

Εγχειρίδιο του *ipsogen*[®] BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit



Έκδοση 1

IVD

Ποσοτική in vitro διαγνωστική εξέταση

Για χρήση σε συνδυασμό με τα όργανα Rotor-Gene[®] Q,
Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] και LightCycler[®]

CE

REF

670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R3

MAT

1072509EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμών για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιουδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	5
Γενικές πληροφορίες για τη ΧΜΛ	5
Παρακολούθηση της νόσου	6
Αρχή της διαδικασίας	7
Υλικά που παρέχονται	10
Περιεχόμενα του kit	10
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	11
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	12
Γενικές προφυλάξεις	12
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	13
Χειρισμός και αποθήκευση δοκιμών	13
Διαδικασία	14
Προετοιμασία RNA δείγματος	14
Πρωτόκολλο:	
■ Αντίστροφη μεταγραφή με χρήση του SuperScript III Reverse Transcriptase	14
■ qPCR σε όργανα Rotor Gene Q MDx 5plex HRM ή Rotor-Gene Q 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων	17
■ qPCR σε όργανα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS και LightCycler 480	21
■ qPCR σε όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0	27
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	31
Αρχή ανάλυσης δεδομένων	31
Πρότυπες καμπύλες και κριτήρια ποιότητας για τα πρωτογενή δεδομένα	32
Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων (normalized copy number, NCN)	34
Μετατροπή IS και αναφορά MMR	35
Περίληψη των κριτηρίων ποιότητας	37
Αντιμετώπιση προβλημάτων	38
Ποιοτικός έλεγχος	38
Περιορισμοί	38
Χαρακτηριστικά επιδόσεων	39
Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης	39

Γραμμικότητα	39
Όγκοι εισαγωγής	40
Ακρίβεια	40
Μελέτη συμφωνίας: Πρότυπο κοινού πλασμιδίου ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) έναντι προτύπου κοινού πλασμιδίου <i>ipsogen</i> (QIAGEN)	40
Βιβλιογραφία	42
Σύμβολα	43
Στοιχεία επικοινωνίας	43
Πληροφορίες παραγγελιών	44

Προβλεπόμενη χρήση

Το *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit προορίζεται για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων BCR-ABL p210 b2a2 ή b3a2 σε δείγματα μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) ή χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) που έχουν προηγουμένως διαγνωστεί με ένα συμβάν γονιδίου σύντηξης (fusion gene, FG) BCR-ABL Mbcf. Η δοκιμασία προορίζεται για την αξιολόγηση του επιπέδου μοριακής ανταπόκρισης και τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.

Σύνοψη και επεξήγηση

Γενικές πληροφορίες για τη ΧΜΛ

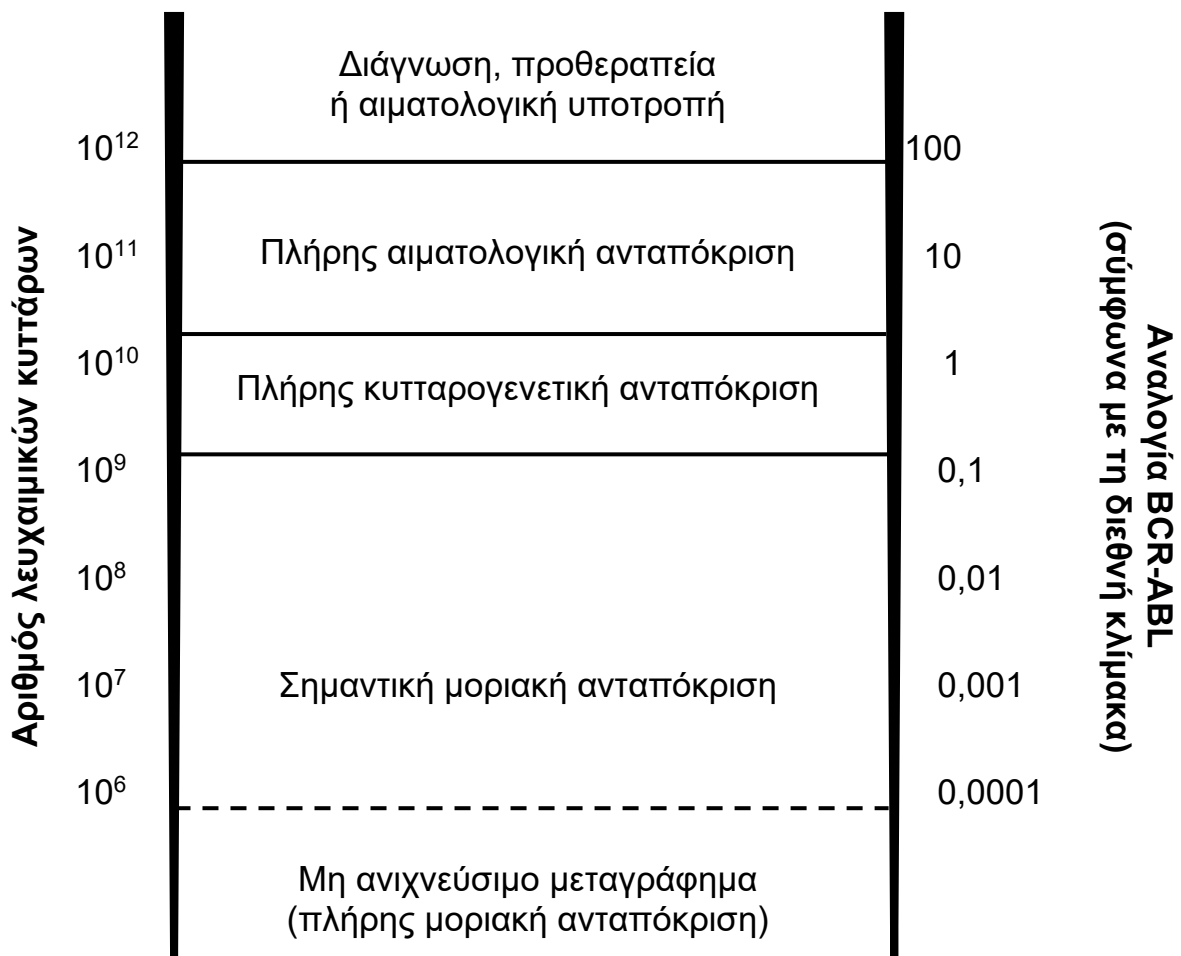
Η ΧΜΛ ανήκει στις μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες και παρατηρείται σε > 90% των περιπτώσεων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία του χρωμοσώματος Philadelphia (χρωμόσωμα Ph).

Το χρωμόσωμα αυτό σχηματίζεται μετά από αμοιβαία μετατόπιση του μακρού βραχίονα των χρωμοσωμάτων 9 και 22, t(9,22), με την περιοχή συστάδας σημείων ρήξης (breakpoint cluster region, BCR) να εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22 και το ογκογονίδιο c-ABL να μεταφέρεται από το χρωμόσωμα 9. Το γονίδιο σύντηξης που προκύπτει, BCR-ABL, μεταγράφεται σε ένα μόριο mRNA μήκους 8,5 kb, με 2 παραλλαγές συνένωσης: το b2a2 (40% των περιπτώσεων) και το b3a2 (55% των περιπτώσεων). Κωδικοποιεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη, την p210, με αυξημένη δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Τα μετάγραφα b2a3 και b3a3 απαντούν σε κάτω από το 5% των περιπτώσεων. Ένα χρωμόσωμα Ph μπορεί, επίσης, να ανιχνευθεί στο 35% των ενηλίκων ασθενών με ΟΛΛ.

Η ετήσια επίπτωση της ΧΜΛ είναι περίπου 1–2 ανά 100.000 και η ΧΜΛ αντιπροσωπεύει το 20% των λευχαιμιών των ενηλίκων. Κλινικά, χαρακτηρίζεται από περίσσεια μυελοειδών κυττάρων που διαφοροποιούνται και λειτουργούν φυσιολογικά. Οι ασθενείς με ΧΜΛ θα διαγνωστούν στο 90–95% των περιπτώσεων στη χρόνια ή σταθερή φάση της νόσου. Ιστορικά, εντός 4 έως 6 ετών κατά μέσο όρο, οι ασθενείς εισέρχονταν σε μια επιταχυνόμενη φάση που οδηγούσε σε βλαστική κρίση και οξεία λευχαιμία, η οποία είναι πάντοτε θανατηφόρα. Η έλευση της ιματινίμπης και, πιο πρόσφατα, των αναστολέων της τυροσινικής κινάσης (tyrosine kinase inhibitor, TKI) δεύτερης γενιάς, άλλαξαν δραματικά τη φυσική πορεία της νόσου: οι περισσότεροι ασθενείς παραμένουν τώρα σε ύφεση και χρήζουν μακροχρόνιας παρακολούθησης και ελέγχου της νόσου.

