

Lipiec 2020 r.

therascreen[®] IDH1/2 RGQ PCR Kit — Instrukcja obsługi



Wersja 1

Do wykrywania 12 mutacji genów *IDH1* i *IDH2* w tkankach glejaka

IVD

Do diagnostyki in vitro

Do użytku z aparatem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R5 **MAT**

1119896PL

Sample to Insight



Spis treści

Przeznaczenie	5
Podsumowanie i objaśnienie	6
Zasada procedury	8
Dostarczone materiały	10
Zawartość zestawu	10
Materiały wymagane, ale niedostarczone	12
Ostrzeżenia i środki ostrożności	15
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	15
Ogólne środki ostrożności	15
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami	17
Warunki transportu	17
Przechowywanie.....	17
Stabilność.....	17
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	18
Procedura	19
Izolacja i przygotowanie DNA.....	19
Protokół: Wykrywanie mutacji genów <i>IDH1/2</i>	23
Interpretacja wyników	28
Kontrole — woda	28
Kontrola jakości na podstawie wartości C_T kontroli	28
Walidacja materiału wejściowego próbki	31
Wyniki generowane dla próbek	31

Rozwiązywanie problemów	37
Kontrola jakości	40
Ograniczenia	41
Parametry skuteczności.....	43
Granica próby ślepej (Limit of Blank, LOB)	43
Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD)	43
Wpływ wejściowej ilości DNA	45
Powtarzalność i odtwarzalność	45
Porównanie metod.....	48
Literatura	51
Symbole.....	53
Informacje dotyczące zamawiania	55
Historia zmian dokumentu.....	57

Przeznaczenie

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit to diagnostyczny test in vitro oparty na technologii PCR przeznaczony do jakościowego wykrywania 7 mutacji genu *IDH1* i 5 mutacji genu *IDH2* oraz do bezpośredniej identyfikacji 3 poważnych mutacji w próbkach DNA wyizolowanego z ludzkich tkanek mózgowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jest przeznaczony do stosowania jako test wspomagający lekarzy podczas klasyfikacji glejaka.

Podsumowanie i objaśnienie

Mutacje genów dehydrogenazy izocytrynianowej (isocitrate dehydrogenase, IDH), *IDH1* i *IDH2*, często występują w przypadku osób dorosłych z glejakami sklasyfikowanymi przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) jako glejaki II i III stopnia złośliwości oraz wtórne glejaki wielopostaciowe (glioblastoma, GBM) IV stopnia złośliwości. Testy wykrywające mutacje genów *IDH1/2* mają nie tylko wartość diagnostyczną — mutacje te obecne u pacjentów chorych na glejaka wiążą się z dobrym rokowaniem (1–13).

Zestaw *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* to oznaczenie przeznaczone do wykrywania 12 swoistych mutacji genów *IDH1/2*: 6 w obrębie 132. kodonu genu *IDH1*, 5 w obrębie homologicznego 172. kodonu genu *IDH2* oraz 1 w obrębie 100. kodonu genu *IDH1* (Tabela 1). Zestaw umożliwia również bezpośrednie wykrycie poważnych mutacji genów *IDH1* i *IDH2* prowadzących do substytucji *IDH1* R132H, *IDH1* R132C i *IDH2* R172K.

Tabela 1. Mutacje genów IDH1 i IDH2 wykrywane przez zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Gen	Mutacja	Zmiana zasady	Nr identyfikacyjny COSMIC*
IDH1	Arg132His (R132H)	395G>A	COSM28746
	Arg132Cys (R132C)	394C>T	COSM28747
	Arg132Ser (R132S)	394C>A	COSM28748
	Arg132Gly (R132G)	394C>G	COSM28749
	Arg132Leu (R132L)	395G>T	COSM28750
	Arg132Val (R132V)	394_395CG>GT	COSM28751
	Arg100Gln (R100Q)	299G>A	COSM88208
IDH2	Arg172Lys (R172K)	515G>A	COSM33733
	Arg172Met (R172M)	515G>T	COSM33732
	Arg172Trp (R172W)	514A>T	COSM34039
	Arg172Ser (R172S)	516G>T	COSM34090
	Arg172Gly (R172G)	514A>G	COSM33731

* Numery identyfikacyjne COSMIC pochodzą z Katalogu mutacji somatycznych w nowotworach (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Zasada procedury

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit zawiera odczynniki przeznaczone do wykonania 9 odrębnych reakcji amplifikacji umożliwiających wykrycie 12 mutacji (Tabela 1):

- 3 reakcje całkowitej amplifikacji 132. i 100. kodonu genu *IDH1* oraz 172. kodonu genu *IDH2*;
- 3 reakcji amplifikacji swoistych dla mutacji w obrębie 132. i 100. kodonu genu *IDH1* oraz 172. kodonu genu *IDH2*;
- 3 reakcji amplifikacji swoistych dla mutacji *IDH1* R132H, *IDH1* R132C i *IDH2* R172K.

Mieszanki reakcyjne Total

Mieszanki starterów i sond Total (PPM-Total) zawierają startery i sondy przeznaczone do amplifikacji docelowych sekwencji zmutowanych oraz typu dzikiego (Ryc. 1).

Mieszanki reakcyjne przeznaczone do wykrywania mutacji

Mieszanki starterów i sond przeznaczone do wykrywania mutacji zawierają startery i sondy przeznaczone do amplifikacji docelowych sekwencji zmutowanych oraz typu dzikiego, a także oligonukleotyd zablokowany na końcu 3' poprzez dodanie grupy fosforanowej w celu uniemożliwienia wydłużania docelowej sekwencji typu dzikiego (metoda PCR clamp).

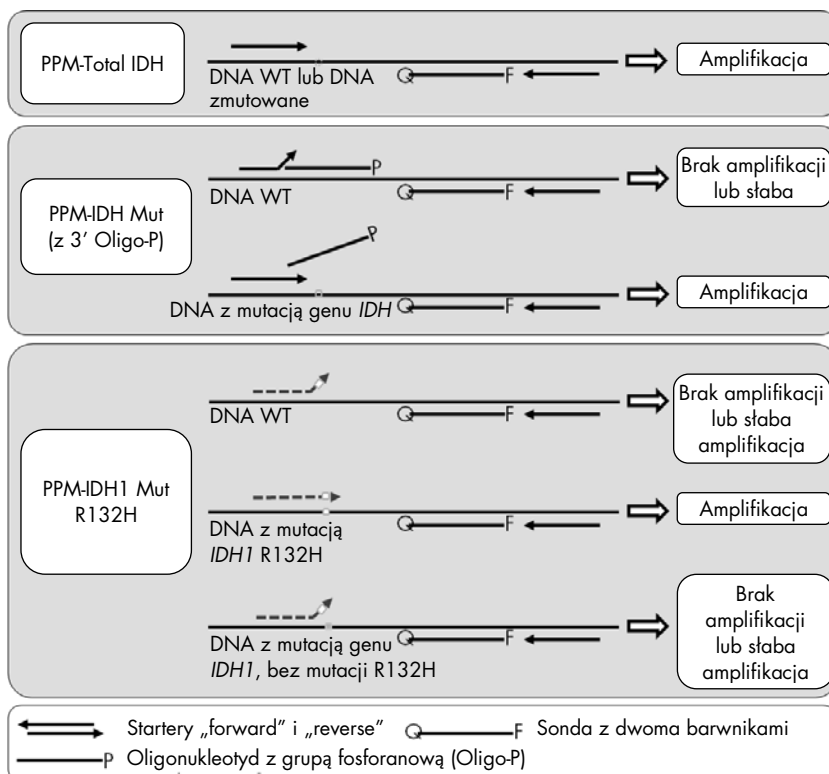
Jeśli w matrycy PCR znajduje się sekwencja typu dzikiego, oligonukleotyd z grupą fosforanową na końcu 3' będzie wypierał przyłączanie się cząsteczek startera PCR, ponieważ ma on większe powinowactwo do sekwencji docelowej. W takim przypadku polimeraza DNA nie może wydłużyć sekwencji lub wydłużanie zachodzi z niską częstością, w wyniku czego nie jest obserwowana amplifikacja lub zachodzi ona na niskim poziomie.

Jeśli obecna jest zmutowana sekwencja, przyłączanie startera PCR będzie przeważać nad przyłączeniem oligonukleotydu z grupą fosforanową na końcu 3' i dojdzie do amplifikacji sekwencji (Ryc. 1).

