

November 2017

# Príručka k súprave *ipsogen*<sup>®</sup> PML-RARA bcr1 Kit



24

Verzia 1

Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s prístrojmi Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System, LightCycler<sup>®</sup> a SmartCycler<sup>®</sup>



672123

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden  
NEMECKO



1108718SK

# Obsah

Účel použitia .....	4
Súhrn a vysvetlenie .....	4
Princíp postupu .....	6
Dodávané materiály.....	9
<b>Obsah súpravy</b> .....	<b>9</b>
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	10
Varovania a preventívne opatrenia.....	11
<b>Všeobecné bezpečnostné opatrenia</b> .....	<b>12</b>
Skladovanie a manipulácia s reagensiami.....	13
Postup .....	14
Príprava vzorky RNA.....	14
Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC.....	14
Protokol: qPCR na prístrojoch Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor-Gene Q 5plex HRM so 72-skúmavkovým rotorom .....	17
Protokol: qPCR na prístrojoch ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480 .....	21
Protokol: qPCR na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0 .....	25
Protokol: qPCR na prístroji SmartCycler .....	29
Interpretácia výsledkov.....	33
Princíp analýzy údajov .....	33
Výsledky.....	34
Sprievodca riešením problémov .....	37

---

Kontrola kvality .....	40
Obmedzenia .....	40
Charakteristiky účinnosti.....	41
<b>Neklinické štúdie</b> .....	<b>41</b>
<b>Klinické štúdie</b> .....	<b>43</b>
Referenčná literatúra .....	47
Symboly.....	48
Informácie o objednávaní .....	49

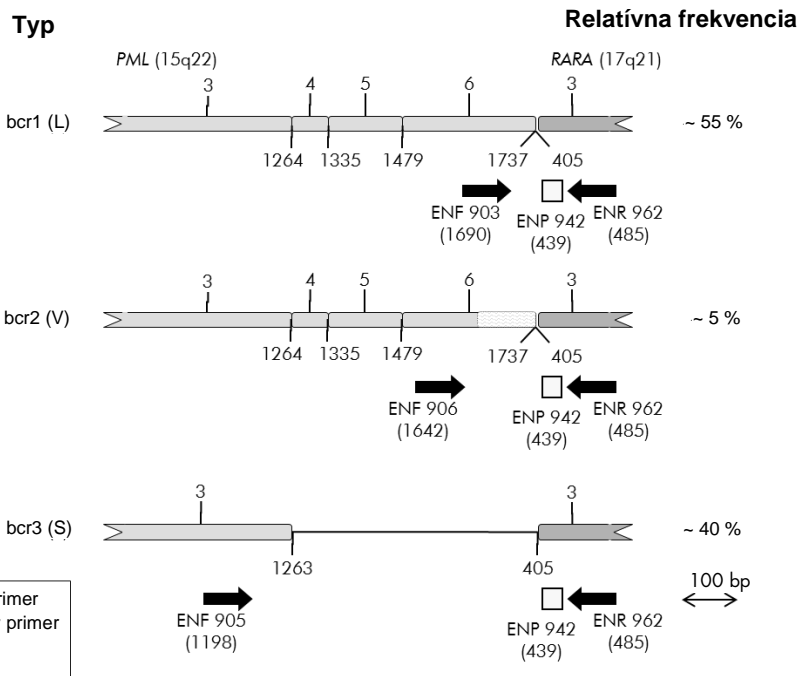
# Účel použitia

Súprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit je určená na kvantifikáciu fúzných transkriptov typu PML-RARA bcr1 vo vzorkách kostnej drene alebo periférnej krvi v podskupine pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (acute myeloid leukemia, AML) s diagnostikovanou cytomorfológiou M3 a translokáciou t(15;17)(q22;q21) s bodom zlomu do PML intrónu 6. Získané výsledky sa používajú ako pomôcka na monitorovanie účinnosti liečby u pacientov podstupujúcich liečbu a na následné monitorovanie minimálneho reziduálneho ochorenia (minimal residual disease, MRD) na sledovanie relapsu ochorenia.

## Súhrn a vysvetlenie

Transkripty fúzneho génu (fusion gene, FG) PML-RARA, ktoré sú molekulárnym výsledkom translokácie t(15;17)(q22;q21), sú spojené s väčšinou prípadov akútnej progranulocytovej leukémie (acute progranulocytic leukemia, APL) (> 90 %), osobitnou podskupinou AML s cytomorfológiou M3, ktorá predstavuje 10 – 15 % všetkých prípadov AML. Vyvážená recipročná translokácia t(15;17) vedie k fúzii génu promyelocytovej leukémie (promyelocytic leukemia, PML) s receptorom kyseliny retinovej alfa (retinoic acid receptor alpha, RARA) za vzniku fúzneho proteínu PML-RARA. Chimérický proteín PML-RARA je transkripčný represor. Jeho expresia je spojená so zhoršenou myeloidnou diferenciáciou v dôsledku zvýšenej afinity ku komplexu nukleárneho represorového proteínu (nuclear repressor protein complex, NcoR), zmeny chromatinovej štruktúry histón-deacetylázou (histone deacetylase, HDAC) a inhibície transkripcie. Liečba kyselinou all-trans retinovou (all-trans retinoic acid, ATRA) je v prípade APL vysoko účinná a pôsobí ako diferenciačné činidlo podporovaním uvoľňovania komplexu NCoR/HDAC, čím obnovuje normálnu transkripciu.

Body zlomu RARA sa vždy vyskytujú v intróne 2. V závislosti od polohy bodov zlomu v rámci miesta PML, intrónu 6, exónu 6 a intrónu 3, môžu vzniknúť príslušné podtypy transkriptu PML-RARA označované ako dlhé (L alebo bcr1), variantné (V alebo bcr2) a krátke (S alebo bcr3) (Obrázok 1). Tieto podtypy transkriptu predstavujú 55 %, 5 % a 40 % prípadov.



**Obrázok 1. Schematický diagram transkriptu PML-RARA FG pokrytého primermi EAC qPCR a súpravou prób. Pre typ bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. Pre typ bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. Pre typ bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962.**Číslo pod primermi a próbami odkazuje na ich nukleotidovú polohu v normálnej transkripcii génov. Relatívna frekvencia sa týka podielu jednotlivých typov transkriptov FG medzi variantmi PML-RARA.

Kombinovaná liečba chemoterapiou na báze antracyklínov a ATRA je u APL veľmi úspešná, poskytuje dlhotrvajúce remisie a pravdepodobné vyliečenie až u 70 % novodiagnostikovaných pacientov. Relaps a nízka miera prežitia sa však stále vyskytujú u 15 – 25 % pacientov. Detekcia jedinečného fúzneho génu PML-RARA pomocou konvenčnej kvalitatívnej reverznej transkripčnej polymerázovej reťazovej reakcie (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) sa vo veľkej miere používa na rýchlu diagnostiku a predikciu odpovede na liečbu. Táto technika má však nevýhody a jej citlivosť je pomerne nízka.

Kvantifikácia počtu kópií PML-RARA pomocou kvantitatívnej real-time PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) má niekoľko výhod. Je to vysoko citlivá a reprodukovateľná technika, ktorá umožňuje aj hodnotenie kinetiky. Analýza prognostickej hodnoty dobre zavedeného štandardizovaného protokolu qPCR (program EAC) u pacientov s APL počas rôznych fáz liečby preukázala, že tento prístup je robustnou alternatívou na hodnotenie MRD a že stratifikáciu rizika relapsu je možné stanoviť na základe normalizovaného počtu kópií PML-RA. Počas postkonsolidačnej analýzy je pozitívny test qPCR silným prediktorom následného hematologického relapsu. Počas udržiavacej liečby a po ukončení liečby je pozitívny test qPCR spojený s vyšším rizikom relapsu a kratším prežitím. Stratifikácia rizika relapsu na základe kvantifikácie počtu normalizovaných kópií (normalized copy number, NCN) PML-RARA rozdeľuje pacientov do 3 skupín: pacientov s vysokým rizikom relapsu, pacientov so stredným rizikom a pacientov s nízkym rizikom relapsu (1). Monitorovanie PML-RARA prostredníctvom citlivej detekcie transkriptu sa považuje za neoddeliteľnú súčasť celkovej stratégie liečby pri APL (podrobnosti nájdete v odkazoch 2 a 3), pričom typ a intenzita liečby sa modulujú u pacientov s rôznymi rizikami relapsu počas následných kontrol.

Štandardizácia a validácia metódy kvantifikácie MRD bola stanovená v multicentrickom projekte uskutočnenom v rámci programu EAC a publikovaná v roku 2003 (4, 5). Táto technika je základom súpravy *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit.