Παρακολούθηση της νόσου

Μέχρι σήμερα, ο στόχος της θεραπείας της ΧΜΛ είναι η επίτευξη 100% επιβίωσης και αρνητικότητας στο χρωμόσωμα Ph. Η παρακολούθηση της νόσου αποτελεί, επομένως, ένα ουσιαστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και την ανίχνευση της πρώιμης υποτροπής για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Κατά τη θεραπεία με αναστολείς κινάσης τυροσίνης (tyrosine kinase inhibitors, TKI), οι ασθενείς τυπικά σημειώνουν πρόοδο από αιματολογική σε κυτταρογενετική και στη συνέχεια μοριακή ύφεση, που αντιστοιχεί σε μειωμένους αριθμούς λευχαιμικών κυττάρων και μεταγραφημάτων BCR-ABL, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Προσαρμογή από την παραπομπή 1.

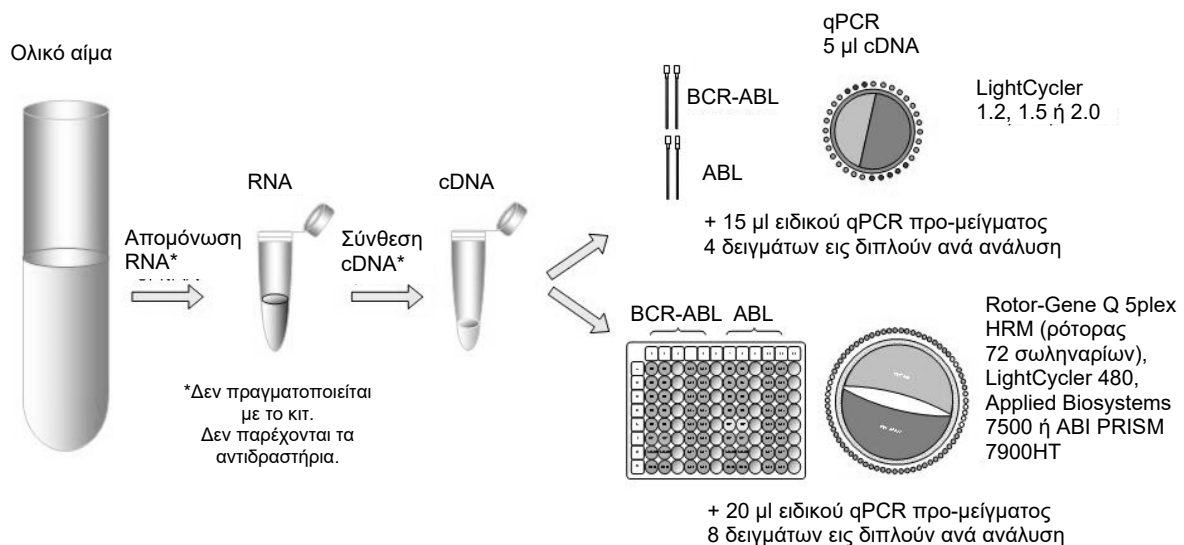
Η τυπική μέθοδος για την εκτίμηση του καρκινικού φορτίου σε ασθενείς με ΧΜΛ είναι συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση (G-banding) σε μεταφάσεις του μυελού των οστών (ΜΟ). Η κυτταρογενετική ανταπόκριση αξιολογείται σε τουλάχιστον 20 μεταφάσεις του μυελού. Το επίπεδο της κυτταρογενετικής ανταπόκρισης εκτιμάται με βάση το ποσοστό των θετικών για χρωμόσωμα Ph μεταφάσεων (βλ. Πίνακα 1, παραπομπή 2). Ωστόσο, αυτή η αξιολόγηση εξαρτάται από τις εργαστηριακές αποδόσεις και έχει χαμηλή ευαισθησία, στο 5% όταν αναλύονται 20 μεταφάσεις.

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) πραγματικού χρόνου που ποσοτικοποιεί το BCR-ABL Mbcf mRNA σε δοκίμια περιφερικού αίματος (ΠΑ) αποτελεί τώρα μέρος των τεχνικών παρακολούθησης της νόσου για τη ΧΜΛ κατά τη θεραπεία. Είναι λιγότερο επεμβατική από τη συμβατική κυτταρογενετική μεταφάσεων μυελού των οστών και προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία.

Οι συστάσεις για την παρακολούθηση της ΧΜΛ έχουν επίσης ενημερωθεί πρόσφατα για να συμπεριλάβουν νέα κλινικά στοιχεία από κλινικές δοκιμές, καθώς και βελτιωμένους στόχους και εργαλεία παρακολούθησης της νόσου. Οι πιο πρόσφατες συστάσεις σχετικά με τον ορισμό της ανταπόκρισης και την παρακολούθηση των ασθενών που λαμβάνουν ιματινίμη προέρχονται από εμπειρογνώμονες του Ευρωπαϊκού Δικτύου για τη Λευχαιμία (ELN) (2).

Από τεχνική άποψη, έχουν γίνει προσπάθειες από διεθνείς εμπειρογνώμονες για την εναρμόνιση των εξετάσεων και αναφορών BCR-ABL Mbcf (3–5). Επιπλέον, πρόσφατα επικυρώθηκε ένας πίνακας αναφοράς υπό την αιγίδα του ΠΟΥ, με στόχο την απλούστευση του ποσοτικού προσδιορισμού του BCR-ABL (6).

Αρχή της διαδικασίας



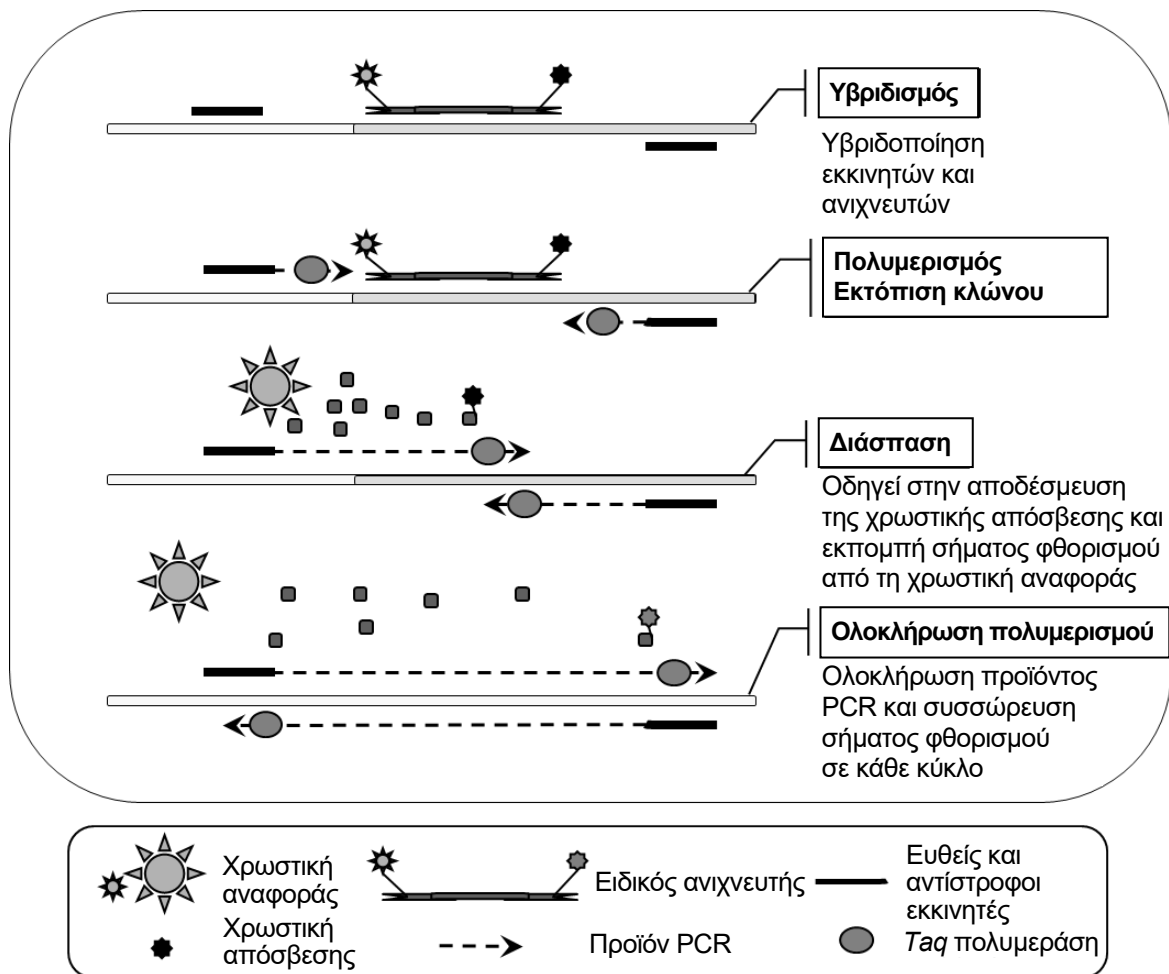
Εικόνα 2. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και qPCR.

