας μακροχρόνιες υφέσεις και πιθανή θεραπεία στο 70% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. Ωστόσο, υποτροπή και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης εξακολουθούν να παρατηρούνται στο 15–25% των ασθενών. Η ανίχνευση του μοναδικού γονιδίου σύντηξης PML-RARA μέσω συμβατικής ποιοτικής αντίστροφης μεταγραφής- αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για ταχεία διάγνωση και πρόβλεψη της ανταπόκρισης στις θεραπείες. Εντούτοις, αυτή η τεχνική παρουσιάζει μειονεκτήματα και η ευαισθησία της είναι σχετικά χαμηλή.

Η ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων PML-RARA μέσω ποσοτικής PCR (qPCR) πραγματικού χρόνου παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα. Είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και αναπαραγώγιμη τεχνική η οποία επιτρέπει επίσης την αξιολόγηση της κινητικής. Η ανάλυση της προγνωστικής αξίας ενός καλά τεκμηριωμένου τυποποιημένου πρωτοκόλλου qPCR (Πρόγραμμα EAC) στους ασθενείς με APL κατά τη διάρκεια διαφορετικών φάσεων θεραπείας έχει δείξει ότι αυτή η προσέγγιση είναι μια ισχυρή εναλλακτική λύση για την αξιολόγηση της MRD, και ότι η διαστρωμάτωση του κινδύνου υποτροπής μπορεί να καθοριστεί με βάση τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων PML-RARA. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης μετά τη σταθεροποίηση, ένας θετικός προσδιορισμός qPCR αποτελεί ισχυρό προγνωστική δείκτη επακόλουθης αιματολογικής υποτροπής. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας συντήρησης, και πέρα από το τέλος της θεραπείας, μια θετική εξέταση qPCR σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής και μικρότερη επιβίωση. Η διαστρωμάτωση του κινδύνου υποτροπής με βάση την ποσοτικοποίηση του κανονικοποιημένου αριθμού αντιγράφων (NCN) PML-RARA διαχωρίζει τους ασθενείς σε 3 ομάδες: εκείνους με υψηλό κίνδυνο υποτροπής, εκείνους με ενδιάμεσο κίνδυνο και εκείνους με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής (1). Η παρακολούθηση PML-RARA μέσω ευαίσθητης ανίχνευσης του μεταγραφήματος θεωρείται ως αναπόσπαστο μέρος της συνολικής θεραπευτικής στρατηγικής στην APL (βλ. παραπομπές 2 και 3 για λεπτομέρειες), σύμφωνα με την οποία ο τύπος και η ένταση της θεραπείας διαμορφώνονται σε ασθενείς με διαφορετικούς κινδύνους υποτροπής κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης.

Η τυποποίηση και επικύρωση της μεθόδου ποσοτικοποίησης της MRD τεκμηριώθηκαν σε ένα πολυκεντρικό πρόγραμμα που διενεργήθηκε από το EAC και δημοσιεύθηκε το 2003 (4, 5). Το kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 βασίζεται σε αυτήν την τεχνική.

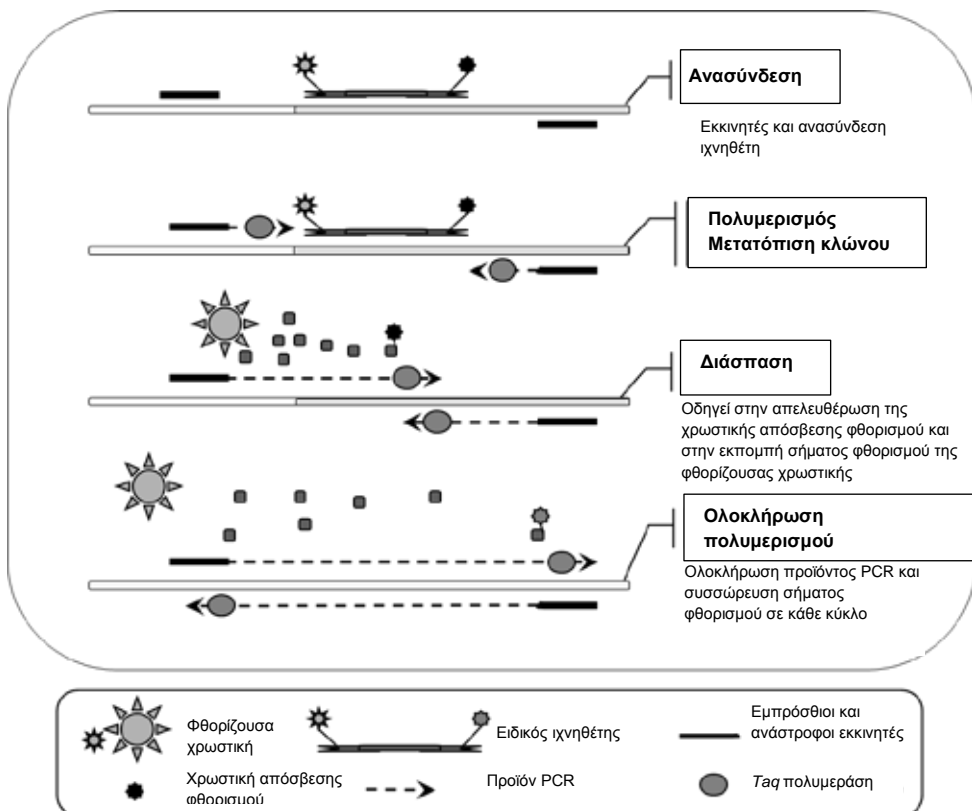
Αρχές της διαδικασίας

Η τεχνική qPCR επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της διεργασίας ενίσχυσης PCR. Επιπλέον, τα δεδομένα PCR μπορούν να ληφθούν γρήγορα, χωρίς μετεπεξεργασία PCR, μέσω ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο των σημάτων φθορισμού κατά τη διάρκεια ή/και μετά την κυκλοποίηση PCR, μειώνοντας έτσι δραστικά τον κίνδυνο επιμόλυνσης του προϊόντος PCR. Επί του παρόντος, υπάρχουν διαθέσιμοι 3 κύριοι τύποι τεχνικών qPCR: Ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί χρωστική SYBR® Green I, ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ιχνηθέτες υδρόλυσης, και ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ιχνηθέτες υβριδισμού.

Αυτός ο προσδιορισμός εκμεταλλεύεται την αρχή της ολιγονουκλεοτιδικής υδρόλυσης διπλής χρωστικής qPCR. Κατά τη διάρκεια της PCR, εμπρόσθιοι ή ανάστροφοι εκκινητές υβριδίζουν σε μια ειδική αλληλουχία. Ένα ολιγονουκλεοτίδιο διπλής χρώσης περιέχεται στο ίδιο μείγμα. Αυτός ο ιχνηθέτης, ο οποίος αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με μια φθορίζουσα χρωστική (reporter) στο 5' άκρο του και μια καθοδική χρωστική απόσβεσης φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο του, υβριδίζει σε μια αλληλουχία-στόχο εντός του προϊόντος PCR. Η ανάλυση qPCR με τους ιχνηθέτες υδρόλυσης εκμεταλλεύεται τη δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης από *Thermus aquaticus* (*Taq*). Όταν ο ιχνηθέτης είναι άθικτος, η εγγύτητα της φθορίζουσας χρωστικής με τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού οδηγεί σε καταστολή του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής κυρίως μέσω μεταφοράς ενέργειας τύπου Förster.