Mieszanki reakcyjne przeznaczone do identyfikacji mutacji

Amplifikacja allelospecyficzna jest wykonywana metodą ARMS (system do detekcji mutacji oparty o oporność na amplifikację, Amplification Refractory Mutation System), w której wykorzystywana jest zdolność polimerazy DNA do rozróżnienia dopasowanej i niedopasowanej zasady na końcu 3' startera PCR.

Kiedy starter PCR jest w pełni dopasowany, amplifikacja zachodzi z pełną wydajnością. Kiedy zasada na końcu 3' nie jest dopasowana, zachodzi jedynie słaba amplifikacja (Ryc. 1).



Ryc. 1. Wyniki generowane przy użyciu mieszanin starterów i sond zawartych w zestawie *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. Wykrywanie mutacji *IDH1* R132C i *IDH2* R172K przebiega w taki sam sposób, jak przedstawione w przykładzie wykrywanie mutacji *IDH1* R132H.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Numer katalogowy		873011
Liczba reakcji		20
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Mieszanina starterów i sond przeznaczona do wykrywania całej sekwencji <i>IDH1/R132</i>) (gen typu dzikiego i gen zmutowany)	PPM-Total IDH1/R132 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Mieszanina starterów i sond przeznaczona do wykrywania całej sekwencji <i>IDH2/R172</i>) (gen typu dzikiego i gen zmutowany)	PPM-Total IDH2/R172 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Mieszanina starterów i sond przeznaczona do wykrywania całej sekwencji <i>IDH1/R100</i>) (gen typu dzikiego i gen zmutowany)	PPM-Total IDH1/R100 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> (Mieszanina starterów i sond (zawierająca Oligo-P) przeznaczona do wykrywania zmutowanego genu <i>IDH1/R132</i>)	PPM-IDH1/R132 Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i> (Mieszanina starterów i sond (zawierająca Oligo-P) przeznaczona do wykrywania zmutowanego genu <i>IDH2/R172</i>)	PPM-IDH2/R172 Mut 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i> (Mieszanina starterów i sond (zawierająca Oligo-P) przeznaczona do wykrywania zmutowanego genu <i>IDH1/R100</i>)	PPM-IDH1/R100 Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H (Mieszanina starterów i sond przeznaczona do identyfikacji mutacji R132H genu <i>IDH1</i>)	PPM-IDH1 Mut R132H 25x	40 µl

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Zawartość zestawu (ciąg dalszy)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Numer katalogowy		873011
Liczba reakcji		20
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C (Mieszanina starterów i sond przeznaczona do identyfikacji mutacji R132C genu <i>IDH1</i>)	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> Mut R172K (Mieszanina starterów i sond przeznaczona do identyfikacji mutacji R172K genu <i>IDH2</i>)	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA (Odczynnik zawierający genomowe DNA genów <i>IDH1/IDH2</i> typu dzikiego)	Kontrola zawierająca geny <i>IDH1/IDH2</i> WT	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control (Kontrola pozytywna zawierająca zmutowane geny <i>IDH1/IDH2</i>)	Kontrola pozytywna zawierająca zmutowane geny <i>IDH1/IDH2</i>	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR (Mieszanina zawierająca polimerazę DNA <i>Taq</i> , dezoksyrybonukleotydy dNTP, MgCl ₂ i bufor do reakcji qPCR)	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water (Woda wolna od nukleaz)	Woda wolna od nukleaz	5 x 525 µl
therascreen <i>IDH1/2</i> RGQ PCR Kit — Instrukcja obsługi (w języku angielskim)		1

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Ważne: Należy upewnić się, że aparaty używane w tej procedurze zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

Odczynniki (ręczna izolacja DNA)

- Zestaw do izolacji DNA: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (nr kat. 56404)
- RNase A (17 500 U) (nr kat. 19101)
- Ksylen lub Histolemon™ (Carlo Erba, nr kat. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100%)
- 1x stężony bufor TE, pH 8,0

Odczynniki (zautomatyzowana izolacja DNA)

- Zestaw do izolacji DNA: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (nr kat. 937236)
- Buffer ATL (nr kat. 19076 lub 939016)
- RNase A (nr kat. 19101)
- Ksylen lub Histolemon (Carlo Erba, nr kat. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100%)
- 1x stężony bufor TE, pH 8,0

Materiały eksploatacyjne

- Skalpele
- Sterylne końcówki do pipet do przygotowywania reakcji PCR, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami hydrofobowymi
- Probówki wolne od nukleaz, 2,0 ml lub 1,5 ml
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, do aparatu Rotor-Gene Q (nr kat. 981103 lub 981106)
- Lód

Dodatkowe materiały eksploatacyjne do zautomatyzowanej izolacji DNA

- Sample Prep Cartridges, 8-well (nr kat. 997002)
- 8-Rod Covers (nr kat. 997004)
- Filter-Tips, 200 μ l, Qsym SP (nr kat. 990332) i Filter-Tips, 1500 μ l, Qsym SP (nr kat. 997024)
- Elution Microtubes CL (nr kat. 19588)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, nr kat. 72.693, www.sarstedt.com)

Wyposażenie

- Statyw na szkiełka i 2 zgodne łaźnie na preparaty, które można napełnić ksylenem/odczynnikiem Histolemon i etanolem
- Pipety mikrolitrowe przeznaczone do przygotowywania reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wirówka laboratoryjna z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 0,5 ml/1,5 ml i mikro płytek (umożliwiająca wirowanie przy 13 000–14 000 rpm)
- Wytrząsarka laboratoryjna
- Aparat do przeprowadzania reakcji real-time PCR: aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oraz powiązane odpowiednie materiały
- Oprogramowanie Rotor-Gene Q MDx w wersji 2.1.0 lub wyższej
- Biofotometr
- Termomikser, podgrzewany inkubator z orbitalnym wytrząsaniem, blok grzewczy lub łaźnia wodna umożliwiający(-a) inkubację w temperaturze 56°C i 90°C

Dodatkowe wyposażenie do zautomatyzowanego oczyszczania

- Aparat QIASymphony SP
- Oprogramowanie QIASymphony SP w wersji 4.0 lub wyższej

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS). Są one dostępne online w formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

W celu uzyskania informacji na temat bezpieczeństwa dotyczących używanego zestawu do oczyszczania należy zapoznać się z instrukcją obsługi odpowiedniego zestawu. W celu uzyskania informacji na temat bezpieczeństwa dotyczących konkretnego urządzenia należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi.

Ogólne środki ostrożności

- Test jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek wyizolowanymi podczas resekcji chirurgicznej, utrwalonymi w zbuforowanej formalinie i zatopionymi w parafinie (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).
- Wszystkie środki chemiczne i materiały biologiczne są potencjalnie niebezpieczne. Próbkę są potencjalnie zakaźne i należy je traktować jako materiały stwarzające zagrożenie biologiczne.
- Zużyte próbki i odczynniki należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

- Odczynniki zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit są optymalnie rozcieńczone. Nie należy bardziej rozcieńczać odczynników, ponieważ może to skutkować utratą skuteczności. Nie stosować objętości reakcyjnych (mieszanina reakcyjna i próbka łącznie) mniejszych niż 25 µl.
- Wszystkie odczynniki dostarczone w zestawie *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit są przeznaczone do stosowania wyłącznie z odczynnikami z tego samego zestawu. Nie należy wymieniać odczynników między zestawami *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, gdyż może to wpłynąć na skuteczność.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury można znaleźć w podręczniku użytkownika aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Zmiana okresów i temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub rozbieżnych danych.
- Nie należy używać składników, których termin ważności minął, ani niewłaściwie przechowywanych składników.
- Właściwości mieszanin starterów i sond mogą ulec zmianie pod wpływem światła słonecznego.
- Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia mieszanin syntetycznymi materiałami, które są zawarte w odczynniku będącym kontrolą pozytywną.
- Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec przenoszeniu zanieczyszczenia w postaci DNaz, które mogą spowodować rozkład matrycy DNA.
- Do przygotowania mieszanin reakcyjnych i dodawania matryc należy używać osobnych pipet przeznaczonych wyłącznie do tych czynności.
- Przygotowanie i rozdzielanie mieszanin reakcyjnych należy wykonywać w obszarze oddzielnym od obszaru, w którym dodawane są matryce.
- Nie otwierać aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM przed zakończeniem reakcji.
- Nie otwierać probówek Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM po zakończeniu reakcji.
- Zachować ostrożność, aby zapewnić prawidłowe przebadanie próbek, zwracając szczególną uwagę na nieprawidłowe umieszczenie próbek, błędy podczas ładowania i błędy pipetowania.

