

ipsogen[®] BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR komplekti käsiraamat



1. versioon

IVD

Kvantitatiivne *in vitro* diagnostika

Kasutamiseks koos kaubamärke Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®], ja LightCycler[®] kandvate seadmetega

CE

REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY

R3 **MAT** 1072509ET



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN on uuenduslike proovi- ja analüüsimeetodite juhtiv tootja, kes loob võimalused mikroorganismide isoleerimiseks ja tuvastamiseks igasugusest bioloogilisest proovimaterjalist. Meie väljatöötatud kõrge kvaliteediga tooted ja teenused tagavad edu proovi analüüsimisel.

QIAGEN loob standardid järgmistes tegevustes:

- DNA, RNA ja valkude puhastamine
- nukleiinhapete ja valkude analüüsimine
- microRNA uurimine ja RNAi
- proovi- ja analüüsimeetodite automatiseerimine

Meie missiooniks on aidata teil saavutada väljapaistvat edu ja läbimurret. Lisateavet saate meie kodulehelt **www.qiagen.com**.

Sisu

Sihtotstarve	5
Kokkuvõte ja selgitus	5
CML-i olemus	5
Haiguse jälgimine	5
Protseduuri põhimõte	7
Komplektis olevad materjalid	9
Komplekti sisu	9
Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid	10
Hoiatused ja ettevaatusabinõud	11
Üldised ettevaatusabinõud	11
Reaktiivide säilitamine ja käitlemine	12
Proovide käsitlemine ja säilitamine	12
Läbiviimine	13
Proovi RNA ettevalmistamine	13
Protokollid	
■ Pöördtranskriptsioon toote SuperScript III Reverse Transcriptase abil	13
■ qPCR seadmel Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM (72 katsutit)	16
■ qPCR seadmetel Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS ja LightCycler 480	20
■ qPCR seadmetel LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0	26
Tulemuste tõlgendamine	30
Andmeanalüüsi põhimõte	30
Standardkõverad ja kvaliteedikriteeriumid sisaldavad töötlemata andmeid	31
Normalized copy number (NCN, normaliseeritud koopiate arv)	33
Teisendamine IS-i ja MMR tulemuste esitamiseks	34
Kokkuvõtte kvaliteedikriteeriumidest	35
Tõrkeotsing	36
Kvaliteedikontroll	37
Piirangud	37
Toimekarakteristikud	38

Tulemuse puudumise piir ja tuvastuspiir	38
Lineaarsus	38
Sisendid	38
Täpsus	38
Vastavusuuring: ERM-AD623 BCR-ABL1 üksikplasmiid (IRMM) võrreldes komplekti <i>ipsogen</i> üksikplasmiiidi (QIAGEN) standarditega	39
Viited	41
Sümbolid	42
Kontaktandmed	42
Tellimisinfo	43

Sihtotstarve

ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR komplekt on mõeldud BCR-ABL p210 b2a2 või b3a2 transkriptsioonide kvantifitseerimiseks varem leitud BCR-ABL Mbc fusioonigeeniga (FG) ägedat lümfoblastset leukeemiat (ALL) või kroonilist müeloidset leukeemiat (CML) põdevate patsientide luuüdist või verest võetud proovidest. Test on mõeldud molekulaarse vastuse määra hindamiseks; tulemusi saab kasutada minimaalse residuaalhaiguse jälgimiseks.

Kokkuvõte ja selgitus

CML-i olemus

CML kuulub müeloproliferatiivsete kasvajate rühma ning rohkem kui 90%-l juhtudest iseloomustab seda Philadelphia kromosoomi (Ph-kromosoomi) olemasolu.

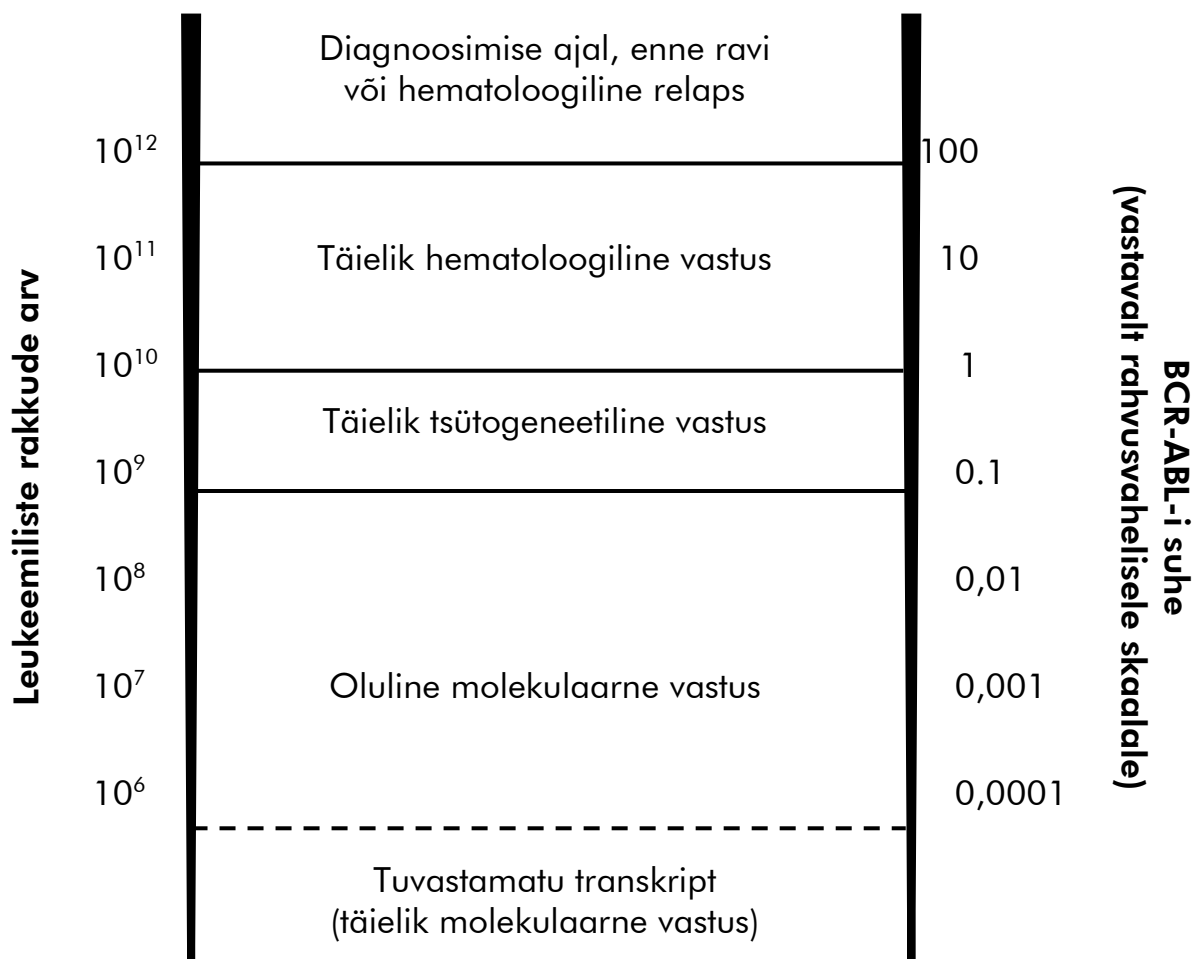
See kromosoom on 9. ja 22. t(9;22) pikkade õlgade vahel toimunud retsiprookse translokatsiooni tulemus, kusjuures selle BCR-i (katkemiste klatri piirkond) asub 22. kromosoomis ja c-ABL-i onkogeen pärineb 9. kromosoomist. Vastav fusioonigeen BCR-ABL transkribeeritakse 8,5 kb mRNA-ks, millel on 2 varianti: b2a2 (40% juhtudest) ja b3a2 (55% juhtudest). See kodeerib kimäärset valku p210, lisaks on tõusnud türosiini kinaasi aktiivsus. b2a3 ja b3a3 transkriptsioonid esinevad vähem kui 5%-l juhtudest. Ph-kromosoomi tuvastatakse ka 35%-l täiskasvanud ALL-i patsientidest.

CML-i diagnoosimissagedus on tavaliselt 1–2 juhtu 100 000 elaniku aastas, CML moodustab umbes 20% täiskasvanute leukeemiatest. Seda iseloomustab kliiniliselt liigne, normaalselt diferentseerunud ja normaalse funktsiooniga müeloidsete rakkude hulk. CML-i patsientidele pannakse 90–95%-l juhtudest diagnoos haiguse kroonilises või stabiilses faasis. Varem tekkis patsientidel keskmiselt 4 kuni 6 aasta möödudes aktseleereeritud faas, mis viis blastse kriisi ja ägeda leukeemiani, mis on alati surmav. Imanitiibi ja teiste hiljuti välja töötatud teise põlvkonna türosiini kinaasi inhibiitorite kasutuselevõtt muutis haiguse kulgu väga mõjusalt: enamik patsientidest jääb nüüd remissiooni ja nende jälgimine toimub pikaajaliselt.

Haiguse jälgimine

Tänaseks on CML-i ravi eesmärgiks 100%-lise elulemuse ja Ph-negatiivsuse saavutamine. Haiguse jälgimine on seega ülioluline vahend ravivastuse hindamises ning varase relapsi tuvastamine iga patsiendi puhul eraldi. TKI ravi saavate patsientide puhul toimub tavaliselt hematoloogilisest remissioonist tsütogeneetilisse, seejärel molekulaarsesse remissiooni liikumine, mis tähenda

leukeemiliste rakkude ja BCR-ABL-i transkriptide arvu vähenemine, nagu näidatud joonisel 1 allpool.



Joonis 1. Kohandatud viite 1 põhjal.

Standardmeetod kasvajakoomuse hindamiseks CML-i patsientidel on konventsionaalne tsütogeneetiline analüüs (G-vöödid) luuüdi (BM) metafaasides). Tsütogeneetilist vastust hinnatakse vähemalt 20 luuüdimetafaasi põhjal. Tsütogeneetilise vastuse taset hinnatakse Ph-kromosoom-positiivsete metafaaside protsentuaalsel hulgal (vt tabel 1, viide 2). Siiski sõltub see hinnang labori jõudlusest ning sellel on madal tundlikkus, 20 metafaasi analüüsimisel 5%.

