

Kasım 2017

ipsogen[®] PML-RARA bcr1 Kit El Kitabı



24

Versiyon 1

Kantitatif in vitro diagnostik

Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System, LightCycler[®] ve SmartCycler[®] aletleriyle kullanılmak üzere

IVD

CE

REF



672123

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden
ALMANYA

R5 MAT

1108718TR

Sample to Insight



İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	4
İşlemin Prensipleri	6
Sağlanan Materyal.....	9
Kit içeriği.....	9
Gereken ama Sağlanmayan Materyal	10
Uyarılar ve Önlemler.....	11
Genel önlemler.....	12
Reaktif Saklama ve Muamele	13
İşlem.....	14
Örnek RNA hazırlama	14
Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon.....	14
Protokol: 72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazları üzerinde qPCR	17
Protokol: ABI PRISM 7000, 7700'de qPCR ve 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistem ve LightCycler 480 cihazı	21
Protokol: LightCycler 1.2 ve 2.0 aletlerinde qPCR	26
Protokol: SmartCycler aletinde qPCR	30
Sonuçların Değerlendirilmesi.....	34
Veri analizi prensibi	34
Sonuçlar	35
Sorun Giderme kılavuzu.....	39

Kalite Kontrol	41
Sınırlamalar	42
Performans Özellikleri	43
Klinik olmayan çalışmalar	43
Klinik araştırmalar	46
Referanslar	51
Semboller	52
Sipariş Bilgisi	53

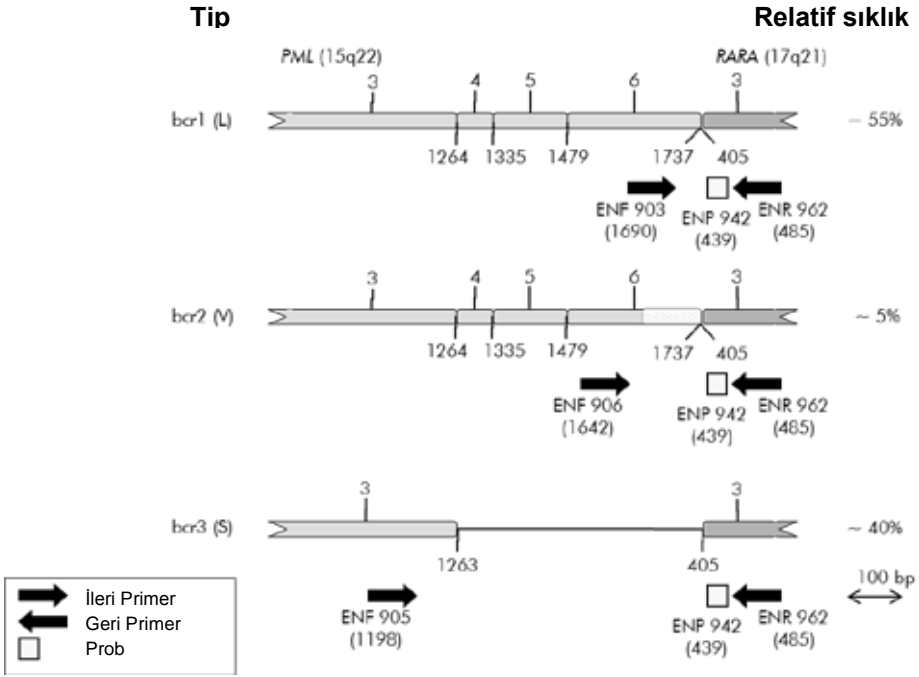
Kullanım Amacı

ipsogen PML-RARA bcr1 Kitinin PML intron 6 içine kırılma noktasıyla M3 sitomorfolojisi ve t(15;17)(q22;q21) translokasyonu tanısı konmuş bir akut myeloid lösemi (AML) hastaları alt grubunda kemik iliği veya periferel kan örneklerinde PML-RARA tip bcr1 füzyon transkriptlerinin kantifikasyonunda kullanılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların hastalık relapsını izlemek üzere minimal rezidüel hastalık (MRD) takibi ve tedavi yapılmakta olan hastalarda tedavi etkinliğini izlemek için kullanılması amaçlanmıştır.

Özet ve Açıklama

PML-RARA füzyon geni (FG) transkriptleri, t(15;17)(q22;q21) translokasyonunun moleküler sonucudur ve tüm AML vakalarının %10-15'ini oluşturan M3 sitomorfolojili ayrı bir AML alt seti olan akut progranüositik lösemi (APL) vakalarının büyük kısmıyla (>%90) ilişkilidir. Dengelenmiş resiprokal translokasyon t(15;17) promyelositik lösemi (PML) geninin retinoik asit reseptörü alfa (RARA) ile füzyonu ve sonuçta PML-RARA füzyon proteini oluşmasına neden olur. Kimerik PML-RARA proteini bir transkripsiyonel repressördür. Ekspresyonu nükleer reseptör protein kompleksine (NcoR) artmış afinite, histon deasetilaz (HDAC) ile kromatin yapısı değişikliği ve transkripsiyon inhibisyonu yoluyla bozulmuş myeloid diferansiyasyonu ile ilişkilidir. All-trans retinoik asit (ATRA) ile tedavi APL'de yüksek ölçüde etkindir ve NCoR/HDAC kompleksinin serbest kalmasını destekleyip bu şekilde normal transkripsiyonu tekrar oluşturarak bir diferansiyasyon yapıcı ajan görevi yapar.

RARA kırılma noktaları daima intron 2'de oluşur. PML bölgesinde kırılma noktalarının, intron 6, ekson 6 ve intron 3 şeklinde yerine bağlı olarak ilgili PML-RARA transkripti alt tipleri uzun (L veya bcr1), varyant (V veya bcr2) ve kısa (S veya bcr3), şeklinde oluşabilir (Şekil 1). Bu transkript alt tipleri vakaların sırasıyla %55, %5 ve %40'ını temsil eder.



Şekil 1. EAC qPCR primerleri ve prob setinin kapsadığı PML-RARA FG transkriptinin şeması. Tip bcr1 (L) için: ENF903–ENP942–ENR962. Tip bcr2 (V) için: ENF906–ENP942–ENR962. Tip bcr3 (S) için: ENF905–ENP942–ENR962. Primerler ve prob altındaki rakam normal gen transkriptindeki nükleotid konumuna karşılık gelir. Relatif sıklık PML-RARA varyantları arasında her FG transkripti tipinin oranıyla ilgilidir.

APL'de antrasiklin tabanlı kemoterapi ve ATRA ile kombine tedavi yüksek ölçüde başarılıdır ve yeni tanı konmuş hastaların %70'ine kadarında uzun etkili remisyonlar ve olası kür sağlar. Ancak, relaps ve düşük sağkalım oranları hastaların %15-25'inde halen görülür. Geleneksel kalitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile benzersiz PML-RARA füzyon geninin saptanması hızlı tanı koyma ve tedavilere cevabı ön görme açısından yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tekniğin sakıncaları vardır ve hassasiyeti nispeten düşüktür.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR) ile PML-RARA kopya numarasının kantifikasyonunun birkaç avantajı vardır. Kinetik özelliklerin de değerlendirilmesini mümkün kılan yüksek ölçüde hassas ve tekrar üretilebilir bir tekniktir. APL hastalarında farklı tedavi fazlarında iyi belirlenmiş bir standardize qPCR protokolünün (EAC Programı) prognostik değerinin analizi bu yaklaşımın MRD değerlendirmek için güçlü bir alternatif olduğuna ve PML-RARA normalize kopya numarası temelinde relaps-risk katmanlandırması yapılabileceğine işaret etmiştir. Konsolidasyon sonrası analizde pozitif qPCR testi daha sonraki hematolojik relapsın güçlü bir öngörücüsüdür. Bakım tedavisi sırasında ve tedavinin sonundan sonra pozitif bir qPCR testi daha yüksek relaps riski ve daha kısa sağkalımla ilişkilidir. PML-RARA normalize kopya numarası (NCN) kantifikasyonu temelinde relaps-risk katmanlandırma hastaları 3 gruba böler: yüksek relaps riski olanlar, orta riski olanlar ve düşük relaps riski olanlar (1). Transkriptin hassas bir şekilde saptanması yoluyla PML-RARA izlenmesi APL'de genel tedavi stratejisinin entegre bir parçası olarak görülür (ayrıntılar için bakınız referans 2 ve 3) ve tedavi tipi ve şiddeti takip sırasında farklı relaps riskleri taşıyan hastalarda bu şekilde ayarlanır.