## Princíp postupu

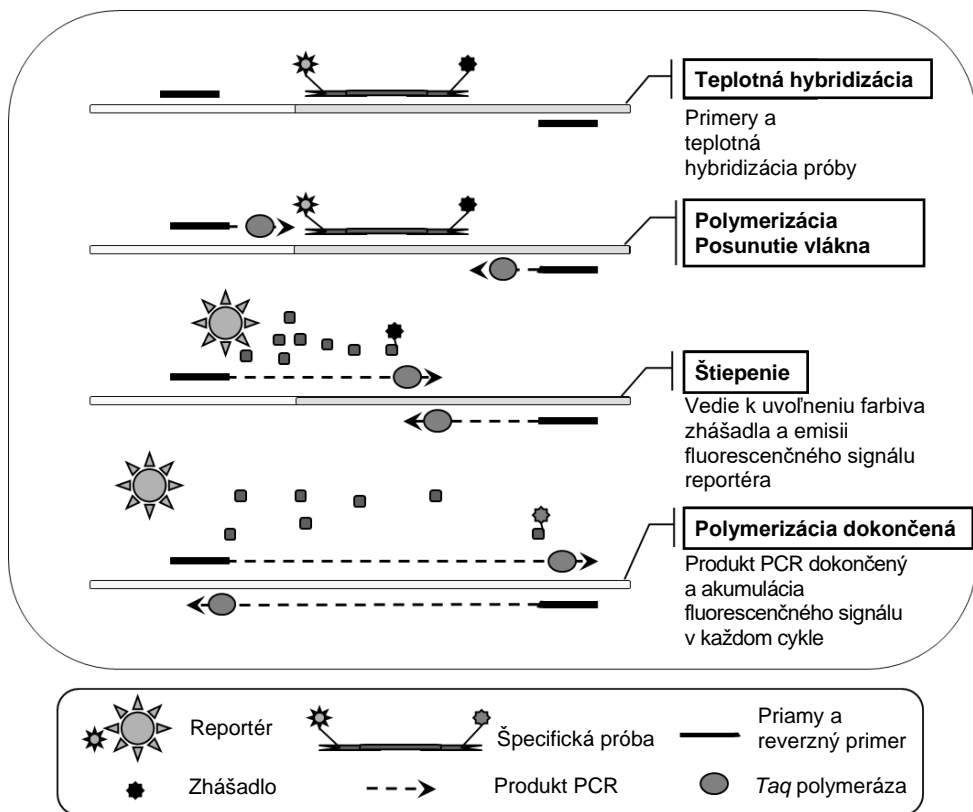
Technika qPCR umožňuje presnú kvantifikáciu produktov PCR počas exponenciálnej fázy procesu amplifikácie PCR. Okrem toho údaje qPCR je možné rýchlo získať bez spracovania po PCR, a to detekciou fluorescenčných signálov v reálnom čase počas cyklovania PCR a/alebo po ňom, čím sa významne znižuje riziko kontaminácie produktu PCR. V súčasnosti sú k dispozícii 3 hlavné typy techník qPCR: analýza qPCR pomocou zeleného farbiva SYBR® I, analýza qPCR pomocou hydrolyzačných prôb a analýza qPCR pomocou hybridizačných prôb.

---

Tento test využíva princíp hydrolýzy oligonukleotidu dvojitého farbiva qPCR. Počas PCR priame a reverzné primery hybridizujú do špecifickej sekvencie. V rovnakej zmesi je obsiahnutý oligonukleotid dvojitého farbiva. Táto próba, ktorá sa skladá z oligonukleotidu označeného farbivom 5' reportéra a za daným miestom farbivom 3' zhášadla, hybridizuje do cieľovej sekvencie v rámci produktu PCR. Analýza qPCR s hydrolyzačnými próbami využíva aktivitu exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA *Thermus aquaticus* (Taq). Keď je próba nedotknutá, blízkosť farbiva reportéra pri farbive zhášadla spôsobuje potlačenie fluorescence reportéra primárne prevodom energie Försterovho typu.

Ak je počas PCR prítomný cieľ záujmu, próba špecificky hybridizuje medzi miestami priamych a reverzných primerov. Aktivita exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA štiepi próbu medzi reportéra a zhášadla iba v prípade, keď próba hybridizuje na cieľ. Fragmenty próby sú potom z cieľa vytlačené a polymerizácia vlákna pokračuje. 3' koniec próby je blokovaný, aby sa zabránilo predĺženiu próby počas PCR (Obrázok 2). Tento proces nastane v každom cykle a nebude narušený exponenciálnou akumuláciou produktu.

Zvýšenie fluorescenčného signálu je detegované iba v prípade, že cieľová sekvencia bude komplementárna s próbou, a tým bude počas PCR amplifikovaná. Pre tieto požiadavky sa nedeteguje nešpecifickou amplifikáciou. Preto je zvýšenie fluorescence priamo úmerné cieľovej amplifikácii počas PCR.



**Obrázok 2. Princíp reakcie.** Celková RNA sa reverzne transkribuje a generovaná cDNA sa amplifikuje pomocou PCR s využitím páru špecifických primerov a špecifickej internej próby s dvojitém farbivom (FAM™–TAMRA™). Próba sa viaže na amplicón počas každého koru hybridizácie PCR. Keď sa Taq rozšíri z primerovej väzby k amplicónu, vytlačí 5' koniec próby, ktorý sa potom degraduje aktivitou exonukleázy 5'→3' polymerázy Taq DNA. Štiepenie pokračuje, pokiaľ zostávajúca próba amplicón neroztaví. Tento proces uvoľňuje do roztoku fluórofor a zhášadlo, priestorovo ich oddeľuje a vedie k zvýšeniu fluorescence spôsobenej FAM a poklesom fluorescence pochádzajúcej z TAMRA.



# Dodávané materiály

## Obsah súpravy

<b>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalógové číslo</b>		<b>672123</b>
<b>Počet reakcií</b>		<b>24</b>
<b>Komponent</b>	<b>Názov</b>	<b>Množstvo</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie kontrolného génu ABL) ( $10^3$ kópií/5 $\mu$ l)	C1-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie kontrolného génu ABL) ( $10^4$ kópií/5 $\mu$ l)	C2-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie kontrolného génu ABL) ( $10^5$ kópií/5 $\mu$ l)	C3-ABL	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu PML-RARA bcr1) ( $10^1$ kópií/5 $\mu$ l)	F1-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu PML-RARA bcr1) ( $10^2$ kópií/5 $\mu$ l)	F2-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu PML-RARA bcr1) ( $10^3$ kópií/5 $\mu$ l)	F3-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu PML-RARA bcr1) ( $10^5$ kópií/5 $\mu$ l)	F4-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu PML-RARA bcr1) ( $10^6$ kópií/5 $\mu$ l)	F5-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
Primers and Probe Mix ABL (ABL zmes primerov a prób)*	PPC-ABL 25x	90 $\mu$ l
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion (Zmes primerov a prób fúzneho génu PML-RARA bcr1)†	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 $\mu$ l
Príručka k súprave ipsogen <i>PML-RARA bcr1 Kit</i> (angličtina)		1

\* Zmes špecifických reverzných a priamych primerov pre kontrolný gén ABL plus špecifická próba FAM-TAMRA.

† Zmes špecifických reverzných a priamych primerov pre fúzny gén PML-RARA bcr1 plus špecifická próba FAM-TAMRA.

**Poznámka:** Pred použitím krátko odstredíte štandardné riedenia a zmesi primerov a prób.

# Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Overte, či boli prístroje skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

## Reagencie

- Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy
- Reagencie pre reverznú transkripciu: Validovanou reagensiou je Superscript® II (alebo Superscript) Reverse Transcriptase, obsahuje 5x pufer prvého vlákna, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. č. 18064-022)
- Inhibitor RNázy: Validovanou reagensiou je RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. č. 10777-019)
- Súbor dNTP, stupeň PCR
- Náhodný hexamér
- MgCl<sub>2</sub>
- Polymeráza pufru a Taq DNA: Validované reagensie sú TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. č. 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. č. 04535286001)

## Spotrebný materiál

- Sterilné špičky PCR pipiet bez obsahu nukleáz odolné voči aerosólom s hydrofóbnymi filtrami
- 0,5 ml alebo 0,2 ml PCR skúmavky neobsahujúce RNázu a DNázu
- Ľad

## Zariadenie

- Mikrolitrové pipety určené na PCR (1 – 10 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl)
- Stolná odstredivka s rotorom pre reakčné skúmavky s objemom 0,2 ml/0,5 ml (s maximálnymi otáčkami 13 000/14 000 ot/min)
- Prístroj na real-time PCR: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo iné prístroje Rotor Gene Q, LightCycler 1.2, 2.0, alebo 480, ABI PRISM 7000, 7700 alebo 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, alebo SmartCycler a súvisiaci špecifický materiál
- Tepelný cyklovač alebo vodný kúpeľ (krok reverznej transkripcie)

## Doplnkové reagensy

- Súprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit (kat. č. 672091) určená iba na výskumné účely obsahujúca bunkové línie s negatívnou, vysokou a nízkou pozitívnou expresiou fúzneho génu PML-RARA bcr1 na kvalitatívne overenie extrakcie RNA a reverznej transkripcie

# Varovania a preventívne opatrenia

## Na diagnostické použitie in vitro

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online vo formáte PDF na adrese **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**, kde môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť KBÚ pre jednotlivé súpravy QIAGEN a ich súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

## Všeobecné bezpečnostné opatrenia

Použitie testov qPCR si vyžaduje správne laboratórne postupy vrátane údržby zariadení, ktoré sú určené pre molekulárnu biológiu a sú v súlade s platnými predpismi a príslušnými normami.