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

Στον εν λόγω προσδιορισμό χρησιμοποιείται η αρχή της υδρόλυσης ολιγονουκλεοτιδίων διπλής χρωστικής qPCR. Κατά την αντίδραση PCR, ευθείς και αντίστροφοι εκκινητές υβριδοποιούνται σε μια ειδική αλληλουχία. Στο ίδιο μείγμα περιλαμβάνεται ένα ολιγονουκλεοτίδιο με διπλή χρωστική. Αυτός ο ανιχνευτής, που αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με μια χρωστική αναφοράς 5' και μια κατάντη χρωστική απόσβεσης 3', υβριδοποιείται σε μια αλληλουχία-στόχο εντός του προϊόντος της PCR. Η ανάλυση qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης αξιοποιεί τη δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης του *Thermus aquaticus* (*Taq*). Όταν ο ανιχνευτής είναι ακέραιος, η εγγύτητα της χρωστικής αναφοράς στη χρωστική απόσβεσης συνεπάγεται καταστολή του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς, κυρίως μέσω μεταφοράς ενέργειας τύπου Förster.

Εάν ο εξεταζόμενος στόχος είναι παρών κατά την αντίδραση PCR, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται ειδικά σε ένα σημείο ανάμεσα στις θέσεις του ευθέος και του αντίστροφου εκκινητή. Η δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον ανιχνευτή σε ένα σημείο ανάμεσα στις χρωστικές αναφοράς και απόσβεσης μόνον εάν ο ανιχνευτής υβριδοποιηθεί στον στόχο. Τα τμήματα του ανιχνευτή εκτοπίζονται κατόπιν από τον στόχο και ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται. Το 3' άκρο του ανιχνευτή είναι φραγμένο, προκειμένου να αποφευχθεί η επιμήκυνση του ανιχνευτή κατά την PCR (Εικόνα 3). Η διαδικασία αυτή προκύπτει σε κάθε κύκλο και δεν επηρεάζει την εκθετική συσσώρευση του προϊόντος.

Αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνον όταν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική προς τον ανιχνευτή και, συνεπώς, ενισχύεται με την PCR. Λόγω των απαιτήσεων αυτών, δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Έτσι η αύξηση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη της ενίσχυσης του στόχου με την PCR.



Εικόνα 3. Αρχή της αντίδρασης. Το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα και το παραγόμενο cDNA ενισχύεται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών και έναν ειδικό εσωτερικό ανιχνευτή διπλής χρώσης (FAM™–TAMRA™). Ο ανιχνευτής δεσμεύεται στο αμπλικόνιο σε κάθε βήμα υβριδοποίησης της PCR. Καθώς η Taq DNA πολυμεράση επιμηκύνει τον εκκινητή που έχει δεσμευτεί στο αμπλικόνιο, εκτοπίζει το 5' άκρο του ανιχνευτή, το οποίο κατόπιν αποδομείται από τη δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της Taq DNA πολυμεράσης. Η διάσπαση συνεχίζεται μέχρις ότου ο ανιχνευτής που απομένει αποκολληθεί από το αμπλικόνιο στο επόμενο βήμα τήξης. Αυτή η διεργασία απελευθερώνει το φθορισμοφόρο και τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού, διαχωρίζοντάς τα στο χώρο και οδηγώντας σε μια αύξηση του φθορισμού από το FAM και μια μείωση του φθορισμού από το TAMRA.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit		(24)
Αρ. καταλόγου		670723
Αριθμός αντιδράσεων		24
High Positive RNA Control (Θετικός ορός ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (Βαθμονομητής IS-MMR)		3 x 10 µl
Mbcf και ABL Single Plasmid Standard Dilution (Αραίωση προτύπου κοινού πλασμιδίου Mbcf και ABL) (10 ¹ αντίγραφα/5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcf & ABL	35 µl
Mbcf και ABL Single Plasmid Standard Dilution (Αραίωση προτύπου κοινού πλασμιδίου Mbcf και ABL) (10 ² αντίγραφα/5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcf & ABL	35 µl
Mbcf και ABL Single Plasmid Standard Dilution (Αραίωση προτύπου κοινού πλασμιδίου Mbcf και ABL) (10 ³ αντίγραφα/5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcf & ABL	70 µl
Mbcf και ABL Single Plasmid Standard Dilution (Αραίωση προτύπου κοινού πλασμιδίου Mbcf και ABL) (10 ⁴ αντίγραφα/5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcf & ABL	35 µl
Mbcf και ABL Single Plasmid Standard Dilution (Αραίωση προτύπου κοινού πλασμιδίου Mbcf και ABL) (10 ⁵ αντίγραφα/5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcf & ABL	70 µl
Mbcf και ABL Single Plasmid Standard Dilution (Αραίωση προτύπου κοινού πλασμιδίου Mbcf και ABL) (10 ⁶ αντίγραφα/5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcf & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL (Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών ABL)*	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcf Fusion Gene (Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf) [†]	PPF-Mbcf 25x	110 µl
Εγχειρίδιο <i>ipsogen BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit</i> (Αγγλικά)		1

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

[†] Μείγμα ειδικών ανάστροφων και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL Mbcf συν ειδικός ανιχνευτής FAM-TAMRA.

Σημείωση: Αναμείξτε απαλά και φυγοκεντρίστε στιγμιαία τα πρότυπα διαλύματα (SP1-SP6) και τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών πριν από τη χρήση.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (safety data sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήρια για τον καθαρισμό του RNA: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι: RNeasy® Midi Kit (QIAGEN, cat. no. 75144) ή TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, cat. no. 15596018 ή 15596026)
- Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση
- Ρυθμιστικό διάλυμα και *Taq* DNA πολυμεράση: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι: *Premix Ex Taq*™ DNA Polymerase (Perfect Real Time) (TaKaRa, cat. no. RR039A) και *Premix Ex Taq* DNA Polymerase (Probe qPCR) (TaKaRa, cat. no. RR390A). Και τα δύο περιλαμβάνουν κύριο μείγμα 2x *Taq* DNA πολυμεράσης και χρωστικές αναφοράς ROX™
- Αντιδραστήρια για αντίστροφη μεταγραφή: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι το *ipsogen* RT Kit, περιλαμβάνει αντίστροφη μεταγραφάση, 5x RT buffer, 100 mM DTT, RNase inhibitor, τυχαίο εκκινητή και dNTPs (QIAGEN, cat. no. 679923) ή SuperScript® III Reverse Transcriptase, περιλαμβάνει αντίστροφη μεταγραφάση, 5x first-strand buffer, και 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., cat. no. 18080044)
- Όταν χρησιμοποιείτε το SuperScript III, απαιτούνται τα εξής επιπλέον αντιδραστήρια:
 - Αναστολέας RNασών: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι το RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., cat. no. 10777019)
 - Σετ dNTP, κατηγορίας εφαρμογών PCR
 - Τυχαίο εννεανουκλεοτίδιο

Αναλώσιμα

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

Εξοπλισμός

- Πιπέτες μικρολίτρων* αποκλειστική για PCR (1–10 μl, 10–100 μl, 100–1000 μl)
- Φυγόκεντρος πάγκου* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0,5 ml (με δυνατότητα επίτευξης 10.000 rpm)

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

- Όργανο real-time PCR:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή άλλο όργανο Rotor-Gene, LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 ή 480, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS και σχετικό ειδικό υλικό
- Θερμικός κυκλοποιητής* ή λουτρό ύδατος* (βήμα ανάστροφης μεταγραφάσης)

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (safety data sheets, SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety, όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN.