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Warunki transportu

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jest transportowany na suchym lodzie. Jeśli którykolwiek składnik zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit nie jest zamrożony w chwili odbioru, opakowanie zewnętrzne zostało otwarte podczas transportu lub przesyłka nie zawiera listy zawartości opakowania, instrukcji obsługi lub odczynników, należy skontaktować się z jednym z serwisów technicznych firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (informacje znajdują się pod adresem www.qiagen.com).

Przechowywanie

Niezwłocznie po otrzymaniu zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit należy go umieścić w temperaturze od -30 do -15°C w zamrażarce o stałej temperaturze i chronić przed światłem.

Stabilność

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit zachowuje stabilność do podanego terminu ważności, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach przechowywania.

Po otwarciu odczynniki można przechowywać w ich oryginalnych opakowaniach w temperaturze od -30 do -15°C do podanego terminu ważności widocznego na opakowaniu. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania. Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania i rozmrażania.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jest przeznaczony do testowania próbek DNA wyizolowanego z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) tkanek nowotworowych pobranych podczas resekcji chirurgicznych od pacjentów z rakiem mózgu. Wszystkie próbki tkankowe należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.

- Próbki tkankowe należy utwalić w roztworze obojętnej zbuforowanej formaliny (neutral buffered formalin, NBF) o stężeniu 4–10%.
- Wyciąć z bloku parafinowego seryjne skrawki o grubości 10 μm i przenieść je na szklane szkiełka.
- Poprosić przeszkoloną osobę (np. patologa) o ocenę skrawka wybarwionego hematoksyliną i eozyną (H&E) sąsiadującego ze skrawkami, z których ma zostać wyizolowany materiał, pod kątem ilości tkanki nowotworowej i powierzchni zajmowanej przez tę tkankę. Użyć seryjnych skrawków do izolacji DNA.
- Do testu nadają się wyłącznie skrawki o ilości tkanki nowotworowej $\geq 40\%$.
- W przypadku skrawków, na których powierzchnia tkanki jest $< 50 \text{ mm}^2$, zalecane jest poddanie obróbce takiej liczby skrawków, aby zwiększyć łączną powierzchnię tkanki do co najmniej 50 mm^2 (100 mm^2 w przypadku zautomatyzowanej izolacji wykonywanej w aparacie QIASymphony SP).
- Materiały tkanki nowotworowej, bloczki, szkiełka i próbki gotowe do procesu izolacji należy oznaczać w kontrolowany sposób, a także postępować z nimi i przechowywać je zgodnie z lokalnymi procedurami.
- Bloczki FFPE i szkiełka należy przechowywać w temperaturze pokojowej. Szkiełka można przechowywać w temperaturze otoczenia przez maksymalnie 4 tygodnie przed izolacją DNA do użytku z zestawem *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.
- Wyizolowany genomowy DNA można przechowywać przez maksymalnie 1 tydzień w temperaturze $2-8^\circ\text{C}$ lub przez maksymalnie 8 tygodni w temperaturze od -25 do -15°C .


Procedura

Izolacja i przygotowanie DNA

Do oczyszczenia genomowego DNA z próbek otrzymanych z tkanek FFPE raka mózgu należy użyć zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (nr kat. 56404) lub zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit (nr kat. 937236).

Uwaga: Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit zwalidowano wyłącznie w połączeniu z zestawem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit i zestawem QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Nie należy używać żadnego innego produktu do izolacji DNA.

Korzystanie z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

<p>PRZESTROG</p> 	<p>Należy uważnie przeczytać poniższe informacje o zmianach koniecznych do wprowadzenia w protokole QIAamp.</p>
---	---

- Przygotowanie próbek przed odparafinowaniem i izolacją DNA opisano w części „Materiał początkowy” dokumentu *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — Instrukcja obsługi* oraz w części Przechowywanie i sposób postępowania z próbkamina stronie 18 tej instrukcji obsługi.
- Należy wykonywać wyłącznie ręczną procedurę zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Należy wykonać krok dotyczący RNazy opisany w dokumencie *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — Instrukcja obsługi*.
- Nie należy używać roztworu Deparaffinization Solution firmy QIAGEN. W celu odparafinowania należy stosować wyłącznie metodę z wykorzystaniem ksylenu/etanolu opisaną w części „Procedura odparafinowania preparatów na szkiełkach w przypadku korzystania z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit”, niżej. Ksylen można zastąpić odczynnikiem Histolemon (zamiennik ksylenu).


- Trawienie proteinazą K należy przeprowadzać przez 1 godzinę.
- Próbkę należy dwukrotnie eluować w 30 µl buforu do elucji (Buffer ATE) z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Procedura odparafinowania preparatów na szkiełkach w przypadku korzystania z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Umieścić szkiełka w odpowiednim statywie na szkiełka.
2. Włożyć statyw na szkiełka do łaźni na szkiełka napełnionej ksylenem lub odczynnikiem Histolemon i pozostawić na 2 minuty. Wytrząsać, wykonując po 2 lub 3 ruchy do przodu i do tyłu.
3. Włożyć statyw do drugiej łaźni na szkiełka napełnionej etanolem (96–100%) i pozostawić na 2 minuty. Wytrząsać, wykonując po 2 lub 3 ruchy do przodu i do tyłu.
4. Pozostawić szkiełka do wyschnięcia w temperaturze 15–37°C (zajmie to kilka minut).
5. Oznaczyć próbki mikrowirówkowe o poj. 1,5 ml dla każdej próbki, a następnie dodać po 180 µl buforu Buffer ATL (z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) do każdej próbki.
6. Podać kilka kropel buforu Buffer ATL na skrawki tkankowe znajdujące się na szkiełkach (użyć objętości wystarczającej do pokrycia całej powierzchni tkanki).
7. Zeskrobać tkankę sterylnym skalpelem, a następnie przełożyć ją do odpowiednio oznaczonej próbki mikrowirówkowej.
8. Dodać 20 µl proteiny K (z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) do każdej próbki i wymieszać poprzez wytrząsanie.
9. Inkubować w temperaturze 56°C przez 1 godzinę.

Przejdź do kroku inkubacji w temperaturze 90°C, który opisano w protokole dla zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (krok 12. w dokumencie *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — Instrukcja obsługi*, czerwiec 2012 r., strona 13).

Korzystanie z zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit

PRZESTROG 	Należy uważnie przeczytać poniższe informacje o zmianach koniecznych do wprowadzenia w karcie protokołu QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.
---	---

- Przygotowanie próbek przed odparafinowaniem i izolacją DNA opisano w części „Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami” na stronie 18.
- Należy wykonać krok dotyczący RNazy opisany w karcie protokołu QIASymphony SP.
- Nie należy używać roztworu Deparaffinization Solution firmy QIAGEN. W celu odparafinowania należy stosować wyłącznie metodę z wykorzystaniem ksylenu/etanolu opisaną w części Procedura odparafinowania preparatów na szkiełkach w przypadku korzystania z zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit niżej. Ksylen można zastąpić odczynnikiem Histolemon (zamiennik ksylenu).
- Trawienie proteinazą K należy przeprowadzać przez 1 godzinę.
- Objętość elucji równa 50 µl jest wybierana na ekranie dotykowym.

Procedura odparafinowania preparatów na szkiełkach w przypadku korzystania z zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Wykonać procedurę odparafinowania zgodnie z poniższymi krokami, innymi niż kroki opisane w karcie protokołu QIASymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Umieścić szkiełka w odpowiednim statywie na szkiełka.
2. Włożyć statyw na szkiełka do łaźni na szkiełka napelnionej ksylenem lub odczynnikiem Histolemon i pozostawić na 2 minuty. Wyrząsać, wykonując po 2 lub 3 ruchy do przodu i do tyłu.
3. Włożyć statyw do drugiej łaźni na szkiełka napelnionej etanolem (96–100%) i pozostawić na 2 minuty. Wyrząsać, wykonując po 2 lub 3 ruchy do przodu i do tyłu.