Táto súprava je určená na diagnostické použitie *in vitro*. Reagencie a pokyny dodávané v tejto súprave boli validované pre optimálny výkon. Ďalšie riedenie reagensov alebo zmena inkubačných časov a teplôt môže viesť k chybným alebo nezhodným údajom. Ak sú reagenty PPC a PPF vystavené svetlu, môžu sa zmeniť. Všetky reagenty sú pripravené na špecifické použitie s týmto testom. Pre optimálny výkon testu by sa nemali robiť žiadne substitúcie.

Určovanie úrovne transkriptov pomocou qPCR si vyžaduje reverznú transkripciu mRNA a amplifikáciu cDNA vytvorenej pomocou PCR. Preto musí byť celý postup testu vykonaný v podmienkach bez RNázy/DNázy.

Buďte mimoriadne opatrní, aby ste zabránili:

- kontaminácii RNázy/DNázy, ktorá by mohla spôsobiť degradáciu templátovej mRNA a vytvorenej cDNA
- kontaminácii prenosom mRNA alebo PCR, ktorá by mohla viesť k falošne pozitívnemu signálu

Preto odporúčame nasledujúce.

- Pri vykonávaní testu používajte laboratórne vybavenie neobsahujúce nukleázy (napr. pipety, hroty pipiet, reakčné fľaštičky) a noste rukavice.
- Na všetky pipetovacie kroky používajte čerstvé pipetové hroty odolné voči aerosólom, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii vzoriek a reagensov.
- Pripravte predbežnú zmes PCR master s príslušným materiálom (pipety, hroty atď.) v príslušnej oblasti, kde nie sú zavedené žiadne matrice DNA (cDNA, DNA, plazmid). Šablónu pridajte do samostatnej zóny (najlepšie v samostatnej miestnosti) so špecifickým materiálom (pipety, hroty, atď.).
- So štandardnými riedeniami (C1–3 a F1–5) manipulujte v samostatnej miestnosti.

# Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Súpravy sa dodávajú na suchom ľade a po prijatí sa musia skladovať pri teplote  $-30^{\circ}\text{C}$  až  $-15^{\circ}\text{C}$ .

- Minimalizujte vystavenie zmesí primerov a prób (skúmavky PPC a PPF) svetlu.
- Pred otvorením skúmavky jemne premiešajte a odstredíte.
- Všetky komponenty súpravy skladujte v pôvodných obaloch.

Tieto podmienky skladovania platia pre otvorené aj neotvorené komponenty. Komponenty skladované za iných podmienok, ako je uvedené na štítkoch, nemusia správne fungovať a môžu nepriaznivo ovplyvniť výsledky testu.

Dátum expirácie pre každú reagenciu je uvedený na štítkoch jednotlivých komponentov. Za správnych skladovacích podmienok si produkt zachová svoju výkonnosť až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku.

Neexistujú žiadne zjavné znaky naznačujúce nestabilitu tohto produktu. Pozitívne a negatívne kontroly by sa však mali vykonávať súčasne s neznámymi skúšobnými vzorkami.

# Postup

## Príprava vzorky RNA

Príprava RNA zo vzoriek od pacientov (krv alebo kostná dreň) musí byť vykonaná overeným postupom. Kvalita testu veľmi závisí od kvality vstupnej RNA. Preto pred analýzou odporúčame vymedziť purifikovanú RNA elektroforézou na agarózovom\* géli alebo použitím Agilent® Bioanalyzer®.

## Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Pripravte dNTP, 10 mM každý. Skladujte pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v alikvótach.
- Pripravte náhodný hexamér, 100  $\mu\text{M}$ . Skladujte pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v alikvótach.
- Pripravte  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM. Skladujte pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v alikvótach.

### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Inkubujte 1  $\mu\text{g}$  RNA (1 – 4  $\mu\text{l}$ ) 10 minút pri teplote  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a okamžite ju ochladte na ľade v priebehu 5 minút.
3. Krátko odstredujte (približne 10 sekúnd pri otáčkach 10 000 ot/min), aby sa zozbierala kvapalina v spodnej časti skúmavky. Potom držte na ľade.
4. Pripravte nasledujúcu zmes RT podľa počtu spracovávaných vzoriek (Tabuľka 1).

\* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare.

**Tabuľka 1. Príprava zmesi RT**

Komponent	Objem na vzorku (µl)	Konečná koncentrácia
Pufer prvého vlákna (dodávaný s produktom Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM každý, musia byť vopred pripravené a skladované pri teplote –20 °C v alikvótach)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, dodávané s produktom Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
Inhibítór RNázy (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Inhibítór RNázy (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Náhodný hexamér (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II alebo Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Zahrievaná vzorka RNA (pridá sa v kroku 5)	1,0 – 4,0	50 ng/µl
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy (pridá sa v kroku 5)	0,0 – 3,0	–
Konečný objem	20,0	–

5. Napipetujte 16 µl zmesi RT do každej skúmavky PCR. Potom pridajte 1 – 4 µl (1 µg) RNA (z kroku 3) a upravte objem na 20 µl vodou PCR stupňa bez obsahu nukleázy (pozri Tabuľka 2).

**Tabuľka 2. Príprava reakcie reverznej transkripcie**

Komponent	Objem (µl)
Zmes RT	16
Zahrievaná vzorka RNA (1 µg)	1 – 4
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	0 – 3
Konečný objem	20

- 
6. Dobre premiešajte a krátko odstredujte (približne 10 sekúnd pri 10 000 ot/min), aby sa zozbierala kvapalina v spodnej časti skúmavky.
  7. Inkubujte pri teplote 20 °C po dobu 10 minút.
  8. Inkubujte pri teplote 42 °C na tepelnom cyklovači 45 minút, potom okamžite 3 minúty pri teplote 99 °C.
  9. 5 minút ochladzujte na ľade (aby sa zastavila reakcia).
  10. Krátko odstredujte (približne 10 sekúnd pri 10 000 ot/min), aby sa zozbierala kvapalina v spodnej časti skúmavky. Potom držte na ľade.
  11. Konečnú cDNA rozriedte 30 µl vody PCR stupňa bez obsahu nukleázy, aby bol konečný objem 50 µl.
  12. Vykonať PCR podľa nasledujúcich protokolov v súlade s vaším prístrojom na qPCR.