Απορρίπτετε τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς ασφάλειας.

Γενικές προφυλάξεις

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

Το kit αυτό προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται με το kit αυτό έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση. Η περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων ή η τροποποίηση των χρόνων και των θερμοκρασιών επώασης μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασυνεπή δεδομένα. Τα αντιδραστήρια PPC και PPF μπορεί να αλλοιωθούν εάν εκτεθούν στο φως. Όλα τα αντιδραστήρια διαμορφώνονται ειδικά για χρήση με τη συγκεκριμένη δοκιμασία. Προκειμένου να αποδώσει άριστα η δοκιμασία, δεν θα πρέπει να αντικατασταθεί κανένα υλικό.

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

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί:

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

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

Συνεπώς, συνιστούμε τα ακόλουθα.

- Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) χωρίς νουκλεάση και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπετών για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Παρασκευάζετε το κύριο προ-μείγμα PCR με αποκλειστικά για το σκοπό αυτό υλικά (πιπέτες, ρύγχη κ.λπ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν έχουν εισαχθεί μήτρες DNA (cDNA, DNA, πλασμίδιο). Να προσθέτετε τη μήτρα σε χωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε χωριστό δωμάτιο) χρησιμοποιώντας ειδικό εξοπλισμό (πιπέτες, ρύγχη κ.λπ.).
- Χειρίζετε τα πρότυπα διαλύματα (SP1–SP6) σε ξεχωριστό δωμάτιο.

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

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

- Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των μειγμάτων εκκινητών και ανιχνευτών στο φως (σωληνάρια PPC και PPF).
- Αναμείξτε απαλά και φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια πριν το άνοιγμα.
- Φυλάξτε όλα τα συστατικά του κιτ μέσα στο αρχικό δοχείο τους.

Αυτές οι συνθήκες φύλαξης ισχύουν τόσο για τα ανοιγμένα όσο και τα μη ανοιγμένα συστατικά. Τα συστατικά που φυλάσσονται υπό συνθήκες διαφορετικές από αυτές που καθορίζονται στις ετικέτες τους ενδέχεται να μη λειτουργήσουν κανονικά και να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Η ημερομηνία λήξης κάθε αντιδραστηρίου αναγράφεται στην ετικέτα του κάθε συστατικού. Υπό τις σωστές συνθήκες αποθήκευσης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Τυχόν αστάθεια του προϊόντος αυτού δεν εκδηλώνεται με ορατές ενδείξεις. Θα πρέπει όμως να αναλύονται δείγματα θετικού και αρνητικού ελέγχου μαζί με τα άγνωστα δοκίμια.

Χειρισμός και αποθήκευση δοκιμίων

Τα δείγματα ολικού αίματος θα πρέπει να περιέχουν ως αντιπηκτικό καλιούχο EDTA και να φυλάσσονται στους $2-8^{\circ}\text{C}$ για διάστημα 5 ημερών το πολύ προτού απομονωθεί το RNA.

Διαδικασία

Προετοιμασία RNA δείγματος

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

Πρωτόκολλο: Αντίστροφη μεταγραφάση με χρήση του SuperScript III Reverse Transcriptase

Το πρωτόκολλο αυτό προορίζεται για την αντίστροφη μεταγραφάση με χρήση του SuperScript III Reverse Transcriptase. Όταν χρησιμοποιείτε το *ipsogen* RT Kit, ακολουθείτε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο Εγχειρίδιο *ipsogen RT Kit*.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Προετοιμάστε dNTP, 10 mM έκαστο. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Αναμείξτε καλά (μη στροβιλίζετε) και φυγοκεντρίστε στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου). Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
3. Προσαρμόστε τα δείγματα RNA σε 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Διανείμετε 10 μl (1 μg) από κάθε δείγμα RNA με πιπέτα σε ξεχωριστά, επισημασμένα σωληνάρια. Διανείμετε 10 μl θετικού ορού ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης, 10 μl βαθμονομητή IS-MMR και 10 μl νερού χωρίς νουκλεάση (ως αρνητικό μάρτυρα RT) με πιπέτα σε ξεχωριστά, επισημασμένα σωληνάρια και επεξεργαστείτε τα παράλληλα με τα δείγματα RNA, όπως περιγράφεται παρακάτω.
4. Επωάστε κάθε δείγμα, μάρτυρα και βαθμονομητή (10 μl από το καθένα) για 5 λεπτά στους 65°C και ψύξτε τα αμέσως σε πάγο επί 5 λεπτά.
5. Φυγοκεντρίστε στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου) Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
6. Παρασκευάστε το παρακάτω μείγμα RT ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, μαρτύρων και βαθμονομητών υπό επεξεργασία (Πίνακας 1).

* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά.

† Η οπτική πυκνότητα μετράται στα 260 και 280 nm: Μια τιμή OD ίση με 1,0 στα 260 nm ισοδυναμεί με περίπου 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μονόκλωνου RNA. Μια τιμή λόγου A_{260}/A_{280} μεταξύ 1,8 και 2,1 υποδηλώνει ότι το RNA είναι υψηλής καθαρότητας.

Πίνακας 1. Παρασκευή μείγματος RT

Συστατικό	Όγκος ανά δείγμα (μl)	Τελική συγκέντρωση
First-Strand Buffer, 5x (παρέχεται με το SuperScript III Reverse Transcriptase)	5,0	1x
dNTP (10 mM έκαστο, να προετοιμάζεται προηγουμένως και να φυλάσσεται στους –20°C σε κλάσματα)	2,0	0,8 mM
Τυχαίο εννεανουκλεοτίδιο (100 μM)	5,25	21 μM
RNaseOUT (40 U/μl)	0,5	0,8 U/μl
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1,0	8 U/μl
DTT (παρέχεται με το SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Θερμασμένο δείγμα RNA, μάρτυρας ή βαθμονομητής IS-MMR (για προσθήκη στο βήμα 7)	10,0	40 ng/μl
Τελικός όγκος	25,0	–

7. Διανείμετε με πιπέτα 15 μl του μείγματος RT σε κάθε σωληνάριο PCR. Έπειτα προσθέστε 10 μl (1 μg) δείγματος RNA, μάρτυρα ή βαθμονομητή (από το βήμα 4).
8. Αναμείξτε προσεκτικά (μη στροβιλίζετε) και φυγοκεντρίστε στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).
9. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή στο πρόγραμμα αντίστροφη μεταγραφής που αναφέρεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Προφίλ θερμοκρασίας

Reverse transcription 1 (Αντίστροφη μεταγραφή 1)	Θερμοκρασία: 25°C Χρόνος: 10 min
Reverse transcription 2 (Αντίστροφη μεταγραφή 2)	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 60 min
Inactivation (Αδρανοποίηση)	Θερμοκρασία: 85°C Χρόνος: 5 min
Cooling (Ψύξη)	Θερμοκρασία: 4°C Χρόνος: 5 min

10. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως αναφέρεται στον Πίνακα 2.
11. Αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα, φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου). Διατηρήστε τα σωληνάρια σε πάγο ή στους -20°C μέχρι να διενεργηθεί η qPCR, σύμφωνα με τα ακόλουθα πρωτόκολλα και το όργανο qPCR που χρησιμοποιείτε.

Σημείωση: Για τα όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0, κάθε παρασκευή RT παράγει cDNA για δύο αναλύσεις qPCR.