4. Pozostawić szkiełka do wyschnięcia w temperaturze 15–37°C (zajmie to kilka minut).
5. Oznaczyć próbki mikrowirówkowe o poj. 1,5 ml dla każdej próbki, a następnie dodać po 220 µl buforu Buffer ATL do każdej próbki.
6. Podać kilka kropel buforu Buffer ATL na skrawki tkankowe znajdujące się na szkiełkach (użyć objętości wystarczającej do pokrycia całej powierzchni tkanki).
7. Zeskrobać tkankę sterylnym skalpelem, a następnie przełożyć ją do odpowiednio oznaczonej próbki mikrowirówkowej.
8. Dodać 20 µl proteiny K (z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) do każdej próbki i wymieszać poprzez wytrząsanie.

Przejsz do kroku inkubacji w temperaturze 56°C, który opisano w karcie protokołu QIAasymphony SP: Tissue_LC_200_V7_DSP (krok 12. protokołu „Deparafinizacja za pomocą ksylenu”, kwiecień 2012 r.). Inkubować w temperaturze 56°C przez 1 godzinę.

Genomowy DNA

Wyizolowany genomowy DNA należy przechowywać przez maksymalnie 1 tydzień w temperaturze 2–8°C lub przez maksymalnie 8 tygodni w temperaturze od –25 do –15°C.

Ilość DNA należy określić poprzez pomiar gęstości optycznej (optical density, OD) próbki przy długości fali 260 nm.

Rozcieńczyć DNA do stężenia 5 ng/µl w 1x stężonym buforze TE o pH 8,0.

Reakcja PCR jest zoptymalizowana dla próbek zawierających 25 ng oczyszczonego genomowego DNA.

Protokół: Wykrywanie mutacji genów *IDH1/2*

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- W celu optymalnego wykorzystania zestawu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* próbki należy pogrupować w partiach po 4. Testowanie mniejszych partii spowoduje zmniejszenie liczby próbek, które można przebadac za pomocą jednego zestawu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*.
- Zalecane jest testowanie wszystkich próbek wskazanych w Tabeli 2 podczas jednej reakcji PCR przy układzie bloku ładowania i ustawieniu rotora wskazanym w Tabeli 3 i na Ryc. 2.

Tabela 2. Liczba reakcji w przypadku używania aparatów Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki

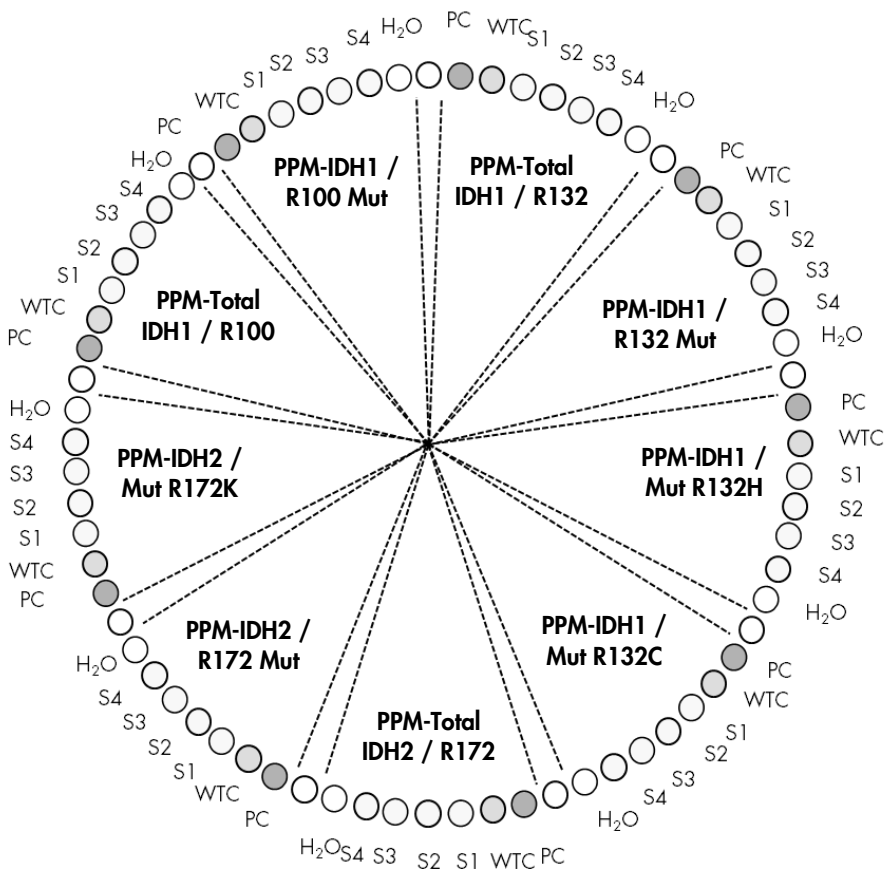
Próbki	Reakcje
n próbek DNA	n x 1 reakcja
2 kontrole DNA	2 reakcje: kontrola pozytywna i kontrola WT, po jednej na reakcję PCR
Kontrola — woda	1 reakcja

Tabela 3. Sugerowany układ bloku ładowania dla eksperymentu z wykorzystaniem zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Próbka	Total IDH1/R132	IDH1/ R132 Mut	IDH1 Mut R132H	IDH1 Mut R132C	Total IDH2/ R172	IDH2/ R172 Mut	IDH2 Mut R172K	Total IDH1/ R100	IDH1/ R100 Mut
Mut PC*	1	9	17	25	33	41	49	57	65
WTC†	2	10	18	26	34	42	50	58	66
S1	3	11	19	27	35	43	51	59	67
S2	4	12	20	28	36	44	52	60	68
S3	5	13	21	29	37	45	53	61	69
S4	6	14	22	30	38	46	54	62	70
H ₂ O	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Pusta próbówka	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* PC: Positive control (kontrola pozytywna).

† WTC: Wild-type control (kontrola genu typu dzikiego).



Ryc. 2. Sugerowane ustawienie rotora dla eksperymentu z wykorzystaniem zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Ważne: Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie aparat nie wykona kalibracji i zostaną zarejestrowane nieprawidłowe dane fluorescencji.

Procedura

1. Rozmrozić wszystkie niezbędne składniki i umieścić je na lodzie.
2. Przygotować opisane niżej mieszaniny PCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Uwaga: Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 4 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczony w taki sposób, aby końcowa objętość reakcji wynosiła 25 µl. Dla każdej mieszaniny starterów i sond (PPM) można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji. Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 4. Przygotowanie mieszanin do reakcji PCR

Składnik	1 reakcja (µl)	Wstępna mieszanina: 7 + 1 reakcja (µl)	Stężenie końcowe
qPCR Master Mix, 2x	12,5	100	1x
PPM*, 25x	1	8	1x
Woda wolna od nukleaz	6,5	52	–
Próbka lub kontrola† (dodawana w kroku 4.)	5	5 na każdą	–
Całkowita objętość	25	25 na każdą	–

* Przygotować 9 wstępnych mieszanin, po jednej na każdą mieszaninę PPM dostarczoną w zestawie.

† Kontrola pozytywna, kontrola negatywna lub woda stosowana jako kontrola.

3. Dodać po 20 µl roztworu wstępnej mieszaniny na próbkę Rotor-Gene (Tabela 3).
 4. Dodać 5 µl materiału, który ma zostać oznaczony ilościowo (25 ng genomowego DNA próbki lub kontroli), do odpowiedniej próbki (całkowita objętość 25 µl; Tabela 3).
 5. Delikatnie wymieszać, pipetując w górę i w dół.
 6. Umieścić próbki w adapterze dostarczonym z aparatem (Ryc. 2).
- Uwaga:** Do nieużywanych pozycji należy włożyć puste próbki.
7. Załadować pełny adapter do aparatu Rotor-Gene Q MDx.
 8. Zaprogramować aparat Rotor-Gene Q MDx na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 5.