MRD kantifikasyon yönteminin standardizasyonu ve doğrulaması EAC tarafından yürütülen çok merkezli bir projede belirlenmiş ve 2003 yılında yayımlanmıştır (4, 5). *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kiti bu tekniği temel alır.

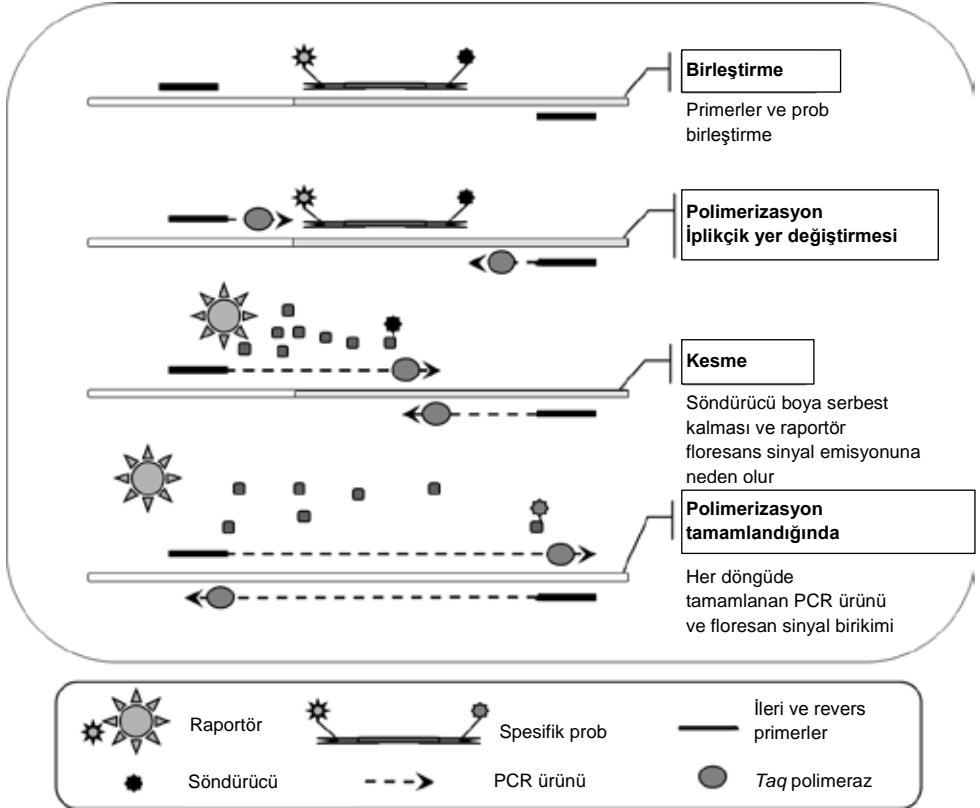
İşlemin Prensipleri

qPCR tekniği, PCR amplifikasyon sürecinin ekspanensiyel fazı sırasında PCR ürünlerinin doğru kantifikasyonunu mümkün kılar. Ek olarak qPCR verileri post-PCR işleme olmadan PCR cycling sırasında ve/veya sonrasında floresans sinyallerin gerçek zamanlı saptanmasıyla hızla elde edilebilir ve böylece PCR ürünü kontaminasyonu riski önemli ölçüde azalır. Şu anda 3 ana tipte qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Yeşil I Boya kullanılarak qPCR analizi, hidroliz problemleri kullanılarak qPCR analizi ve hibridizasyon problemleri kullanılarak qPCR analizi.

Bu test qPCR çift boya oligonükleotid hidroliz prensibini kullanır. PCR sırasında, ileri ve revers primerler belirli bir sekansa hibridize olur. Aynı karışımda bir çift boya oligonükleotid bulunur. Bir 5' raportör boya ve bir akış aşağı 3' söndürücü boyayla etiketlenmiş bir oligonükleotidden oluşan bu prob PCR ürünü içinde bir hedef sekansa hibridize olur. Hidroliz problemleriyle qPCR analizi *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraz 5'â 3' eksonükleaz aktivitesini kullanır. Prob sağlam olduğunda raportör boyanın söndürücü boyaya yakınlığı raportör floresansın temel olarak Förster tipi enerji transferiyle baskılanmasıyla sonuçlanır.

PCR sırasında, ilgilenilen hedef mevcutsa, prob spesifik olarak ileri ve revers primer bölgeleri arasına yapışır. DNA polimerazın 5'â 3' eksonükleaz aktivitesi ancak prob hedefe hibridize olursa probu raportör ile söndürücü arasında keser. Prob fragmanları sonra hedeften ayrılır ve iplikçiğin polimerizasyonu devam eder. Probun 3' ucu PCR sırasında probun uzamasını önlemek üzere bloke edilir (Şekil 2). Bu işlem her döngüde oluşur ve ürünün eksponensiyel birikimini olumsuz etkilemez.

Bu floresans sinyali artışı ancak hedef sekans probu tamamlayıcı ise ve böylece PCR sırasında amplifiye oluyorsa saptanır. Bu gereklilikler nedeniyle nonspesifik amplifikasyon saptanmaz. Böylece, florestaki artış PCR sırasında hedef amplifikasyonla doğrudan orantılıdır.



Şekil 2. Reaksiyon prensibi. Total RNA revers transkripsiyona uğrar ve oluşan cDNA PCR ile bir çift spesifik primer ve spesifik internal çift boya probu (FAM™–TAMRA™) kullanılarak amplifiye edilir. Prob PCR'da her yapışma adımında amplicona bağlanır. Taq DNA polimeraz bağlı primerden amplicona uzandığında probun 5' ucunu yerinden oynatır ve burası Taq DNA polimerazın 5' à 3' eksonükleaz aktivitesi ile degrade olur. Kesme kalan prob amplicondan eriyip ayrılıncaya kadar devam eder. Bu işlem florofor ve söndürücüyü solüsyona serbest bırakır, bunları uzaysal olarak ayırır ve FAM'dan floresans artmasına ve TAMRA'dan floresans azalmasına neden olur.

Sağlanan Materyal

Kit içeriği

ipsogen PML-RARA bcr1 Kit		(24)
Katalog no.		672123
Reaksiyon sayısı		24
Component	Name	Amount
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyon) (10^3 kopya/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyon) (10^4 kopya/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyon) (10^5 kopya/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10^1 kopya/5 μ l)	F1-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10^2 kopya/5 μ l)	F2-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10^3 kopya/5 μ l)	F3-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10^5 kopya/5 μ l)	F4-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10^6 kopya/5 μ l)	F5-PML-RARA bcr1	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL* (Primerler ve Prob Karışımı ABL)	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene† (Primerler ve Prob Karışımı PML-RARA bcr1 Füzyon Geni†)	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 μ l
ipsogen <i>PML-RARA bcr1 Kit Handbook</i> (İngilizce)		1

* ABL kontrol geni için spesifik revers ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM–TAMRA probunun karışımı.

† PML-RARA bcr1 füzyon geni için spesifik revers ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM–TAMRA probunun karışımı.

Not: Standart dilüsyonları ve primerler ile prob karışımalarını kullanımdan önce kısa bir süre santrifüje edin.

Gereken ama Sağlanmayan Materyal

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edilip kalibre edildiğinden emin olun.

Reaktifler

- I Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su
- I Revers transkripsiyon için reaktifler: Onaylanmış reaktif Superscript® II (veya Superscript) Revers Transkriptazdır ve 5x birinci iplikçik tamponu, 100 mM DTT içerir (Life Technologies, kat. no. 18064-022)
- I RNaz inhibitörü: Onaylanmış reaktif RNaseOUT™'dir (Life Technologies, kat. no. 10777-019)
- I dNTPs Seti, PCR sınıfı
- I Rastgele heksamer
- I MgCl₂
- I Tampon ve Taq DNA polimeraz: Onaylanmış reaktifler TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. no. 4304437) ve LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. no. 04535286001) şeklindedir.