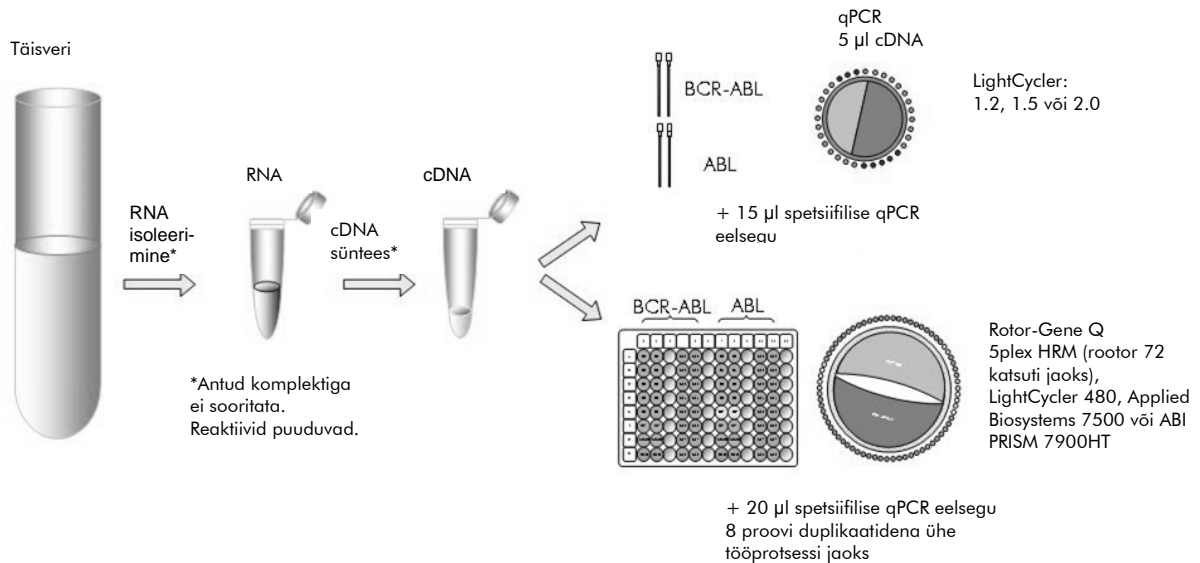
Reaalajaline kvantitatiivne polümeraasahela reaktsioon (qPCR), mille abil kvantifitseeritakse BCR-ABL M_{bcr} mRNA perifeerse vere (PB) proovides on osa haiguse jälgimise meetodist CML-i ravist. See on vähem invasiivne kui konventsionaalne luuüdi metafaasi tsütogeneetika, ja tundlikum.

CML-haiguse jälgimise soovitusel on samuti hiljuti läbi vaadatud, et kasutada kliiniliste uuringute abil saadud uusi kliinilisi saavutusi ning uuenenud eesmärke ja vahendeid haiguse jälgimises. Uusimad soovitusel ravivastuse definitsiooni

ja imatiniibi saavate patsientide jälgimise kohta pärinevad ELN-i ekspertidelt (2).

Tehnilisest vaatepunktist on rahvusvahelised eksperdid teinud jõupingutusi BCR-ABL Mbcr testimise ja tulemuste väljastamise ühtlustamiseks (3–5). Lisaks on WHO järelevalve hiljuti valideerinud referentspaneeli, mis võimaldab BCR-ABL-i kvantifitseerimise lihtsat standardiseerimist (6).

Protseduuri põhimõte



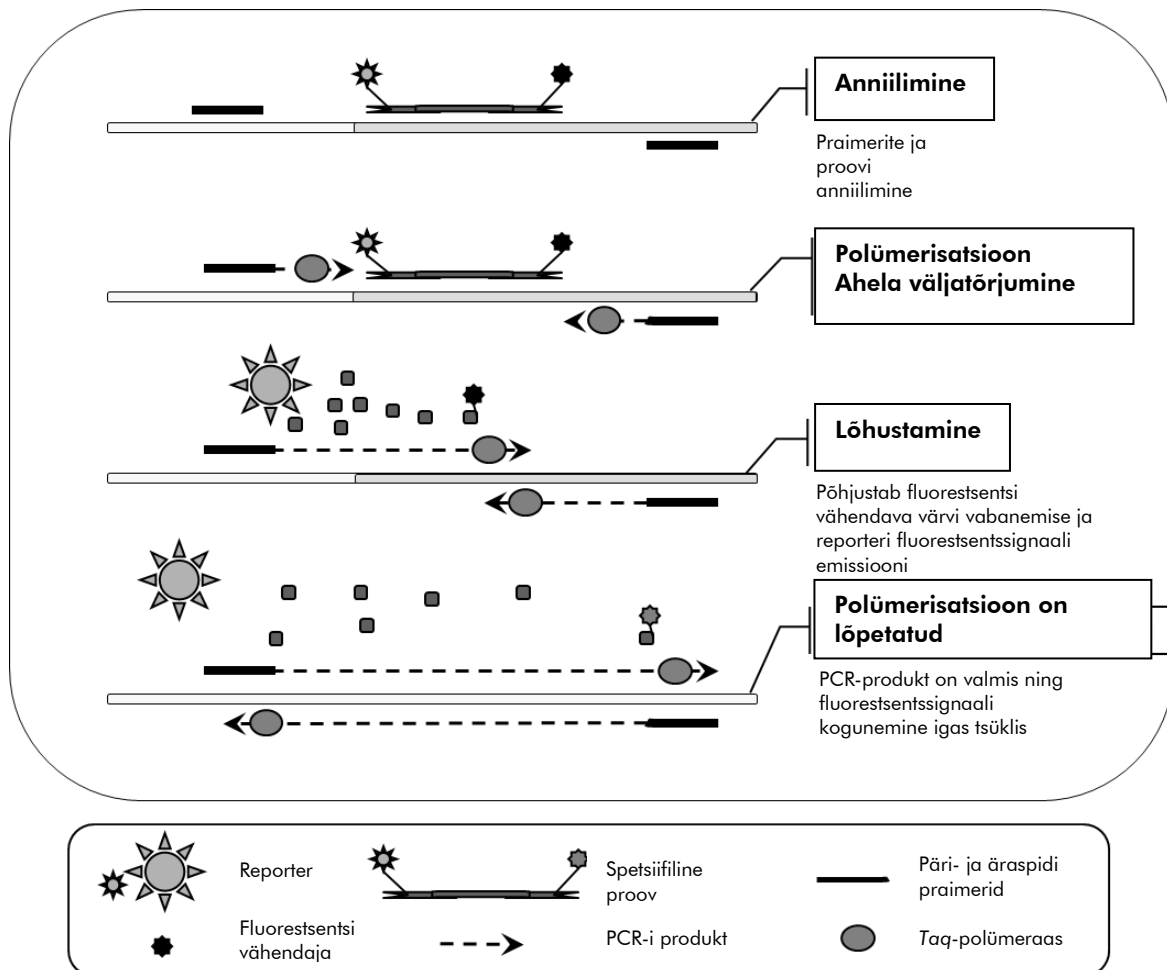
Joonis 2. RNA isoleerimine, cDNA süntees ja qPCR.

qPCR-meetod võimaldab PCR-produktide täpset kvantifitseerimist PCR-i amplifikatsiooniprotsessi eksponentsiaalse faasi ajal. Kvantitatiivsed PCR-andmeid saab hankida kiiresti ilma PCR-järgse tötluseta, kasutades fluorestsentsete signaalide reaajalist tuvastamist PCR-tsükli ajal ja/või selle järel, mistõttu PCR-toote saastumise risk drastiliselt väheneb. Hetkel on saadaval 3 peamist tüüpi qPCR-meetodit: qPCR-analüüs komplekti SYBR® värvi Green I (roheline I) abil, qPCR-analüüs hüdrolüüsiproovide abil ja qPCR-analüüs hübriidiseerimisproovide abil.

See analüüs kasutab qPCR-i topeltvärvinguga oligonukleotiidi hüdrolüüsi põhimõtet. PCR-i ajal hübriidiseerivad pari- ja äraspidi praimerid spetsiifilise järjestuse. Topeltvärvinguga oligonukleotiid on samas segus. Proov, mis koosneb 5' reportervärviga märgistatud ja pärioolulise, 3' fluorestseerumist vähendava värviga märgistatud oligonukleotiidist, hübriidiseerib sihtjärjestust PCR-i toote piires. Hüdrolüüsiproovi qPCR-analüüsis kasutatakse *Thermus aquaticus*'e (*Taq*) DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsust. Kui proov on intaktne, annab reportervärvi lähedus fluorestseerumist neelavale värvile tulemuseks reportervärvi fluorestseerumise peamiselt Förster-tüüpi energiaülekanne abil.

Kui huvipakkuv sihtmärk on olemas, anniilib proov PCR-i ajal spetsiifiliselt äras- ja päripidised praimerid. DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsus lõhestab proovi reporteri ja fluorestsentsi vähendaja vahel vaid juhul, kui proov hübridiseerib sihtmärgi. Proovi fragmendid tõrjutakse seejärel sihtmärgist välja ning algab ahela polümerisatsioon. Proovi 3' ots blokeeritakse, et takistada proovi pikenedamist PCR-i ajal (joonis 3). See protsess toimub igas tsüklis ning ei sega toote eksponentsiaalset akumulatsiooni.

Fluorestsentsignaali tugevnemist tuvastatakse vaid juhul, kui sihtjärjestus on prooviga komplementaarne ning seega PCR-i ajal amplifitseeritud. Nende tingimuste tõttu ei tuvastata mittespetsiifilist amplifikatsiooni. Seega on fluorestsentsi tugevnemine otseselt proportsionaalne sihtmärgi amplifikatsiooniga PCR-i ajal.



Joonis 3. Reaktsiooni põhimõte. Toimub kogu RNA pöördtranskriptsioon ning saadud cDNA amplifitseeritakse PCR-i abil, kasutades spetsiifiliste praimerite paari ning spetsiifilist sisemist topeltvärvingu proovi (FAM™–TAMRA™). Proov seondub amplikoniga PCR-i iga anniilimisetapi ajal. Kui Taq laieneb amplikoniga seotud praimerist, tõrjub see välja proovi 5' otsa, mis seejärel lagundatakse Taq DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsuse abil. Lõhustamine jätkub, kuni allesjäänud proov amplikoni „ära sulatab“. Selle protsessi käigus vabaneb lahusesse fluorofoor ja fluorestsentsi vähendaja, need eraldatakse ruumiliselt ning see põhjustab FAM-i fluorestsentsi suurenemise ning TAMRA fluorestsentsi vähenemise.

Komplektis olevad materjalid

Komplekti sisu

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit		(24)
Kataloogi nr		670723
Reaktsioonide arv		24
High Positive RNA Control (Tugevalt positiivne RNA kontroll-lahus)		3 × 10 µl
IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibraator)		3 × 10 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ja ABL ühe plasmiidiga standardlahus) (10 ¹ koopiat / 5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ja ABL ühe plasmiidiga standardlahus) (10 ² koopiat / 5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ja ABL ühe plasmiidiga standardlahus) (10 ³ koopiat / 5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ja ABL ühe plasmiidiga standardlahus) (10 ⁴ koopiat / 5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ja ABL ühe plasmiidiga standardlahus) (10 ⁵ koopiat / 5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ja ABL ühe plasmiidiga standardlahus) (10 ⁶ koopiat / 5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL (Praimerite ja proovi segu ABL)*	PPC-ABL 25×	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbcr Fusion Gene [†] (Praimerite ja proovi segu BCR-ABL mbcr fusioonigeen)	PPF-Mbcr 25×	110 µl
ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit Handbook (inglise keeles)		1

* Segu spetsiifilistest päri- ja äraspidistest ABL-i kontrollgeeni (CG) praimeritest, lisaks spetsiifiline FAM-TAMRA proov.