Tabela 5. Profil temperaturowy

Hold (Wstrzymanie)	Temperature (Temperatura): 95°C Time (Czas): 10 min
Cycling (Powtarzanie cykli)	40 razy 95°C przez 15 sekund 60°C przez 60 sekund z rejestracją fluorescencji FAM™ w kanale Green: Single (Pojedynczy)

9. Kliknąć przycisk **Gain Optimisation** (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym New Run Wizard (Kreator nowego cyklu), aby otworzyć okno dialogowe Auto-Gain Optimisation Setup (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego). Ustawić zakres dla kanału zielonego od wartości **2FI** dla odczytu **Min Reading** (Odczyt min.) do wartości **10FI** dla odczytu **Max Reading** (Odczyt maks.).
10. Upewnić się, że pole **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Wykonaj optymalizację przed pierwszą rejestracją) jest zaznaczone i zamknąć okno dialogowe Auto-Gain Optimisation Setup (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego).
11. Uruchomić program cykli termicznych.
12. Po zakończeniu cykli termicznych wykonać poniższe czynności.
 - 12a. Wybrać opcję **Options** (Opcje) > **Crop Start Cycles** (Usuń cykle początkowe).
Usunąć dane zarejestrowane przed cyklem **10**, aby odrzucić wszelkie artefakty.
 - 12b. Wybrać opcję **Analysis** (Analiza) > **Cycling A. Green from 10** (Zielony kanał rejestracji od 10), wskazaną w raporcie jako „left threshold = 10.00” (lewy próg = 10,00).
 - 12c. Wybrać opcję **Dynamic Tube** (Probówka dynamiczna) jako metodę normalizacji, a następnie opcję **Slope Correct** (Korekcja nachylenia), aby uwzględnić nachylenie szumu.
 - 12d. Ustawić opcję **Outlier Removal** (Usuwanie wartości odstających) na **0%** (odpowiednio do progów NTC).
 - 12e. Wyłączyć funkcję **Reaction Efficiency Threshold** (Próg wydajności reakcji).
 - 12f. Zdefiniować próg na wartość **0,03**.
 - 12g. Ustawić wykres na skalę liniową.
 - 12h. Wybrać opcję **Digital Filter** (Filtr cyfrowy): **Light** (Jasny).

Interpretacja wyników

Kontrole — woda

Próbki wody będące kontrolą (kontrola bez matrycy) powinny dawać wartości C_T równe zero dla wszystkich mieszanin starterów i sond.

Jeśli próbka wody będąca kontrolą wygeneruje dodatnią wartość C_T , doszło do zanieczyszczenia krzyżowego. Rozwiązanie tego problemu podano w części „Rozwiązywanie problemów” na stronie 37.

Kontrola jakości na podstawie wartości C_T kontroli

Kontrola zawierająca geny *IDH1/2* typu dzikiego (wild-type control, WTC) oraz kontrola pozytywna zawierająca zmutowane geny *IDH1/2* (Mut-PC) umożliwiają walidację eksperymentu.

- Jeśli dla kontroli nie zostanie wygenerowana żadna wartość C_t , kontrola jest klasyfikowana jako negatywna względem mutacji w danym oznaczeniu.
- Jeśli zostaną wygenerowane wartości C_t , dla każdej kontroli należy obliczyć wartość ΔC_T , korzystając z poniższych wzorów

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132 Mut} = C_T \text{ IDH1/R132 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172 Mut} = C_T \text{ IDH2/R172 Mut} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100 Mut} = C_T \text{ IDH1/R100 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

Kontrole są klasyfikowane jako pozytywne względem mutacji, jeśli wartości ΔC_T są równe odpowiednim punktom odcięcia ΔC_T lub mniejsze od nich. Punkty odcięcia zawiera Tabela 6. Jeśli wartość ΔC_T przekracza punkt odcięcia, kontrola jest klasyfikowana jako negatywna względem mutacji w danym oznaczeniu mutacji.

Tabela 6. Punkty odcięcia dla każdego oznaczenia mutacji

Oznaczenie mutacji	Punkt odcięcia (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

- W każdym oznaczeniu mutacji kontrola zawierająca geny *IDH1/2* typu dzikiego musi dać wynik negatywny względem mutacji (Tabela 7).
- W każdym oznaczeniu mutacji kontrola pozytywna zawierająca zmutowane geny *IDH1/2* musi dać wynik pozytywny względem mutacji (Tabela 7).

Jeśli którykolwiek z tych warunków nie zostanie spełniony, cały eksperyment należy uznać za nieważny.

Tabela 7. Przykład walidacji eksperymentu na podstawie kontroli

Wartość	Woda (NTC)	Kontrola zawierająca geny IDH1/IDH2 WT	Kontrola pozytywna zawierająca zmutowane geny IDH1/IDH2
C _T Total IDH1/R132	Nie wykryto	25,45	23,95
C _T IDH1/R132 Mut	Nie wykryto	34,32	25,76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Nie wykryto	8,87	1,81
C _T Total IDH2/R172	Nie wykryto	25,42	24,93
C _T IDH2/R172 Mut	Nie wykryto	34,36	26,36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Nie wykryto	8,94	1,43
C _T Total IDH1/R100	Nie wykryto	26,30	24,69
C _T IDH1/R100 Mut	Nie wykryto	33,04	26,39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Nie wykryto	6,74	1,70
C _T IDH1 Mut R132H	Nie wykryto	35,20	26,48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Nie wykryto	9,75	2,53
C _T IDH1 Mut R132C	Nie wykryto	37,16	27,07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Nie wykryto	11,71	3,12
C _T IDH2 Mut R172K	Nie wykryto	Nie wykryto	27,97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Nie wykryto	nd.	3,04

Walidacja materiału wejściowego próbki

Przed interpretacją wyników należy przeprowadzić walidację materiału wejściowego próbki.

Wartość C_T uzyskana dla próbki przy użyciu każdej mieszaniny PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ i $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) musi być mniejsza niż 32,00. Wartości C_T uzyskane przy użyciu mieszanin $_{Total}$, które są $\geq 32,00$, wskazują na niską jakość DNA. W takim wypadku należy ponownie przetestować próbkę. Jeśli wynik ponownie wskazuje na niewystarczającą ilość DNA, należy przeprowadzić izolację na większej próbce tkanki nowotworowej (jeśli jest ona dostępna) (patrz część „Rozwiązywanie problemów”, strona 37).

Wyniki generowane dla próbek

Wykrycie mutacji genów *IDH1/2*

Dla każdej próbki należy obliczyć wartości ΔC_T uzyskane w każdym oznaczeniu wykrywającym mutacje (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut), korzystając z poniższych wzorów.

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} = C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$$

Jeśli w oznaczeniu wykrywającym mutację nie uzyskano wartości C_t , próbkę należy sklasyfikować jako negatywną względem danej mutacji.

Próbki są klasyfikowane jako pozytywne względem mutacji, jeśli wartości ΔC_T są równe odpowiednim punktom odcięcia ΔC_T lub mniejsze od nich. Punkty odcięcia wyznaczone dla danych oznaczeń mutacji zawiera Tabela 8.

Tabela 8. Punkty odcięcia dla każdego oznaczenia wykrywającego mutację

Oznaczenie mutacji	Punkt odcięcia (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65

Identyfikacja mutacji genów *IDH1/2*

Dla każdej próbki należy obliczyć wartości ΔC_T uzyskane w każdym oznaczeniu identyfikującym mutacje (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K), korzystając z poniższych wzorów.

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

Jeśli w oznaczeniu identyfikującym mutację nie uzyskano wartości C_t , próbkę należy sklasyfikować jako negatywną względem mutacji.

Mutacja została zidentyfikowana w próbce, jeśli wartość ΔC_T jest równa punktowi odcięcia ΔC_T lub mniejsza od niego. Punkty odcięcia wyznaczone dla danych oznaczeń identyfikujących mutacje zawiera Tabela 9. Przykłady interpretacji wartości ΔC_T przedstawiono w Tabeli 10 i Tabeli 11.