## Protokol: qPCR na prístrojoch Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor-Gene Q 5plex HRM so 72-skúmvkovým rotorom

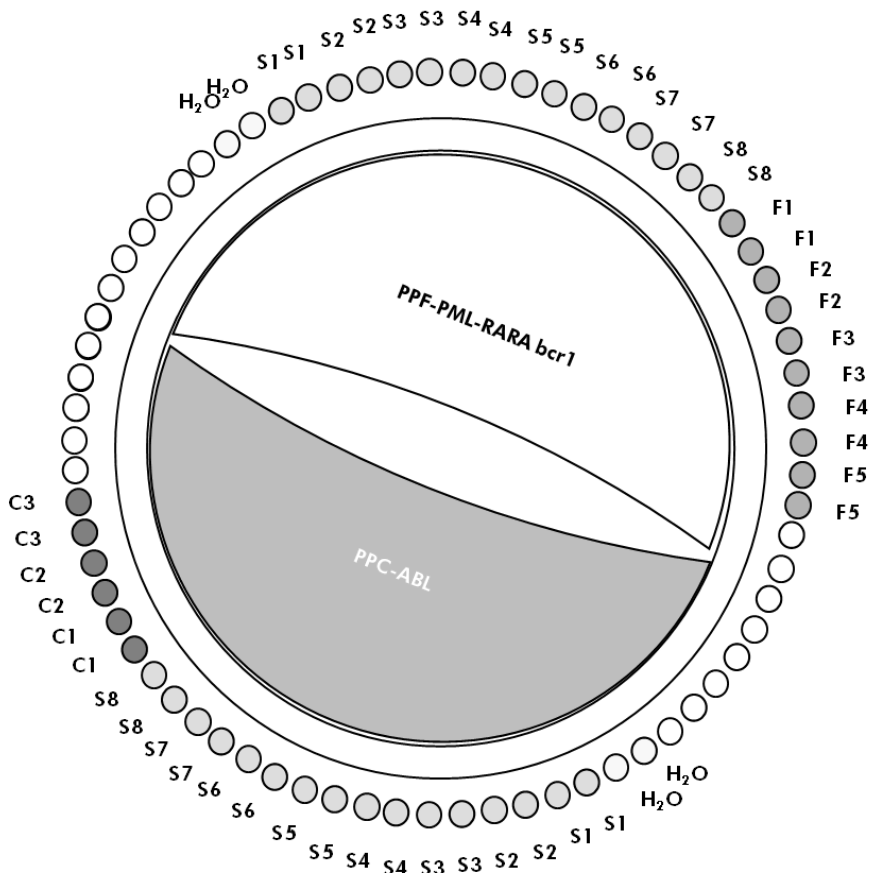
Pri použití tohto prístroja sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 3.

**Tabuľka 3. Počet reakcií pre prístroje Rotor-Gene Q so 72-skúmvkovým rotorom**

Vzorky	Reakcie
<b>S primermi ABL a zmesou prób (PPC-ABL)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	2 x 3 reakcie (3 zriedenia, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie
<b>S primermi PML-RARA bcr1 a zmesou prób (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard PML-RARA	2 x 5 reakcií (5 zriedení, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie

### Spracovanie vzoriek inštrumentmi Rotor-Gene Q so 72-skúmvkovým rotorom

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 8 vzoriek cDNA s cieľom optimalizovať používanie štandardov a primerov a zmesí prób.



**Obrázok 3. Navrhované nastavenie rotora pre jednotlivé experimenty s *ipsogen* PML-RARA *bcr1* Kit.**

F1–5: Štandardy PML-RARA *bcr1*; C1 – 3: Štandardy ABL; S: vzorka cDNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

**Poznámka:** Vzorku, ktorá sa má testovať, vždy umiestnite do polohy 1 rotora. Inak počas kalibračného kroku prístroj nevykoná kalibráciu a získajú sa nesprávne údaje o fluorescencii.

Vyplňte všetky ostatné polohy prázdnyimi skúmavkami.

## qPCR na prístroji Rotor-Gene Q so 72-skúmvkovým rotorom

**Poznámka:** Vykonaajte všetky kroky na ľade.

### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 4 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagencií, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a prôb (PPC-ABL alebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 4. Príprava zmesi qPCR**

Komponent	1 reakcia (µl)	ABL: 24 + 1 reakcií (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reakcií (µl)	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primery a zmes prôb, 25x	1	25	29	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na skúmavku.
4. Pridajte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného z reverznej transkripcie (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 14) do príslušnej skúmavky (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Skúmavky umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
7. Naprogramujte prístroj Rotor-Gene Q a program tepelného cyklovača, ako je uvedené v Tabuľke 5.

#### Tabuľka 5. Teplotný profil

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Kvantifikácia
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 50 stup. Čas: 2 min
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95 stup. Čas: 10 min
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 stup. na 15 s 60 stup. na 1 min so získaním fluorescence FAM v kanáli zelenom: Jednotlivý

8. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 5.
9. V prípade prístrojov Rotor-Gene Q zvolte na analýzu možnosť „Slope Correct“ (Sklon správny). Odporúčame nastaviť prah na hodnotu 0,03.

## Protokol: qPCR na prístrojoch ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

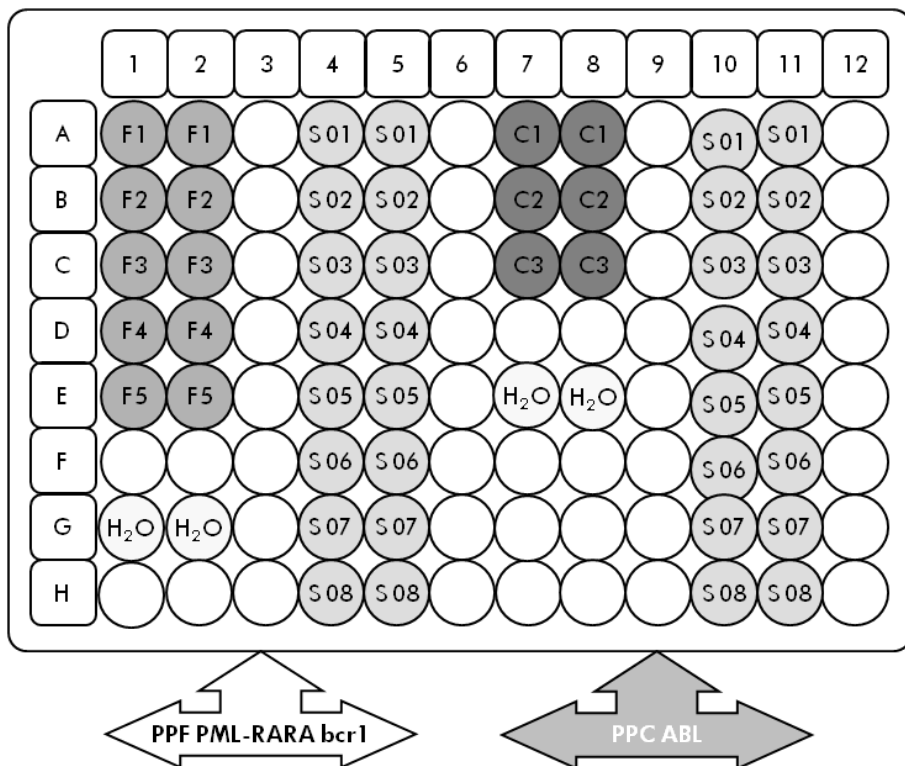
Pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 6.

**Tabuľka 6. Počet reakcií pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami**

Vzorky	Reakcie
<b>S primermi ABL a zmesou prób (PPC-ABL)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	2 x 3 reakcie (3 zriedenia, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie
<b>S primermi PML-RARA bcr1 a zmesou prób (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard PML-RARA	2 x 5 reakcií (5 zriedení, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie

Spracovanie vzoriek v prístrojoch ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 8 vzoriek cDNA s cieľom optimalizovať používanie štandardov a primerov a zmesí prób. Schéma doštičiek na obrázku 4 znázorňuje príklad takéhoto experimentu.



**Obrázok 4. Navrhované nastavenie doštičiek pre jeden experiment.** S: vzorka cDNA; F1 – 5: Štandardy PML-RARA bcr1; C1 – 3: Štandardy ABL; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

qPCR na prístrojoch ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

**Poznámka:** Vykonajte všetky kroky na ľade.

### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 7 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a prób (PPC-ABL alebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 7. Príprava zmesi qPCR**

Komponent	1 reakcia (µl)	ABL: 24 + 1 reakcií (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reakcií (µl)	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primery a zmes prób, 25x	1	25	29	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na jednu jamku.
4. Pridajte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v reverznej transkripcii (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 14) v príslušnej jamke (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Zatvorte platňu a krátko odstredujte (300 x g, približne 10 sekúnd).
7. Platňu umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.

Naprogramujte tepelný cyklovač na program teplotného cyklovania, ako uvádza Tabuľka 8 pre prístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System alebo ako uvádza Tabuľka 9 pre prístroj LightCycler 480.

**Tabuľka 8. Teplotný profil pre ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Štandardná krivka – Absolútna kvantifikácia
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 50 °C Čas: 2 minúty
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95 °C Čas: 10 minút
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 60 °C 1 minútu so získaním fluorescence FAM; zhášadlo: TAMRA

**Tabuľka 9. Teplotný profil pre prístroj LightCycler 480**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Absolútna kvantifikácia („Abs Quant“)
<b>Detection formats (Formáty detekcie)</b>	V okne Formáty detekcie vyberte možnosť „Simple Probe“ (Jednoduchá próba)
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 50 °C Čas: 2 minúty
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95 °C Čas: 10 minút
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 60 °C 1 minútu so získaním fluorescence FAM, čo zodpovedá (483–533 nm) pri LC verzii 01 a (465–510 nm) pri LC verzii 02



8. V prípade prístrojov ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System pokračujte krokom 8a. V prípade prístroja LightCycler 480 pokračujte krokom 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Odporúčame nastaviť prah na hodnotu 0,1, ako je opísané v protokole EAC v kroku analýzy a základné hodnoty nastaviť medzi cyklami 3 a 15. Spustíte program cyklovania podľa údajov v Tabuľke 8.
- 8b. LightCycler 480: Odporúčame režim analýzy Fit point s pozadím nastaveným na hodnotu 2,0 a prahovou hodnotou 2,0. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 9.