Κατά τη διάρκεια της PCR, εάν ο στόχος ενδιαφέροντος είναι παρών, ο ιχνηθέτης ανασυνδέεται ειδικά μεταξύ των θέσεων εμπρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών. Η δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον ιχνηθέτη μεταξύ της φθορίζουσας χρωστικής και της χρωστικής απόσβεσης φθορισμού μόνο εάν ο ιχνηθέτης υβριδίζει στο στόχο. Τα θραύσματα του ανιχνευτή στη συνέχεια μετατοπίζονται από το στόχο, και ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται. Το 3' άκρο του ανιχνευτή μπλοκάρεται για να αποτραπεί η επέκταση του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της PCR (Εικόνα 2). Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα σε κάθε κύκλο και δεν παρεμβαίνει στην εκθετική συσσώρευση του προϊόντος.

Η αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνο εάν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική στον ιχνηθέτη και ως εκ τούτου ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR. Λόγω αυτών των απαιτήσεων, δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Συνεπώς, η αύξηση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με την ενίσχυση του στόχου κατά τη διάρκεια της PCR.



Εικόνα 2. Γενική αρχή της αντίδρασης. Το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα και το παραγόμενο cDNA ενισχύεται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών και έναν ειδικό εσωτερικό ιχνηθέτη διπλής χρώσης (FAMTM–TAMRATM). Το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα και το παραγόμενο cDNA ενισχύεται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών και έναν ειδικό εσωτερικό ιχνηθέτη διπλής χρώσης (FAMTM–TAMRATM). Ο ιχνηθέτης συνδέεται στο αμπλικόνιο κατά τη διάρκεια κάθε βήματος ανασύνδεσης της PCR. Όταν η *Taq* επεκτείνεται από τον εκκινητή που είναι συνδεδεμένος στο αμπλικόνιο, μετατοπίζει το 5' άκρο του ανιχνευτή, το οποίο στη συνέχεια αποικοδομείται από τη δραστηριότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης της *Taq* DNA πολυμεράσης. Η διάσπαση συνεχίζεται μέχρι την τήξη του αμπλικονίου από τον υπολειπόμενο ιχνηθέτη. Αυτή η διεργασία απελευθερώνει το φθορισμοφόρο και τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού, διαχωρίζοντάς τα στο χώρο και οδηγώντας σε μια αύξηση του φθορισμού από το FAM και μια μείωση του φθορισμού από το TAMRA.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του kit

<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit		(24)
Αρ. καταλόγου		672123
Αριθμός αντιδράσεων		24
Συστατικό	Όνομα	Ποσότητα
ABL Control Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^3 αντίγραφα/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^4 αντίγραφα/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^5 αντίγραφα/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραιώση γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1) (10^1 αντίγραφα/5 μ l)	F1-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραιώση γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1) (10^2 αντίγραφα/5 μ l)	F2-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραιώση γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1) (10^3 αντίγραφα/5 μ l)	F3-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραιώση γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1) (10^5 αντίγραφα/5 μ l)	F4-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (τυπική αραιώση γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1) (10^6 αντίγραφα/5 μ l)	F5-PML-RARA bcr1	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL (Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1) [†]	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 μ l
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit Handbook (Εγχειρίδιο kit <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1) (αγγλικά)		1

* Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο-μάρτυρα ABL συν ειδικός ιχνηθέτης FAM-TAMRA.

[†] Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο σύντηξης PML-RARA bcr1 συν ειδικός ανιχνευτής FAM-TAMRA.

Σημείωση: Φυγοκεντρίστε σύντομα τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα και τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών πριν τη χρήση.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Βεβαιωθείτε πως τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Αντιδραστήρια

- | Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση
- | Αντιδραστήρια για ανάστροφη μεταγραφή: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι ανάστροφη μεταγραφή Superscript® II (ή Superscript), περιλαμβάνει 5x ρυθμιστικό διάλυμα πρώτου κλώνου, 100 mM DTT (Life Technologies, αριθμός καταλόγου 18064-022)
- | Αναστολέας RNAσών: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι RNaseOUT™ (Life Technologies, αρ. καταλόγου 10777-019)
- | Σετ dNTP, κατηγορίας εφαρμογών PCR
- | Τυχαιο εξαμερές
- | MgCl₂
- | Ρυθμιστικό διάλυμα και Taq DNA πολυμεράση: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι TaqMan® Universal PCR Master Mix (κύριο μείγμα PCR 2x) (Life Technologies, αρ. καταλόγου 4304437) και LightCycler TaqMan Master (κύριο μείγμα PCR 5x) (Roche, αρ. καταλόγου 04535286001)

Αναλώσιμα

- | Ανθεκτικά στα αερολύματα αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας PCR χωρίς νουκλεάση με υδρόφοβα φίλτρα
- | Σωληνάρια PCR χωρίς RNάση και DNάση 0,5 ml ή 0,2 ml
- | Πάγος

Εξοπλισμός

- | Πιπέτα μικρολίτρων αποκλειστική για PCR (1–10 μl, 10–100 μl, 100–1000 μl)
- | Φυγόκεντρος πάγκου με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0,5 ml (με μέγιστη ταχύτητα 13.000 / 14.000 rpm)
- | Όργανο PCR πραγματικού χρόνου: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή άλλα όργανα Rotor-Gene Q, LightCycler 1.2, 2.0 ή 480, ABI PRISM 7000, 7700 ή 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ή SmartCycler, και σχετικό ειδικό υλικό
- | Θερμικός κυκλοποιητής ή λουτρό νερού (βήμα ανάστροφης μεταγραφάσης)

Συμπληρωματικά αντιδραστήρια

- | Κιτ μαρτύρων *ipsogen* PML-RARA bcr1 (αρ. καταλόγου 672091), μόνο για ερευνητική χρήση, που αποτελείται από κυτταρικές σειρές με αρνητική, υψηλή και χαμηλή θετική έκφραση του γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1 για την ποσοτική επικύρωση της εκχύλισης RNA και της ανάστροφης μεταγραφής.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση **www.qiagen.com/safety** όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

Γενικές προφυλάξεις

Η χρήση δοκιμασιών qPCR απαιτεί καλές εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του εξοπλισμού, οι οποίες είναι αποκλειστικές για τη μοριακή βιολογία και συμμορφώνονται με τους ισχύοντες κανονισμούς και τα σχετικά πρότυπα.

Αυτό το kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται σε αυτό το kit έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση. Η περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων ή η αλλαγή των χρόνων και θερμοκρασιών επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασύμβατα δεδομένα. Τα αντιδραστήρια PPC και PPF μπορεί να αλλοιωθούν εάν εκτεθούν στο φως. Όλα τα αντιδραστήρια είναι μορφοποιημένα ειδικά για χρήση με αυτήν τη δοκιμασία. Για βέλτιστη απόδοση της δοκιμασίας, δεν επιτρέπεται να γίνουν υποκαταστάσεις.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων μεταγραφημάτων με χρήση qPCR απαιτεί τόσο την ανάστροφη μεταγραφή του mRNA όσο και την ενίσχυση του παραγόμενου cDNA μέσω PCR. Συνεπώς, ολόκληρη η διαδικασία του προσδιορισμού πρέπει να εκτελείται υπό συνθήκες χωρίς RNάση/DNάση.

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί:

- | Επιμόλυνση RNάσης/DNάσης, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει αποικοδόμηση της μήτρας mRNA και του παραγόμενου cDNA
- | Επιμόλυνση από μεταφορά mRNA ή PCR με αποτέλεσμα ψευδές θετικό σήμα

Συνεπώς, συνιστούμε τα ακόλουθα.

- | Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) χωρίς νουκλεάση και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- | Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπέτων για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- | Παρασκευάζετε το κύριο προ-μείγμα PCR με αποκλειστικά για το σκοπό αυτό υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν έχουν εισαχθεί μήτρες DNA (cDNA, DNA, πλασμίδιο). Προσθέτετε τη μήτρα σε ξεχωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε ξεχωριστό δωμάτιο) με ειδικά υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.).
- | Χειρίζεστε τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα (C1–3 και F1–5) σε ξεχωριστό δωμάτιο.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα κιτ αποστέλλονται σε ξηρό πάγο και πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -30°C έως -15°C κατά την παραλαβή.

- | Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών στο φως (σωληνάρια PPC και PPF).
- | Αναμείξτε απαλά και φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια πριν το άνοιγμα.
- | Φυλάσσετε όλα τα συστατικά του κιτ στους αρχικούς περιέκτες.

Αυτές οι συνθήκες φύλαξης ισχύουν τόσο για τα ανοιγμένα όσο και τα μη ανοιγμένα συστατικά. Συστατικά που φυλάσσονται σε συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που αναφέρονται στις ετικέτες ενδέχεται να μην έχουν σωστή απόδοση και να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Οι ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο υποδεικνύονται στις ετικέτες των επιμέρους συστατικών. Σε σωστές συνθήκες φύλαξης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του μέχρι την ημερομηνία λήξης που είναι τυπωμένη στην ετικέτα.

Δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια που να υποδεικνύουν τυχόν αστάθεια αυτού του προϊόντος. Εντούτοις, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα με άγνωστα δείγματα.

Διαδικασία

Προετοιμασία RNA δείγματος

Η προετοιμασία RNA από δείγματα ασθενούς (αίμα ή μυελός των οστών) πρέπει να έχει διενεργηθεί με χρήση επικυρωμένης διαδικασίας. Η ποιότητα του προσδιορισμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του RNA εισόδου. Συνεπώς συνιστούμε την επικύρωση του κεκαθαμένου RNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης* ή χρησιμοποιώντας το βιοαναλυτή Agilent® Bioanalyzer® πριν από την ανάλυση.

Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Ι Προετοιμάστε dNTP, 10 mM έκαστο. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.
- Ι Προετοιμάστε τυχαίο εξαμερές, 100 μM . Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.
- Ι Προετοιμάστε MgCl_2 , 50 mM. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Επλώστε 1 μg RNA (1–4 μl) για 10 λεπτά στους 70°C και ψύξτε αμέσως σε πάγο για 5 λεπτά.
3. Φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm) για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
4. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα RT σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία (Πίνακας 1).

* Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά.

Πίνακας 1. Προετοιμασία του μείγματος RT

Συστατικό	Όγκος ανά δείγμα (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα πρώτου κλώνου (παρέχεται με την ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM έκαστο, να προετοιμάζεται προηγουμένως και να φυλάσσεται στους – 20°C σε κλάσματα)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, παρέχεται με την ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II)	2,0	10 mM
Αναστολέας RNAσών (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Αναστολέας RNAσών (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Τυχαίο εξαμερές (100 μM)	5,0	25 μM
Ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II ή Superscript (200 U/μl)	0,5	5 U/μl
Θερμασμένο δείγμα RNA (για προσθήκη στο βήμα 5)	1,0–4,0	50 ng/μl
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση (για προσθήκη στο βήμα 5)	0,0–3,0	–
Τελικός όγκος	20,0	–

5. Διανείμετε με πιπέτα 16 μl του μείγματος RT σε κάθε σωληνάριο PCR. Στη συνέχεια προσθέστε 1–4 μl (1 μg) RNA (από το βήμα 3), και προσαρμόστε τον όγκο σε 20 μl με νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση (βλ. Πίνακα 2).

Πίνακας 2. Προετοιμασία της αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφής

Συστατικό	Όγκος (μl)
Μείγμα RT	16
Θερμασμένο RNA δείγματος (1 μg)	1–4
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	0–3
Τελικός όγκος	20

6. Αναμείξτε καλά και φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm) για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου.
7. Επωάστε στους 20°C για 10 λεπτά.
8. Επωάστε στους 42°C σε θερμικό κυκλοποιητή για 45 λεπτά, κατόπιν αμέσως στους 99°C για 3 λεπτά.
9. Ψύξτε σε πάγο (για να διακόψετε την αντίδραση) για 5 λεπτά.
10. Φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm) για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
11. Αραιώστε το τελικό cDNA με 30 μl νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 μl.
12. Διενεργήστε PCR σύμφωνα με τα ακόλουθα πρωτόκολλα, σύμφωνα με το όργανο qPCR που διαθέτετε.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή Rotor-Gene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων

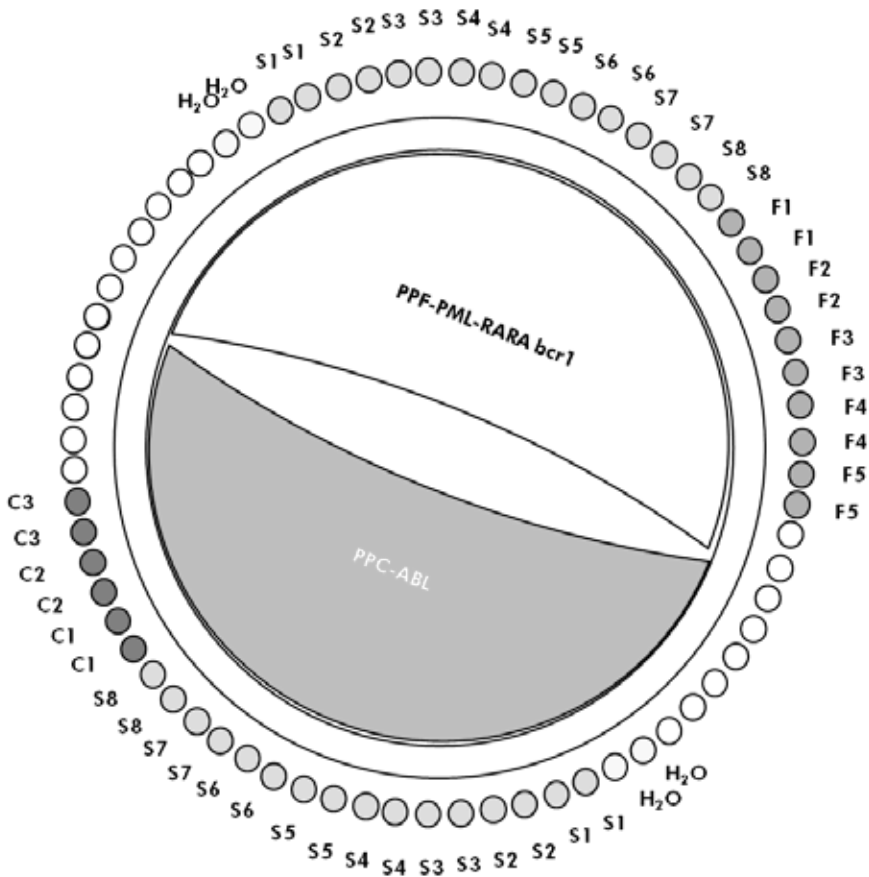
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αριθμός αντιδράσεων για όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο PML-RARA	2 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανα Rotor-Gene® Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών.



Εικόνα 3. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* PML-RARA *bcr1*. F1–5: πρότυπα PML-RARA *bcr1*, C1–3: πρότυπα ABL, S: δείγμα cDNA, H₂O: μάρτυρας νερού.

Σημείωση: Φροντίστε έτσι ώστε να τοποθετείτε πάντοτε ένα δείγμα προς εξέταση στη θέση 1 του στροφέα. Διαφορετικά, κατά τη διάρκεια του βήματος βαθμονόμησης, το όργανο δεν θα εκτελέσει βαθμονόμηση, και θα ληφθούν εσφαλμένα δεδομένα φθορισμού.