Sarf Malzemesi

- I Hidrofobik filtrelili nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril PCR pipet uçları
- I 0,5 ml veya 0,2 ml RNaz- ve DNaz içermeyen PCR tüpleri
- I Buz

Ekipman

- I PCR için ayrılmış mikrolitre pipet* (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- I 0,2 ml/0,5 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüj* (maksimum 13.000 / 14.000 rpm ile)
- I Gerçek zamanlı PCR cihazı:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya diğer Rotor-Gene Q cihazları; LightCycler 1.2, 2.0 veya 480; ABI PRISM 7000, 7700 veya 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi; veya SmartCycler; ve ilgili spesifik materyal
- I Termal cycler* veya su banyosu* (revers transkripsiyon adımı)

Tamamlayıcı reaktifler

- I *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit (kat. no. 672091), yalnızca araştırma kullanımına yönelik olup RNA ekstraksiyonu ve revers transkripsiyonun kalitatif doğrulanması için PML-RARA bcr1 füzyon geninin negatif, yüksek ve düşük pozitif ekspresyonuyla hücre hatlarından oluşur

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro diagnostik kullanım için

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrim içi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve kullanıcılar burada her QIAGEN kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilir.

Örnek ve tahlil atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize göre atın.

Genel önlemler

qPCR testleri geçerli düzenlemeler ve ilgili standartlarla uyumlu ve moleküler biyolojiye özel ekipman bakımı dahil iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Bu kitin in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. Bu kitede sağlanan reaktifler ve talimat optimum performans için doğrulanmıştır. Reaktiflerin daha fazla seyreltilmesi veya inkübasyon süreleri ve sıcaklıklarının değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilerle sonuçlanabilir. PPC ve PPF reaktifleri ışığa maruz kalırlarsa değişebilir. Tüm reaktifler özellikle bu test için formüle edilmiştir. Testin optimum performansı için yerine başka bir şey kullanılmamalıdır.

qPCR kullanılarak transkript düzeylerinin belirlenmesi hem mRNA revers transkripsiyonu hem de oluşan cDNA'nın PCR ile amplifikasyonunu gerektirir. Bu nedenle tüm test işlemi RNaz/DNaz içermeyen koşullarda yapılmalıdır.

Aşağıdakileri önlemek için çok dikkatli olun:

- I Şablon mRNA ve oluşan cDNA'nın degradasyonuna yol açabilecek RNaz/DNaz kontaminasyonu
- I Yalancı pozitif sinyalle sonuçlanan mRNA veya PCR bulaşma kontaminasyonu

Bu nedenle şunları öneririz:

- I Testi yaparken nükleaz içermeyen laboratuvar gereçleri (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve eldiven takın.
- I Örnekler ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek üzere tüm pipetleme adımları için taze aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- I Ön PCR ana karışımını belirlenmiş materyalle (pipetler, uçlar, vs.) DNA matrikslerinin (cDNA, DNA, plasmid) giremeyeceği belirlenmiş bir bölgede hazırlayın. Şablonu belirli materyalle (pipetler, uçlar, vs.) ayrı bir bölgede (tercihen ayrı bir odada) ekleyin.
- I Standart dilüsyonları (C1–3 ve F1–5) ayrı bir odada kullanın.

Reaktif Saklama ve Muamele

Kitler kuru buzda gönderilir ve alındığında -30°C ila -15°C 'de saklanmalıdır.

- I Primerler ve prob karışımlarının (PPC ve PPF tüpleri) ışığa maruz kalmasını minimuma indirin.
- I Açmadan önce tüpleri yavaşça karıştırın ve santrifüje edin.
- I Tüm kit bileşenlerini orijinal kaplarda saklayın.

Bu saklama koşulları hem açılmış hem açılmamış bileşenler için geçerlidir. Etiketlerde belirtilenlerden farklı koşullar altında saklanan bileşenler uygun performans göstermeyebilir ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.

Her reaktif için son kullanma tarihleri ayrı bileşen etiketlerinde belirtilmiştir. Doğru saklama koşulları altında ürün performansını etikette yazılı son kullanma tarihine kadar korur.

Bu ürünün stabil olmamasını belirtecek bariz bir işaret yoktur. Ancak, bilinmeyen örneklerle aynı anda pozitif ve negatif kontroller çalışmalıdır.

İşlem

Örnek RNA hazırlama

Hasta örneklerinden (kan veya kemik iliği) RNA hazırlama onaylanmış bir işlemle yapılmış olmalıdır. Testin kalitesi büyük ölçüde giriş RNA kalitesine bağlıdır. Bu nedenle saflaştırılmış RNA'yı agaroz* jel elektroforezi ile vasıflandırmanızı veya analiz öncesinde Agilent® Bioanalyzer® kullanmanızı öneririz.

Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon

Başlamadan önce yapılacaklar

- I Her biri için 10 mM dNTP hazırlayın. Alikotlar halinde –20°C de saklayın.
- I Rastgele heksamer hazırlama, 100 µM. Alikotlar halinde –20°C de saklayın.
- I MgCl₂, 50 mM hazırlama. Alikotlar halinde –20°C de saklayın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. 1 µg RNA'yı (1–4 µl) 70°C'de 10 dakika inkübe edin ve hemen buz üzerinde 5 dakika soğutun.
3. Kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Sonra buz üzerinde tutun.
4. Aşağıdaki RT karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın (Tablo 1).

* Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın.

Tablo 1. RT karışımı hazırlama

Bileşen	Örnek başına hacim (µl)	Son konsantrasyon
Birinci İplikçik Tamponu (Superscript II Revers Transkriptaz ile sağlanır), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (her birinden 10 mM, önceden hazırlanacak ve alikotlar halinde -20°C'de saklanacak)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, Superscript II Revers Transkriptaz ile sağlanır)	2,0	10 mM
RNaz inhibitörü (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
RNaz inhibitörü (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Rastgele heksamer (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II veya Superscript Revers Transkriptaz (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Isıtılmış RNA örneği (adım 5'te eklenecek)	1,0–4,0	50 ng/µl
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su (adım 5'te eklenecek)	0,0–3,0	–
Son hacim	20,0	–

5. Her PCR tüpüne RT karışımından 16 µl pipetleyin. Sonra 1–4 µl (1 µg) RNA (adım 3'ten) ekleyin ve hacmi nükleaz içermeyen PCR sınıfı suyla 20 µl'ye ayarlayın (bakınız Tablo 2).

Tablo 2. Revers transkripsiyon reaksiyonunun hazırlanması

Bileşen	Hacim (µl)
RT karışımı	16
Isıtılmış örnek RNA (1 µg)	1–4
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	0–3
Son hacim	20

6. İyice karıştırın ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).
7. 10 dakika boyunca 20°C'de inkübe edin.
8. Termal cycler üzerinde 45 dakika 42°C'de inkübe edin sonra hemen 99°C'de 3 dakika inkübe edin.
9. Buz üzerinde (reaksiyonu durdurmak için) 5 dakika inkübe edin.
10. Kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Sonra buz üzerinde tutun.
11. Son cDNA'yı son hacim 50 µl olacak şekilde 30 µl nükleaz içermeyen PCR sınıfı suyla seyreltin.
12. PCR'ı qPCR aletinize göre aşağıdaki protokollerle yapın.