† Segu spetsiifilistest päri- ja äraspidistest BCR-ABL Mbcr fusioonigeeni praimeritest, lisaks spetsiifiline FAM-TAMRA proov.

Märkus. Enne kasutamist segage standardlahuseid (SP1–SP6), praimerite ja proovi segusid õrnalt ja tsentrifuugige veidi.

Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisateavet saate vastavatelt ohutuslehtedelt, mis on saadaval toote tarnija juures.

Reaktiivid

- RNA puhastamise reaktiivid: valideeritud reaktiivid on RNeasy® Midi Kit (QIAGEN, katalooginr 75144) või TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, katalooginr 15596018 või 15596026)
- Nukleaasivaba PCR Grade Water
- Puhver ja *Taq*-i DNA polümeraas: valideeritud reaktiivid on *Premix Ex Taq™* DNA Polymerase (Perfect Real Time) (TaKaRa, katalooginr RR039A) ja *Premix Ex Taq* DNA Polymerase (Probe qPCR) (TaKaRa, kataloogi nr RR390A). Mõlemad sisaldavad 2x *Taq* DNA polümeraasi põhiseгу ja ROX™ referentsvärve
- Pöördtranskriptsiooni reaktiivid: valideeritud reaktiivid on komplektis *ipsogen* RT Kit, mis sisaldab pöördtranskriptaasi, 5x RT puhvrit, 100 mM DTT, RNAasi inhibiitorit, juhuslikku praimerit ja dNTP-sid (QIAGEN, katalooginr 679923); või SuperScript® III Reverse Transcriptase, mis sisaldab pöördtranskriptaasi, 5x esimese ahela puhvrit ja 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., katalooginr 18080044)
- SuperScript III kasutamisel on vajalikud järgmised lisareaktiivid.
 - RNAasi inhibiitor: valideeritud reaktiiv on RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., katalooginr 10777019)
 - Komplekt dNTP-sid, PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga
 - Juhuslik nonameer

Tarvikud

- Nukleaasivabad aerosoolide suhtes resistentsed steriilsed PCR-pipetiotsikud hüdrofoobsete filtritega
- 0,5 ml või 0,2 ml RNAasi- ja DNAasivabad PCR-katsutid
- Jää

Vahend

- Mikroliitri-pipetid* mõeldud spetsiaalselt PCR-i jaoks (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1.000 µl)
- Lauatsentrifuug,* millel on rootor 0,2 ml / 0,5 ml reaktsioonikatsutite jaoks (suudab saavutada 10.000 pööret minutis)
- Reaalajalise PCR-i määramise seade:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või muu Rotor-Gene seade; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 või 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS; ja nendega seotud spetsiifilised materjalid.
- Termotsükler* või vesivann* (pöördtranskriptsiooni etapp)

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisateavet saate vastavate andmelehtedelt. Need on saadaval internetis ja kompaktses PDF-vormingus kodulehel www.qiagen.com/safety, kus saate vaadata ja printida ohutuslehti QIAGENi iga komplekti ja komplekti osa kohta.

Hävitage proovide ja analüüside jäätmed vastavalt kohalikele ohutuseeskirjadele.

Üldised ettevaatusabinõud

qPCR-testide kasutamisel on vaja järgida häid laboritavasid, sh molekulaarbioloogia seadmete hooldus, mis vastab kehtivatele eeskirjadele ja asjakohastele standarditele.

Komplekt on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Komplektis olevad reaktiivid ja juhtnõõrid on optimaalse töökindluse osas valideeritud. Reaktiivide edasine lahjendamine või inkubatsiooniaegade ja temperatuuride muutmine võib anda ekslikud või sobimatud tulemused. PPC- ja PPF-reaktiivid võivad valgusega kokku puutudes muunduda. Kõik reaktiivid on kokku pandud spetsiaalselt selle testiga kasutamiseks.

Testi optimaalse töökindluse tagamiseks ei tohi neid muude reaktiividega asendada.

Transkriptsiooni tasemete määramisel qPCR-i abil on vaja nii mRNA pöördtranskriptsiooni kui saadud cDNA amplifikatsiooni PCR-i abil. Seetõttu tuleb kogu analüüsiprotseduur sooritada RNAasi- ja DNAasivabades tingimustes.

*Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja kalibreeritud tootja soovitude kohaselt.

Olge äärmiselt ettevaatlik, et ei juhtuks järgmist:

- saastumine RNAasi/DNAasiga, mis võib põhjustada matriits-mRNA ja saadud cDNA lagunemist
- mRNA või PCR-i ülekandesaste, mis annab valepositiivse signaali

Seetõttu soovitame järgmist.

- Kasutage nukleasivabasid laborivahendeid (nt pipetid, pipetiotsikud, reaktsioonivialid) ja kandke analüüsi sooritamisel kindaid.
- Proovide ja reaktiivide ristsaaste vältimiseks kasutage kõikide pipeteerimisprotseduuride ajal värskeid aerosoolide suhtes resistentseid pipetiotsikuid.
- Valmistage ette PCR-i eelne põhisegu spetsiaalsete vahenditega (pipetid, pipetiotsikud jne) spetsiaalses piirkonnas, kus DNA maatriksite (cDNA, DNA, plasmiidid) sattumine lahusesse pole võimalik. Lisage matriits eraldi tsooni (eelistatavalt eraldi ruumis), kasutades spetsiaalseid vahendeid (pipetid, pipetiotsikud jne).
- Käsitsege standardlahuseid (SP1–SP6) eraldi ruumis.

Reaktiivide säilitamine ja käitlemine

Komplektid saadetakse kuival jääl ning neid tuleb pärast kättesaamist säilitada temperatuuril –30...–15 °C.

- Minimeerige praimerite ja proovi segude kokkupuudet valgusega (PPC- ja PPF-katsutid).
- Enne avamist segage ja tsentrifugeerige katsuteid veidi.
- Säilitage kõiki komplekti komponente originaalpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui ka avamata pakendiga komponentide kohta. Muudel tingimustel säilitatud komponendid ei pruugi õigesti toimida ning need võivad analüüsitulemusi rikkuda.

Kõikide reaktiivide kõlblikkusajad on näidatud üksikute komponentide etikettidel. Õigete säilitustingimuste korral säilitab toode töökindluse kuni etiketil trükitud kõlblikkusaja lõpuni.

Toote ebastabiilsust ei näita ükski selgelt eristatav märk. Siiski tuleb positiivseid ja negatiivseid kontrollproove analüüsida samaaegselt tundmatu kontsentratsiooniga proovidega.

Proovide käsitsemine ja säilitamine

Enne RNA ekstrahatsiooni tuleb täisvere proovid kaalium-EDTA abil antikoaguleerida ja säilitada neid temperatuuril 2–8 °C mitte üle 5 päeva.

Läbiviimine

Proovi RNA ettevalmistamine

Patsiendi proovides (veres või luuüdis) olev RNA tuleb ette valmistada valideeritud protseduuri järgides. Analüüsi kvaliteet sõltub suuresti sisend-RNA kvaliteedist. Seetõttu soovitame tõsta puhastatud RNA kvaliteeti enne analüüsimist elektroforeesi abil agar-agar* geelil või kasutada vahendit Agilent® Bioanalyzer®.†

Protokoll: Pöördtranskriptsioon toote SuperScript III Reverse Transcriptase abil

See protokoll on mõeldud pöördtranskriptsiooni jaoks lahuse SuperScript III Reverse Transcriptase abil. Kui kasutate komplekti *ipsogen* RT Kit, järgige trükises *ipsogen RT Kit Handbook* (*ipsogen* RT komplekti käsiraamat) toodud protokoll.

Enne alustamist tehke järgmist.

- Valmistage ette dNTP-d, igaüks 10 mM. Säilitage võrdsete osadena temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Segage hästi (ärge keerutage) ja tsentrifuugige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja. Seejärel hoidke seda jääl.
3. Lisage RNA-proovidele lahust kuni mahuni $0,1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pipeteerige $10\text{ }\mu\text{l}$ ($1\text{ }\mu\text{g}$) iga RNA-proovi eraldi, märgistatud katsutitesse. Pipeteerige $10\text{ }\mu\text{l}$ tugevalt positiivset RNA kontroll-lahust, $10\text{ }\mu\text{l}$ lahust IS-MMR Calibrator ja $10\text{ }\mu\text{l}$ nukleaasivaba vett (RT-negatiivse kontroll-lahusena) eraldi, märgistatud katsutitesse ja töödelge neid paralleelselt RNA-proovidega vastavalt kirjeldusele allpool.
4. Inkubeerige iga proovi, kontroll-lahust ja kalibraatorit (igaühte $10\text{ }\mu\text{l}$) 5 minutit $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures ja jahutage kohe jääl 5 minutit.

* Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille.

† Optilist tihedust mõõdetakse lainepikkusel 260 ja 280 nm: OT 1,0 on 260 nm juures ekvivalentne umbes $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ühe ahelaga RNA-ga. A_{260}/A_{280} suhe vahemikus 1,8 ja 2,1 näitab kõrgpuhastatud RNA olemasolu.

5. Tsentrifuugige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pöoret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja. Seejärel hoidke seda jääl.
6. Valmistage järgmine RT-segu vastavalt analüüsitavate proovide, kontroll-lahuste ja kalibraatorite arvule (tabel 1).

Tabel 1. RT-segu valmistamine

Komponent	Maht proovi kohta (μl)	Lõppkontsentratsioon
First-Strand Buffer (komplektis Superscript III Reverse Transcriptase (pöördtranskriptaas)), 5 \times	5,0	1 \times
dNTP-d (igaüks 10 mM, peavad olema varem ette valmistatud ning säilitatud võrdsete osadena temperatuuril -20 °C)	2,0	0,8 mM
Suvaline nonameer (100 μ M)	5,25	21 μ M
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT (komplektis SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Soojendatud RNA-proov, kontroll-lahus või kalibraator IS-MMR Calibrator (lisatakse etapis 7)	10,0	40 ng/ μ l
Lõppmaht	25,0	–

7. Pipeteerige igasse PCR-i katsutisse 15 μ l RT-segu. Seejärel lisage 10 μ l (1 μ g) uuritavat RNA-d, kontroll-lahust või kalibraatorit (etapist 4).
8. Segage hoolikalt (ärge keerutage) ja tsentrifuugige veidi (u 10 s, 10.000 pöoret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja.
9. Programmeerige termotsükler pöördtranskriptsiooniprogrammiga, nagu näidatud tabelis 2.

Tabel 2. Temperatuuriprofiil

Pöördtranskriptsioon 1	Temperatuur: 25 °C Kestus: 10 min
Pöördtranskriptsioon 2	Temperatuur: 50 °C Kestus: 60 min
Inaktiveerimine	Temperatuur: 85 °C Kestus: 5 min
Jahutamine	Temperatuur: 4 °C Kestus: 5 min

10. Asetage katsutid termotsüklerisse ja käivitage termotsükliprogramm, nagu näidatud tabelis 2.

11. Pärast programmi lõppemist tsentrifuugige katsuteid veidi (u 10 s, 10.000 pööret minutis, et koguda vedelik katsuti põhja). Hoidke katsuteid jääl või temperatuuril –20 °C, kuni sooritatakse qPCR vastavalt järgmistele protokollile ja qPCR-i eeskirjadele.