Tabela 9. Punkty odcięcia dla każdego oznaczenia identyfikującego mutację

Oznaczenie mutacji	Punkt odcięcia (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

Tabela 10. Przykład wykrycia mutacji genów *IDH1/2*

Wartość	Próbka 1	Próbka 2
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C_T <i>IDH1/R132</i> Mut	33,86	28,29
ΔC_T <i>IDH1/R132</i> Mut	7,47	1,97
C_T Total <i>IDH2/R172</i>	26,79	25,79
C_T <i>IDH2/R172</i> Mut	35,13	35,21
ΔC_T <i>IDH2/R172</i> Mut	8,34	9,42
C_T Total <i>IDH1/R100</i>	27,20	27,37
C_T <i>IDH1/R100</i> Mut	33,83	33,76
ΔC_T <i>IDH1/R100</i> Mut	6,63	6,39
Wykrycie mutacji	Nie wykryto mutacji	Wykryto mutację R132

Tabela 11. Przykład identyfikacji mutacji genów *IDH1/2*

Wartość	Próbka 1	Próbka 2
C _T Total <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C _T <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i>	33,82	28,27
Δ C _T <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i>	7,43	1,95
C _T Total <i>IDH1/R132</i>	26,39	26,32
C _T <i>IDH1</i> Mut <i>R132C</i>	37,94	Nie wykryto
Δ C _T <i>IDH1</i> Mut <i>R132C</i>	11,55	nd.
C _T Total <i>IDH2/R172</i>	26,79	25,79
C _T <i>IDH2</i> Mut <i>R172K</i>	Nie wykryto	Nie wykryto
Δ C _T <i>IDH2</i> Mut <i>R172K</i>	nd.	nd.
Identyfikacja mutacji	Nie wykryto mutacji	Wykryto mutację <i>R132H</i>

Interpretacja mutacji genów *IDH1/2*

Procedurę używaną do przypisywania typów mutacji genów *IDH1/2* do próbek pozytywnych względem mutacji genów *IDH1/2* przedstawiono w Tabeli 12. Przykładową interpretację przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 12. Przewodnik interpretacji

		Identyfikacja mutacji			
		Wykryto mutację R132H genu <i>IDH1</i>	Wykryto mutację R132C genu <i>IDH1</i>	Wykryto mutację R172K genu <i>IDH2</i>	Nie wykryto mutacji
Wykrycie mutacji	Wykryto mutację R132	Wykryto mutację R132H	Wykryto mutację R132C	–	Wykryto mutację R132, ale nie wykryto mutacji R132H ani R132C
	Wykryto mutację R172	–	–	Wykryto mutację R172K	Wykryto mutację R172, ale nie wykryto mutacji R172K
	Wykryto mutację R100	–	–	–	R100
	Nie wykryto mutacji	Wykryto małą ilość mutacji R132H (od 1% do 2%)*	Wykryto małą ilość mutacji R132C (od 1% do 4%)*	Wykryto małą ilość mutacji R172K (około 1%)*	Nie wykryto mutacji

* Takie przypadki mogą wystąpić rzadko. Należy sprawdzić, czy wszystkie kryteria akceptacji próbki i kryteria techniczne zostały spełnione, zwłaszcza wymogi dotyczące ilości komórek nowotworowych. Jeśli wszystkie kryteria zostały spełnione, należy ponownie przetestować próbkę.

Tabela 13. Przykład zgłaszania i interpretacji mutacji genów *IDH1/2*

	Próbka 1	Próbka 2
Wykrycie mutacji	Nie wykryto mutacji	Wykryto mutację R132
Identyfikacja mutacji	Nie wykryto mutacji	Wykryto mutację R132H
Interpretacja wyników	Nie wykryto ani nie zidentyfikowano mutacji	Mutacja R132H

Uwaga: Jeśli dla próbki wygenerowano 2 lub więcej wartości ΔC_T , które są równe punktom odcięcia ΔC_T lub mniejsze od nich, status mutacji jest przypisywany na podstawie mutacji charakteryzującej się największą różnicą między wartością punktu odcięcia a uzyskaną wartością ΔC_T . Przykład przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Przykład interpretacji w przypadku kilku pozytywnych wyników

	Próbka 3	Próbka 4
ΔC_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	1,24	5,24
punkt odcięcia ΔC_T <i>IDH1/R132 Mut</i>	5,34	5,34
(punkt odcięcia $\Delta C_T - \Delta C_T$) <i>IDH1/R132 Mut</i>	4,10	0,10
ΔC_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	5,32	5,95
punkt odcięcia ΔC_T <i>IDH2/R172 Mut</i>	6,42	6,42
(punkt odcięcia $\Delta C_T - \Delta C_T$) <i>IDH2/R172 Mut</i>	1,10	0,47
Interpretacja wyników	Mutacja R132	Mutacja R172

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Komentarze i wskazówki

Zatkanie kolumny podczas izolacji DNA

- | | |
|-------------------|--|
| Niecałkowita liza | Powtórz wirowanie. |
| | Pozostały lizat można przenieść na nową kolumnę. |
| | Powtórz izolację, używając mniejszej ilości tkanki FFPE. |

Niewystarczająca ilość DNA w eluacie po izolacji

- | | |
|---|--|
| Niewystarczająca powierzchnia tkanki FFPE | Powtórz izolację, używając większej liczby skrawków tkanki FFPE. |
|---|--|

Nie wykryto kontroli zawierającej geny IDH1/2 WT

- | | |
|--|--|
| a) Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
Powtórz reakcję PCR. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit w temperaturze od –30 do –15°C i chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 16.

Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania i rozmrażania. |
| c) Minął termin ważności zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | Sprawdź warunki przechowywania i termin ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

Komentarze i wskazówki

Nie wykryto kontroli pozytywnej zawierającej zmutowane geny *IDH1/2*

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbówki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórz reakcję PCR. |
| b) | Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit w temperaturze od –30 do –15°C i chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 16.

Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania i rozmrażania. |
| c) | Minął termin ważności zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | Sprawdź warunki przechowywania i termin ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |

Brak sygnału, w tym brak sygnału dla kontroli

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Brak próbówki reakcyjnej w pozycji 1 aparatu Rotor-Gene Q MDx | Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie aparat nie wykona kalibracji i zostaną zarejestrowane nieprawidłowe dane fluorescencji. |
| b) | Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbówki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórz reakcję PCR. |
| c) | Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit w temperaturze od –30 do –15°C i chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 16.

Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania i rozmrażania. |

Komentarze i wskazówki

- | | | |
|----|---|--|
| d) | Minął termin ważności zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | Sprawdź warunki przechowywania i termin ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |
| e) | Wybrano nieprawidłowy kanał detekcji | Ustaw kanał detekcji na kanał Cycling Green lub 530 nm/640 nm. |
| f) | Nie zaprogramowano programu rejestracji danych | Sprawdź program wykonywania cykli. Patrz Tabela 5, strona 27.
Wybierz tryb rejestracji Single (Pojedynczy) przy końcu każdego segmentu hybrydyzacji w programie reakcji PCR. |

Zmienne natężenie fluorescencji

- | | |
|---|---|
| Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbówki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
Powtórz reakcję PCR. |
|---|---|

Zbyt niskie natężenie fluorescencji

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit w temperaturze od –30 do –15°C i chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 16.

Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania i rozmrażania. |
| b) | Minął termin ważności zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit | Sprawdź warunki przechowywania i termin ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit. |
| c) | Bardzo niska ilość docelowego DNA | Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj stężenie DNA. Patrz „Izolacja i przygotowanie DNA”, strona 19. |

Komentarze i wskazówki

Kontrola negatywna (H₂O) daje wynik pozytywny

Zanieczyszczenie krzyżowe,
zanieczyszczenie odczynnika,
błąd aparatu, zmiana miejsca
dołka lub probówki kapilarnej lub
rozkład sondy

Wymień wszystkie kluczowe odczynniki lub użyj nowego zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit.

Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze należy postępować z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.

Chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem.

Sprawdź krzywe fluorescencji pod kątem fałszywie pozytywnych odczytów.

Sprawdź konfigurację reakcji. Patrz „Protokół: Wykrywanie mutacji genów *IDH1/2*”, strona 23.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktów. Certyfikaty analiz są dostępne na żądanie pod adresem www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Ten zestaw jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

Produkt może być obsługiwany wyłącznie przez odpowiednio poinstruowany personel przeszkolony w dziedzinie technik biologii molekularnej i zaznajomiony z tą technologią.

Niniejszego zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanym aparatem wymienionym w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 12.

Należy zwracać uwagę na terminy ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit zwalidowano do użytku wyłącznie z próbkami tkanek mózgu utrwalonymi w zbuforowanej formalinie i zatopionymi w parafinie.

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit zwalidowano do użytku wyłącznie z zestawami QIAamp DNA FFPE Tissue Kit i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Zwalidowano wyłącznie aparaty Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (do reakcji PCR) i QIASymphony SP (do przygotowania próbek).

Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy QIAGEN.

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami skuteczności wykonanymi przez firmę QIAGEN.

Test jest przeznaczony do wykrywania 7 mutacji w obrębie kodonu 132. i 100. genu *IDH1* i 5 mutacji w obrębie kodonu 172. genu *IDH2*. W próbkach, dla których uzyskano wynik „no mutation detected” (nie wykryto mutacji), mogą być obecne mutacje genu *IDH1* lub genu *IDH2* niewykrywane przez to oznaczenie.