Protokol: 72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazları üzerinde qPCR

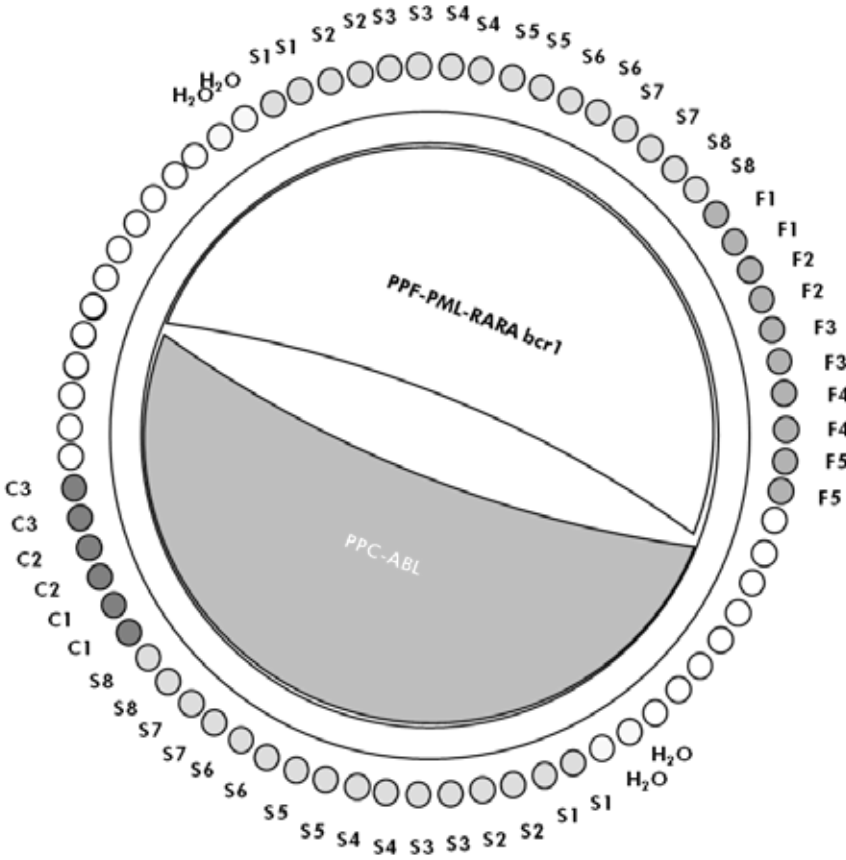
Bu aleti kullanarak Tablo 3'te gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 3. 72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	2 x 3 reaksiyon (3 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon
PML-RARA bcr1 primerler ve prob karışımı ile (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
PML-RARA standardı	2 x 5 reaksiyon (5 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon

72 tüp rotorlu Rotor-Gene® Q aletlerinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz.



Şekil 3. *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. F1–5: PML-RARA bcr1 standartları; C1–3: ABL standartları; S: cDNA örneği; H₂O: su kontrol.

Not: Daima test edilecek bir örneği rotorda pozisyon 1'e koyduğunuzdan emin olun. Aksi halde kalibrasyon adımı sırasında alet kalibrasyon yapmaz ve hatalı floresans verileri alınır.

Tüm diğer pozisyonları boş tüplerle doldurun.

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 4 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-PML-RARA bcr1). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 4. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 24 + 1 reaksiyon (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	25	29	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	162,5	188,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

3. Tüp başına 20 µl qPCR ana karışımı verin.
4. Karşılık gelen tüpe revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız “Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon”, sayfa 14) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).
5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Tüpleri üretici önerilerine göre termal cycler'a koyun.
7. Rotor-Gene Q aletini Tablo 5'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Tablo 5. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 50 derece Süre: 2 dk
Tutma 2	Sıcaklık: 95 derece Süre: 10 dk
Cycling	50 kez 15 sn için 95 derece 1 dk için 60 derece ve Yeşil kanalında FAM floresans alınması: Tek

8. Termal cycling programını Tablo 5'te belirtildiği şekilde başlatın.
9. Rotor-Gene Q aletleri için analizde “Slope Correct” (Eğim Düzelt) seçin. Eşiği 0,03 olarak ayarlamınızı öneriyoruz.

Protokol: ABI PRISM 7000, 7700'de qPCR ve 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistem ve LightCycler 480 cihazı

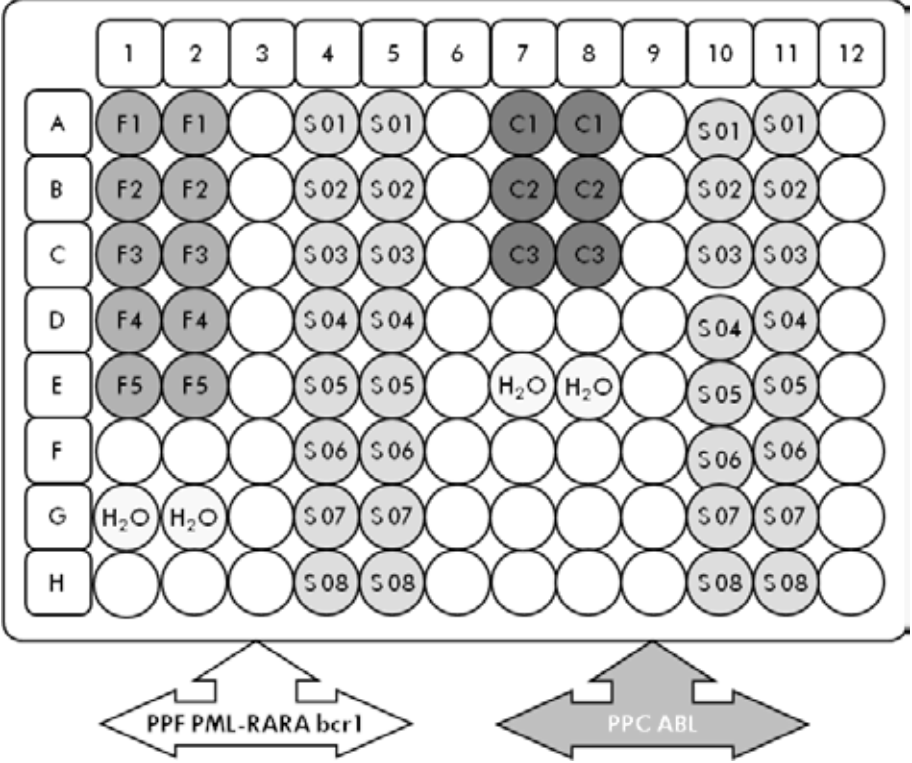
96 kuyulu plakalı qPCR aletini kullanarak Tablo 6'da gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 6. 96 kuyulu plakalı qPCR ekipmanında reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	2 x 3 reaksiyon (3 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon
PML-RARA bcr1 primerler ve prob karışımı ile (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
PML-RARA bcr1 standardı	2 x 5 reaksiyon (5 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon

ABI PRISM 7000, 7700'de örnek işleme ve 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi ve LightCycler 480 cihazı

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 4'teki plaka şeması böyle bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 4. Bir deney için önerilen plaka kurulumu. S: cDNA örneği; F1–5: PML-RARA bcr1 standartları; C1–3: ABL standartları; H₂O: su kontrol.

ABI PRISM 7000, 7700'e qPCR ve 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi ve LightCycler 480 cihazı

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 7 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-PML-RARA bcr1). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 7. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 24 +1 reaksiyon (µl)	PML-RARA bcr1: 28 +1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	25	29	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	162,5	188,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

3. Kuyucuk başına 20 µl qPCR ana karışımı verin.
4. Karşılık gelen kuyucuğa revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız “Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon”, sayfa 14) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).

5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Plakayı kapatın ve kısa süre santrifüje edin (300 x g, yaklaşık 10 saniye).
7. Plakayı üretici önerilerine göre termal cycler'a koyun. Termal cycler'ı Tablo 8'de ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi veya Tablo 9'da LightCycler 480 aleti içinde belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Table 8. ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi için sıcaklık profili

Analiz modu	Standart Eğri — Mutlak Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C FAM floresansı almayla 1 dakika için 60°C; söndürücü: TAMRA

Tablo 9. LightCycler 480 cihazı için Sıcaklık profili

Analiz modu	Mutlak Kantifikasyon ("Abs Quant")
Format saptama	Detection formats (Saptama formatları) penceresinde "Simple Probe" (Basit Prob) seçin
Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C LC versiyon 01 için 483–533 nm, LC versiyon 02 için 465–510 nm'ye karşılık gelen FAM floresansı almayla 1 dakikada 60°C

8. ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi için adım 8a'yı izleyin. LightCycler 480 aleti için adım 8b'yi izleyin.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi: Analiz adımında EAC protokolünde tanımlandığı gibi 0,1 olarak ayarlanmış bir eşik ve döngü 3 ile 15 arasında ayarlanmış bir başlangıç öneriyoruz. Cycling programını Tablo 8'de belirtildiği şekilde başlatın.
- 8b. LightCycler 480: Zemin 2,0 ve eşik 2,0 olarak bir Uyum noktası analiz modu öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 9'te belirtildiği şekilde başlatın.