Γεμίστε όλες τις άλλες θέσεις με κενά σωληνάρια.

qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 4 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-PML-RARA bcr1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 24 + 1 αντιδράσεις (μl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, 25x	1	25	29	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	162,5	188,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά σωληνάριο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Προγραμματίστε το όργανο Rotor-Gene Q με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM στο κανάλι Green: Μονό

- Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.
- Για όργανα Rotor-Gene Q, επιλέξτε «SLOPE CORRECT» (διόρθωση κλίσης) για την ανάλυση. Συνιστούμε τη ρύθμιση του κατωφλίου στο 0,03.

Πρωτόκολλο: qPCR στο ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480

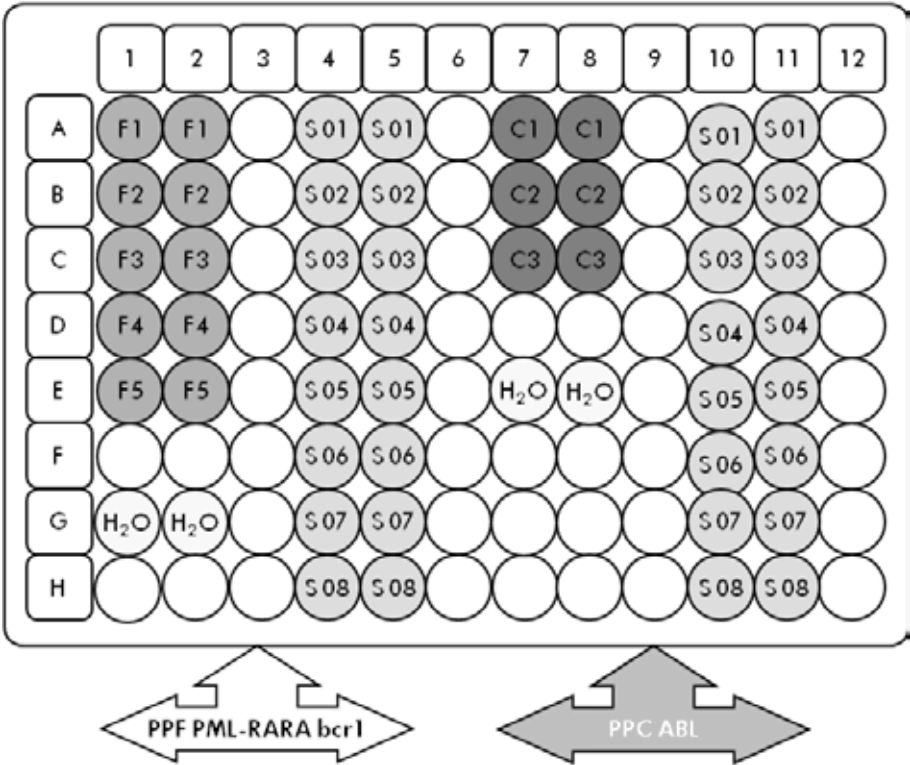
Κατά τη χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αριθμός αντιδράσεων με χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο PML-RARA bcr1	2 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δείγματος στο ABI PRISM 7000, 7700 και 7900 SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στα όργανα LightCycler 480

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών. Η διάταξη πλακιδίων στην Εικόνα 4 δείχνει ένα παράδειγμα τέτοιου πειράματος.



Εικόνα 4. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. S: δείγμα cDNA, F1–5: πρότυπα PML-RARA bcr1, C1–3: πρότυπα ABL, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR στο ABI PRISM 7000, 7700 και 7900 SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στα όργανα LightCycler 480

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 7 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-PML-RARA bcr1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 24 + +1 αντιδράσεις (μl)	PML-RARA bcr1: 28 + +1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, 25x	1	25	29	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	162,5	188,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

- Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
- Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο φρεάτιο (συνολικός όγκος 25 μl).
- Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
- Κλείστε το πλακίδιο και φυγοκεντρήστε σύντομα (300 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
- Τοποθετήστε το πλακίδιο στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 8 για το ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και το σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, ή στον Πίνακα 9 για το όργανο LightCycler 480.

Πίνακας 8. Προφίλ θερμοκρασίας για το σύστημα ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR

Λειτουργία ανάλυσης	Πρότυπη καμπύλη — Απόλυτη ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM, χρωστική απόσβεσης φθορισμού: TAMRA

Πίνακας 9. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

Λειτουργία ανάλυσης	Απόλυτη ποσοτικοποίηση («Abs Quant»)
Μορφές ανίχνευσης	Επιλέξτε «SIMPLE PROBE» (απλός ιχνηθέτης) στο παράθυρο DETECTION FORMAT (μορφές ανίχνευσης)
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM που αντιστοιχεί σε (483–533 nm) για LC έκδοση 01 και (465–510 nm) για LC έκδοση 02

8. Για το ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και το σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, ακολουθήστε το βήμα 8α. Για το LightCycler 480, ακολουθήστε το βήμα 8β.

-
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 0,1 όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο EAC στο βήμα ανάλυσης και γραμμή βάσης ρυθμισμένη μεταξύ των κύκλων 3 και 15. Ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 8.
- 8b. LightCycler 480: Συνιστούμε μια λειτουργία ανάλυσης Fit point (σημεία προσαρμογής) με υπόβαθρο 2,0 και κατώφλι στα 2,0. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

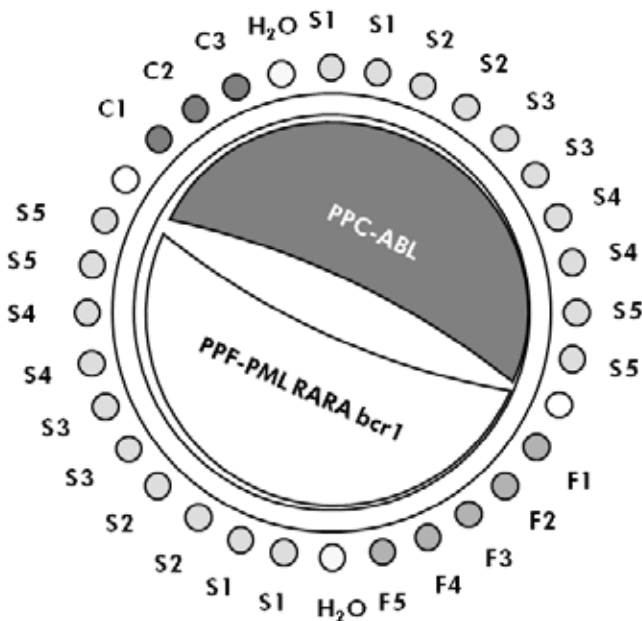
Κατά τη χρήση τριχοειδών οργάνων, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αριθμός αντιδράσεων για τα όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο PML-RARA bcr1	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στα όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών. Η διάταξη τριχοειδών στην Εικόνα 5 δείχνει ένα παράδειγμα πειράματος.



Εικόνα 5. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* PML-RARA *bcr1*. F1–5: πρότυπα PML-RARA *bcr1*, C1–3: πρότυπα ABL, S: άγνωστο δείγμα DNA προς ανάλυση, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Σημείωση: Λόγω ιδιαίτερων τεχνολογικών απαιτήσεων, τα πειράματα στο LightCycler πρέπει να πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια. Συνιστούμε τη χρήση του LightCycler TaqMan Master και την τήρηση των οδηγιών του κατασκευαστή για την προετοιμασία του κύριου μείγματος 5x.