Märkus. Seadmete LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0 puhul tähendab iga RT ettevalmistamine cDNA-d kahe qPCR protsessi jaoks.

Protokoll: qPCR seadmel Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM (72 katsutit)

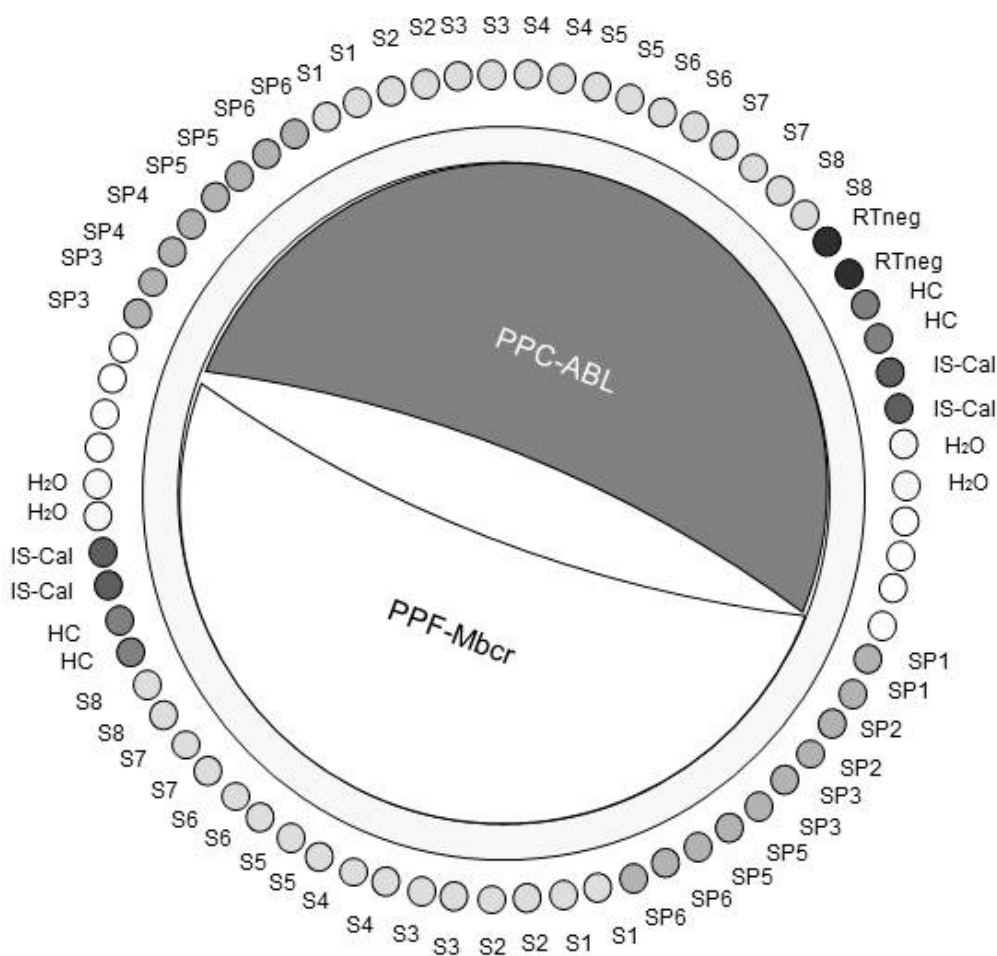
Selle seadme kasutamisel soovitame kõiki mõõtmisi teha kahekordselt, nagu näidatud tabelis 3. Komplekt on mõeldud 8 erineva cDNA proovi kolmekordseks testimiseks sama katse käigus.

Tabel 3. Reaktsioonide arv, kui kasutatakse 72 katsuti jaoks mõeldud rootoriga seadet Rotor-Gene Q

Proovid	Reaktsioonid
ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL) (32 reaktsiooni)	
8 cDNA proovi	8 × 2 reaktsiooni
1 cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus	2 reaktsiooni
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaktsiooni
Ühe plasmiidiga standardlahused	2 × 4 reaktsiooni (SP3, SP4, SP5 ja SP6, igaüht testiti kaks korda)
RT-negatiivne kontroll-lahus	2 reaktsiooni
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni
BCR-ABL Mbc praimerite ja proovi seguga (PPF-Mbc) (32 reaktsiooni)	
8 cDNA proovi	8 × 2 reaktsiooni
1 cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus	2 reaktsiooni
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaktsiooni
Ühe plasmiidiga standardlahused	2 × 5 reaktsiooni (SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6, igaüht testiti kaks korda)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni

Proovi töötlemine seadmel Rotor-Gene Q (rootor 72 katsuti jaoks)

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 8 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist. Rootori skeemil joonisel 4 on toodud näide sellisest katsest.



Joonis 4. Rootori soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL1 MbcR ja ABL standardlahused; **HC:** cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus; **IS-Cal:** IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibraator); **RTneg:** RT-negatiivne kontroll-lahus; **S:** cDNA proov; **H₂O:** vesi – kontroll.

Märkus. Olge tähelepanelik, et paneksite testitava proovi alati rootori asendisse 1. Vastasel korral ei soorita seade kalibreerimist korralikult ning fluorestseerumise kohta saadakse valeandmed.

Täitke kõik muud kohad tühjade katsutitega.

qPCR seadmel Rotor-Gene Q (rootor 72 katsuti jaoks)

Märkus. Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Segage standardlahused, PPF-MbcR ja PPC-ABL katsuteid ja tsentrifuugige veidi (u 10 s, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja.

3. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavaate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 4 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerite ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

Tabel 4. qPCR-segu valmistamine

Komponent	BCR-ABL			Lõpp-kontsentratsioon
	1 reaktsioon (µl)	ABL: 32+1 reaktsiooni (µl)	Mbcr: 32+1 reaktsiooni (µl)	
Premix Ex Taq, 2×	12,5	412,5	412,5	1×
Praimerite ja proovi segu, 25×	1	33	33	1×
Nukleaasi-vaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	214,5	214,5	–
Proov (lisatakse etapis 5)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25	igaüht 25	igaüht 25	–

4. Pipeteerige 20 µl qPCR-i eellahust katsuti kohta.

5. Labori muus piirkonnas ja kohas, kus on selleks spetsiaalsed seadmed, lisage 5 µl RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 200 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: Pöördtranskriptsioon toote SuperScript III Reverse Transcriptase abil“, lk 13) vastavas katsutis (kogumaht 25 µl).

6. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.

7. Sulgege kõik katsutid ja asetage need termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.
8. Programmeerige seade Rotor–Gene Q koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 5.

Tabel 5. Temperatuuriprofiil

Analüüsirežiim	Kvantifitseerimine
Hold 1	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 s
Cycling	50 korda 95 °C 5 sekundi jooksul 60 °C 30 s jooksul, saadakse FAM-i fluorestsents kanalil Green: Single
Hold 2	Temperatuur: 36 °C Kestus: 1 min

9. Dialoogiboksi „Auto-Gain Optimisation Setup” (Automaatse kogumise optimeerimise seadistamine) avamiseks klõpsake dialoogiboksis „New Run Wizard” (Uue tööseeria viisard) olevat nuppu „Gain Optimisation” (Optimeeri kogumist). Seadke roheline kanali vahemik järgmiselt: „Min Reading” (Min näit) alates „5 FI” ja „Max Reading” (Max näit) kuni „10 FI” ning vastuvõetavaks kasvuvahemikuks –10 kuni 10.
10. Märkige ruut „Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Optimeeri enne esimest hankimist) ja sulgege dialoogiboks „Auto-Gain Optimisation Setup” (Automaatse kogumise optimeerimise seadistamine).
11. Käivitage termotsükleri programm.
12. Valige analüüsi jaoks „Slope Correct” (Kõvera parandamine). Soovitame seada läveks 0,03.

Protokoll: qPCR seadmetel Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS ja LightCycler 480

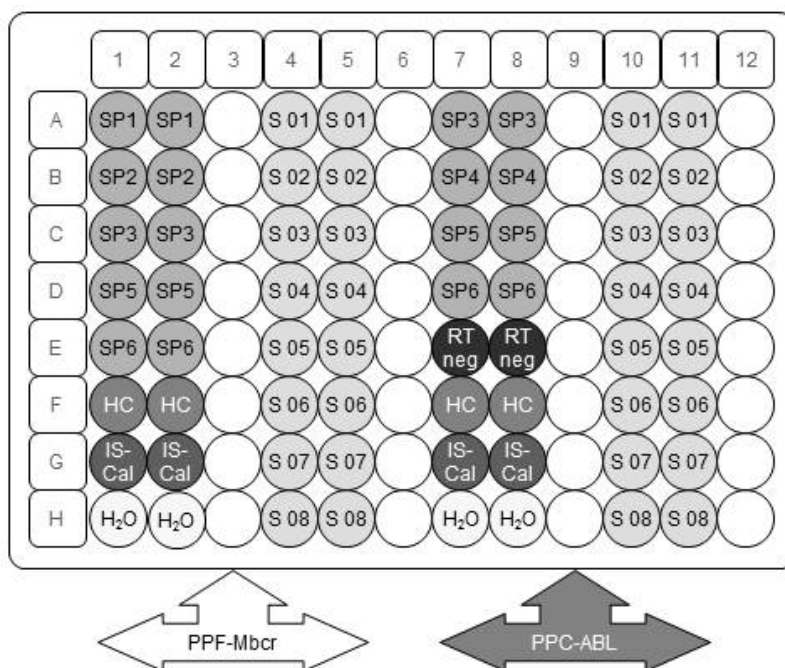
96 lohuga plaadiga qPCR-seadme kasutamisel soovitame kõiki mõõtmisi teha kahekordselt, nagu näidatud tabelis 6. Komplekt on mõeldud 8 erineva cDNA proovi kolmekordseks testimiseks sama katse käigus.

Tabel 6. Reaktsioonide arv 96 lohuga plaadiga qPCR-seadme kasutamisel

Proovid	Reaktsioonid
ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL) (32 reaktsiooni)	
8 cDNA proovi	8 × 2 reaktsiooni
1 cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus	2 reaktsiooni
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaktsiooni
Ühe plasmiidiga standardlahused	2 × 4 reaktsiooni (SP3, SP4, SP5 ja SP6, igaüht testiti kaks korda)
RT-negatiivne kontroll-lahus	2 reaktsiooni
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni
BCR-ABL Mbcr praimerite ja proovi seguga (PPF-Mbcr) (32 reaktsiooni)	
8 cDNA proovi	8 × 2 reaktsiooni
1 cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus	2 reaktsiooni
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaktsiooni
Ühe plasmiidiga standardlahused	2 × 5 reaktsiooni (SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6, igaüht testiti kaks korda)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni

Proovi töötlemine seadmetel Applied Biosystems, ABI PRISM ja LightCycler 480

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 8 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist. Plaadi skeemil joonisel 5 on toodud näide sellisest katsest.