Protokol: LightCycler 1.2 ve 2.0 aletlerinde qPCR

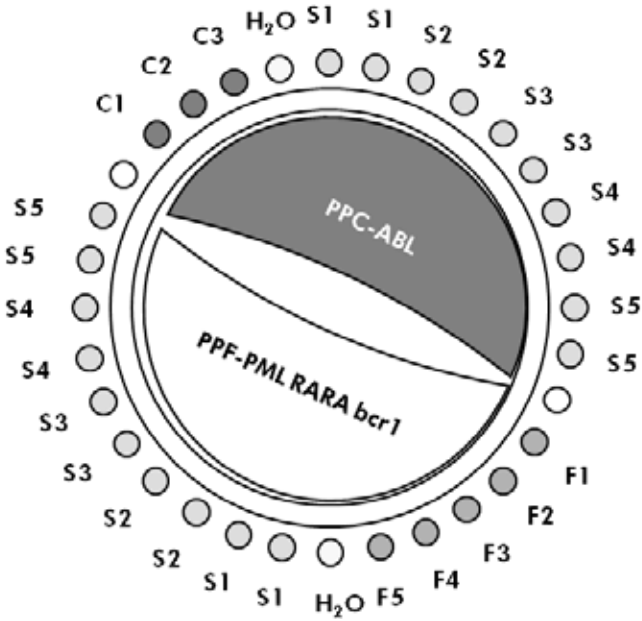
Kapiller aletler kullanarak Tablo 10'da gösterildiği gibi örnekleri ikili ve kontrolleri bir kez ölçmeyi öneriyoruz.

Tablo 10. LightCycler 1.2 ve 2.0 aletlerinde reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	1 x 3 reaksiyon (3 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon
PML-RARA bcr1 primerler ve prob karışımı ile (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
PML-RARA bcr1 standardı	1 x 5 reaksiyon (5 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon

LightCycler 1.2 ve 2.0 aletleri örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 5 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 5'daki kapiller şeması bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 5. *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. F1–5: PML-RARA bcr1 standartları; C1–3: ABL standartları; S: analiz edilecek bilinmeyen DNA örneği; H₂O: su kontrol.

LightCycler 1.2 ve 2.0 aletlerinde qPCR

Not: Belirli teknolojik gereklilikler nedeniyle LightCycler deneylerinin belirli reaktifler kullanılarak yapılması gerekir. LightCycler TaqMan Master kullanılması ve Master Mix 5x hazırlamak için üreticinin talimatının izlenmesini öneriyoruz.

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 11 20 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-PML-RARA bcr1). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 11. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 14 + 1 reaksiyon (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x yeni hazırlanır	4,0	60	68,0	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	0,8	12	13,6	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	10,2	153	173,4	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	Her birinden 5,0	–
Toplam hacim	20,0	Her birinden 20	Her birinden 20,0	–

3. Kapiller başına 15 µl qPCR ana karışımı verin.
4. Karşılık gelen tüpe revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız “Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon”, sayfa 14) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 20 µl).
5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Kapillerleri aparat ile sağlanan adaptörlere yerleştirin ve kısa süre santrifüje edin (700 x g, yaklaşık 10 saniye).
7. Kapillerleri üreticinin önerilerine göre termal cyclers'a yükleyin.
8. LightCycler 1.2 veya 2.0 aletini Tablo 12'de belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Tablo 12. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika Rampa: 20
Cycling	50 kez 10 saniye için 95°C; rampa: 20 1 dakika için 60°C; rampa: 20; FAM floresansı almayla: Tek
Tutma 2	1 dakika için 45°C; rampa: 20

9. LightCycler 1.2 için adım 9a'yı izleyin. LightCycler 2.0 için adım 9b'yi izleyin.
 - 9a. LightCycler 1.2: F1/F2 ve “2nd derivative analysis” (2 derivatif analizi) modu önerilir. Termal cycling programını Tablo 12'de belirtildiği şekilde başlatın.
 - 9b. LightCycler 2.0: Tekrar üretilebilir sonuçlar elde etmek üzere LightCycler 2.0 Yazılım versiyon 4.0 üzerinde Otomatik (F''maks) analizi kullanmanızı öneririz. Termal cycling programını Tablo 12'de belirtildiği şekilde başlatın.

Protokol: SmartCycler aletinde qPCR

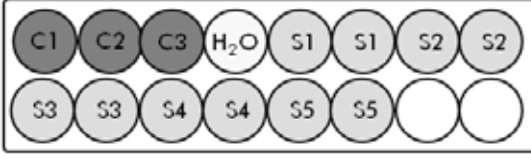
Bu aleti kullanarak Tablo 13'de gösterildiği gibi örnekleri ikili ve kontrolleri bir kez ölçmeyi öneriyoruz.

Tablo 13. SmartCycler aleti için reaksiyon sayısı

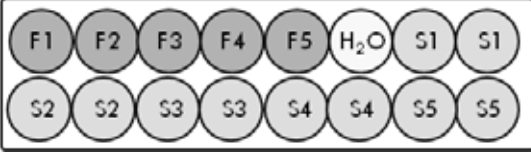
Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	1 x 3 reaksiyon (3 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon
PML-RARA bcr1 primerler ve prob karışımı ile (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
PML-RARA bcr1 standardı	1 x 5 reaksiyon (5 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon

SmartCycler aletinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 5 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 6'daki iki bloklü şema bir örnek vermektedir.



Birinci bloktaki tüm tahliller PPC-ABL ile yapılır



Bu ikinci bloktaki tüm tahliller PPF-PML-RARA bcr1 ile yapılır

Şekil 6. Bir deney için önerilen plaka kurulumu. S: cDNA örneği; F1–5: PML-RARA bcr1 standartları; C1–3: ABL standartları; H₂O: su kontrol.

SmartCycler aletinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 14 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-PML-RARA bcr1). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 14. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 14 + 1 reaksiyon (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	15	17	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	97,5	110,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

3. Kuyucuk başına 20 µl qPCR ana karışımı verin.
4. Karşılık gelen tüpe revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız “Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon”, sayfa 14) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).
5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Örnekleri üreticinin önerilerine göre termal cycler'a yükleyin.
7. SmartCycler aletini Tablo 15'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Tablo 15. Sıcaklık profili

Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C 1 dakika için 60°C alınmasıyla: Tek

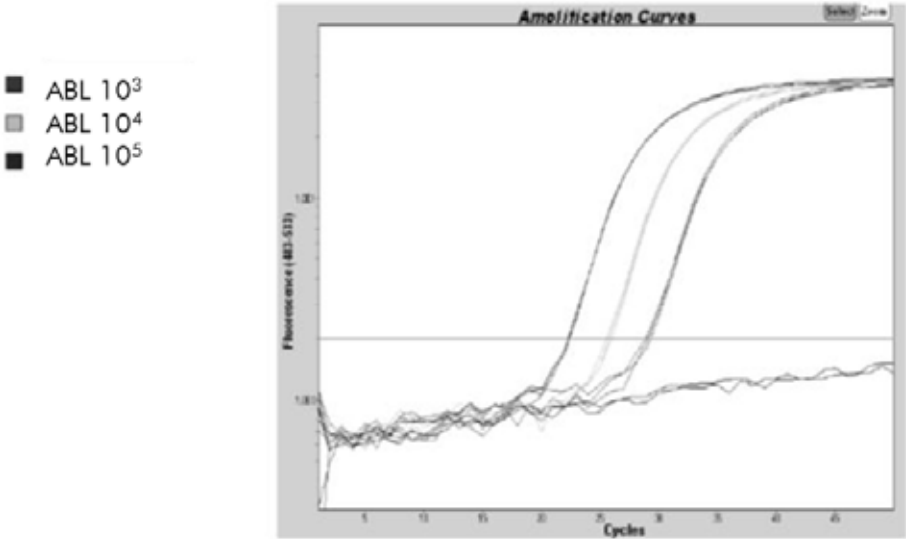
8. Eşiği 30 olarak ayarlamanızı öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 15'te belirtildiği şekilde başlatın.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Veri analizi prensibi