To, czy mutacja zostanie wykryta, zależy od stopnia integralności próbki, ilości tkanki nowotworowej oraz ilości obecnego DNA, który można poddać amplifikacji.

Wyniki uzyskane za pomocą tego produktu należy interpretować w kontekście stanu klinicznego pacjenta i wszystkich odnośnych wyników laboratoryjnych.

Parametry skuteczności

Granica próby ślepej (Limit of Blank, LOB)

Granice próby ślepej (Limit of Blank, LOB) określono (zgodnie z wytycznymi EP17-A CLSI/NCCLS; 14) na próbkach negatywnych (prawidłowa mózgowia tkanka FFPE, 8 próbek, 64 pomiary/serię, 2 serie).

Wyniki granicy LOB przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Granica próby ślepej (Limit of Blank, LOB)

Oznaczenie	LOB	Końcowa granica LOB
R132 Mut	Walidacja — 1. seria: 6,57 Walidacja — 2. seria: 6,32	6,32
R132H Mut	Walidacja — 1. seria: 7,91 Walidacja — 2. seria: 8,22	7,91
R132C Mut	Walidacja — 1. seria: 8,04 Walidacja — 2. seria: 8,20	8,04
R172 Mut	Walidacja — 1. seria: 7,74 Walidacja — 2. seria: 7,59	7,59
R172K Mut	Walidacja — 1. seria: 9,93 Walidacja — 2. seria: 10,58	9,93
R100 Mut	Walidacja — 1. seria: 6,52 Walidacja — 2. seria: 5,19	5,17

Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD)

Granice wykrywalności (Limit of Detection, LOD; czułość analityczna) określono na podstawie „metody profilu precyzji” opisanej w wytycznych EP17-A CLSI/NCCLS (14). Na każdą mutację używano pięć próbek niskopozytywnych (DNA plazmidowe dodane do DNA typu dzikiego wyizolowanego z tkanek glejaka) (od 30 do 110 pomiarów na typ mutacji i odsetek mutacji).

Wyniki granicy LOD przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD)

Oznaczenie	Mutacje	LOD	Punkt odcięcia oznaczenia	Czułość (%)
R132H Mut	R132H	6,87	6,87	0,78
R132C Mut	R132C	7,14	7,14	1,19
R172K Mut	R172K	8,49	8,49	0,61
R132 Mut	R132H	5,50	5,34	2,32
	R132C	5,34		4,35
	R132L	5,42		2,30
	R132G	5,61		2,23
	R132S	5,42		2,75
	R132V	5,56		2,24
R172 Mut	R172K	6,42	6,42	1,06
	R172G	6,58		3,00
	R172M	6,66		3,31
	R172S	6,42		14,93
	R172W	6,68		2,36
R100 Mut	R100Q	4,65	4,65	3,45

Mutację uznaje się za wykrytą, jeśli wartość ΔC_T jest równa granicy LOD lub mniejsza od niej.

Wpływ wejściowej ilości DNA

DNA wyizolowano z 4 różnych próbek glejaka: 2 próbek z genami *IDH1/2* typu dzikiego oraz 2 z mutacją R132H (395G>A) genu *IDH1*.

W celu oceny wpływu wejściowej ilości DNA na wyniki jakościowe przetestowano trzy różne ilości DNA (w tym ilość zalecaną dla protokołu). Wyniki wskazują, że wejściowa ilość DNA nie wpływa na wyniki jakościowe. W przypadku wejściowych ilości DNA niższych od ilości zalecanej (<25 ng DNA) obserwowano jednak więcej problemów technicznych (problemy związane z kontrolą jakości C_T Total). Mając to na uwadze, zalecana do tego testu wejściowa ilość DNA to 25 ng na objętość 5 μ l.

Powtarzalność i odtwarzalność

Badanie precyzji wykonano na 4 różnych próbkach (DNA plazmidowe dodane do DNA typu dzikiego wyizolowanego z tkanek glejaka w celu utworzenia próbek typu dzikiego (wild-type, WT), ze zmutowanymi genami i próbek odpowiadających punktom odcięcia), które testowano 40 razy w dwóch powtórzeniach ($n = 80$ pomiarów).

Odchylenia standardowe (standard deviation, SD) i współczynniki zmienności (coefficient of variation, CV) przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Wyniki badania precyzji

Oznaczenie	Próbka	Średnia wartość ΔC_T	SD_R^*	$SD_{Reakcja}^\dagger$	$SD_{Ogółem}^\ddagger$	$CV_{Ogółem}(\%)^\ddagger$	Odsetek prawidłowych wywołań
R132C Mut	WT	11,58	1,08	0,00	1,11	10	100% (78/78)
	5%	5,19	0,26	0,23	0,46	9	100% (76/76)
	10%	4,37	0,27	0,14	0,48	11	100% (78/78)
	30%	2,62	0,20	0,21	0,46	18	100% (78/78)
R132H Mut	WT	10,87	1,48	0,00	1,48	14	100% (78/78)
	5%	4,46	0,27	0,05	0,31	7	100% (78/78)
	10%	3,57	0,28	0,14	0,31	9	100% (76/76)
	30%	1,86	0,21	0,20	0,30	16	100% (72/72)
R172K Mut	WT	12,20	0,31	0,17	0,39	3	100% (66/66)
	5%	6,19	0,50	0,00	0,63	10	100% (76/76)
	10%	5,23	0,32	0,20	0,48	9	100% (76/76)
	30%	3,68	0,18	0,11	0,36	10	100% (76/76)

* R: Repeatability (powtarzalność).

† Reakcja: odtwarzalność między reakcjami.

‡ Ogółem: precyzja całkowita (w tym między aparatami, między operatorami i między seriami).

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Tabela 17. Wyniki badania precyzji (ciąg dalszy)

Oznaczenie	Próbka	Średnia wartość ΔC_T	SD_R^*	$SD_{Reakcja}^\dagger$	$SD_{Ogółem}^\ddagger$	$CV_{Ogółem}(\%)^\ddagger$	Odsetek prawidłowych wywołań
R100 Mut	WT	7,21	0,41	0,27	0,52	7	100% (70/70)
	5%	3,68	0,27	0,16	0,33	9	100% (76/76)
	10%	2,93	0,24	0,15	0,32	11	100% (76/76)
	30%	1,56	0,25	0,07	0,26	17	100% (76/76)
R132 Mut	WT	8,01	0,76	0,00	0,78	10	100% (152/152)
	R132H 5%	4,29	0,30	0,15	0,48	11	99% (151/152)
	R132C 5%	4,44	0,30	0,00	0,56	13	
	R132H 10%	3,49	0,27	0,22	0,46	13	99% (151/152)
	R132C 10%	3,69	0,27	0,23	0,53	14	
	R132H 30%	1,87	0,21	0,02	0,33	18	100% (152/152)
R132C 30%	2,00	0,26	0,28	0,59	29		
R172 Mut	WT	9,47	0,91	0,87	1,45	15	100% (66/66)
	5%	4,45	0,35	0,12	0,56	13	100% (76/76)
	10%	3,55	0,29	0,02	0,53	15	100% (76/76)
	30%	2,05	0,18	0,15	0,47	23	100% (76/76)

* R: Repeatability (powtarzalność).

† Reakcja: odtwarzalność między reakcjami.

‡ Ogółem: precyzja całkowita (w tym między aparatami, między operatorami i między seriami).

Porównanie metod

Porównanie do metody immunohistochemicznego (IHC) wykrywania mutacji *IDH1/R132H*.

Przeprowadzono badanie w celu wykazania zgodności statusu mutacji ocenianego przy użyciu zestawu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit* oraz metodą IHC (Anti-human *IDH1R132H* antibody clone H09, DIANOVA).

Do badania wybrano łącznie 103 kliniczne próbki glejaka. Najstarszy błądzek miał 10 lat.

Wszystkie próbki pomyślnie przeszły kontrolę jakości zarówno dla zestawu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*, jak i dla metody IHC.

Wyniki wskazują na zgodność procentową wyników dodatnich (positive percent agreement, PPA) na poziomie 100%, zgodność procentową wyników ujemnych (negative percent agreement, NPA) na poziomie 98% i zgodność ogółem (overall agreement, OA) na poziomie 99% (Tabela 18).