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

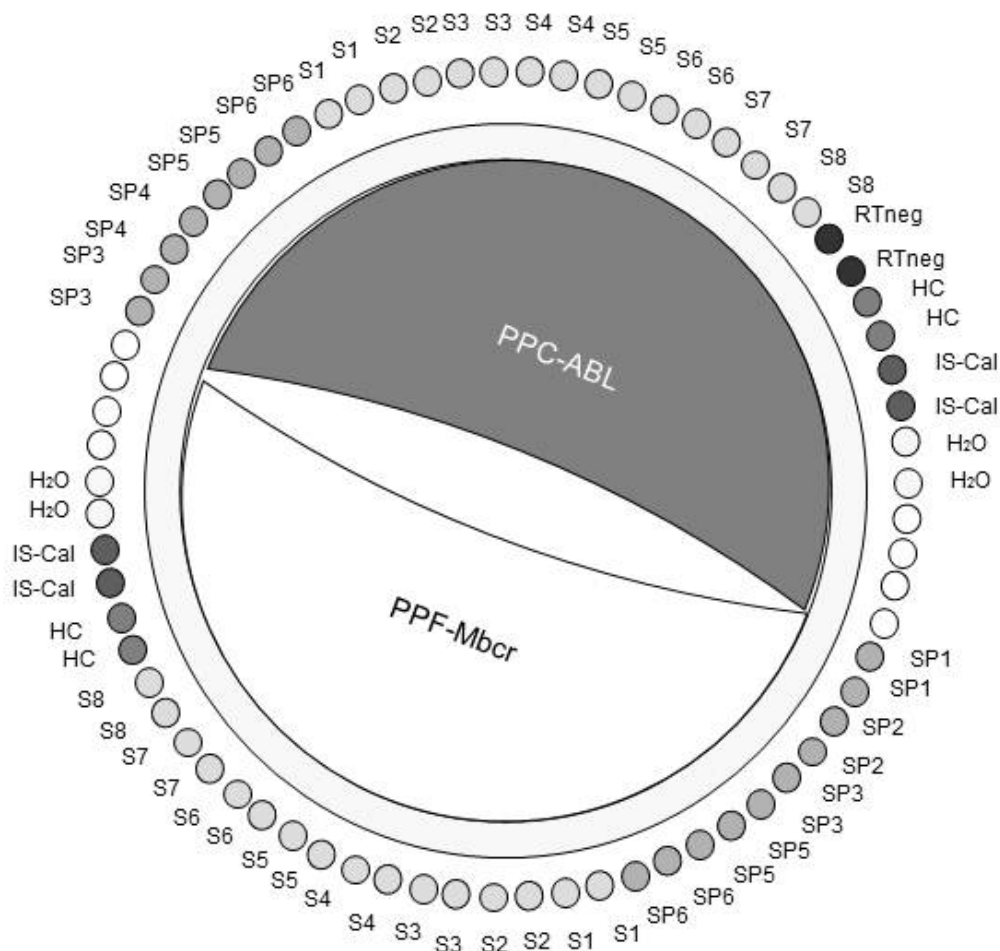
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 3. Το κιτ έχει σχεδιαστεί για ανάλυση οκτώ διαφορετικών δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα τρεις φορές.

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

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL) (32 αντιδράσεις)	
8 δείγματα cDNA	8 × 2 αντιδράσεις
1 θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης	2 αντιδράσεις
1 βαθμονομητής cDNA IS-MMR	2 αντιδράσεις
Πρότυπα κοινού πλασμιδίου	2 x 4 αντιδράσεις (SP3, SP4, SP5 και SP6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Αρνητικός ορός ελέγχου RT	2 αντιδράσεις
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 αντιδράσεις)	
8 δείγματα cDNA	8 × 2 αντιδράσεις
1 θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης	2 αντιδράσεις
1 βαθμονομητής cDNA IS-MMR	2 αντιδράσεις
Πρότυπα κοινού πλασμιδίου	2 x 5 αντιδράσεις (SP1, SP2, SP3, SP5 και SP6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις

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

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



Εικόνα 4. Προτεινόμενη προετοιμασία ρότορα για κάθε πείραμα με το *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit. SP1–SP6: Πρότυπα BCR-ABL MbcR και ABL, **HC:** Θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης, **IS-Cal:** Βαθμονομητής IS-MMR, **RTneg:** Αρνητικός μάρτυρας RT, **S:** Δείγμα cDNA, **H₂O:** Δείγμα ελέγχου με καθαρό νερό.

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

Τοποθετήστε κενά σωληνάκια σε όλες τις άλλες θέσεις.

qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με ρότορα 72 σωληναρίων

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Στροβιλίστε τα πρότυπα διαλύματα, τα σωληνάκια με PPF-Mbcr και PPC-ABL και φυγοκεντρίστε στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).
3. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 4 περιγράφει τη μέθοδο διανομής με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 32 + 1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών, 25x	1	33	33	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	214,5	214,5	–
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 5)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

4. Χορηγήστε 20 µl από το προ-μείγμα qPCR ανά σωληνάριο.
5. Σε διαφορετικό μέρος του εργαστηρίου και με εξοπλισμό αποκλειστικά για αυτή τη χρήση, προσθέστε 5 µl προϊόντος RT (cDNA, 200 ng ισοδύναμο RNA) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Αντίστροφη μεταγραφάση με χρήση του SuperScript III Reverse Transcriptase», σελίδα 14) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 µl).
6. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
7. Κλείστε όλα τα σωληνάρια, τοποθετήστε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Προγραμματίστε το όργανο Rotor-Gene Q στο πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Προφίλ θερμοκρασίας

Mode of analysis (Μέθοδος ανάλυσης)	Ποσοτικός προσδιορισμός
Hold 1 (Διατήρηση 1)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 s
Cycling (Κυκλοποίηση)	50 φορές 95°C για 5 s 60°C για 30 s με λήψη φθορισμού FAM στο κανάλι Green: Μονό
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 36°C Χρόνος: 1 min

9. Πατήστε το «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου «Auto-Gain Optimisation Setup» (Ρυθμίσεις βελτιστοποίησης αυτόματης απολαβής). Ρυθμίστε το εύρος του καναλιού Green από «5 FI» για το «Min Reading» (Ελάχιστη τιμή ανάγνωσης) σε «10 FI» για το «Max Reading» (Μέγιστη τιμή ανάγνωσης) και το αποδεκτό εύρος «Gain» (Απολαβή) από -10 έως 10.
10. Σημειώστε το πλαίσιο «Perform Optimisation Before 1st Acquisition» (Να γίνει βελτιστοποίηση πριν από την 1η λήψη) και κλείστε το πλαίσιο διαλόγου «Auto-Gain Optimisation Setup» (Ρύθμιση αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής).
11. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικών κύκλων.
12. Επιλέξτε «Slope Correct» (Διόρθωση κλίσης) για την ανάλυση. Συνιστούμε τη ρύθμιση του κατωφλίου στο 0,03.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS και LightCycler 480

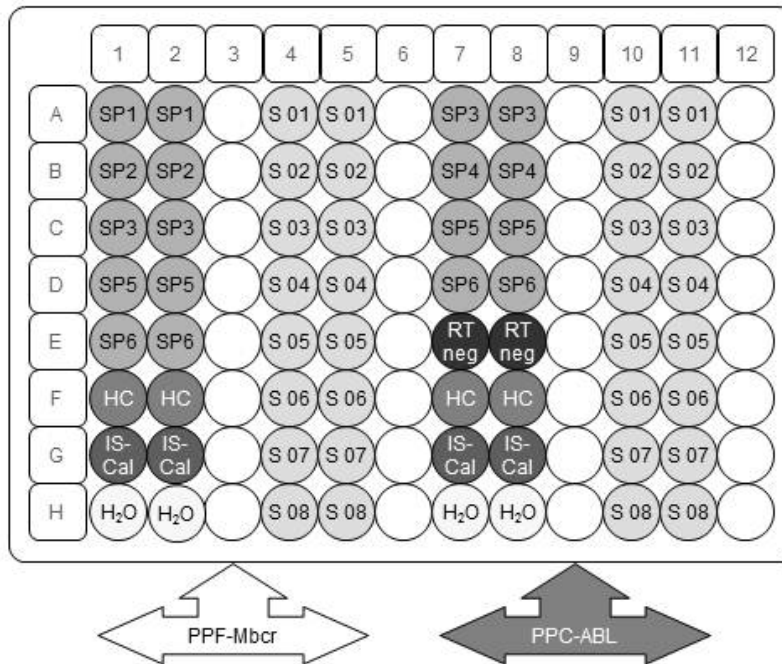
Κατά τη χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 βυθισμάτων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 6. Το κιτ έχει σχεδιαστεί για ανάλυση οκτώ διαφορετικών δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα τρεις φορές.