## Protokol: qPCR na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0

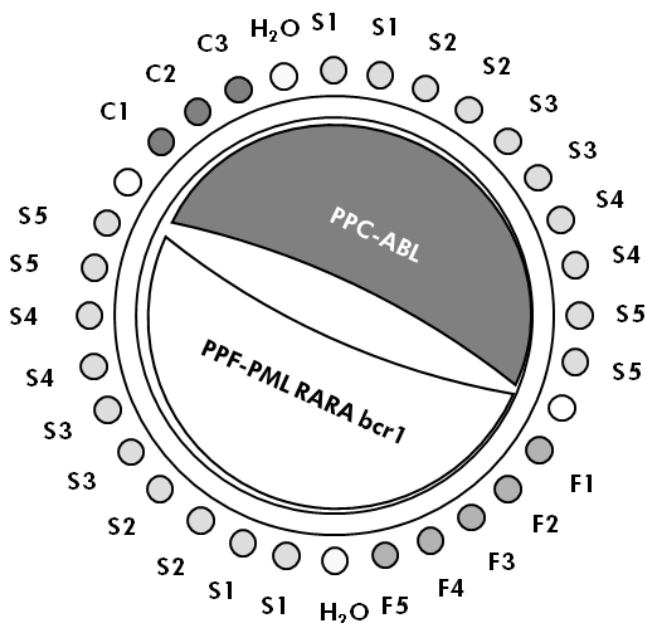
Odporúčame merať vzorky dvakrát pomocou kapilárnych nástrojov a kontrolovať ich len raz, ako je uvedené v Tabuľke 10.

**Tabuľka 10. Počet reakcií pre prístroje LightCycler 1.2 a 2.0**

Vzorky	Reakcie
<b>S primermi ABL a zmesou prób (PPC-ABL)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	1 x 3 reakcie (3 štandardné zriedenia, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia
<b>S primermi PML-RARA bcr1 a zmesou prób (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard PML-RARA	1 x 5 reakcií (5 štandardných zriedení, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia

## Spracovanie vzoriek na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 5 vzoriek cDNA na optimalizovanie používania štandardov a primerov a zmesí prób. Kapilárna schéma na obrázku 5 znázorňuje príklad experimentu.



**Obrázok 5.** Navrhované nastavenie rotora pre jednotlivé experimenty s *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit*. F1–5: Štandardy PML-RARA bcr1; C1 – 3: Štandardy ABL; S: neznáma vzorka DNA určená na analýzu; H2O: kontrola vody.

## qPCR na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0

**Poznámka:** Pre osobitné technologické požiadavky sa musia experimenty na prístroji LightCycler vykonávať s použitím špecifických reagensí. Odporúčame použiť LightCycler TaqMan Master a pri príprave Master Mix 5x postupovať podľa odporúčaní výrobcu.

**Poznámka:** Vykonajte všetky kroky na ľade.

## Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.  
Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 11 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 20 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a prób (PPC-ABL alebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 11. Príprava zmesi qPCR**

Komponent	1 reakcia (µl)	ABL: 14 + 1 reakcií (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reakcií (µl)	Konečná koncentrácia
Čerstvo pripravená hlavná zmes LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Primery a zmes prób, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	10,2	153,0	173,4	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	20	20 každá	20 každá	–

3. Dispenzujte 15 µl predbežnej zmesi qPCR na kapiláru.
4. Pridajte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného z reverznej transkripcie (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 14) do príslušnej skúmavky (celkový objem 20 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.

6. Vložte kapiláry do adaptérov dodaných s prístrojom a krátko odstredíte (700 x g, približne 10 sekúnd).
7. Vložte kapiláry do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
8. Naprogramujte prístroje LightCycler 1.2 alebo 2.0 programom tepelného cyklovania, ako uvádza Tabuľka 12.

**Tabuľka 12. Teplotný profil**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Kvantifikácia
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 95 °C Čas: 10 minút Sklon: 20
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 10 sekúnd; sklon: 20 60 °C 1 minútu; sklon: 20; so získaním fluorescencie FAM: Jednotlivý
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	45 °C 1 minútu; sklon: 20

9. V prípade prístroja LightCycler 1.2 pokračujte krokom 9a. V prípade prístroja LightCycler 2.0 pokračujte krokom 9b.
  - 9a. LightCycler 1.2: Odporúča sa F1/F2 a režim „2nd derivative analysis“ (analýza založená na 2. derivácii). Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 12.
  - 9b. LightCycler 2.0: Odporúčame použiť Automatizovanú (F<sup>''</sup>max) analýzu na prístroji LightCycler 2.0 s verziou softvéru 4.0 na získanie reprodukovateľných výsledkov. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 12.

## Protokol: qPCR na prístroji SmartCycler

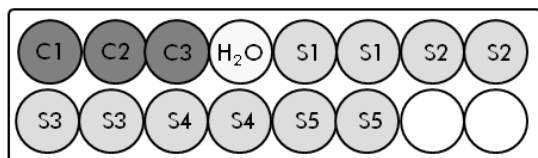
Odporúčame merať vzorky pomocou tohto prístroja dvakrát a kontrolovať ich len raz, ako je uvedené v Tabuľke 13.

**Tabuľka 13. Počet reakcií pre prístroj SmartCycler**

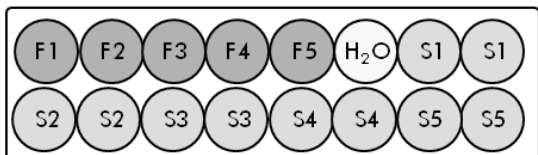
Vzorky	Reakcie
<b>S primermi ABL a zmesou prób (PPC-ABL)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	1 x 3 reakcie (3 štandardné zriedenia, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia
<b>S primermi PML-RARA bcr1 a zmesou prób (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard PML-RARA	1 x 5 reakcií (5 štandardných zriedení, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia

### Spracovanie vzoriek na prístroji SmartCycler

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 5 vzoriek cDNA na optimalizovanie používania štandardov a primerov a zmesí prób. Dvojbloková schéma na obrázku 6 znázorňuje príklad.



Všetky testy v tomto prvom bloku sú vykonané pomocou PPC-ABL.



Všetky testy v tomto druhom bloku sú vykonané pomocou PPF-PML-RARA bcr1.

**Obrázok 6. Navrhované nastavenie doštičiek pre jeden experiment.** S: vzorka cDNA; F1 – 5: Štandardy PML-RARA bcr1; C1 – 3: Štandardy ABL; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

## qPCR na prístroji SmartCycler

**Poznámka:** Vykonajte všetky kroky na ľade.

### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 14 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25  $\mu$ l. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a prób (PPC-ABL alebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 14. Príprava zmesi qPCR**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakcia (µl)</b>	<b>ABL: 14 + 1 reakcií (µl)</b>	<b>PML-RARA bcr1: 16 + 1 reakcií (µl)</b>	<b>Konečná koncentrácia</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primery a zmes prób, 25x	1	15	17	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	97,5	110,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na jednu jamku.
4. Pridajte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného z reverznej transkripcie (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 14) do príslušnej skúmavky (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Vložte vzorky do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
7. Naprogramujte prístroj SmartCycler a program tepelného cyklovača, ako je uvedené v Tabuľke 15.