Tabela 18. Analiza zgodności między zestawem *therascreen* RGQ PCR Kit a metodą IHC

Miara zgodności	Częstość (%)	95-procentowy przedział ufności
PPA	45/45 (100%)	[92; 100]
NPA	57/58 (98%)	[91; 100]
OA	102/103 (99%)	[96; 100]

Porównanie do metody sekwencjonowania dwukierunkowego

Przeprowadzono badanie w celu wykazania zgodności statusu mutacji ocenianego przy użyciu zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit oraz metodą sekwencjonowania dwukierunkowego.

Do badania wybrano łącznie 103 kliniczne próbki nowotworowe pobrane od pacjentów chorych na glejaka. Najstarszy boleczek miał 10 lat.

Wszystkie 103 próbki pomyślnie przeszły kontrolę jakości dla zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, a w przypadku sekwencjonowania dwukierunkowego uzyskano wyniki dla 101 próbek.

Wyniki wskazują na zgodność procentową wyników dodatnich (positive percent agreement, PPA) na poziomie 100%, zgodność procentową wyników ujemnych (negative percent agreement, NPA) na poziomie 92% i zgodność ogółem (overall agreement, OA) na poziomie 96% (Tabele 19 i 20).

Tabela 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit a sekwencjonowanie dwukierunkowe

		Sekwencjonowanie dwukierunkowe Sangera				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* Wynik R132 oznacza, że w próbce wykryto mutację R132, ale nie wykryto mutacji R132H ani R132C.

† Wynik R172 oznacza, że w próbce wykryto mutację R172, ale nie wykryto mutacji R172K.

Tabela 20. Analiza zgodności z wynikami sekwencjonowania dwukierunkowego

Miara zgodności	Częstość (%)	95-procentowy przedział ufności
PPA	50/50 (100%)	[93; 100]
NPA	47/51 (92%)	[81; 97]
OA	97/101 (96%)	[90; 98]

Literatura

1. Louis, D.N. et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97.
2. Parsons, D.W. et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807.
3. Yan, H. et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**, 765.
4. Hartmann, C. et al. (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* **118**, 469.
5. Ichimura, K. et al. (2009) IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology* **11**, 341.
6. Von Deimling, A., Korshunov, A., and Hartmann, C. (2011) The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* **21**, 74.
7. Hartmann, C. et al. (2010) Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* **120**, 707.
8. Sanson, M. et al. (2009) Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4150.

-
9. Houillier, C. et al. (2010) IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* **75**, 1560.
 10. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **174**, 1149.
 11. Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6002.
 12. Weller, M. et al. (2009) Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5743.
 13. Riemenschneider, M.J., Jeuken, J.W.M., Wesseling, P., and Reifenberger, G. (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* **120**, 567.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbole

Poniższa tabela zawiera opisy symboli, które mogą znajdować się na etykietach lub w niniejszym dokumencie.



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji



Termin ważności

IVD

Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro

REF

Numer katalogowy

LOT

Numer serii

MAT

Numer materiału (tj. oznaczenie składnika)

COMP

Składniki (tj. lista zawartości)

CONT

Zawiera (zawartość)

NUM

Liczba (tj. fiołki, butelki)

Rn

R oznacza wydanie instrukcji obsługi, a n oznacza numer wydania



Globalny numer jednostki handlowej



Zakres temperatury



Producent



Zapoznać się z instrukcją użycia



Przeostoga

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Na 20 reakcji: 9 mieszanin starterów i sond, kontrola WT, kontrola pozytywna, mieszanina Master Mix, woda wolna od nukleaz	873011
Aparat Rotor-Gene Q MDx i akcesoria		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; obejmuje instalację i przeszkolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji w probówkach w układzie 72 x 0,1 ml za pomocą pipety jednokanałowej	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 1000 reakcji	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 10 000 reakcji	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — do oczyszczania genomowego DNA z tkanek zatopionych w parafinie		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Na 50 przygotowań DNA: 50 kolumn QIAamp MinElute® Columns, proteinaza K, bufony, probówki Collection Tubes (2 ml)	56404
Zestaw QIAasymphony DSP DNA Mini Kit — do automatycznego oczyszczania materiału DNA z 1–96 próbek		
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Na 192 przygotowania po 200 µl: zawiera 2 kasety z odczytnikami, statywy na enzymy i akcesoria	937236

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Aparat QIASymphony SP i akcesoria		
QIASymphony SP System	Moduł sample prep QIASymphony: obejmuje instalację i przeszkolenie oraz roczną gwarancję na części i robociznę	9001751
QIASymphony SP	Moduł sample prep QIASymphony: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-dołkowe kasety sample prep do użytku z aparatem QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Zamknięcia 8-Rod Cover do użytku z aparatem QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Jednorazowe końcówki Filter-Tip, na statywie; (8 x 128). Do użytku z aparatami QIAcube i QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Jednorazowe końcówki Filter-Tip, na statywie; (8 x 128). Do użytku z aparatami QIASymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Niesterylne probówki polipropylenowe (maksymalna pojemność 0,85 ml, pojemność przechowywania poniżej 0,7 ml, pojemność elucji 0,4 ml); 2304 w statywach po 96; wraz z paskami zatyczek	19588
Odczynniki		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 jednostek/ml, roztwór)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml buforu do lizy tkanek na 1000 przygotowań	19076

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiednich instrukcjach obsługi lub podręcznikach użytkownika zestawów QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Historia zmian dokumentu

Data	Zmiany
R5, lipiec 2020 r.	<p>Zmieniono część „Interpretacja wyników” w celu dodania informacji dotyczących klasyfikacji kontroli i próbek w zależności od wartości C_t wygenerowanej w oznaczeniu</p> <p>Zmieniono zawartość kolumny „Kontrola zawierająca geny IDH1/IDH2 WT” w Tabeli 7 pod względem wartości C_T IDH Mut R172K i ΔC_T IDH2 Mut R172K</p> <p>Zmieniono zawartość kolumn „Próbka 1” i „Próbka 2” w Tabeli 11 pod względem wartości C_T IDH1 Mut R132C, ΔC_T IDH1 Mut R132C, C_T IDH2 Mut R172K i ΔC_T IDH2 Mut R172K</p>

Strona celowo pozostawiona pusta

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie naruszają praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować ani sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji, wnosząc sprawę do dowolnego sądu, a także ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich przysługujących jej praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

Ten produkt jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Produkty firmy QIAGEN nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży lub wykorzystywane do produkcji komercyjnych produktów bez pisemnej zgody firmy QIAGEN.

Informacje zawarte w niniejszym dokumencie mogą ulec zmianie bez powiadomienia. Firma QIAGEN nie ponosi żadnej odpowiedzialności za błędy, które mogą wystąpić w niniejszym dokumencie. Dokument ten uważa się za kompletny i dokładny w momencie jego opublikowania. Firma QIAGEN nie ponosi w żadnym wypadku odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody przypadkowe, specjalne lub wynikowe ani z tytułu odszkodowań wielokrotnych w związku z niniejszym dokumentem lub jego użyciem.

Produkty firmy QIAGEN są objęte gwarancją w odniesieniu do podanych specyfikacji. Wyłącznym obowiązkiem firmy QIAGEN i jedynym zadośćuczynieniem przysługującym klientowi jest bezpłatna wymiana produktów w przypadku, gdy ich działanie nie będzie zgodne z zapisami gwarancji.

Nabywca tego produktu umożliwia zastosowanie go przez nabywcę do przeprowadzania czynności diagnostycznych w zakresie diagnostyki in vitro u ludzi. Niniejszym nie udziela się praw patentowych ani innych licencji żadnego typu poza powyższym prawem użytkowania wynikającym z nabycia produktu.

Mutacje *IDH1/2* i ich zastosowania są chronione prawami patentowymi, w tym europejskimi zgłoszeniami patentowymi EP2326735 i EP2546365, amerykańskimi zgłoszeniami patentowymi US2011229479 i US2012202207 i zagranicznymi odpowiednikami.

Zakup tego produktu nie przenosi żadnych praw do jego wykorzystania w badaniach klinicznych leków ukierunkowanych na geny *IDH1/2*. Firma QIAGEN opracowuje specjalne programy licencyjne dla takich zastosowań. Z naszym działem prawnym można skontaktować się pod adresem idliscenses@qiagen.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIASymphony® MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™ (Life Technologies Corporation); Histolemon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