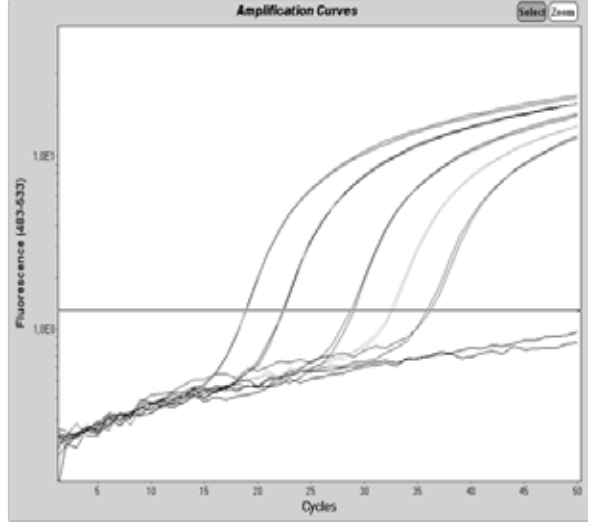
TaqMan teknolojisi kullanılarak, eşik üzerinde bir sinyal saptamak için gerekli PCR döngüsü sayısına eşik döngüsü (C_T) denir ve reaksiyon başında bulunan hedef miktarıyla doğrudan orantılıdır.

Bilinen sayıda molekülle standartlar kullanarak standart bir eğri oluşturulabilir ve test örneğinde bulunan kesin hedef miktarı belirlenebilir. *ipsogen* standart eğrileri plasmid tabanlıdır; doğru standart eğrileri sağlamak üzere ABL kontrol geni (CG) için 3 plasmid standart dilüsyonu ve füzyon geni (PML-RARA bcr1) için 5 standart dilüsyon öneririz. Şekil 7 ve 8 *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitiyle elde edilen TaqMan amplifikasyon eğrilerine örnek gösterir.



Şekil 7. ABL standartlarının saptanması (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ ve 10⁵ kopya/5 µl.

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



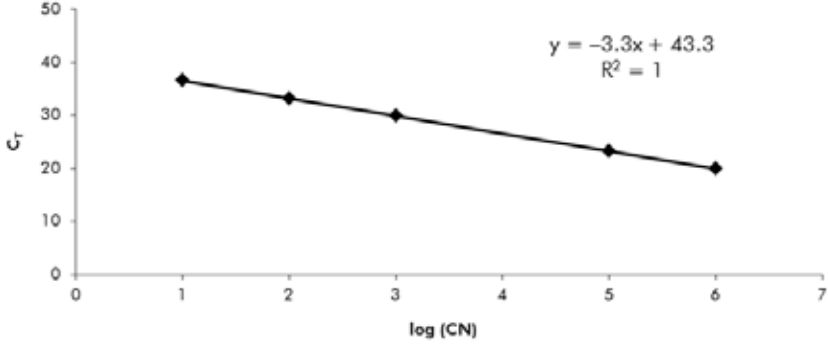
Şekil 8. PML-RARA bcr1 standart sapmaların saptanması (F1–F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ ve 10⁶ kopya/5 µl.

Sonuçlar

Standart eğri ve kalite kriterleri

Ham veriler analiz için bir Excel® dosyasına yapıştırılabilir.

Her gen için (ABL ve PML-RARA), plasmid standart dilüsyonlarından elde edilen ham C_T değerleri log kopya numarasına göre plotlanır (C1, C2 ve C3 için 3, 4 ve 5; F1, F2, F3, F4 ve F5 için 1, 2, 3, 5 ve 6). Şekil 9 5 standart dilüsyonda hesaplanmış teorik eğri örneği gösterir.



Şekil 9. 5 standart dilüsyondan hesaplanmış teorik eğri. Her gen için (ABL and PML-RARA) bir lineer regresyon eğrisi ($y = ax + b$) hesaplanır ve burada a çizginin eğimi ve b y -kesişimidir ve burası çizginin y eksenini geçtiği noktada y koordinatıdır. Belirlemenin katsayısı (R^2) ve denklem grafikte yazdırılır.

Standartlar on kat dilüsyon olduğundan eğrinin teorik eğimi $-3,3$ 'dir. $-3,0$ ile $3,9$ arasında bir eğim $R^2 > 0,95$ olduğu sürece kabul edilebilir (6). Ancak hassas sonuçlar için $R^2 > 0,98$ istenir (7).

Normalize kopya numarası (NCN)

ABL standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_T verilerini (PPC-ABL ile elde edilen) ABL kopya numaralarına (ABL_{CN}) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

PML-RARA standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_T verilerini (PPF-PML-RARA ile elde edilen) PML-RARA kopya numaralarına ($PML-RARA_{CN}$) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

Bu CN değerlerinin oranı normalize kopya numarasını (NCN) verir:

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

MRD değeri

Minimal rezidüel hastalık (MRD) değeri takip $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ ve diagnostik örnekler $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ FG için CG normalize ekspresyonunun oranıdır.

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

Hassasiyet

Hassasiyet (SENSv) tanıda relatif FG ekspresyonu $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ ve takip örneğinde CG ekspresyonuna $(CG_{CN,FUP})$ göre hesaplanır.

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

ABL değerlerinde kalite kontrol

Kötü RNA kalitesi veya qPCR adımları sırasında problemler düşük ABL_{CN} 'ye neden olur. $ABL_{CN} < 1318$ olan örneklerden sonuçları atmanızı öneriyoruz (referans 5, EAC çalışmasında hasta örneklerinden %95 GA için alt değer).

Replikatlar arasında tekrar üretilebilirlik

Replikatlar arasında C_T değerleri değişkenliği kopya sayısı değerlerinde 4 kat değişikliğe karşılık gelecek şekilde <2 olmalıdır.

Replikatlar arasında C_T değerleri değişikliğü replikatların ortalama C_T değeri <36 (6) ise genelde $<1,5$ 'tir.

Not: Her kullanıcı laboratuvarında kendi tekrar üretilebilirliğini ölçmelidir.

Su kontrol

Negatif kontroller sıfır CN vermelidir.

Pozitif su kontrol çapraz kontaminasyon nedeniyle oluşur. Bir çözüm bulmak için aşağıda "Sorun Giderme kılavuzu" kısmına bakınız.

Sorun Giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu oluşabilecek herhangi bir problemi çözmekte faydalı olabilir. Daha fazla bilgi için klinik koordinatörünüze başvurun veya

www.qiagen.com adresini **ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091, yalnızca Araştırma Kullanımı içindir. Diagnostik işlemlerde kullanım için değildir. Bir hastalığın teşhisi, önlenmesi veya tedavisine yönelik bilgi sağlama konusunda herhangi bir iddia veya beyan bulunmamaktadır.

ziyaret edin.

Açıklama ve öneriler

Tüm örneklerde PML-RARA bcr1 ve kontrol geninde (ABL) negatif sonuç — standart iyi

- | | |
|---|--|
| a) Kötü RNA kalitesi | Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091)*). |
| b) Revers transkripsiyon adımının başarısızlığı | Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091)*). |

Kontrol geninde (ABL) negatif sonuç — standart iyi

- | | |
|---|--|
| a) Kötü RNA kalitesi | Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091)*). |
| b) Revers transkripsiyon adımının başarısızlığı | Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091)*). |

Standart sinyal negatif

Açıklama ve öneriler

-
- | | |
|--|---|
| a) Pipetleme hatası | Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın. |
| b) Kit bileşenlerinin uygun olmayan saklanması | <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kitini –15 ila –30°C’de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını (PPC ve PPF) ışıktan koruyun. Bakınız “Reaktif Saklama ve Muamele”, sayfa 13.
Tekrarlanan dondurma ve çözmelerden kaçının.
Reaktifleri saklama için alikotlayın. |

Negatif kontroller pozitifdir

Çapraz kontaminasyon

Tüm kritik reaksiyonları değiştirin.
Deneyi tüm reaktiflerin yeni alikotlarıyla tekrarlayın.
Örnekler, kit bileşenleri ve sarf malzemesini bulaşma kontaminasyonunu önlemek için daima yaygın olarak kabul edilen uygulamalara göre kullanın.