**Tabuľka 15. Teplotný profil**

<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota 50 °C Čas: 2 minúty
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95 °C Čas: 10 minút
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 60 °C 1 minútu so získaním: Jednotlivý

8. Odporúčame prah nastavený na hodnotu 30. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 15.



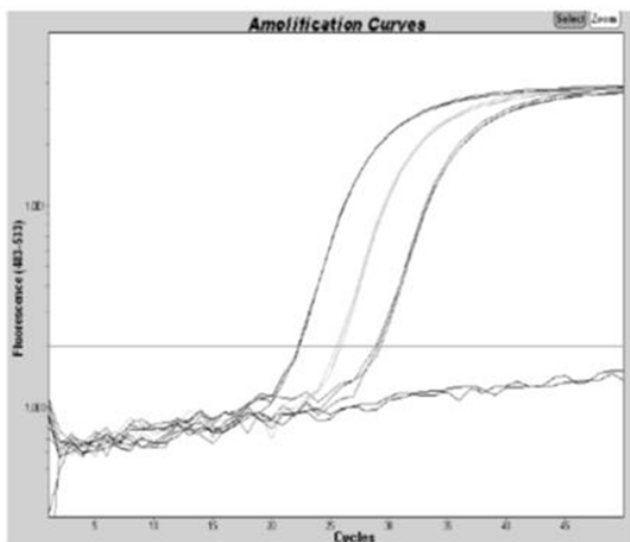
# Interpretácia výsledkov

## Princíp analýzy údajov

Pri použití technológie TaqMan sa počet cyklov PCR potrebných na detekciu signálu nad prahovou hodnotou nazýva prahový cyklus ( $C_T$ ) a je priamo úmerný množstvu prítomnej cieľovej látky na začiatku reakcie.

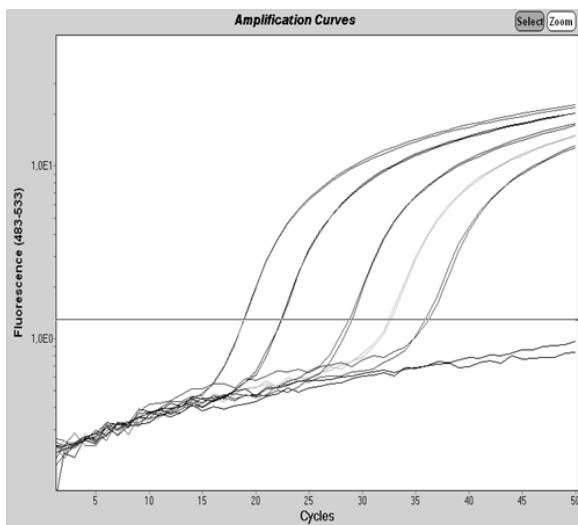
Pomocou štandardov so známym počtom molekúl môžeme vytvoriť štandardnú krivku a určiť presné množstvo prítomnej cieľovej látky v testovanej vzorky. Štandardné krivky *ipsogen* sú založené na plazmidoch a používajú 3 plazmidové štandardné riedenia pre kontrolný gén ABL (control gene, CG) a 5 štandardných riedení pre fúzny gén (PML-RARA bcr1), aby boli zabezpečené presné štandardné krivky. Obrázky 7 a 8 zobrazujú príklad amplifikačných kriviek TaqMan získaných pomocou súpravy *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit.

- ABL  $10^3$
- ABL  $10^4$
- ABL  $10^5$



Obrázok 7. Detekcia štandardov ABL (C1, C2, C3).  $10^3$ ,  $10^4$  a  $10^5$  kópií/5  $\mu$ l.

- PML-RARA bcr1 10<sup>1</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>2</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>3</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>5</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>6</sup>



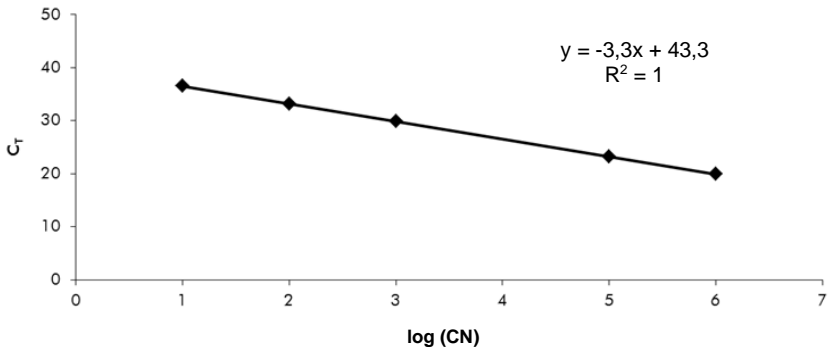
Obrázok 8. Detekcia štandardov PML-RARA bcr1 (F1 – F5). 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> kópií/5 µl.

## Výsledky

### Štandardná krivka a kritériá kvality

Nespracované údaje možno vložiť do súboru Excel® na analýzu.

Pre každý gén (ABL a PML-RARA) sa nespracované hodnoty C<sub>T</sub> získané z rozriedenia plazmidových štandardov vyznačujú podľa logaritmu počtu kópií (3, 4 a 5 pre C1, C2 a C3; 1, 2, 3, 5 a 6 pre F1, F2, F3, F4 a F5). Obrázok 9 znázorňuje príklad teoretickej krivky vypočítanej z 5 štandardných zriedení.



**Obrázok 9. Teoretická krivka vypočítaná z 5 štandardných zriedení.** Krivka lineárnej regresie ( $y = ax + b$ ) sa vypočíta pre každý gén (ABL a PML-RARA), pri ktorom je  $a$  sklon priamky a  $b$  je priesečník s osou  $y$ , ktorá je súradnicou bodu  $y$ , v ktorom priamka pretína os  $y$ . Jej rovnica a koeficient stanovenia ( $R^2$ ) sa vytlačia na grafe.

Keďže štandardy predstavujú desaťnásobné zriedenia, teoretický sklon krivky je  $-3,3$ . Sklon od  $-3,0$  do  $-3,9$  je akceptovateľný, pokiaľ je  $R^2 > 0,95$  (6). Pre presné výsledky je však žiadúca hodnota  $R^2 > 0,98$  (7).

### Normalizovaný počet kópií (Normalized copy number, NCN)

Na transformovanie nespracovaných hodnôt  $C_T$  (získaných pomocou PPC-ABL) pre neznáme vzorky na počet kópií ABL ( $ABL_{CN}$ ) je potrebné použiť rovnicu štandardnej krivky ABL.

Na transformovanie nespracovaných hodnôt  $C_T$  (získaných pomocou PPPF-PML-RARA) pre neznáme vzorky na počet kópií PML-RARA ( $PML-RARA_{CN}$ ) je potrebné použiť rovnicu štandardnej krivky PML-RARA.

Pomer týchto hodnôt vyjadrujúcich počet kópií CN predstavuje normalizovaný počet kópií (Normalized Copy Number, NCN):

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

## Hodnota MRD

Hodnota minimálneho zvyškového ochorenia (Minimal Residual Disease, MRD) predstavuje pomer medzi normalizovanou expresiou fúzneho génu z hľadiska kontrolného génu pri následnej kontrole  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$  a v diagnostických vzorkách  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ .

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

## Citlivosť

Citlivosť ( $SENS_V$ ) sa vypočíta podľa relatívnej expresie fúzneho génu FG pri diagnóze  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$  a expresie CG ( $CG_{CN,FUP}$ ) vo vzorke následnej kontroly.

$$\text{Citlivosť (SENS}_V\text{)} = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

## Kontrola kvality z hodnôt ABL

Slabá kvalita RNA alebo problémy počas krokov qPCR vedú k nízkemu počtu  $ABL_{CN}$ . Odporúčame odmietnuť výsledky zo vzoriek s hodnotou  $ABL_{CN} < 1318$  (nižšia hodnota 95 % CI zo vzoriek pacientov v štúdií EAC, referencia 5).

## Reprodukovateľnosť medzi replikátmi

Variácia hodnôt  $C_T$  medzi replikátmi by mala byť  $< 2$ , čo zodpovedá 4-násobnej zmene hodnôt počtu kópií.

Variácia hodnôt  $C_T$  medzi replikátmi je vo všeobecnosti  $< 1,5$ , ak je stredná hodnota  $C_T$  replikátov  $< 36$  (6).

**Poznámka:** Každý používateľ by si mal merať svoju vlastnú reprodukovateľnosť vo svojom laboratóriu.

## Kontroly vody

Negatívne kontroly musia mať nulový počet kópií.

Positívna kontrola vody vyplýva z krížovej kontaminácie. Riešenie nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“ uvedenej ďalej.

## Spríevodca riešením problémov

Tento spríevodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Ďalšie informácie získate od koordinátora klinických skúšaní alebo na webovej stránke [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

### Komentáre a návrhy

---

#### Negatívny výsledok pre kontrolný gén (ABL) a PML-RARA bcr1 vo všetkých vzorkách – štandard je v poriadku

- |  |  |
|--|--|
| a) Slabá kvalita RNA                     | Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.<br><br>Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091*). |
| b) Zlyhanie kroku reverznej transkripcie | Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.<br><br>Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091*). |

#### Negatívny výsledok pre kontrolný gén (ABL) vo vzorkách – štandard je v poriadku

- |  |  |
|--|--|
| a) Slabá kvalita RNA                     | Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.<br><br>Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091*). |
| b) Zlyhanie kroku reverznej transkripcie | Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.<br><br>Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091*). |

#### Štandardný signál negatívny

- |                      |  |
|----------------------|--|
| a) Chyba pipetovania | Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.<br>Zopakujte cyklus PCR. |
|----------------------|--|

## Komentáre a návrhy

- b) Nesprávne skladovanie komponentov súpravy
- Súpravu *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit skladujte pri teplote od  $-15$  do  $-30$  °C a zmesi primerov a prób (PPC a PPF) uchovávajte chránené pred svetlom. Pozrite si časť „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“ na strane 13.
- Vyhňte sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.
- Alikvotné reagensie na skladovanie.