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

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL) (32 αντιδράσεις)	
8 δείγματα cDNA	8 × 2 αντιδράσεις
1 θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης	2 αντιδράσεις
1 βαθμονομητής cDNA IS-MMR	2 αντιδράσεις
Πρότυπα κοινού πλασμιδίου	2 x 4 αντιδράσεις (SP3, SP4, SP5 και SP6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Αρνητικός ορός ελέγχου RT	2 αντιδράσεις
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 αντιδράσεις)	
8 δείγματα cDNA	8 × 2 αντιδράσεις
1 θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης	2 αντιδράσεις
1 βαθμονομητής cDNA IS-MMR	2 αντιδράσεις
Πρότυπα κοινού πλασμιδίου	2 x 5 αντιδράσεις (SP1, SP2, SP3, SP5 και SP6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δείγματος στα όργανα Applied Biosystems, ABI PRISM και LightCycler 480

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των μειγμάτων εκκινητών και ανιχνευτών. Η διάταξη πλακιδίων στην Εικόνα 5 δείχνει ένα παράδειγμα τέτοιου πειράματος.



Εικόνα 5. Συνιστώμενη διάταξη πλάκας για ένα πείραμα με το *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. **SP1–SP6:** Πρότυπα BCR-ABL Mbcr και ABL, **HC:** Θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης, **IS-Cal:** Βαθμονομητής IS-MMR, **RTneg:** Αρνητικός μάρτυρας RT, **S:** Δείγμα cDNA, **H₂O:** Δείγμα ελέγχου με καθαρό νερό.

qPCR στα όργανα Applied Biosystems, ABI PRISM και LightCycler 480

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποφύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Στροβιλίστε τα πρότυπα διαλύματα, τα σωληνάρια με ROX, PPF-Mbcr και PPC-ABL και φυγοκεντρίστε στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).
3. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία. Εάν χρησιμοποιείτε εξοπλισμό qPCR πλακιδίων 96 βυθισμάτων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν.

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 7 περιγράφει τη μέθοδο διανομής με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων για τα όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 25 μl. Ο Πίνακας 8 περιγράφει τη μέθοδο διανομής με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων για το όργανο LightCycler 480, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 7. Παρασκευή μείγματος qPCR για όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 32 + 1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών, 25x	1	33	33	1x
Χρωστική ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) ή χρωστική ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6	198	198	–
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 5)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

Πίνακας 8. Παρασκευή του μείγματος qPCR για το LightCycler 480

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 32 + 1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL Mbcrr: 32 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών, 25x	1	33	33	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	214,5	214,5	–
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 5)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

4. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά βύθισμα.
5. Σε διαφορετικό μέρος του εργαστηρίου και με εξοπλισμό αποκλειστικά για αυτή τη χρήση, προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 200 ng ισοδύναμο RNA) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Αντίστροφη μεταγραφάση με χρήση του SuperScript III Reverse Transcriptase», σελίδα 14) στο αντίστοιχο βύθισμα (συνολικός όγκος 25 μl).
6. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
7. Κλείστε το πλακίδιο και φυγοκεντρίστε στιγμιαία (300 x g, για περίπου 10 δευτερόλεπτα).
8. Τοποθετήστε την πλάκα στον θερμικό κυκλοποιητή, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή στο πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9 για τα όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM ή στον Πίνακα 10 για το όργανο LightCycler 480.

Πίνακας 9. Προφίλ θερμοκρασίας για όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM

Mode of analysis (Μέθοδος ανάλυσης)	Πρότυπη καμπύλη — Απόλυτη ποσοτικοποίηση
Hold 1 (Διατήρηση 1)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 s
Cycling (Κυκλοποίηση)	50 φορές 95°C για 5 s 60°C για 30 δευτερόλεπτα με λήψη φθορισμού FAM: Μονό, παρεμποδιστής: TAMRA
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 36°C Χρόνος: 1 min

Πίνακας 10. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

Mode of analysis (Μέθοδος ανάλυσης)	Απόλυτη ποσοτικοποίηση («Abs Quant»)
Detection formats (Μορφές ανίχνευσης)	Επιλέξτε «Simple Probe» (απλός ανιχνευτής) στο παράθυρο Detection formats (μορφές ανίχνευσης)
Hold 1 (Διατήρηση 1)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 s
Cycling (Κυκλοποίηση)	50 φορές 95°C για 5 s 60°C για 30 δευτερόλεπτα με λήψη φθορισμού FAM που αντιστοιχεί σε (483–533 nm) για την LC έκδοση 01 και (465–510 nm) για την LC έκδοση 02
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 36°C Χρόνος: 1 min

9. Για τα Applied Biosystems 7500 και ABI PRISM 7900HT SDS, ακολουθήστε το βήμα 9α. Για το όργανο LightCycler 480, ακολουθήστε το βήμα 9β.
- 9α. Applied Biosystems και ABI PRISM: Συνιστούμε να ρυθμίσετε το κατώφλι στο 0,1 στο βήμα ανάλυσης του οργάνου. Ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9.
- 9β. Όργανο LightCycler 480: Συνιστούμε μια λειτουργία ανάλυσης Fit point (σημεία προσαρμογής) με υπόβαθρο 2,0 και κατώφλι 2,0. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 10.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0

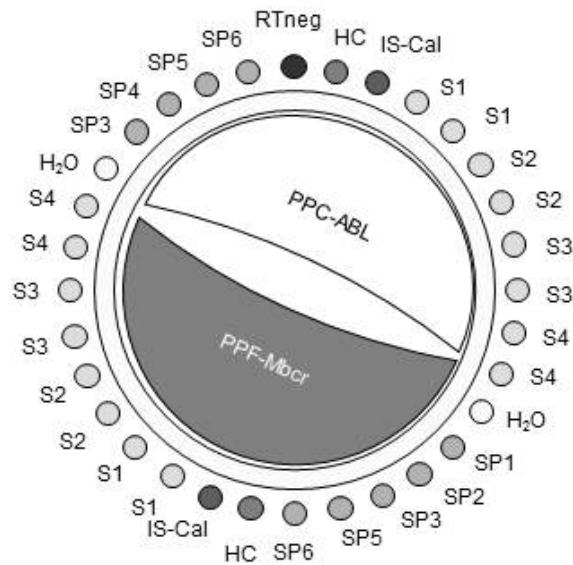
Κατά τη χρήση τριχοειδών οργάνων, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 11. Το κιτ έχει σχεδιαστεί για την ανάλυση τεσσάρων διαφορετικών δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα έξι φορές.

Πίνακας 11. Αριθμός αντιδράσεων για τα όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL) (16 αντιδράσεις)	
4 δείγματα cDNA	4 × 2 αντιδράσεις
1 θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης	1 αντίδραση
1 βαθμονομητής cDNA IS-MMR	1 αντίδραση
Πρότυπα κοινού πλασμιδίου	1 x 4 αντιδράσεις (SP3, SP4, SP5 και SP6)
Αρνητικός ορός ελέγχου RT	1 αντίδραση
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (16 αντιδράσεις)	
4 δείγματα cDNA	4 × 2 αντιδράσεις
1 θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης	1 αντίδραση
1 βαθμονομητής cDNA IS-MMR	1 αντίδραση
Πρότυπα κοινού πλασμιδίου	1 x 5 αντιδράσεις (SP1, SP2, SP3, SP5 και SP6)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στα όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 4 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των μειγμάτων εκκινητών και ανιχνευτών. Η διάταξη τριχοειδών στην Εικόνα 6 δείχνει ένα παράδειγμα πειράματος.