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 11 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 20 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-PML-RARA bcr1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 11. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 14 + 1 αντιδράσεις (μl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Φρέσκο προετοιμασμένο κύριο μείγμα LightCycler TaqMan, 5x	4,0	60	68,0	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, 25x	0,8	12	13,6	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς βουκλεάση	10,2	153	173,4	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5,0 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	20,0	20 έκαστο	20,0 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 15 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά τριχοειδές.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 20 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα τριχοειδή στους προσαρμογείς που παρέχονται με τη συσκευή, φυγοκεντρήστε σύντομα (700 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Φορτώστε τα τριχοειδή στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Προγραμματίστε τα όργανα LightCycler 1.2 ή 2.0 με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά Ράμπα: 20
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 10 δευτερόλεπτα, ράμπα: 20 60°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20, με λήψη φθορισμού FAM: Μονό
Διατήρηση 2	45°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20

9. Για το LightCycler 1.2, ακολουθήστε το βήμα 9α. Για το LightCycler 2.0, ακολουθήστε το βήμα 9β.
 - 9α. LightCycler 1.2: Συνιστάται η λειτουργία F1/F2 και «2nd derivative analysis» (ανάλυση 2ης παραγώγου). Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

- 9b. LightCycler 2.0: Συνιστούμε τη χρήση αυτοματοποιημένης (F^{max}) ανάλυσης στο LightCycler 2.0 έκδοση λογισμικού 4.0 για τη λήψη αναπααραγωγίμων αποτελεσμάτων. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμοκικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο SmartCycler

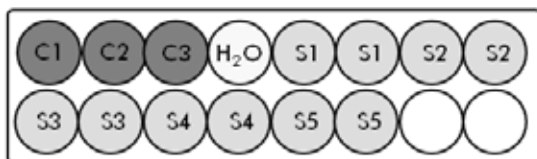
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο SmartCycler

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο PML-RARA bcr1	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στο όργανο SmartCycler

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινήτων και μειγμάτων ιχνηθετών. Η διάταξη δύο μπλοκ στην Εικόνα 6 δείχνει ένα παράδειγμα.



Όλοι οι προσδιορισμοί στο πρώτο μπλοκ πραγματοποιούνται με το PPC-ABL



Όλοι οι προσδιορισμοί σε αυτό το δεύτερο μπλοκ πραγματοποιούνται με το PPF-PML-RARA bcr1

Εικόνα 6. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. S: δείγμα cDNA, F1–5: πρότυπα PML-RARA bcr1, C1–3: πρότυπα ABL, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR στο όργανο SmartCycler

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 14 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των

αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-PML-RARA bcr1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 14. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 14 + 1 αντιδράσεις (μl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, 25x	1	15	17	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς βουκλεάση	6,5	97,5	110,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

- Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
- Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).
- Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
- Φορτώστε τα δείγματα στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
- Προγραμματίστε το όργανο SmartCycler με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Προφίλ θερμοκρασίας

Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη: Μονό

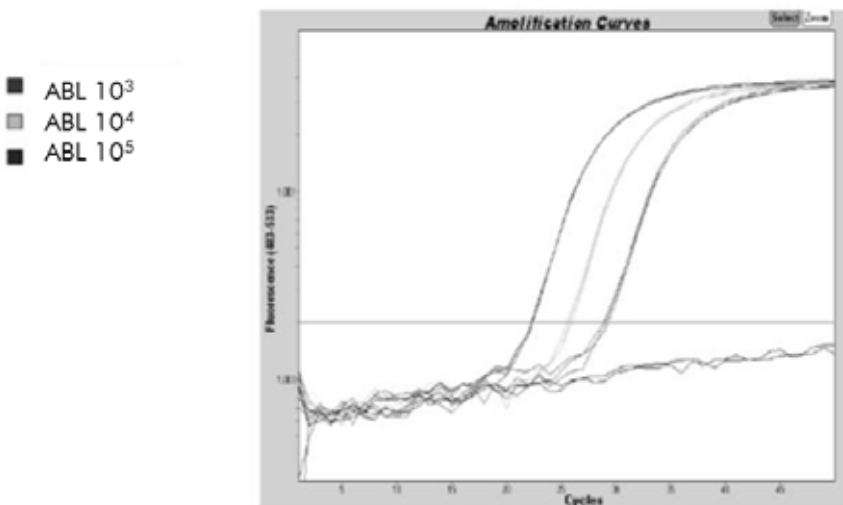
8. Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 30. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 15.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αρχή της ανάλυσης δεδομένων

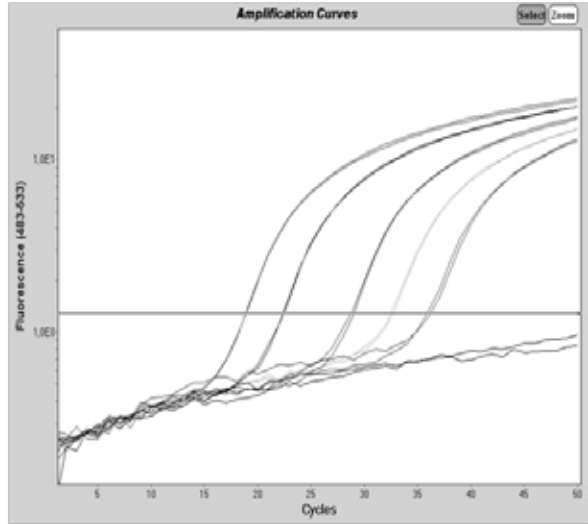
Χρησιμοποιώντας τεχνολογία TaqMan, ο αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για την ανίχνευση ενός σήματος πάνω από το κατώφλι ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (C_T) και είναι ευθέως ανάλογος με την ποσότητα του στόχου που είναι παρών κατά την έναρξη της αντίδρασης.

Χρησιμοποιώντας πρότυπα με γνωστό αριθμό μορίων, είναι δυνατή η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης και ο καθορισμός της ακριβούς ποσότητας του στόχου που είναι παρών στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι πρότυπες καμπύλες *ipsogen* βασίζονται σε πλασμίδια. Χρησιμοποιούμε 3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου για το γονίδιο-μάρτυρα ABL (CG), και 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα για το γονίδιο σύντηξης (PML-RARA *bcr1*), προκειμένου να διασφαλίσουμε ακριβείς πρότυπες καμπύλες. Οι εικόνες 7 και 8 δείχνουν ένα παράδειγμα των καμπυλών ενίσχυσης TaqMan που λαμβάνονται με το kit *ipsogen* PML-RARA *bcr1*.



Εικόνα 7. Ανίχνευση προτύπων ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ και 10⁵ αντίγραφα/5 μ l.

- PML-RARA bcr1 10¹
- PML-RARA bcr1 10²
- PML-RARA bcr1 10³
- PML-RARA bcr1 10⁵
- PML-RARA bcr1 10⁶



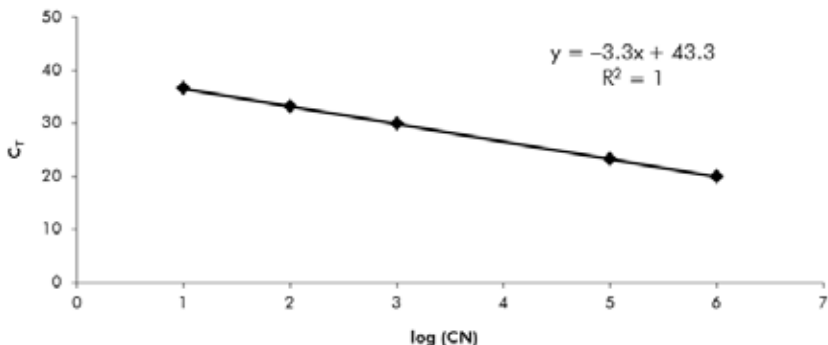
Εικόνα 8. Ανίχνευση προτύπων PML-RARA bcr1 (F1–F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ και 10⁶ αντίγραφα/5 μl.

Αποτελέσματα

Πρότυπη καμπύλη και κριτήρια ποιότητας

Ανεπεξέργαστα δεδομένα μπορούν να επικολληθούν σε ένα αρχείο Excel® για ανάλυση.