Joonis 5. Plaadi soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti *ipsogen BCR-ABL1 Mbc* IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL Mbc ja ABL standardlahused; HC: cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus; IS-Cal: IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibraator); RTneg: RT-negatiivne kontroll-lahus; S: cDNA proov; H₂O: vesi – kontroll.

qPCR seadmetel Applied Biosystems, ABI PRISM ja LightCycler 480

Märkus. Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Segage standardlahused, ROX, PPF-Mbcr ja PPC-ABL katsuteid ja tsentrifuugige veidi (u 10 s, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja.
3. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitava proovide arvule. Kui kasutatakse 96 lohuga plaadiga qPCR-seadet, soovitame kõik mõõtmised teha kahekordselt.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonsaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 7 kirjeldab seadmete Applied Biosystems ja ABI PRISM kasutamisel ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 μ l. Tabel 8 kirjeldab ühe seadmel LightCycler 480 reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 μ l. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerite ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

Tabel 7. qPCR-segu ettevalmistamine seadmel Applied Biosystems ja ABI PRISM

Komponent	BCR-ABL Mbcr: 32+1			Lõpp- kontsentratsioon
	1 reaktsioon (μ l)	ABL: 32+1 reaktsiooni (μ l)	reaktsiooni (μ l)	
Premix Ex Taq, 2 \times	12,5	412,5	412,5	1 \times
Praimerite ja proovi segu, 25 \times	1	33	33	1 \times
ROX I värvaine, 50 \times (ABI PRISM 7900HT) või ROX II värvaine, 50 \times (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1 \times
Nukleasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6	198	198	–
Proov (lisatakse etapis 5)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25	igaüht 25	igaüht 25	–

Tabel 8. qPCR-segu ettevalmistamine seadmel LightCycler 480

Komponent	BCR-ABL Mbcr: 32+1			Lõpp- kontsentratsioon
	1 reaktsioon (μ l)	ABL: 32+1 reaktsiooni (μ l)	reaktsiooni (μ l)	
Premix Ex Taq, 2 \times	12,5	412,5	412,5	1 \times
Praimerite ja proovi segu, 25 \times	1	33	33	1 \times
Nukleasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	214,5	214,5	–
Proov (lisatakse etapis 5)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25	igaüht 25	igaüht 25	–

4. Pipeteerige 20 μ l qPCR-i eellahust lohu kohta.
5. Labori muus piirkonnas ja kohas, kus on selleks spetsiaalsed seadmed, lisage 5 μ l RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 200 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: Pöördtranskriptsioon toote SuperScript III Reverse Transcriptase abil“, lk 13) vastavas lohus (kogumaht 25 μ l).
6. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.
7. Sulgege plaat ja tsentrifugeeri veidi (300 \times g, umbes 10 s).
8. Asetage plaat termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt. Programmeerige termotsüklerile programm, mis on näidatud tabelis 9 seadmete Applied Biosystems ja ABI PRISM kohta või tabelis 10 seadme LightCycler 480 kohta.

Tabel 9. Temperatuuriprofiil seadmetel Applied Biosystems ja ABI PRISM

Analüüsirežiim	Standardkõver – absoluutne kvantifitseerimine
Hold 1	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 s
Cycling	50 korda 95 °C 5 s 60 °C 30 minutit, saavutatakse FAM-i fluorestsents: Single; fluorestsentsi vähendaja: TAMRA
Hold 2	Temperatuur: 36 °C Kestus: 1 min

Tabel 10. Temperatuuriprofiil seadmel LightCycler 480

Analüüsirežiim	Absoluutne kvantifitseerimine („Abs Quant“)
Aken Detection Formats (Tuvastamise vormingud)	Aknas Detection formats valige „Simple Probe“ (Lihtne proov)
Hold 1	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 s
Cycling	50 korda 95 °C 5 s 60 °C 30 s jooksul FAM-i fluorestsentsi saavutamiseks, mis vastab LC versioonile 01 (483–533 nm) ja LC versioonile 02 (465–510 nm).
Hold 2	Temperatuur: 36 °C Kestus: 1 min

- 9. Seadmete Applied Biosystems 7500 ja ABI PRISM 7900HT SDS puhul jätkake punktist 9a. Seadmel LightCycler 480 jätkake punktist 9b.**
- 9a. Applied Biosystems ja ABI PRISM: seadme analüüsietapis soovitame läve seadistada väärtusele 0,1. Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 9.**
- 9b. Seade LightCycler 480: soovitame analüüsirežiimi Fit point, mille taustväärtuseks oleks 2,0 ja läviväärtus 2,0. Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 10.**

Protokoll: qPCR seadmetel LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0

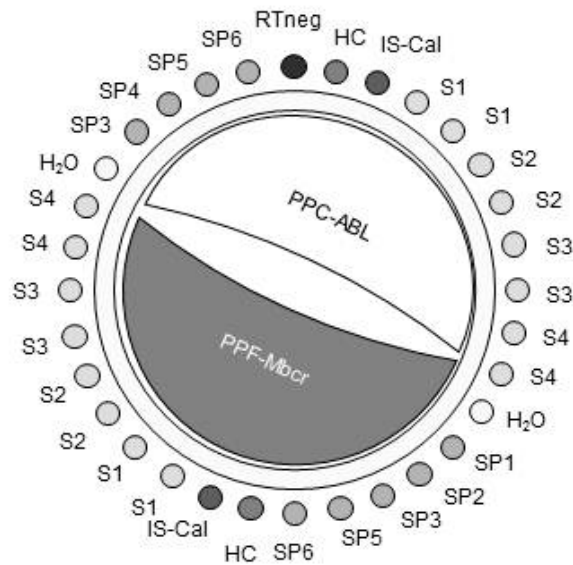
Kapillaarse seadme kasutamisel soovitame kõiki proovide analüüse teha kahekordselt ja kontroll-lahuste puhul ühekordselt, nagu näidatud tabelis 11. Komplekt on mõeldud 4 erineva cDNA proovi kuuekordseks testimiseks sama katse käigus.

Tabel 11. Reaktsioonide arv seadmetel LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0

Proovid	Reaktsioonid
ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL) (16 reaktsiooni)	
4 cDNA proovi	4 × 2 reaktsiooni
1 cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus	1 reaktsioon
1 cDNA IS-MMR Calibrator	1 reaktsioon
Ühe plasmiidiga standardlahused	1 × 4 reaktsiooni (SP3, SP4, SP5 ja SP6)
RT-negatiivne kontroll-lahus	1 reaktsioon
Vesi – kontroll	1 reaktsioon
BCR-ABL Mbc praimerite ja proovi seguga (PPF-Mbc) (16 reaktsiooni)	
4 cDNA proovi	4 × 2 reaktsiooni
1 cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus	1 reaktsioon
1 cDNA IS-MMR Calibrator	1 reaktsioon
Ühe plasmiidiga standardlahused	1 × 5 reaktsiooni (SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon

Proovi analüüsimine seadmetel LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 4 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist. Kapillaari skeemil joonisel 6 on toodud näide sellisest katsest.



Joonis 6. Rootori soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR*. SP1–SP6: BCR-ABL MbcR ja ABL standardlahused; HC: cDNA tugevalt positiivne kontroll-lahus; IS-Cal: IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibraator); RTneg: RT-negatiivne kontroll-lahus; S: cDNA proov; H₂O: vesi – kontroll.

qPCR seadmetel LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0

Märkus. Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Segage standardlahused, PPF-MbcR ja PPC-ABL katsuteid ja tsentrifuugige veidi (u 10 s, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja.
3. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavaate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 12 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 20 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerite ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-MbcR). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

Tabel 12. qPCR-segu valmistamine seadmete LightCycler 1.2, 1.5 ja 2.0 jaoks

Komponent	BCR-ABL Mbcr: 16+1			Lõpp- kontsentratsioon
	1 reaktsioon (μ l)	ABL: 16+1 reaktsiooni (μ l)	reaktsiooni (μ l)	
Premix Ex Taq, 2 \times	10	170	170	1 \times
Praimerite ja proovi segu, 25 \times	0,8	13,6	13,6	1 \times
Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	4,2	71,4	71,4	–
Proov (lisatakse etapis 5)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	20	igaüht 20	igaüht 20	–

4. Pipeteerige 15 μ l qPCR-i eellahust kapillaari kohta.
5. Labori muus piirkonnas ja kohas, kus on selleks spetsiaalsed seadmed, lisage 5 μ l RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 200 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: Pöördtranskriptsioon toote SuperScript III Reverse Transcriptase abil“, lk 13) vastavas kapillaaris (kogumaht 20 μ l).
6. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.
7. Asetage kapillaarid aparaadiga kaasas olevatesse adapteritesse ning tsentrifuugige veidi (700 \times g, u 10 s).
8. Asetage kapillaarid termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.
9. Programmeerige seade LightCycler 1.2, 1.5 või 2.0 koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 13.

Tabel 13. Temperatuuriprofiil

Analüüsirežiim	Kvantifitseerimine
Hold 1	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 s Ramp: 20
Cycling	50 korda 95 °C 5 s; ramp: 20 60 °C 30 s; ramp: 20; FAM-i fluorestsentsi saavutamiseks: Single
Hold 2	Temperatuur: 36 °C Kestus: 1 min Ramp: 20

10. Seadmel LightCycler 1.2 ja 1.5 jätkake etapist 10a. Seadmel LightCycler 2.0 jätkake etapist 10b.

10a. LightCycler 1.2 ja 1.5: soovitatav režiim on F1/F2 ja „2nd derivative analysis” (2. tuletatud analüüs). Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 13.

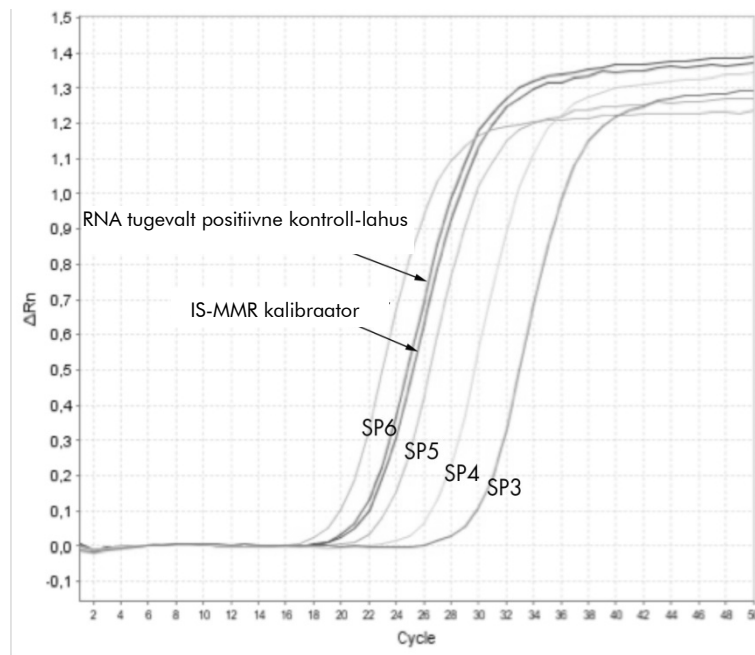
10b. Seade LightCycler 2.0: seadmel LightCycler 2.0 tarkvaraversiooniga 4.0 soovitate korratavate tulemuste saamiseks kasutada analüüsi Automated (F''max). Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 13.