### Negatívne kontroly sú pozitívne

#### Krížová kontaminácia

Vymeňte všetky kritické reagensie.

Experiment opakujte s novými alikvótnymi všetkých reagensíí.

So vzorkami, komponentmi súpravy a spotrebným materiálom vždy zaobchádzajte v súlade so všeobecne uznávanými postupmi, aby ste zabránili kontaminácii pri prenose.

### Žiaden signál, ani pri štandardných kontrolách

- a) Chyba pipetovania alebo vynechanie reagensíí
- Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.
- Zopakujte cyklus PCR.
- b) Inhibičné účinky materiálu vzorky spôsobené nedostatočnou purifikáciou
- Zopakujte prípravu RNA.
- c) LightCycler: Bol zvolený nesprávny detekčný kanál
- Nastavte nastavenie kanálov na F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Nie je naprogramovaná žiadna akvizícia údajov
- Skontrolujte programy cyklov.
- Vyberte režim akvizície „single“ (jednotlivý) na konci každého segmentu hybridizácie primerov programu PCR.

### Chýbajúci alebo slabý signál vo vzorkách, ale štandardné kontroly sú v poriadku

- a) Slabá kvalita RNA alebo nízka koncentrácia
- Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
- Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091\*).

## Komentáre a návrhy

- |  |  |
|--|--|
| b) Zlyhanie kroku reverznej transkripcie | Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.<br><br>Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA ( <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091*). |
|--|--|

### Intenzita fluorescencie je príliš nízka

- |  |  |
|--|--|
| a) Nesprávne skladovanie komponentov súpravy   | Súpravu <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit skladujte pri teplote od $-15$ do $-30$ °C a zmesi primerov a prób (PPC a PPF) uchovávajte chránené pred svetlom. Pozrite si časť „Skladovanie a manipulácia s reagentami“ na strane 13.<br><br>Vyhnite sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.<br><br>Alikvotné reagentie na skladovanie. |
| b) Veľmi malé počiatkové množstvo cieľovej RNA | Zvýšte množstvo vzoriek RNA.<br><br><b>Poznámka:</b> V závislosti od zvolenej metódy prípravy RNA sa môžu vyskytnúť inhibičné účinky.  |

### LightCycler: Intenzita fluorescencie sa líši

- |  |   |
|--|---|
| a) Chyba pipetovania                               | Variabilitu spôsobenú tzv. „chybou pipetovania“ je možné znížiť analýzou údajov v režime F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.   |
| b) Nedostatočné odstredenie kapilár                | Prípravená zmes PCR môže byť ešte vždy v hornej nádobe kapiláry, alebo môže byť v kapilárnom hrote zachytená vzduchová bublina.<br><br>Kapiláry naplnené reakčnou zmesou vždy odstredte, ako je to opísané v osobitnom návode na obsluhu prístroja. |
| c) Vonkajší povrch kapilárneho hrotu je znečistený | Pri manipulácii s kapilármi vždy noste rukavice.  |

### LightCycler: Chyba štandardnej krivky

- |                   |   |
|-------------------|---|
| Chyba pipetovania | Variabilitu spôsobenú tzv. „chybou pipetovania“ je možné znížiť analýzou údajov v režime F1/F2 alebo 530 nm/640 nm. |
|-------------------|---|

**\*Poznámka:** Súprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091, je určená len na výskumné účely. Nie je určená na diagnostické postupy. Žiadne tvrdenie ani vyhlásenie nie sú určené na poskytnutie informácií o diagnostike, prevencii alebo liečbe ochorenia.

## Kontrola kvality

Kontrola kvality celej súpravy bola vykonaná na prístroji LightCycler 480. Táto súprava je vyrobená v súlade s normou ISO 13485:2003. Osvedčenia o analýze sú k dispozícii na požiadanie na stránke [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Obmedzenia

Pred použitím tohto zariadenia musia byť používatelia zaškolení a oboznámení s touto technológiou. Táto súprava by sa mala používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s overeným prístrojom uvedeným v „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“, strana 10.

Všetky získané diagnostické výsledky sa musia interpretovať v spojení s inými klinickými alebo laboratórnymi nálezmi. Používateľ je zodpovedný za overenie výkonu systému pre všetky postupy používané v jeho laboratóriu, na ktoré sa nevzťahujú štúdie výkonnosti QIAGEN.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte expirované komponenty.

**Poznámka:** Táto súprava bola navrhnutá v súlade so štúdiami programu „Európa proti rakovine“ (Europe Against Cancer, EAC) (4, 5). Mala by sa používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s validovanými reagensiami a prístrojmi. Používanie tohto produktu spôsobom, ktorý nie je v súlade s príručkou, a/alebo modifikácia komponentov ruší zodpovednosť spoločnosti QIAGEN.



# Charakteristiky účinnosti

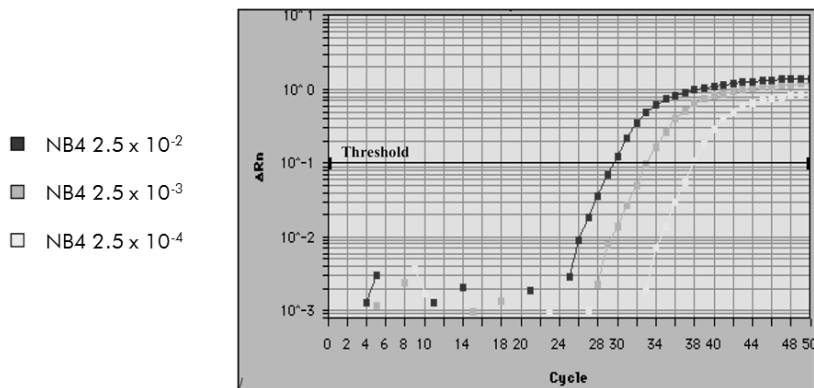
## Neklinické štúdie

### Materiály a metódy

Hodnotenie účinnosti bolo vykonané na prístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinácii s reagenciami uvedenými v časti „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 10. Štúdie rovnocennosti potvrdili jej použitie na nasledujúcich prístrojoch: ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, Rotor-Gene 3000 a SmartCycler.

Vykonal sa neklinické štúdie s cieľom stanoviť analytickú výkonnosť súpravy *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit. Tieto neklinické laboratórne štúdie boli vykonané na celej RNA z bunkovej línie NB4 zriedenej v stálom konečnom množstve celkovej RNA bunkovej línie MV4-11.

Na určenie opakovateľnosti testu bolo analyzovaných 5 rôznych koncentrácií celkovej RNA línie NB4 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg a 0,5 pg) zriedenej v celkovej RNA línie MV4-11 v stálom konečnom celkovom množstve 200 ng v 5 replikátoch na cyklus a v 4 rôznych cykloch. Vzorok s hmotnosťou 5 pg a 0,5 pg NB4 RNA v MV4-11 RNA boli príliš malé na to, aby poskytli výsledky (Obrázok 10).



**Obrázok 10.** Amplifikácia vytvára krivku zriedení  $2,5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2,5 \times 10^{-3}$  (0,5 ng) a  $2,5 \times 10^{-4}$  (0,05 ng) celkovej RNA línie NB4 v celkovej RNA negatívnej na líniu MV4-11.

## Analytické údaje

V tabuľkách 16 – 19 sú uvedené medzilaboratórne testy so stredným prahovým cyklom ( $C_T$ ), štandardnou odchýlkou (standard deviation, SD), počtom vzoriek (n), koeficientom variácie (coefficient of variation, CV), stredným počtom kópií (copy number, CN) a stredným normalizovaným počtom kópií (normalized copy number, NCN).