Για κάθε γονίδιο (ABL και PML-RARA), ανεπεξέργαστες τιμές C_T που λαμβάνονται από πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου σχεδιάζονται σύμφωνα με τον αριθμό αντιγράφου log (3, 4 και 5 για C1, C2 και C3, και 1, 2, 3, 5 και 6 για F1, F2, F3, F4 και F5). Η Εικόνα 9 δείχνει ένα παράδειγμα της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.



Εικόνα 9. Θεωρητική καμπύλη υπολογιζόμενη σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα. Μια καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης ($y = ax + b$) υπολογίζεται για κάθε γονίδιο (ABL και PML-RARA), όπου a είναι η κλίση της γραμμής και b είναι η τομή y , η οποία είναι η συντεταγμένη y του σημείου όπου η γραμμή τέμνει τον άξονα y . Η εξίσωσή της και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) αναγράφονται στο γράφημα.

Καθώς τα πρότυπα είναι δεκαπλάσιες αραιώσεις, η θεωρητική κλίση της καμπύλης είναι $-3,3$. Μια κλίση μεταξύ $-3,0$ και $-3,9$ είναι αποδεκτή εφόσον R^2 είναι $>0,95$ (6). Ωστόσο, μια τιμή για $R^2 >0,98$ είναι επιθυμητή για ακριβή αποτελέσματα (7).

Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων (NCN)

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης ABL πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών C_T (που λαμβάνονται με PPC-ABL) για τα άγνωστα δείγματα σε αριθμούς αντιγράφων ABL (ABL_{CN}).

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης PML-RARA πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών C_T (που λαμβάνονται με PPF-PML-RARA) για τα άγνωστα δείγματα σε αριθμούς αντιγράφων PML-RARA ($PML-RARA_{CN}$).

Η αναλογία αυτών των τιμών CN δίνει τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN):

$$NCN = \frac{PML-RARA_{CN}}{ABL_{CN}}$$

Τιμή MRD

Η τιμή ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) είναι η αναλογία μεταξύ της CG-κανονικοποιημένης έκφρασης του FG κατά την παρακολούθηση $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ και των διαγνωστικών δειγμάτων $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

Ευαισθησία

Η ευαισθησία (SENSv) υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχετική έκφραση του FG κατά τη διάγνωση $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ και την έκφραση του CG $(CG_{CN,FUP})$ στο δείγμα παρακολούθησης.

$$\text{Ευαισθησία (SENSv)} = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

Έλεγχος ποιότητας στις τιμές ABL

Κακή ποιότητα του RNA ή προβλήματα κατά τη διάρκεια των βημάτων qPCR οδηγούν σε χαμηλό ABL_{CN} . Συνιστούμε την απόρριψη των αποτελεσμάτων από δείγματα που δίνουν $ABL_{CN} < 1318$ (τιμή χαμηλότερη από το 95% CI από δείγματα ασθενών στη μελέτη EAC, παραπομπή 5).

Αναπαραγωγικότητα μεταξύ θυγατρικών κλώνων

Η διακύμανση στις τιμές C_T μεταξύ των θυγατρικών κλώνων πρέπει να είναι <2 , που αντιστοιχεί σε μια 4-πλάσια μεταβολή στις τιμές αριθμού αντιγράφων.

Η διακύμανση στις τιμές C_T μεταξύ των θυγατρικών κλώνων είναι γενικά $<1,5$ εάν η μέση τιμή C_T των θυγατρικών κλώνων είναι <36 (6).

Σημείωση: Κάθε χρήστης πρέπει να μετρά τη δική του επαναληψιμότητα στο εκάστοτε εργαστήριο.

Μάρτυρες νερού

Οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δίνουν μηδενικό CN.

Ένας θετικός μάρτυρας νερού προκύπτει από διασταυρούμενη μόλυνση. Βλ. «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», παρακάτω, για να βρείτε μια λύση.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε τον κλινικό συντονιστή σας ή επισκεφτείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com.

Σχόλια και προτάσεις

Αρνητικό αποτέλεσμα για το γονίδιο-μάρτυρα (ABL) και το PML-RARA bcr1 σε όλα τα δείγματα — το πρότυπο είναι εντάξει

- | | |
|---|--|
| α) Κακή ποιότητα RNA | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls, αρ. καταλόγου 672091*) παράλληλα. |
| β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls, αρ. καταλόγου 672091*) παράλληλα. |

Αρνητικό αποτέλεσμα για το γονίδιο-μάρτυρα (ABL) στα δείγματα — το πρότυπο είναι εντάξει

- | | |
|---|--|
| α) Κακή ποιότητα RNA | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls, αρ. καταλόγου 672091*) παράλληλα. |
| β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls, αρ. καταλόγου 672091*) παράλληλα. |

Σχόλια και προτάσεις

Αρνητικό σήμα προτύπου

- a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.
- b) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* PML-RARA bcr1 στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών (PPC και PPF) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 15. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη. Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.

Οι αρνητικοί μάρτυρες είναι θετικοί

Διασταυρούμενη μόλυνση

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια. Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων. Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του κιτ και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

Απουσία σήματος, ακόμα και στους πρότυπους μάρτυρες

- a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή παράλειψη αντιδραστηρίων Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.
- b) Ανασταλτικές επιδράσεις του υλικού του δείγματος, προκαλούμενες από ανεπαρκή καθαρισμό Επαναλάβετε την προετοιμασία RNA.
- c) LightCycler: Επιλέχθηκε λανθασμένο κανάλι ανίχνευσης Ορίστε τη ρύθμιση καναλιού σε F1/F2 ή 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Δεν προγραμματίστηκε λήψη δεδομένων Ελέγξτε τα προγράμματα κύκλων. Επιλέξτε τη λειτουργία λήψης «SINGLE» (μονό) στο τέλος κάθε τμήματος ανασύνδεσης του προγράμματος PCR.

Σχόλια και προτάσεις

Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα στα δείγματα αλλά οι πρότυποι μάρτυρες είναι εντάξει

- α) Κακή ποιότητα RNA ή χαμηλή συγκέντρωση
- Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε. Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls, αρ. καταλόγου 672091*) παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος αναστροφής μεταγραφής
- Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε. Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls, αρ. καταλόγου 672091*) παράλληλα.

Η ένταση του φθορισμού είναι πολύ χαμηλή

- α) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ
- Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* PML-RARA bcr1 στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών (PPC και PPF) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 15. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη. Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.
- β) Πολύ χαμηλή αρχική ποσότητα RNA-στόχου
- Αυξήστε την ποσότητα του RNA δείγματος. Σημείωση: Ανάλογα με την επιλεγμένη μέθοδο προετοιμασίας RNA, ενδέχεται να υπάρξουν ανασταλτικές επιδράσεις.

LightCycler: Η ένταση φθορισμού ποικίλλει

- α) Σφάλμα διανομής με πιπέτα
- Η διακύμανση που προκαλείται από το επονομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

Σχόλια και προτάσεις

-
- | | | |
|----|---|---|
| b) | Ανεπαρκής φυγοκέντριση των τριχοειδών | Το προετοιμασμένο μείγμα PCR μπορεί ακόμα να βρίσκεται στο επάνω δοχείο του τριχοειδούς, ή φυσαλίδα αέρα εγκλωβισμένη στο άκρο του τριχοειδούς.

Πάντοτε να φυγοκεντρίζετε τα τριχοειδή φορτωμένα με το μείγμα της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στο ειδικό εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. |
| c) | Η εξωτερική επιφάνεια του άκρου του τριχοειδούς είναι βρώμικη | Πάντοτε να φοράτε γάντια όταν χειρίζεστε τα τριχοειδή. |

LightCycler: Σφάλμα της πρότυπης καμπύλης

Σφάλμα διανομής με πιπέτα

Η διακύμανση που προκαλείται από το επονομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

* Το Kit μαρτύρων *ipsogen* PML-RARA bcr1, αρ. καταλόγου 672091, προορίζεται μόνο για ερευνητική χρήση. Δεν προορίζεται για χρήση σε διαγνωστικές διαδικασίες. Καμία αξίωση ή αντιπροσώπευση δεν αποσκοπεί στην παροχή πληροφοριών για τη διάγνωση, την πρόληψη ή τη θεραπεία κάποιας νόσου.