Tulemuste tõlgendamine

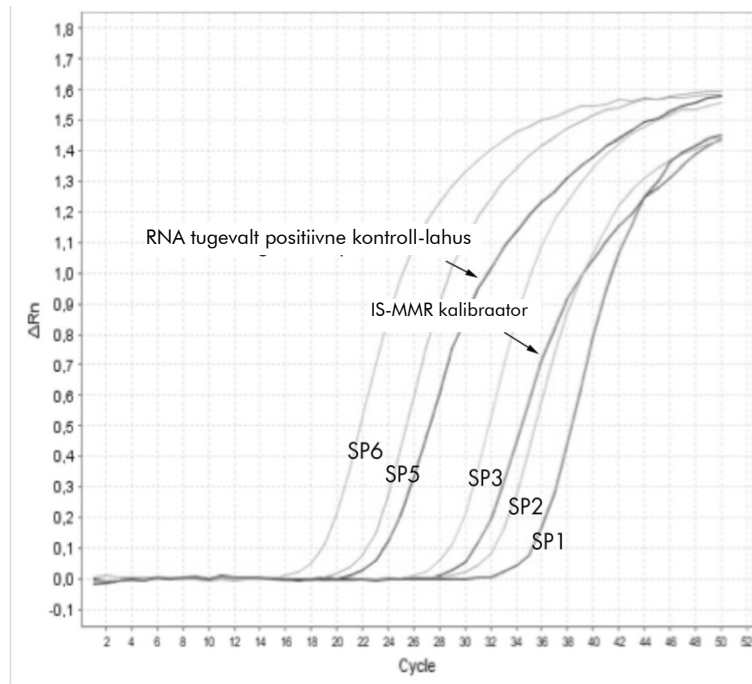
Andmeanalüüsi põhimõte

TaqMan®-i meetodi kasutamisel nimetatakse läve ületava signaali tuvastamiseks vajalike PCR-tsüklite arvu lävitsükliks C_T) ja see on otseselt proportsionaalne sihtmärgi hulga reaktsiooni alguses.

Teadaoleva arvu molekulidega standardlahuste kasutamisel saab luua standardkõvera ning määrata proovis oleva sihtmärgi väga täpse koguse. *ipsogen*'i standardkõverad on plasmiidipõhised. Täpsete standardkõverate saamiseks kasutame ABL-i jaoks 4 ning Mbcr-i jaoks 5 standardlahust. Komplekt sisaldab ka IS-MMR-kalibraatorit, mis võimaldab tulemused rahvusvahelisse skaalasse teisendada. Joonistel 7 ja 8 on toodud näited TaqMani amplifikatsioonikõveratest, mis on saadud standardlahuste, kalibraatori IS-MMR Calibrator ja tugevalt positiivse RNA-kontroll-lahuste puhul komplektiga *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR.



Joonis 7. ABL-i tuvastamine standardlahustega SP3, SP4, SP5 ja SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 ja 10^6 koopiat / $5 \mu\text{l}$.



Joonis 8. BCR-ABL Mbc tuvastamine standardlahustega SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6.
 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 koopiat / 5 μ l.

Standardkõverad ja kvaliteedikriteeriumid sisaldavad töötlemata andmeid

Replikaatidevaheline korratavus

Varieeruvus C_T -väärtustes replikaatide vahel peab olema < 2 , mis vastab koopiate arvu 4-kordsele muutusele.

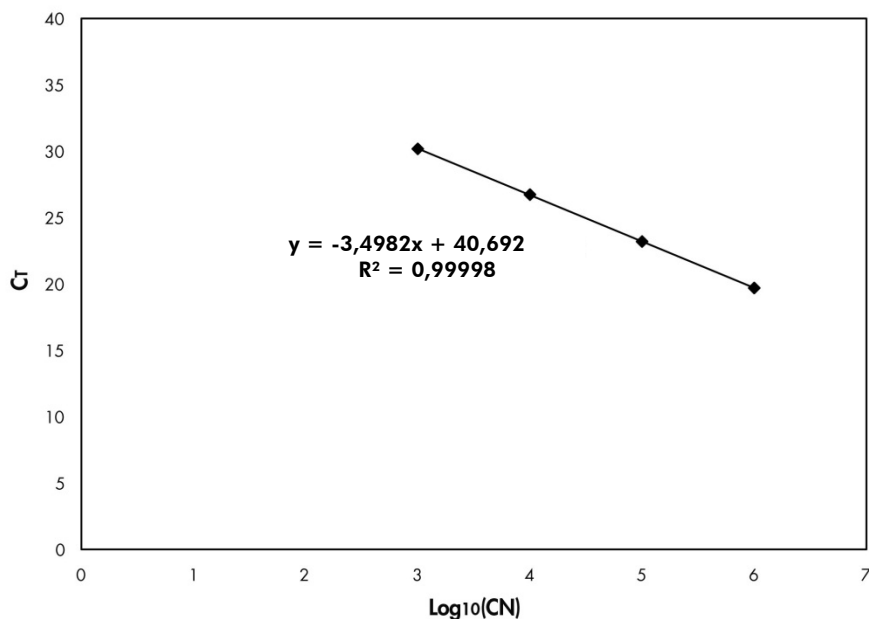
Varieeruvus replikaatide C_T -väärtustes on tavaliselt $< 1,5$, kui replikaatide keskmine C_T -väärtus on < 36 . (7)

Märkus. Iga kasutaja peab oma laboris korratavust mõõtma.

Standardkõverad

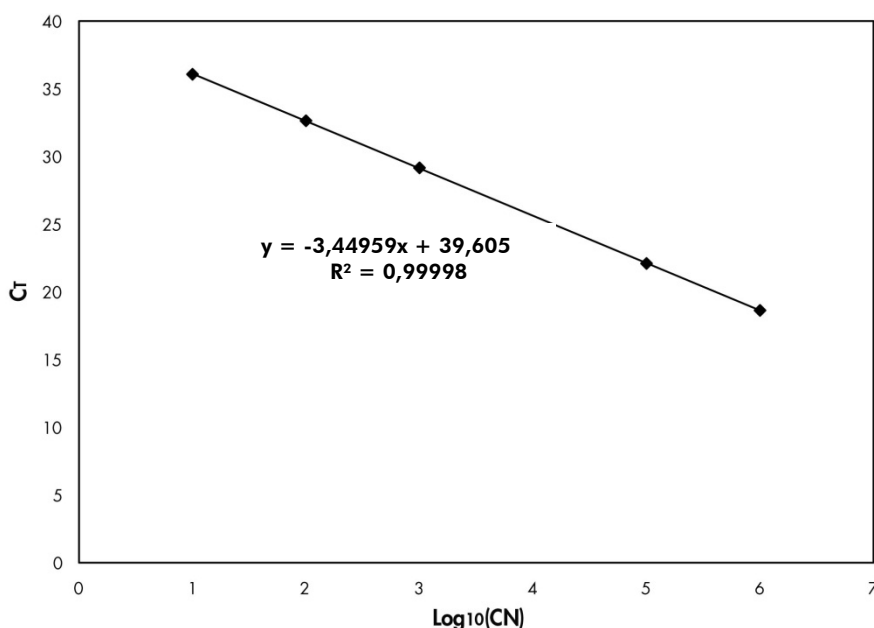
Töötlemata andmed saab analüüsimiseks kleepida Excel®-i faili.

Kummagi geeni (ABL ja BCR-ABL) kohta saadud C_T plasmiidi standardlahuste töötlemata andmeid analüüsitakse logis olevate koopiate arvuga (3, 4, 5 ja 6 koopiat SP3, SP4, SP5 ja SP6 puhul; 1, 2, 3, 5 ja 6 koopiat SP1, SP2, SP3, SP5, ja SP6 puhul). Joonisel 9 on toodud näide 4 standardlahuse põhjal arvutatud teoreetilisest ABL-i standardkõverast. Joonisel 10 on toodud näide 5 standardlahuse põhjal arvutatud teoreetilisest BCR-ABL-i standardkõverast.



Joonis 9. Teoreetiline kõver, mis on arvatatud ABL-i 4 standardlahuse põhjal.

Arvutatakse lineaarne regressioonikõver ($y = ax + b$), kus a on joone kõver ja b on y -lõikaja, mis on selle punkti y -koordinaat, kus joon ületab y -telge. Selle võrrand ja määramiskordaja (R^2) prinditakse graafikule.



Joonis 10. Teoreetiline kõver, mis on arvatatud BCR-ABL-i 5 standardlahuse põhjal.

Arvutatakse lineaarne regressioonikõver ($y = ax + b$), kus a on joone kõver ja b on y -lõikaja, mis on selle punkti y -koordinaat, kus joon ületab y -telge. Selle võrrand ja määramiskordaja (R^2) prinditakse graafikule.

Kuna standardlahused on kümnekordsed lahjendused, on kõvera teoreetiline kalle $-3,3$. Kalle, mis jääb vahemikku $-3,0$ ja $-3,9$ on aktsepteeritav, kuni $R^2 > 0,95$ (7). Siiski on täpsete tulemuste saamiseks soovitatav $R^2 > 0,98$. (3)

Märkus. SP1 standardlahus (BCR-ABL-i plasmid, 10 koopiat) peab olema tuvastatav ning see tuleb lisada BCR-ABL-i standardkõverale.

Kõikide ABL-i väärtuste kvaliteedikontroll

RNA halb kvaliteet või qPCR-i ajal tekkinud probleemid annavad tulemuseks väikese ABL-i koopiate arvu (ABL_{CN}). Optimaalne tundlikkus saavutatakse proovidega, mis annavad tulemuseks $ABL_{CN} \geq 10.000$ koopiat. See ABL_{CN} kriteerium kehtib ka tugevalt positiivse RNA kontroll-lahuse ja kalibraatori IS-MMR Calibrator kohta.

RT-negatiivne lahus ja vee kontroll-lahused

Matriitsi mittesisaldavad kontroll-lahused (NTC) PCR-i etapi (vee kontroll-lahus) ja pöördtranskriptsiooni etapi (RT-negatiivne kontroll-lahus) puhul peavad tulemuseks andma null CN nii ABL-i kui ka BCR-ABL Mbcr-i testimisel. Nende NTC-de positiivne tulemus tähendab pöördtranskriptsiooni ja/või qPCR-i ajal toimunud saastumist.

Normalized copy number (NCN, normaliseeritud koopiate arv)

Tundmatu proovi töötlemata C_T -väärtuste (saadud PPC-ABL-iga) teisendamiseks ABL-i koopiate arvuks (ABL_{CN}) tuleks kasutada ABL-i standardkõvera võrrandit.