**Tabuľka 16. Medzilaboratórny a vnútro laboratórny test – bunkové línie PML-RARA a ABL**

Bunková línia	Zriedenie	Medzilaboratórny test				Vnútro laboratórny test	
		Stredná $C_T$	SD	n	CV (%)	Stredný CV	Max. CV
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	–	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

**Tabuľka 17. Medzilaboratórny test – plazmidy**

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

**Tabuľka 18. Medzilaboratórny test – bunkové línie PML-RARA bcr1 a ABL (stredný CN)**

Bunková línia	Zriedenie	Stredný CN	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 µg)	583,95	149,19	20	25,55
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	44,98	12,25	20	27,23
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	4,91	1,55	19	31,52
ABL	–	35 171,47	22 448,3	99	63,83

**Tabuľka 19. Medzilaboratórny test – bunková línia PML-RARA bcr1 (stredný NCN)**

Bunková línia	Zriedenie	Stredný NCN*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 µg)	271,4	150,00	20	55,56
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14

\* Iba pre výsledky týchto štúdií je NCN uvedený ako  $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$

## Klinické štúdie

Hodnotenie účinnosti bolo vykonané na prístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinácii s reagensiami uvedenými v časti „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 10. Štúdie rovnocennosti potvrdili jej použitie na nasledujúcich prístrojoch: ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, Rotor-Gene 3000 a SmartCycler.

Skupina 26 laboratórií v 10 európskych štátoch, ktoré sú zoskupené v programe EAC, zosúladiť svoj postup a použila plazmidy dodané spoločnosťou *ipsogen* na vytvorenie štandardizovaného protokolu analýzy qPCR hlavných fúzných génov spojených s leukémiou v klinickom prostredí. Jedným z fúzných génov (fusion genes, FG) zahrnutých do tejto štúdie bol transkript PML-RARA bcr1. Predkladáme vám zhrnutie tejto overovacej štúdie, jej úplné výsledky už boli zverejnené v roku 2003 (4, 5).

### Medzilaboratórna reprodukovateľnosť pre štandardy plazmidov CG a FG

Celkovo 11 laboratórií urobilo experiment medzilaboratórnej reprodukovateľnosti na zhodnotenie variability merania štandardných riedení plazmidov CG a FG. Riedenia boli v každom zariadení vykonané dvakrát. Tabuľka 20 uvádza priemer, štandardnú odchýlku a CV (%) pre jednotlivé riedenia.

**Tabuľka 20. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť pre štandardy plazmidov CG a FG**

Gén	Zriedenie	Stredná	C <sub>T</sub> SD	CV (%)
Kontrolný gén ABL	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
Fúzny gén PML-RARA bcr1	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

### Hodnoty expresie transkriptu PML-RARA bcr1 FG

V tabuľkách 21 a 22 sú uvedené hodnoty expresie transkriptu FG PML-RARA bcr1 a ABL CG pre bunkovú líniu NB4 u pacientov s APL pri diagnostike a u pacientov s negatívnou kontrolou.

**Tabuľka 21. Hodnoty expresie transkriptu PML-RARA bcr1 FG a ABL CG – hodnoty CT**

	Hodnoty C <sub>T</sub> (95 % rozsah)	
	PML-RARA bcr1	ABL
<b>Bunková línia NB4</b>	24,7	23,7
<b>Vzorky pacientov s APL</b>		
Kostná dreň (n = 14)	25,6 (23,1 – 27,5)	24,5 (21,7 – 28,5)
Periférna krv (n = 9)	25,7 (23,7 – 29,4)	24,6 (22,0 – 27,4)
<b>Vzorky negatívnych pacientov</b>		
Kostná dreň (n = 26)	–	25,35 (24,68 – 26,02)
Periférna krv (n = 74)	–	25,15 (24,83 – 25,48)

Hodnoty ABL C<sub>T</sub> medzi bežnými vzorkami a vzorkami leukémie neboli výrazne odlišné, rovnako ako ani medzi typmi vzoriek (PB alebo BM) alebo vzorkami leukémie od pacientov s diagnostikovaným APL.

**Tabuľka 22. Hodnoty expresie transkriptu PML-RARA bcr1 FG a ABL CG – hodnoty CN a NCN**

	Hodnoty CN (95 % rozsah)		Hodnoty NCN (95 % rozsah)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/CN ABL
<b>Vzorky pacientov</b>			
Kostná dreň (n = 14)	5129 (1480 – 25 704)	1538,7 (133,2 – 46 781,28)	0,30 (0,09 – 1,82)
Periférna krv (n = 9)	3891 (475 – 14 454)	1400,76 (50,27 – 11 274)	0,36 (0,11 – 0,78)
<b>Vzorky negatívnych pacientov</b>			
Kostná dreň (n = 26)	–	19 201 (12 922 – 25 480)	–
Periférna krv (n = 74)	–	21 136 (17 834 – 24 437)	–

## Miera falošnej pozitivity a falošnej negativity

Miera falošnej pozitivity a falošnej negativity bola vypočítaná pomocou nasledujúcich kontrol.

- Pozitívne kontroly: Bunky NB4, bunková línia dobre známa svojou pozitivitou na PML-RARA bcr1 FG; vzorky pacientov už vyhodnotené ako pozitívne na PML-RARA bcr1
- Negatívne kontroly: Negatívne vzorky RNA, neboli vykonané žiadne amplifikačné kontroly (No Amplification Controls, NAC) na RNA baktérií *E. coli* namiesto ľudskej RNA s cieľom skontrolovať kontamináciu PCR a žiadne šablónové kontroly (No Template Controls, NTC), ktoré obsahovali vodu namiesto ľudskej RNA

Amplifikácia na vzorkách RNA FG bola vykonaná trikrát a dvakrát na CG.

Falošne negatívna vzorka bola definovaná ako pozitívna vzorka RNA s menej ako 50 % pozitívnych jamiek (0/2, 0/3 alebo 1/3).

Falošne pozitívna vzorka bola definovaná ako negatívna vzorka s minimálne 50 % pozitívnych jamiek (1/2, 2/3 alebo 3/3).

Tabuľka 23 zobrazuje počet a percento falošne negatívnych a falošne pozitívnych vzoriek.

**Tabuľka 23. Falošne negatívne a falošne pozitívne vzorky**

Falošná negatívnosť		Falošná pozitivita	
$10^{-3}$	$10^{-4}$	Negatívna kontrola FG	NAC/NTC
0 % (0/29)	0 % (0/28)	11 % (5/45)	5 % (5/100)

---

## Referenčná literatúra

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.
5. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

# Symbols

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť na balení a štítkoch:



<N>

Obsahuje reagencie postačujúce na <N> reakcií



Použite do



Zdravotnícka diagnostická pomôcka na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu (t. j. označenie komponentu)



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Teplotné obmedzenia



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie

## Prehľad revízií dokumentu

R5, november 2017

Pridané poznámky, že súprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091, je určená len na výskumné účely; opravené drobné tlačové chyby.



# Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	Pre 24 reakcií: Štandardy kontrolného génu ABL, štandardy fúzneho génu PML-RARA bcr1, zmes primerov a prób ABL, zmes primerov a prób fúzneho génu PML-RARA bcr1.	672123
<b>Rotor-Gene Q MDx – pre IVD-validované analýzy real-time PCR v klinických aplikáciách</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie	9002033

***ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit – na kvalitatívnu validáciu extrakcie RNA a reverznú transkripciu fúzneho génu PML-RARA bcr1**

*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit

Bunkové línie s negatívnou, vysokou a nízkou pozitívnou expresiou fúzneho génu PML-RARA bcr1

672091\*

\* Súprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091, je určená len na výskumné účely. Nie je určená na diagnostické postupy. Žiadne tvrdenie ani vyhlásenie nie sú určené na poskytnutie informácií o diagnostike, prevencii alebo liečbe ochorenia.

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Tento produkt je určený na diagnostické použitie *in vitro*. Produkty *ipsogen* sa nemôžu opätovne predávať, upravovať na ďalší predaj ani používať na výrobu komerčných výrobkov bez písomného súhlasu spoločnosti QIAGEN.

Informácie uvádzané v tomto dokumente sa môžu zmeniť bez predchádzajúceho upozornenia. Spoločnosť QIAGEN nenesie žiadnu zodpovednosť za chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť v tomto dokumente. Tento dokument sa v čase uverejnenia považuje za úplný a presný. Spoločnosť QIAGEN v žiadnom prípade nezodpovedá za náhodné, špeciálne, viacnásobné alebo následné škody, ktoré vzniknú v súvislosti s používaním tohto dokumentu alebo vyplývajúce z jeho použitia.

Na produkty *ipsogen* sa poskytuje záruka, že spĺňajú uvedené špecifikácie. Jediný záväzok spoločnosti QIAGEN a jediný prostriedok nápravy zákazníkom je obmedzený na bezplatnú výmenu produktov v prípade, že produkty nebudú fungovať v súlade so zárukou.

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

#### Obmedzená licenčná zmluva pre súpravu *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy s akýmkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať prislúšné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013 – 2017 QIAGEN, všetky práva vyhradené