Standart kontrollerde bile sinyal yok

- | | |
|--|---|
| a) Pipetleme hatası veya atlanmış reaktifler | Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın. |
| b) Yetersiz saflaştırma nedeniyle örnek materyalinin inhibe edici etkileri | RNA hazırlanmasını tekrarlayın. |
| c) LightCycler: Yanlış saptama kanalı seçilmiş | Kanal Ayarını F1/F2 veya 530 nm/640 nm olarak ayarlayın. |
| d) LightCycler: Veri alma programlanmamış | Döngü programlarını kontrol edin.
PCR programında her birleştirme segmentinin sonunda “single” (tek) çekim modunu seçin. |

Örneklerde sinyal yok veya düşük ama standart kontrolleri iyi

- | | |
|---|---|
| a) Kötü RNA kalitesi veya düşük konsantrasyon | Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091*). |
|---|---|

Açıklama ve öneriler

-
- b) Revers transkripsiyon adımının başarısızlığı
- Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
- Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091*).

Floresans şiddeti fazla düşük

- a) Kit bileşenlerinin uygun olmayan saklanması
- ipsogen* PML-RARA bcr1 Kitini –15 ila –30°C’de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını (PPC ve PPF) ışıktan koruyun. Bakınız “Reaktif Saklama ve Muamele”, sayfa 13.
- Tekrarlanan dondurma ve çözmelerden kaçının.
- Reaktifleri saklama için alikotlayın.
- b) Çok düşük başlangıç hedef RNA miktarı
- Örnek RNA miktarını arttırın.
- Not:** Seçilen RNA hazırlama yöntemine bağlı olarak inhibe edici etkiler oluşabilir.

LightCycler: Floresans şiddeti değişkenlik gösterir

- a) Pipetleme hatası
- “Pipetting error” (pipetleme hatası) denilen durumun yarattığı değişkenlik verileri F1/F2 veya 530 nm/640 nm modunda analiz ederek azaltabilir.
- b) Kapillerlerde yetersiz santrifügasyon
- Hazırlanan PCR karışımı halen kapillerin üst kısmında olabilir veya kapiller ucunda bir hava kabarcığı sıkışmış olabilir.
- Kapillerleri daima cihazın spesifik çalışma el kitabında tanımlanan şekilde reaksiyon karışımıyla yüklenmiş olarak santrifüje edin.
- c) Kapiller ucunun dış yüzeyi kirlidir
- Kapillerleri kullanırken daima eldiven takın.

LightCycler: Standart eğri hatası

- Pipetleme hatası
- “Pipetting error” (pipetleme hatası) denilen durumun yarattığı değişkenlik verileri F1/F2 veya 530 nm/640 nm modunda analiz ederek azaltabilir.

**ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091, yalnızca Araştırma Kullanımı içindir. Diagnostik işlemlerde kullanım için değildir. Bir hastalığın teşhisi, önlenmesi veya tedavisine yönelik bilgi sağlama konusunda herhangi bir iddia veya beyan bulunmamaktadır.

Kalite Kontrol

Tüm kitin kalite kontrolü bir LightCycler 480 aletiyle yapılmıştır. Kit ISO 13485:2003 standardına göre üretilmiştir. Analiz sertifikaları istek üzerine www.qiagen.com/support/ adresinde bulunabilir.

Sınırlamalar

Kullanıcılar bu cihazın kullanılmasından önce bu teknoloji konusunda eğitimli ve aşina olmalıdır. Bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır (bakınız “Gereken ama Sağlanmayan Materyal”, sayfa 10).

Oluşan herhangi bir diagnostik sonuç diğer klinik veya laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır. Laboratuvarlarında QIAGEN performans çalışmalarının kapsamında olmadan kullanılan herhangi bir işlem için sistem performansını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm bileşenlerin kutu ve etiketlerinde basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Not: Bu kit “Europe Against Cancer” (EAC) çalışmalarına göre tasarlanmıştır (4, 5). Bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış reaktifler ve aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır. Bu ürünün etiket dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN’in yükümlülüğünü ortadan kaldırır.

Performans Özellikleri

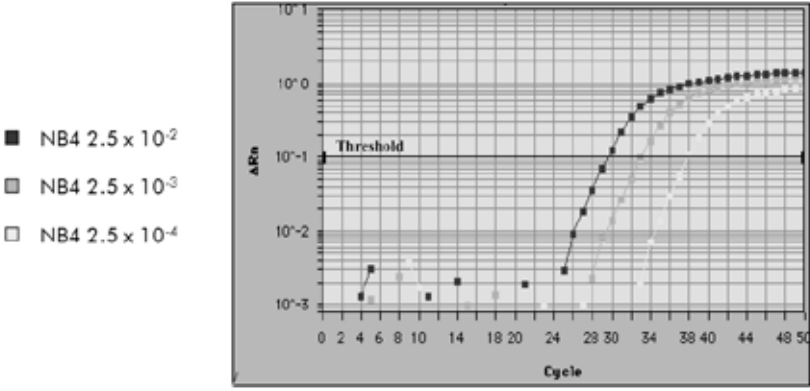
Klinik olmayan çalışmalar

Materyaller ve yöntemler

Performans değerlendirmesi “Gereken ama Sağlanmayan Materyal”, sayfa 10 içinde liste halinde verilen reaktiflerle kombinasyon halinde bir ABI PRISM 7700 SDS ile yapılmıştır. Eşdeğerlik çalışmaları aşağıdaki aletlerde kullanımını doğrulamıştır: ABI PRISM 7000 ve 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ve 480, Rotor-Gene 3000, ve SmartCycler.

ipsogen PML-RARA bcr1 Kitinin analitik performansını belirlemek üzere klinik olmayan çalışmalar yapılmıştır. Bu klinik olmayan laboratuvar çalışmaları sabit bir son MV4-11 hücre hattı total RNA miktarında seyreltilmiş olarak NB4 hücre hattından total RNA üzerinde yapılmıştır.

Testin tekrarlanabilirliğini belirlemek üzere 200 ng sabit son toplam miktarda MV4-11 total RNA'da seyreltilmiş NB4 total RNA konsantrasyonu (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg ve 0,5 pg) çalışma başına 5 replikat ve 4 farklı çalışma olarak analiz edilmiştir. MV4-11 RNA'da 5 pg ve 0,5 pg NB4 RNA bulunan örnekler sonuç vermek için fazla düşük olmuştur (Şekil 10).



Şekil 10. MV4-11 negatif total RNA'da NB4 total RNA için $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng) ve $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng) dilüsyonlarının amplifikasyon plotları.

Analitik veriler

Tablo 16–19 ortalama eşik döngüsü (C_T), standart sapma (SD), örnek sayısı (n), varyasyon katsayısı (CV), ortalama kopya numarası (CN) ve ortalama normalize kopya numarası (NCN) ile testler arası analizleri gösterir.

Tablo 16. Testler arası ve test içi analiz — hücre hatları PML-RARA ve ABL

Hücre hattı	Testler arası analiz				Test içi analiz		
	Dilüsyon	Ortalama C_T	SD	n	CV (%)	Min CV	Maks CV
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

Tablo 17. Testler arası analiz — plasmidler

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

Tablo 18. Testler arası analiz — hücre hatları PML-RARA bcr1 ve ABL (ortalama CN)

Hücre hattı	Dilüsyon	Ortalama CN	SD	n	CV (%)
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

Tablo 19. Testler arası analiz — hücre hattı PML-RARA bcr1 (ortalama NCN)

Hücre hattı	Dilüsyon	Ortalama NCN*	SD	n	CV (%)
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

* Sadece bu çalışma sonuçları için NCN $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}}$ x 10.000 olarak verilir.