Tundmatu proovi töötlemata C_T -väärtuste (saadud PPF-Mbcr-iga) teisendamiseks BCR-ABL-i koopiate arvuks ($BCR-ABL Mbcr_{CN}$) tuleks kasutada BCR-ABL-i standardkõvera võrrandit.

Nende CN-väärtuste suhe annab tulemuseks normaliseeritud koopiate arvu (NCN):

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

Arvutage tugevalt positiivse RNA kontroll-lahuse (NCN_{HC}), IS-MMR kalibraatori (NCN_{arv}) ja iga proovi (NCN_{proov}) NCN tulemus.

Tugevalt positiivse RNA kontroll-lahus ja kalibraator IS-MMR Calibrator

Need kontroll-lahused võimaldavad ABL-i ja BCR-ABL Mbcr-i pöördtranskriptsiooni ja amplifikatsiooni jälgimist transkripti kvantifitseerimise ajal.

NCN_{cal} tulemuste kvaliteedikontroll

Märkus. NCN-i tulemus, mis saadi kalibraatoriga IS-MMR-Calibrator ja mida testiti komplektiga *ipsogen* BCR-ABL Mbcr IS-MMR Kit koos valideeritud

reaktiivide ja seadmetega (vt „Komplektis olevad materjalid“ lk 9 ja „Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid“ lk 10), peab jääma vahemikku 0,05–0,3. Vastasel juhul ei saa NCN-i väärtusi rahvusvahelisse skaalasse teisendada. Lisaks tuleb kogu katse tulemused kõrvale heita, kui RNA tugevalt positiivne kontroll-lahus annab negatiivse tulemuse.

Teisendamine IS-i ja MMR tulemuste esitamiseks

Märkus. Enne tulemuste tõlgendamist vt väärtust, mis on kirjas IS-MMR-kalibraatori katsuti etiketil või komplektiga kaasas oleval analüüsisertifikaadil.

Kasutage IS-MMR-kalibraatori eksperimentaalset NCN-i tulemust (NCN_{cal}) ja selle määratud väärtust (IS-Cal väärtus), mis on näidatud analüüsisertifikaadil, ja arvutage rahvusvahelise skaala normaliseeritud koopiite arv ($IS-NCN_{proov}$).

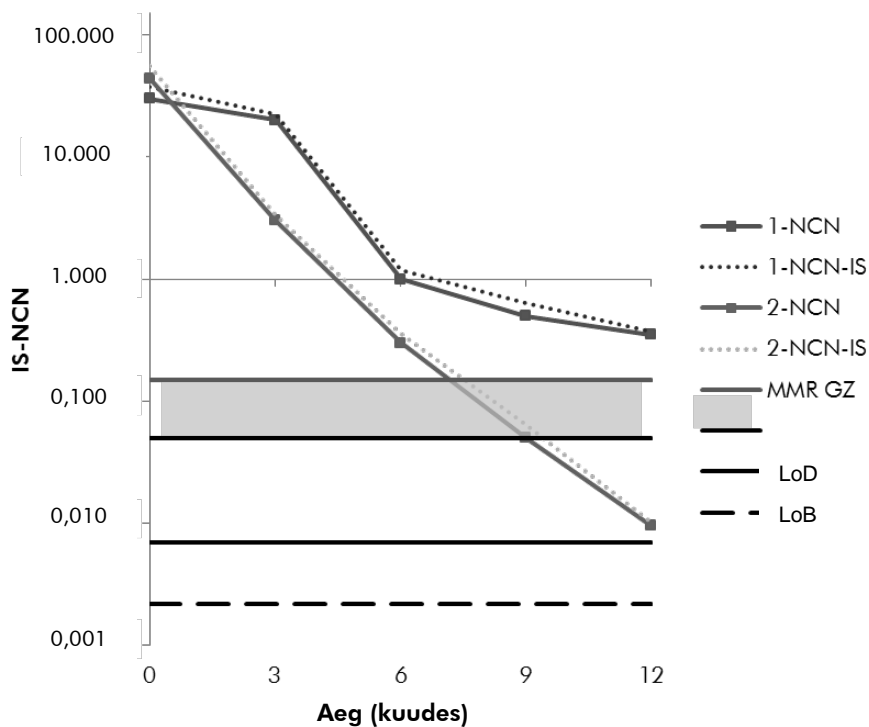
$$IS-NCN_{proov} = \frac{NCN_{proov} \times IS-Cal \text{ väärtus}}{NCN_{arv}}$$

Määrake iga proovi MMR-olek vastavalt allpool toodud kriteeriumidele.

- **$IS-NCN_{proov} \leq 0,05$** : oluline molekulaarne vastus
- **$0,05 < IS-NCN_{proov} < 0,15$** : Hall tsoon MMR-i äralõikeväärtuse lähedal, ebaselge tulemus
- **$IS-NCN_{proov} \geq 0,15$** : oluline molekulaarne vastus puudub

$IS-NCN_{HC}$ tulemus (tugevalt positiivse RNA kontroll-lahuse NCN rahvusvahelise skaala järgi) ei tohi anda olulist molekulaarset vastust.

Joonisel 11 on toodud näide patsiendi jälgimisest NCN-i ja $IS-NCN$ -i tulemuste abil.



Joonis 11. Patsiendi MMR-oleku jälgimiskõverad komplekti *ipsogen BCR-ABL1 Mbc* IS-MMR Kit puhul. NCN: normaliseeritud koopiate arv; NCN-IS: normaliseeritud koopiate arv rahvusvahelisel skaalal; MMR GZ: MMR hall tsoon (GZ) ebamäärane tulemus; LoD: tuvastuspiir; LoB: algkontsentratsioon.

Kokkuvõtte kvaliteedikriteeriumidest

Tabel 14 võtab kokku mitmesugused kvaliteedikriteeriumid ja nendega seotud väärtused või tulemused.

Tabel 14. Kokkuvõte kvaliteedikriteeriumidest

Kriteerium	Aktsepteeritavad väärtused/tulemused
C _T -väärtused replikaatide vahel	≤ 2 C _T , kui keskmine C _T > 36 ≤ 1,5 C _T , kui keskmine C _T ≤ 36
Standardkõverate kalle	Vahemikus –3,0 ja –3,9
Standardkõverate R ²	Vähemalt > 0,95, parem kui > 0,98
SP1 standardlahus (BCR-ABL 10 koopiaga plasmiid)	Peab olema tuvastatav ning see tuleb lisada standardkõverale
ABL _{CN} -väärtuse kvaliteedikontroll patsiendiproovide, tugevalt positiivse RNA kontroll-lahuse ja kalibraatori IS-MMR-Calibrator puhul	ABL _{CN} > 10.000 ABL-i koopiat, et optimaalne tundlikkus oleks tagatud
PCR (vesi) ja pöördtranskriptsiooni (RT-negatiivne) kontroll-lahused	Iga ABL _{CN} = 0 ja Mbcr _{CN} = 0
Kalibraatori IS-MMR Calibrator (NCN _{cal}) puhul saadud NCN	Peab olema vahemikus 0,05–0,3
High Positive RNA Control (Tugevalt positiivne RNA kontroll-lahus)	Peab olema tuvastatav
Tugevalt positiivse RNA kontroll-lahuse NCN teisendatakse rahvusvahelisse skaalasse (IS-NCN _{HC})	Olek: oluline molekulaarne vastus puudub

Tõrkeotsing

Lisateavet saate ka meie tehnilise toe leheküljelt *Frequently Asked Questions* (Korduma kippuvad küsimused): www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

QIAGENi tehnilise toe teadlased vastad rõõmuga kõikidele küsimustele, mis teil tekivad käesolevas käsiraamatus oleva teabe ja protokolliga kohta või proovi ja analüüsimeetodite kohta (kontaktandmeid vt „Kontaktandmed“, lk 42).

Kvaliteedikontroll

Vastavalt QIAGEN-i ISO sertifikaadiga kvaliteedihalduse süsteemile on iga komplekti *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit partiid testitud eelnevalt määratud nõuete kohaselt, et tagada toote ühtlane kvaliteet.

Analüüsisertifikaadid on tellimisel saadaval aadressil

www.qiagen.com/support/.

Piirangud

Enne seadme kasutamist peab kasutaja olema koolitatud ning meetodit tundma.

Kõiki saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete näitajatega. Kasutaja vastutusele jääb süsteemi töökindluse valideerimine vastavas laboris kasutatud protseduuride korral, kui need pole kaetud ettevõtte QIAGEN töökindluse uuringutega.

Tähelepanu tuleb pöörata kõikide komponentide karpidele ja etikettidele trükitud kõlblikkusaegadele. Aegunud komponente ärge kasutage.

Märkus. Komplekt on loodud vastavalt uuringutele, mis on läbi viinud organisatsioon „Europe Against Cancer“ (EAC, Euroopa Vähi Vastu) (8, 9), ja see vastab uusimatele rahvusvahelistele soovitudele. Komplekt sisaldab kalibraatorit IS-MMR Calibrator, mis on standardiseeritud rahvusvahelise skaala abil ja mille puhul on NCN-i tulemusi võimalik teisendada rahvusvahelisse skaalasse ja seega anda vastus MMR-i (oluline molekulaarne vastus) oleku kohta.

Igal kalibraatori IS-MMR Calibrator partiil on määratud väärtus, mis on tuletatud otseselt kalibratsioonist NIBSC WHO sertifikaadiga primaarse referentsmaterjaliga (International Genetic Reference Panel (rahvusvaheline geneetiline referentspaneel) BCR-ABL translokatsiooni RQ-PCR (1st I.S.), vt 09/138 kvantifitseerimiseks).

Iga komplektiga on kaasas analüüsisertifikaat, mis näitab kalibraatori IS-MMR Calibrator määratud väärtust.

Komplekti tuleb kasutada käesoleva käsiraamatu juhtnööride järgi koos valideeritud reaktiivide ja instrumentidega (vt „Vajalikud, kuid komplektis mittedisalduvad materjalid“ lk 10). Igasugune toote mittesihipärane kasutamine ja/või selle komponentide muutmine muudab ettevõtte QIAGEN vastutuse kehtetuks.

Toimekarakteristikud

Märkus. Toimekarakteristikud leiti seadmega Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, kasutades komplekti *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit ja valideeritud lisareaktiive (vt „Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid“ lk 10).

Tulemuse puudumise piir ja tuvastuspiir

Tulemuse puudumise piir (LoB) ja tuvastuspiir (LoD) leiti suunise CLSI/NCCLS EP17-A põhjal.

Taustkontsentratsioon (LoB) määrati tervetelt doonoritelt saadud negatiivsete proovide põhjal (11 proovi, 69 mõõtmist) ja leiti, et see on 0,0022 BCR-ABL MbcR NCN.

Tuvastuspiir (LoD ehk analüüsi tundlikkus) määrati teadaolevalt madalalt positiivsete proovide ($n = 8$, 74 mõõtmist) analüüsimisega, tulemuseks saadi 0,0069 BCR-ABL MbcR NCN.