Ποιοτικός έλεγχος

Ποιοτικός έλεγχος ολόκληρου του kit διενεργήθηκε σε ένα όργανο LightCycler 480. Αυτό το kit παράγεται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 13485:2003. Πιστοποιητικά ανάλυσης είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος στο www.qiagen.com/support/.

Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να έχουν εκπαιδευτεί και εξοικειωθεί με την τεχνολογία πριν από τη χρήση αυτής της συσκευής. Αυτό το κιτ πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με ένα επικυρωμένο όργανο που αναφέρεται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 11.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων. Η επαλήθευση της απόδοσης του συστήματος για οποιοσδήποτε διαδικασίες που εφαρμόζονται στο εκάστοτε εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες αξιολόγησης απόδοσης της QIAGEN αποτελούν ευθύνη του χρήστη.

Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Σημείωση: Το κιτ έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με τις μελέτες «Europe Against Cancer» (Η Ευρώπη κατά του καρκίνου, EAC) (4, 5). Πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα. Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

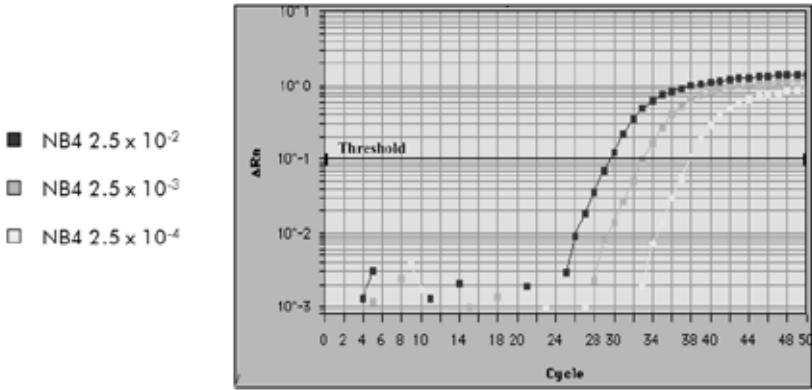
Μη κλινικές μελέτες

Υλικά και μέθοδοι

Η αξιολόγηση της απόδοσης διενεργήθηκε σε ένα ABI PRISM 7700 SDS, σε συνδυασμό με αντιδραστήρια που παρατίθενται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 11. Μελέτες ισοδυναμίας επικύρωσαν τη χρήση του στα ακόλουθα όργανα: ABI PRISM 7000 και 7900HT SDS, LightCycler 1.2 και 480, Rotor-Gene 3000, και SmartCycler.

Μη κλινικές μελέτες διενεργήθηκαν για τον καθορισμό της αναλυτικής απόδοσης του κιτ *ipsogen* PML-RARA bcr1. Αυτές οι μη κλινικές εργαστηριακές μελέτες διενεργήθηκαν σε ολικό RNA από την NB4 κυτταρική σειρά αραιωμένο σε μια σταθερή τελική ποσότητα ολικού RNA MV4-11 κυτταρικής σειράς.

Για τον καθορισμό της επαναληψιμότητας του προσδιορισμού, 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις του NB4 ολικού RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg και 0,5 pg) αραιωμένες σε MV4-11 ολικό RNA, σε σταθερό τελικό συνολικό όγκο 200 ng, αναλύθηκαν σε 5 θυγατρικούς κλώνους ανά εκτέλεση και σε 4 διαφορετικές εκτελέσεις. Τα δείγματα με 5 pg και 0,5 pg NB4 RNA σε MV4-11 RNA ήταν πολύ χαμηλά για να δώσουν αποτελέσματα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Διαγράμματα ενίσχυσης αραιώσεων $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng) και $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng) NB4 ολικού RNA σε MV4-11 αρνητικό ολικό RNA.

Αναλυτικά δεδομένα

Οι Πίνακες 16–19 δείχνουν τις αναλύσεις μεταξύ προσδιορισμών με το μέσο κύκλο κατωφλίου (C_T), τυπική απόκλιση (TA), αριθμό δειγμάτων (n), συντελεστή διακύμανσης (ΣΔ), μέσο αριθμό αντιγράφων (CN), και μέσο κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN).

Πίνακας 16. Ανάλυση μεταξύ και εντός προσδιορισμών — κυτταρικές σειρές PML-RARA και ABL

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών				Ανάλυση εντός προσδιορισμών	
		Μέσος C_T	TA	n	ΣΔ (%)	Ελάχ. ΣΔ	Μέγ. ΣΔ
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	–	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

Πίνακας 17. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — πλασμίδια

Γονίδιο	Πλασμίδιο	Μέσος C _T	TA	n	ΣΔ (%)
PML-RARA	F1 (10 ¹ αντίγραφα)	35,95	0,29	8	0,79
	F2 (10 ² αντίγραφα)	32,25	0,59	8	1,84
	F3 (10 ³ αντίγραφα)	28,71	0,55	8	1,90
	F4 (10 ⁵ αντίγραφα)	22,14	0,49	7	2,23
	F5 (10 ⁶ αντίγραφα)	18,64	0,72	8	3,84
ABL	C1 (10 ³ αντίγραφα)	28,85	0,76	7	2,62
	C2 (10 ⁴ αντίγραφα)	25,25	0,71	8	2,82
	C3 (10 ⁵ αντίγραφα)	21,74	0,81	8	3,74

Πίνακας 18. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — κυτταρικές σειρές PML-RARA bcr1 και ABL (μέσος CN)

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος CN	TA	n	ΣΔ (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 μg)	583,95	149,19	20	25,55
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	44,98	12,25	20	27,23
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	4,91	1,55	19	31,52
ABL	—	35.171,47	22.448,3	99	63,83

Πίνακας 19. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — κυτταρική σειρά PML-RARA bcr1 (μέσος NCN)

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος NCN*	TA	n	ΣΔ (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	271,4	150,00	20	55,56
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14
ABL	–	35.171,47	22.448,3	99	63,83

* Για αυτά τα αποτελέσματα μελέτης μόνο, ο NCN δίνεται ως $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$.

Κλινικές μελέτες

Η αξιολόγηση της απόδοσης διενεργήθηκε σε ένα ABI PRISM 7700 SDS, σε συνδυασμό με αντιδραστήρια που παρατίθενται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 11. Μελέτες ισοδυναμίας επικύρωσαν τη χρήση του στα ακόλουθα όργανα: ABI PRISM 7000 και 7900HT SDS, LightCycler 1.2 και 480, Rotor-Gene 3000, και SmartCycler.

Μια ομάδα 26 εργαστηρίων, σε 10 Ευρωπαϊκές χώρες, οργανωμένα σε μια συντονισμένη δράση του EAC, χρησιμοποίησαν πλασμιδία παρεχόμενα από την *ipsogen* για να καθορίσουν ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο για την ανάλυση qPCR των κύριων σχετιζόμενων με τη λευχαιμία γονιδίων σύντηξης στο κλινικό περιβάλλον. Το μεταγράφημα PML-RARA bcr1 ήταν ένα από τα γονίδια σύντηξης (FG) που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Παρουσιάζουμε εδώ μια σύνοψη αυτής της μελέτης επικύρωσης. Τα πλήρη αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί το 2003 (4, 5).