Klinik araştırmalar

Performans değerlendirmesi “Gereken ama Sağlanmayan Materyal”, sayfa 10 içinde liste halinde verilen reaktiflerle kombinasyon halinde bir ABI PRISM 7700 SDS ile yapılmıştır. Eşdeğerlik çalışmaları aşağıdaki aletlerde kullanımını doğrulaşmıştır: ABI PRISM 7000 ve 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ve 480, Rotor-Gene 3000, ve SmartCycler.

Europe Against Cancer (EAC) tarafından bir toplu eylemde organize edilmiş şekilde 10 Avrupa ülkesinde 26 laboratuvarlık bir grup *ipsogen* tarafından sağlanan plasmidleri klinik ortamda majör lösemiyle ilişkili füzyon genlerinin qPCR analizi için standardize bir protokol elde etmek üzere kullanmıştır. PML-RARA bcr1 transkripti bu çalışmaya dahil edilen füzyon genlerinden (FG) biridir. Burada bu doğrulama çalışmasının bir özetini sunuyoruz; tam sonuçlar 2003 yılında yayımlanmıştır (4, 5).

CG ve FG plasmid standartları için laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik

Toplam 11 laboratuvar CG ve FG plasmid standart dilüsyonlarının ölçümünde değişkenliği değerlendirmek üzere bir laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik deneyi yapmıştır. Dilüsyonlar her tesiste ikili olarak yapılmıştır. Tablo 20 her dilüsyon için ortalama, standart sapma ve CV (%) değerlerini göstermektedir.

Tablo 20. CG ve FG plasmid standartları için laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik

Gen	Dilüsyon	Ortalama	C _T SD	CV (%)
ABL kontrol geni	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
PML-RARA bcr1 füzyon geni	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

PML-RARA bcr1 FG transkripti için ekspresyon değerleri

Tablo 21 ve 22 PML-RARA bcr1 FG transkripti ve ABL CG ekspresyon değerlerini NB4 hücre hattı, tanıda APL hastaları ve negatif kontrol hastalar için vermektedir.

Tablo 21. PML-RARA bcr1 FG transkripti ve ABL CG ekspresyon değerleri — C_T değerleri

	C _T değerleri (%95 aralık)	
	PML-RARA bcr1	ABL
NB4 hücre hattı	24,7	23,7
APL hasta örnekleri		
Kemik iliği (n = 14)	25,6 (23,1–27,5)	24,5 (21,7–28,5)
Periferel kan (n = 9)	25,7 (23,7–29,4)	24,6 (22,0–27,4)
Negatif hasta örnekleri		
Kemik iliği (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Periferel kan (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

ABL CT değerleri normal ve lösemik örnekler arasında önemli fark göstermedi ve ayrıca örnek tipleri (PB veya BM) veya APL tanısı konmuş hastalardan lösemi örnekleri arasında önemli fark göstermedi.

Tablo 22. PML-RARA bcr1 FG transkripti ve ABL CG ekspresyon değerleri — CN ve NCN değerleri

	CN değerleri (%95 aralık)		NCN değerleri (%95 aralık)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Hasta örnekleri			
Kemik iliği (n = 14)	5129 (1480–25.704)	1538,7 (133,2–46.781,28)	0,30 (0,09–1,82)
Periferel kan (n = 9)	3891 (475–14.454)	1400,76 (50,27–11.274)	0,36 (0,11–0,78)
Negatif hasta örnekleri			
Kemik iliği (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
Periferel kan (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

Yalancı pozitif ve yalancı negatif oranları

Yalancı negatif ve yalancı pozitif oranları aşağıdaki kontroller kullanılarak hesaplandı.

- I Pozitif kontroller: NB4 hücreleri, PML-RARA bcr1 FG pozitifliği için iyi bilinen bir hücre hattı; hasta örnekleri zaten PML-RARA bcr1 pozitifliği için değerlendirilmiş
- I Negatif kontroller: Negatif RNA örnekleri, PCR kontaminasyonunu kontrol etmek için insan RNA'sı yerine *E. coli* RNA'sından yapılmış amplifikasyon olmaması kontrolleri (NAC) ve insan RNA'sı yerine su içeren şablon olmaması kontrolleri (NTC)

FG'nin RNA örnekleri amplifikasyonu üçlü olarak ve CG için ikili olarak çalışıldı.

Yalancı negatif örnek %50'den az pozitif kuyunun olduğu (0/2, 0/3 veya 1/3) pozitif RNA örneği olarak tanımlandı.

Bir yalancı pozitif örnek en az %50 pozitif kuyuyla (1/2, 2/3 veya 3/3) bir negatif örnek olarak tanımlandı.

Tablo 23 yalancı negatif ve yalancı pozitif örneklerin sayı ve yüzdesini göstermektedir.

Tablo 23. Yalancı negatif ve yalancı pozitif örnekler

Yalancı negatiflik		Yalancı pozitiflik	
10^{-3}	10^{-4}	FG negatif kontrol	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

Referanslar

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.

Semboller

Aşağıdaki semboller paketler ve etiketlerde belirebilir:



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son Kullanma Tarihi



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası (yani bileşen etiketi)



Küresel Ticari Ürün Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatına başvurun

Belge revizyon geçmişi

R5, Kasım 2017

ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kitin (kat. no. 672091) Yalnızca Araştırma Amaçlı olduğuna yönelik notlar eklenmiştir; küçük yazım hataları düzeltilmiştir.

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	24 reaksiyon için: ABL Kontrol Geni Standartları, PML-RARA bcr1 Füzyon Geni Standartları, Primerler ve Prob Karışımı ABL, Primerler ve Prob Karışımı PML-RARA bcr1 Füzyon Geni	672123
Rotor-Gene Q MDx — Klinik uygulamalarda IVD ile doğrulanmış gerçek zamanlı PCR analizi için		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cyclers ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cyclers ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kontrol Kiti — PML-RARA bcr1 füzyon geninin revers transkripsiyonu ve RNA ekstraksiyonunun kalitatif doğrulanması için		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	PML-RARA bcr1 füzyon geninin negatif, yüksek ve düşük pozitif ekspresyonlu hücre hatları	672091*

**ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. no. 672091, yalnızca Araştırma Kullanımı içindir. Diagnostik işlemlerde kullanım için değildir. Bir hastalığın teşhisi, önlenmesi veya tedavisine yönelik bilgi sağlama konusunda herhangi bir iddia veya beyan bulunmamaktadır.

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakınız. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı el kitapları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu ürünün in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. *ipsogen* ürünleri önceden QIAGEN'in yazılı onayı olmadan tekrar satılamaz, tekrar satış için modifiye edilemez veya ticari ürünler üretmek için kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgi haber verilmeden değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilen herhangi bir hata için sorumluluk almaz. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. QIAGEN, hiçbir şekilde bu belgenin kullanımından doğrudan veya dolaylı olarak kaynaklanan her türlü özel, arızı veya çoklu veya sonuçsal kayıplardan sorumlu değildir.

ipsogen ürünlerinin belirtilen spesifikasyonları karşılayacağı garanti edilir. Ürünler garanti edildiği şekilde performans göstermezse QIAGEN'in tek yükümlülüğü ve müşterinin tek çözümü ürünlerin ücretsiz değiştirilmesiyle sınırlıdır.

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

***ipsogen* PML-RARA bcr1 Kiti için Sınırlı Lisans Sözleşmesi**

Bu ürünün kullanılması ürünün herhangi bir satın alanı veya kullanıcısının şu şartları kabul ettiğini belirtir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazılarını QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açık olarak ifade edilmiş lisanslar dışında, QIAGEN bu Kit ve/veya kullanımının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceği konusunda herhangi bir garanti vermez.
3. Bu Kit ve bileşenleri sadece tek kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, tekrar işlemiden geçirilemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN spesifik olarak açık olarak belirtilen dışında ister açık ister zımnı olsun her türlü başka lisansı reddeder.
5. Kitin satın alanı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan işlemlerden herhangi birine yol açabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı ve başkasının da atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir Mahkemede yürürlüğe sokabilir ve Avukat ücretleri dışında tüm araştırma ve mahkeme masraflarını bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini veya Kit ve/veya bileşenleriyle ilgili herhangi bir fikri mülkiyet haklarını yürürlüğe sokmak için yapılan bir davada geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bakınız www.qiagen.com.

HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