- **NCN \leq LoB:** BCR-ABL MbcR ei tuvastatud
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL MbcR tuvastati, kuid hulka ei määratud
- **NCN \geq LoD:** BCR-ABL MbcR hulk määrati

Lineaarsus

Lineaarsus leiti suunise CLSI/NCCLS EP6-A põhjal.

Uuring sooritati segudes, mis olid rakuliinidest ekstraheeritud RNA suhtes positiivsed ja negatiivsed. Ühtteist erinevat taset testiti kolmekordselt. Nendel proovidel saadud tulemused näitavad, et *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR analüüs on vahemikus 0,003 kuni 65 lineaarne BCR-ABL MbcR NCN-iga.

Sisendid

Uringuks valiti viis RNA-d, millel oli erinev NCN BCR-ABL MbcR-i kontsentratsioon. Sisendi mõju hindamiseks NCN-i tulemustele testiti erinevaid RNA ja cDNA koguseid. Tulemused näitasid, et RNA sisendvariatsioonil on NCN-i tulemustele piiratud mõju, samas kui cDNA sisend oli tundlikum tegur, kui materjali kasutati vähem või rohkem. Seega on testi jaoks soovitatav kasutada 1 μ g RNA-d ja 5 μ l cDNA-d.

Täpsus

Täpsus määrati suunise CLSI/NCCLS EP5-A2 põhjal.

Täpsuse uuring sooritati 13 erineva prooviga, mida testiti paarikaupa 42 korda ($n = 84$). Need proovid näitasid BCR-ABL MbcR ekspressiooni erinevat taset patsientide proovides, mis olid MMR-väärtusega umbes võrdsed või sellest

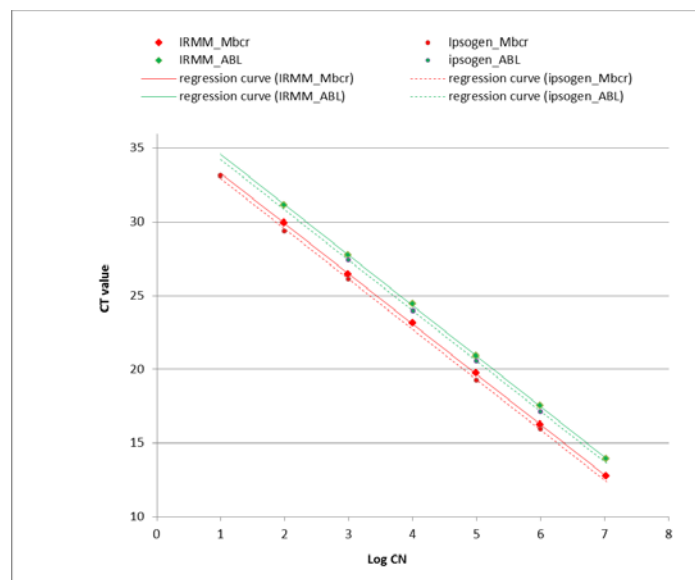
kõrgemad. MMR-i umbkaudse väärtuse globaalne variatsioonikoeffitsient oli 25%.

Vastavusuuring: ERM-AD623 BCR-ABL1 üksikplasmiid (IRMM) võrreldes komplekti *ipsogen* üksikplasmiidi (QIAGEN) standarditega

Kõige uuema praktilise määratluse BCR-ABL1 Mbcr molekulaarse vastuse kohta CML-is on andnud ELN/EUTOS-e molekulaarse jälgimise juhtrühm, soovitudes kasutada ERM-AD623 BCR-ABL1 plasmidi (IRMM, Belgia): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Selle soovituse järgimiseks viis QIAGEN läbi vastavusuuringu, et võrrelda komplekti *ipsogen* mitmesihilist üksikplasmiidi, mis on kasutusel komplektis *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (24) CE (kataloogi nr 670723), ERM-AD623 BCR-ABL1 plasmidiga (IRMM).

Võrdlus põhines BCR-ABL1 Mbcr/ABL1 normaliseeritud koopiade arvu suhtel (NCN), mille hindamiseks kasutati emba-kumba standardlahust (komplekt *ipsogen* või ERM-AD623 BCR-ABL1) kontrollproovidel, mis sisalduvad komplektides *ipsogen* ja NIBSC kinnitatud viitematerjalides: White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.

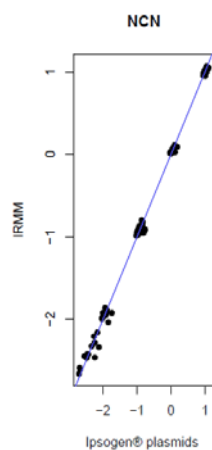


regressioonikõvera

Ct väärtus

Log CN

Joonis 12. Komplekti *ipsogen* ja ERM-AD623 BCR-ABL1 plasmidi standardkõverad ühtivad.



NCN

IRMM

ipsogen® plasmidi

Komplekt *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit.

Joonis 13. ERM-AD623 BCR-ABL1 võrreldes komplekti *ipsogen* NCN-väärtustega.

QIAGEN-i uuringu järgi statistiline erinevus puudub: ERM-AD623 BCR-ABL1 üksikplasmidi ja komplekti *ipsogen* üksikplasmidi standardite tulemused on samaväärsed.

Viited

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
9. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Sümbolid

Pakenditel ja etiketidel võivad esineda järgmised sümbolid.



<N>

Sisaldab reaktiivi <N> reaktsiooni jaoks



Kõlblik kuni



In vitro diagnostiline meditsiiniseade



Kataloogi nr



Partii number



Materjali number



Globaalne kaubaartikli number (GTIN)



Temperatuuripiirang



Tootja



Vt kasutusjuhendit

Kontaktandmed

Tehnilist ja muud teavet saate meie tehnilise toe leheküljelt veebis www.qiagen.com/Support või telefonil 00800-22-44-6000; võite ühendust võtta QIAGENi tehnilise teeninduse osakonna või kohaliku edasimüüjaga (vt tagakaant või külastage veebilehte www.qiagen.com).

Tellimisinfo

Toode	Sisu	Kat nr
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit (24)	24 reaktsiooni jaoks: Mbc ja ABL Single Plasmid Standards (Mbc ja ABL ühe plasmiidiga standardlahused), High RNA Positive Control (RNA tugevalt positiivne kontroll-lahus), IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibraator), Primers and Probe Mix ABL (Pramerite ja proovi segu ABL), Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene (Pramerite ja proovi segu BCR-ABL Mbc fusioonigeen)	670723
Rotor-Gene Q MDx – IVD-valideeritud reaalaajaliseks PCR-analüüsiks kliinilistes rakendustes		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaalaajaline PCR-tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, lilla), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, lisatarvikud, 1-aastane garantii osade ja töö osas, paigaldamist ja koolitust ei sisalda.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaalaajaline PCR-tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, lilla), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, lisatarvikud, 1-aastane garantii osade ja töö osas, sisaldab paigaldamist ja koolitust.	9002033
Komplekt <i>ipsogen</i> RT Kit – pöördtranskriptsiooni jaoks		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Reverse Transcriptase (Pöördtranskriptaas), Random Primer (Suvaline praimer), DTT, dNTP, RNase Inhibitor (RNAasi inhibiitor), RT Buffer (RT puhver)	679923

Toode	Sisu	Kat nr
RNeasy komplektid – kogu RNA puhastamiseks		
RNeasy Midi Kit (50)	50 RNA preparaadi jaoks: 50 RNeasy Midi Spin Columns, kogumiskatsutid (15 ml), RNAasivabad reaktiivid ja puhvrid	75144

Ajakohase litsentseerimisteabe ja tootespetsiifiliste kaebuste puhul vt vastava QIAGENi komplekti käsiraamatut või kasutusjuhendit. QIAGENi komplektide käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel **www.qiagen.com** ja neid saab tellida QIAGENi tehnilise teeninduse osakonnast või teie kohaliku edasimüüja käest.

Käesolev toode on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. *ipsogen*'i tooteid ei või edasi müüa, edasimüügiks muuta ega kasutada komertstoodete tootmiseks ilma ettevõtte QIAGEN kirjaliku loata.

Selles dokumendis sisalduvat teavet võidakse ilma ette teatamata muuta. QIAGEN ei vastuta käesolevas dokumendis esineda võivate vigade eest. Me usume, et dokument oli avaldamise hetkel täielik ja täpne. Mingil juhul ei vastuta QIAGEN juhuslike, sihilike, korduvate või põhjuslike kahjustuste eest, mis võivad tekkida selle dokumendi tõttu.

ipsogen'i toodete puhul on garanteeritud vastavus märgitud tehnilistele nõuetele. QIAGENi ainsaks kohustuseks kliendi ees ja kohustuse ainsaks vahendiks on toote tasuta asendamine juhul, kui toode ei toimi vastavalt garantiile.

Kaubamärgid: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], *ipsogen*[®], RNeasy[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®], FAM[™], RNaseOUT[™], ROX[™], SuperScript[®], SYBR[®], TAMRA[™], TRIZOL[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent[®], Bioanalyzer[®] (Agilent Technologies, Inc.); Excel[®] (Microsoft Corporation); LightCycler[®], TaqMan[®] (Roche Group); Premix Ex Taq[™] (Takara Bio, Inc.).

Piiratud litsentsileping

Komplekti *ipsogen* BCL-ABL1 Mbc IS-MMR ostja või kasutaja nõustub selle toote kasutamisel alljärgnevate tingimustega.

1. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR komplekti võib kasutada vaid vastavalt *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR komplekti käsiraamatule ja ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna luba enda intellektuaalomandi piires ega luba kasutada komplektis olevaid komponente muude komplektis mittesisalduvate komponentidega, v.a juhtudel, mis on kirjeldatud *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR komplekti käsiraamatus ja aadressil www.qiagen.com leiduvates lisaprotokollides.
2. QIAGEN ei anna mingit garantiid, et komplekt ja/või selle kasutusala ei riku kolmandate osaliste õigusi, v.a selgesõnalistes litsentsides mainitud juhtudel.
3. Komplekt ja selle komponendid on litsentseeritud ühekordseks kasutamiseks ning neid ei tohi uuesti kasutada, värskendada ega edasi müüa.
4. QIAGEN keeldub kõikidest muudest otsestest või kaudsetest litsentsidest, v.a neist, mida on selgesõnaliselt väljendatud.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustub mitte lubama kellelgi teisel teha midagi, mis võib põhjustada või soodustada mõnda ülaltoodud keelatud toimingutest. QIAGEN võib piiratud litsentsilepingu keelud kinnitada suvalises kohtus ning tagab kõik uurimisega seotud ja kohtukulud, sh advokaaditasud, iga kord, kui on vaja piiratud litsentsilepingut või enda õigust intellektuaalomandile (mis on seotud komplekti ja/või selle komponentidega) jõustada.

Värskeid litsentsitingimusi vt www.qiagen.com.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, kõik õigused kaitstud.

www.qiagen.com