Επαναληψιμότητα μεταξύ εργαστηρίων για τα πρότυπα πλασμιδίων CG και FG

Ένα σύνολο 11 εργαστηρίων πραγματοποίησαν ένα πείραμα επαναληψιμότητας μεταξύ εργαστηρίων για την αξιολόγηση της διακύμανσης στη μέτρηση των πρότυπων

αραιωμένων διαλυμάτων πλασμιδίων CG και FG. Τα αραιωμένα διαλύματα εκτελέστηκαν εις διπλούν σε κάθε εγκατάσταση. Ο Πίνακας 20 αναφέρει τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση και τον ΣΔ (%) για κάθε αραιωμένο διάλυμα.

Πίνακας 20. Επαναληψιμότητα μεταξύ εργαστηρίων για τα πρότυπα πλασμιδίων CG και FG

Γονίδιο	Αραίωση	Μέσος όρος	C _T TA	ΣΔ (%)
Γονίδιο-μάρτυρας ABL	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
Γονίδιο σύντηξης PML-RARA bcr1	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

Τιμές έκφρασης του μεταγραφήματος PML-RARA bcr1 FG

Οι Πίνακες 21 και 22 δείχνουν τις τιμές έκφρασης μεταγραφήματος PML-RARA bcr1 FG και ABL CG, για την NB4 κυτταρική σειρά, σε ασθενείς με APL κατά τη διάγνωση, και για αρνητικούς ασθενείς-μάρτυρες.

Πίνακας 21. Τιμές έκφρασης του μεταγραφήματος PML-RARA bcr1 FG και ABL CG — Τιμές C_T

	Τιμές C _T (95% εύρος)	
	PML-RARA bcr1	ABL
NB4 κυτταρική σειρά	24,7	23,7
Δείγματα ασθενών με APL		
Μυελός των οστών (n = 14)	25,6 (23,1–27,5)	24,5 (21,7–28,5)
Περιφερικό αίμα (n = 9)	25,7 (23,7–29,4)	24,6 (22,0–27,4)
Αρνητικά δείγματα ασθενών		
Μυελός των οστών (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Περιφερικό αίμα (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Οι τιμές ABL C_T δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και των λευχαιμικών δειγμάτων, ούτε μεταξύ των τύπων δειγμάτων (περιφερικό αίμα ή μυελός των οστών) ή των λευχαιμικών δειγμάτων από ασθενείς που διαγνώστηκαν με APL.

Πίνακας 22. Τιμές έκφρασης του μεταγραφήματος PML-RARA bcr1 FG και ABL CG — Τιμές CN και NCN

	Τιμές CN (95% εύρος)		Τιμές NCN (95% εύρος)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Δείγματα ασθενών			
Μυελός των οστών (n = 14)	5.129 (1.480–25.704)	1.538,7 (133,2–46.781,28)	0,30 (0,09–1,82)
Περιφερικό αίμα (n = 9)	3.891 (475–14.454)	1400,76 (50,27–11.274)	0,36 (0,11–0,78)
Αρνητικά δείγματα ασθενών			
Μυελός των οστών (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
Περιφερικό αίμα (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

Ποσοστά ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών

Τα ποσοστά των ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους μάρτυρες.

- Ι Θετικοί μάρτυρες: NB4 κύτταρα, μια κυτταρική σειρά γνωστή για τη θετικότητα της για PML-RARA bcr1 FG. Δείγματα ασθενών ήδη αξιολογημένα για θετικότητα σε PML-RARA bcr1
- Ι Αρνητικοί μάρτυρες: Αρνητικά δείγματα RNA, μάρτυρες μη ενίσχυσης (NAC) από *E. coli* RNA αντί για ανθρώπινο RNA για τον έλεγχο για επιμόλυνση PCR, και μάρτυρες χωρίς μήτρα (NTC), οι οποίοι περιείχαν νερό αντί για ανθρώπινο RNA

Ενίσχυση στα δείγματα RNA του FG διενεργήθηκε εις τριπλούν, και εις διπλούν για CG.

Ένα ψευδές αρνητικό δείγμα ορίστηκε ως ένα θετικό δείγμα RNA με λιγότερο από 50% θετικών φρεατίων (0/2, 0/3 ή 1/3).

Ένα ψευδές θετικό δείγμα ορίστηκε ως ένα αρνητικό δείγμα με τουλάχιστον 50% θετικών φρεατίων (1/2, 2/3 ή 3/3).

Ο Πίνακας 23 δείχνει τον αριθμό και το ποσοστό των ψευδών αρνητικών και ψευδών θετικών δειγμάτων.

Πίνακας 23. Ψευδή αρνητικά και ψευδή θετικά δείγματα

Ψευδής αρνητικότητα		Ψευδής θετικότητα	
10^{-3}	10^{-4}	Αρνητικός μάρτυρας FG	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

Βιβλιογραφία

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. 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.
5. 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.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Σύμβολα

Τα ακόλουθα σύμβολα μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και στην επισήμανση:



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού (δηλ., επισήμανση συστατικού)



Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

R5, Νοέμβριος 2017	Προστέθηκαν σημειώσεις ότι το Κιτ μαρτύρων <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, αρ. καταλόγου. 672091, προορίζεται μόνο για Ερευνητική Χρήση. Μικρά τυπογραφικά λάθη διορθώθηκαν.
--------------------	--

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Πρότυπα γονιδίου-μάρτυρα ABL, πρότυπα γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1, εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών ABL, εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1	672123
Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνει εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
Κιτ <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls — για ποσοτική επικύρωση της εκχύλισης RNA και της ανάστροφης μεταγραφής του γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Κυτταρικές σειρές με αρνητική, υψηλή και χαμηλή θετική έκφραση του γονιδίου σύντηξης PML-RARA bcr1	672091*

* Το Κιτ μαρτύρων *ipsogen* PML-RARA bcr1, αρ. καταλόγου 672091, προορίζεται μόνο για ερευνητική χρήση. Δεν προορίζεται για χρήση σε διαγνωστικές διαδικασίες. Καμία αξίωση ή αντιπροσώπευση δεν αποσκοπεί στην παροχή πληροφοριών για τη διάγνωση, την πρόληψη ή τη θεραπεία κάποιας νόσου.

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποτοποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του κιτ QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των κιτ QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση **www.qiagen.com**. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από τις Τεχνικές Υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Αυτό το προϊόν προορίζεται για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Τα προϊόντα *ipsogen* δεν επιτρέπεται να μεταπωληθούν, να τροποποιηθούν για μεταπώληση ή να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή εμπορικών προϊόντων χωρίς την έγγραφη έγκριση της QIAGEN.

Οι πληροφορίες στο παρόν έγγραφο μπορεί να αλλάξουν χωρίς προειδοποίηση. Η QIAGEN δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για τυχόν σφάλματα που μπορεί να περιέχονται σε αυτό το έγγραφο. Αυτό το έγγραφο θεωρείται ότι είναι πλήρες και ακριβές κατά το χρόνο της δημοσίευσης. Σε καμία περίπτωση η QIAGEN δεν ευθύνεται για τυχαιές, ειδικές, πολλαπλές ή επακόλουθες ζημιές σε σχέση με, ή που προκύπτουν από τη χρήση αυτού του εγγράφου.

Τα προϊόντα *ipsogen* είναι εγγυημένα ότι πληρούν τις δηλωμένες προδιαγραφές τους. Η αποκλειστική υποχρέωση της QIAGEN και η αποκλειστική αποκατάσταση του πελάτη περιορίζονται στην αντικατάσταση των προϊόντων δωρεάν σε περίπτωση που η απόδοση των προϊόντων αυτών δεν είναι η προβλεπόμενη.

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

Συμφωνία άδειας περιορισμένης χρήσης για το Kit *ipsogen* PML-RARA bcr1

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιοσδήποτε αγοραστή ή χρήστη του προϊόντος των εξής όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο εγχειρίδιο αυτό και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση πως δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το kit και/ή η χρήση/-εις του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου ετεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιασδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιαδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιαδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοσδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