Εικόνα 6. Προτεινόμενη προετοιμασία ρότορα για κάθε πείραμα με το *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit. **SP1–SP6:** Πρότυπα BCR-ABL Mbcf και ABL, **HC:** Θετικός ορός ελέγχου cDNA υψηλής συγκέντρωσης, **IS-Cal:** Βαθμονομητής IS-MMR, **RTneg:** Αρνητικός μάρτυρας RT, **S:** Δείγμα cDNA, **H₂O:** Δείγμα ελέγχου με καθαρό νερό.

qPCR σε όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Στροβιλίστε τα πρότυπα διαλύματα, τα σωληνάρια με PPF-Mbcf και PPC-ABL και φυγοκεντρίστε στιγμιαία (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm, ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).
3. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 12 περιγράφει τη μέθοδο διανομής με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 20 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcf). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 12. Παρασκευή του μείγματος qPCR για τα όργανα LightCycler 1.2, 1.5 και 2.0

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 16 + 1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL Mbcr: 16 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	10	170	170	1x
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	4,2	71,4	71,4	—
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 5)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	—
Συνολικός όγκος	20	20 έκαστο	20 έκαστο	—

4. Χορηγήστε 15 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά τριχοειδές.
5. Σε διαφορετικό μέρος του εργαστηρίου και με εξοπλισμό αποκλειστικά για αυτή τη χρήση, προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 200 ng ισοδύναμο RNA) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Αντίστροφη μεταγραφάση με χρήση του SuperScript III Reverse Transcriptase», σελίδα 14) στο αντίστοιχο τριχοειδές (συνολικός όγκος 20 μl).
6. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
7. Τοποθετήστε τα τριχοειδή στους προσαρμογείς που παρέχονται με τη συσκευή, φυγοκεντρίστε στιγμιαία (700 x g, για περίπου 10 δευτερόλεπτα).
8. Φορτώστε τα τριχοειδή στον θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
9. Προγραμματίστε το όργανο LightCycler 1.2, 1.5 ή 2.0 στο πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Προφίλ θερμοκρασίας

Mode of analysis (Μέθοδος ανάλυσης)	Ποσοτικοποίηση
Hold 1 (Διατήρηση 1)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 s Κλιμάκωση: 20
Cycling (Κυκλοποίηση)	50 φορές 95°C για 5 s, κλιμάκωση: 20 60°C για 30 s, κλιμάκωση: 20, με λήψη φθορισμού FAM: Μονό
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 36°C Χρόνος: 1 min Κλιμάκωση: 20

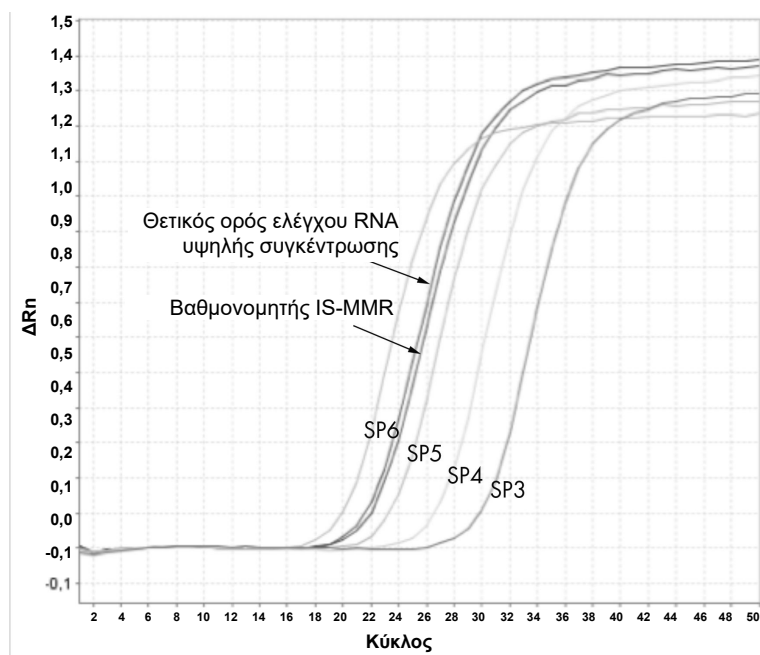
10. Για το LightCycler 1.2 και 1.5, ακολουθήστε το βήμα 10α. Για το LightCycler 2.0, ακολουθήστε το βήμα 10β.
- 10α. LightCycler 1.2 και 1.5: Συνιστάται η λειτουργία ανάλυσης F1/F2 και «2nd derivative analysis» (ανάλυση 2ης παραγώγου). Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.
- 10β. LightCycler 2.0: Συνιστούμε τη χρήση αυτοματοποιημένης (F''max) ανάλυσης στο LightCycler 2.0 έκδοση λογισμικού 4.0 για τη λήψη αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

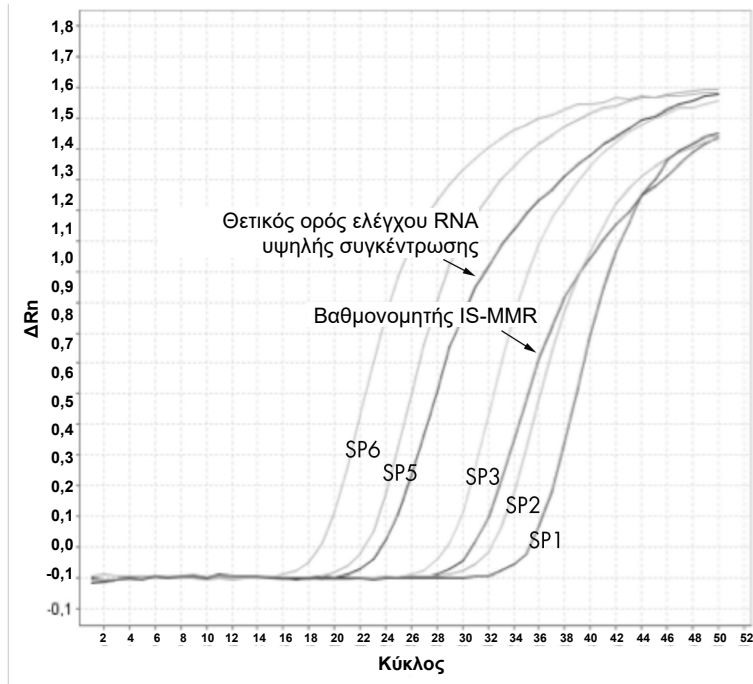
Αρχή ανάλυσης δεδομένων

Με την τεχνολογία TaqMan®, ο αριθμός των κύκλων PCR που απαιτείται για να ανιχνευτεί ένταση σήματος ισχυρότερη από το όριο ονομάζεται κύκλος ορίου (C_T) και είναι ευθέως ανάλογος με την ποσότητα στόχου που υπάρχει στην αρχή της αντίδρασης.

Με τη χρήση προτύπων με γνωστό αριθμό μορίων μπορεί να σχεδιαστεί μια πρότυπη καμπύλη και να προσδιοριστεί η ακριβής ποσότητα στόχου που υπάρχει στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι πρότυπες καμπύλες του *ipsogen* βασίζονται σε πλασμίδια. Για να διασφαλιστεί η ορθότητα των πρότυπων καμπυλών, χρησιμοποιούνται τέσσερις αραιώσεις πρότυπου για το ABL και 5 αραιώσεις πρότυπου για το Mbcg. Το κιτ περιλαμβάνει επίσης έναν βαθμονομητή IS-MMR, που επιτρέπει τη μετατροπή των αποτελεσμάτων στη διεθνή κλίμακα. Στις εικόνες 7 και 8 φαίνονται παραδείγματα καμπυλών ενίσχυσης TaqMan που λήφθηκαν για τα πρότυπα, το βαθμονομητή IS-MMR και τον θετικό ορό ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης με το *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcg IS-MMR Kit.



Εικόνα 7. Ανίχνευση του ABL με πρότυπα SP3, SP4, SP5 και SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 και 10^6 αντίγραφα/5 μ l.



Εικόνα 8. Ανίχνευση του BCR-ABL Mbcf με πρότυπα SP1, SP2, SP3, SP5 και SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 αντίγραφα/5 μ l.

Πρότυπες καμπύλες και κριτήρια ποιότητας για τα πρωτογενή δεδομένα

Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ επαναλήψεων

Η διακύμανση στις τιμές C_T μεταξύ των αντιγράφων πρέπει να είναι <2 , που αντιστοιχεί σε μια τετραπλάσια μεταβολή στις τιμές αριθμού αντιγραφής.

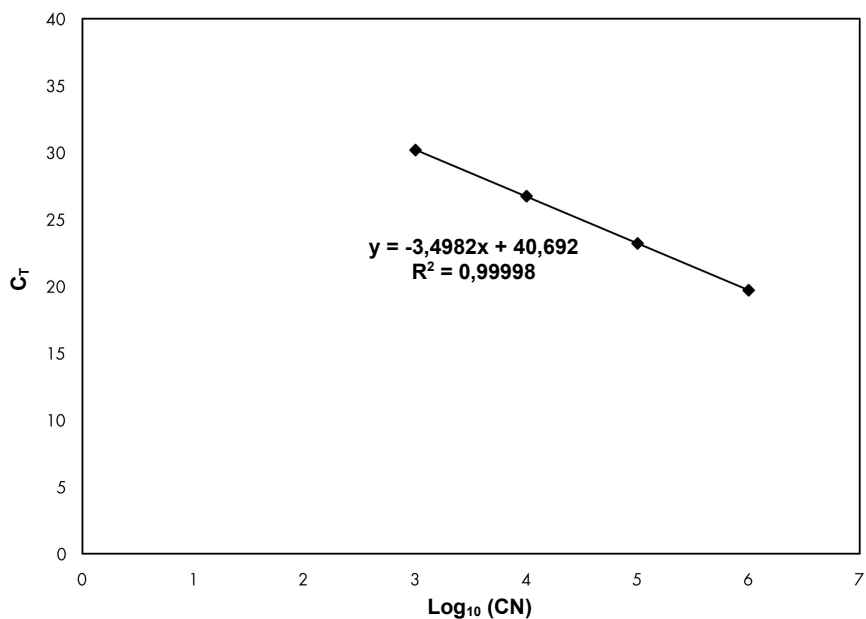
Η διακύμανση στις τιμές C_T μεταξύ των αντιγράφων είναι γενικά $<1,5$ εάν η μέση τιμή C_T των αντιγράφων είναι <36 (7).

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

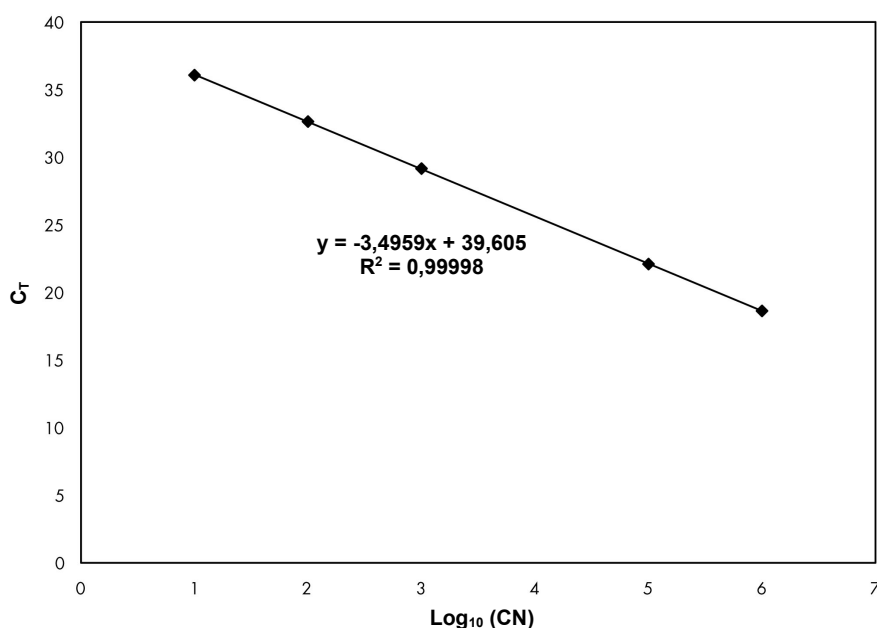
Πρότυπες καμπύλες

Μπορείτε να επικολλήσετε τα πρωτογενή δεδομένα σε ένα αρχείο Excel® για ανάλυση.

Για κάθε γονίδιο (ABL και BCR-ABL), ανεπεξέργαστες τιμές C_T που λαμβάνονται από πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου σχεδιάζονται σύμφωνα με τον αριθμό αντιγράφων log (3, 4, 5 και 6 για SP3, SP4, SP5 και SP6 και 1, 2, 3, 5 και 6 για SP1, SP2, SP3, SP5 και SP6). Στην Εικόνα 9 φαίνεται ένα παράδειγμα μιας θεωρητικής πρότυπης καμπύλης ABL υπολογισμένη με βάση τέσσερις αραιώσεις προτύπων διαλυμάτων. Στην Εικόνα 10 φαίνεται ένα παράδειγμα θεωρητικής πρότυπης καμπύλης BCR-ABL υπολογισμένη με βάση πέντε αραιώσεις προτύπων διαλυμάτων.



Εικόνα 9. Θεωρητική πρότυπη καμπύλη για το ABL υπολογισμένη με βάση 4 αραιώσεις προτύπου. Υπολογίζεται μια γραμμική καμπύλη παλινδρόμησης ($y = ax + b$), όπου a είναι η κλίση της ευθείας και b είναι η τεταγμένη, δηλαδή το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα y . Η εξίσωσή της και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) αναγράφονται στο γράφημα.



Εικόνα 10. Θεωρητική πρότυπη καμπύλη για το BCR-ABL, υπολογισμένη με βάση 5 αραιώσεις προτύπου. Υπολογίζεται μια γραμμική καμπύλη παλινδρόμησης ($y = ax + b$), όπου a είναι η κλίση της ευθείας και b είναι η τεταγμένη, δηλαδή το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα y . Η εξίσωσή της και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) αναγράφονται στο γράφημα.

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

Σημείωση: Η αραίωση προτύπου SP1 (πλασμίδιο BCR-ABL, 10 αντίγραφα) πρέπει να ανιχνευτεί και να περιληφθεί στην καμπύλη προτύπου BCR-ABL.

Έλεγχος ποιότητας όλων των τιμών ABL

Κακή ποιότητα του RNA ή προβλήματα κατά τη διάρκεια των βημάτων qPCR οδηγούν σε χαμηλό αριθμός αντιγράφων ABL (ABL_{CN}). Η βέλτιστη ευαισθησία επιτυγχάνεται με δείγματα που δίνουν $ABL_{CN} \geq 10.000$ αντίγραφα. Το κριτήριο για το ABL_{CN} ισχύει επίσης και για το θετικό ορό ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης και το βαθμονομητή IS-MMR.

Αρνητικός μάρτυρας RT και δείγμα ελέγχου καθαρού νερού

Οι μάρτυρες ελέγχου χωρίς μήτρα (no template control, NTC) για το βήμα της PCR (δείγμα ελέγχου καθαρού νερού) και το βήμα αντίστροφης μεταγραφής (αρνητικός μάρτυρας RT) θα πρέπει να δώσουν μηδενικό CN τόσο για το ABL όσο και για το BCR-ABL Mbcf. Τυχόν θετικό αποτέλεσμα από αυτούς τους NTC δείχνει διασταυρούμενη μόλυνση κατά την αντίστροφη μεταγραφή ή/και την qPCR.

Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων (normalized copy number, NCN)

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

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

Ο λόγος αυτών των τιμών CN αποτελεί τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (normalized copy number, NCN):

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

Υπολογίστε το αποτέλεσμα NCN για το θετικό ορό ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης (NCN_{HC}), το βαθμονομητή IS-MMR ($NCN_{\beta\alpha\theta\mu}$) και για κάθε δείγμα ($NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma}$).

Θετικός ορός ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης και βαθμονομητής IS-MMR

Οι μάρτυρες αυτοί επιτρέπουν τη παρακολούθηση των βημάτων αντίστροφης μεταγραφής και ενίσχυσης των ABL και BCR-ABL Mbcf κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγραφημάτων.

Ποιοτικός έλεγχος του αποτελέσματος NCN_{cal}

Σημείωση: Το αποτέλεσμα NCN που προκύπτει για το βαθμονομητή IS-MMR, σε ανάλυση με το *ipsogen* BCR-ABL Mbcf IS-MMR Kit σε συνδυασμό με τα επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα (βλ. «Υλικά που παρέχονται», σελίδα 10 και «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται», σελίδα 11), πρέπει να είναι εντός του διαστήματος 0,05–0,3. Διαφορετικά οι τιμές NCN δεν μπορούν να μετατραπούν βάσει της Διεθνούς κλίμακας. Επιπλέον, ολόκληρο το πείραμα θα πρέπει να απορριφθεί εάν δεν ανιχνεύεται ο θετικός ορός ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης.

Μετατροπή IS και αναφορά MMR

Σημείωση: Πριν από την ερμηνεία, δείτε την τιμή που αναγράφεται στην ετικέτα του σωληναρίου του βαθμονομητή IS-MMR ή στο πιστοποιητικό ανάλυσης που συνοδεύει το κιτ.

Χρησιμοποιήστε το πειραματικό αποτέλεσμα NCN για το βαθμονομητή IS-MMR ($NCN_{\beta\alpha\theta\mu}$) και την αντιστοιχισμένη τιμή (τιμή IS-Cal) που αναγράφεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης για να υπολογίσετε τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων στη διεθνή κλίμακα ($IS-NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma}$).

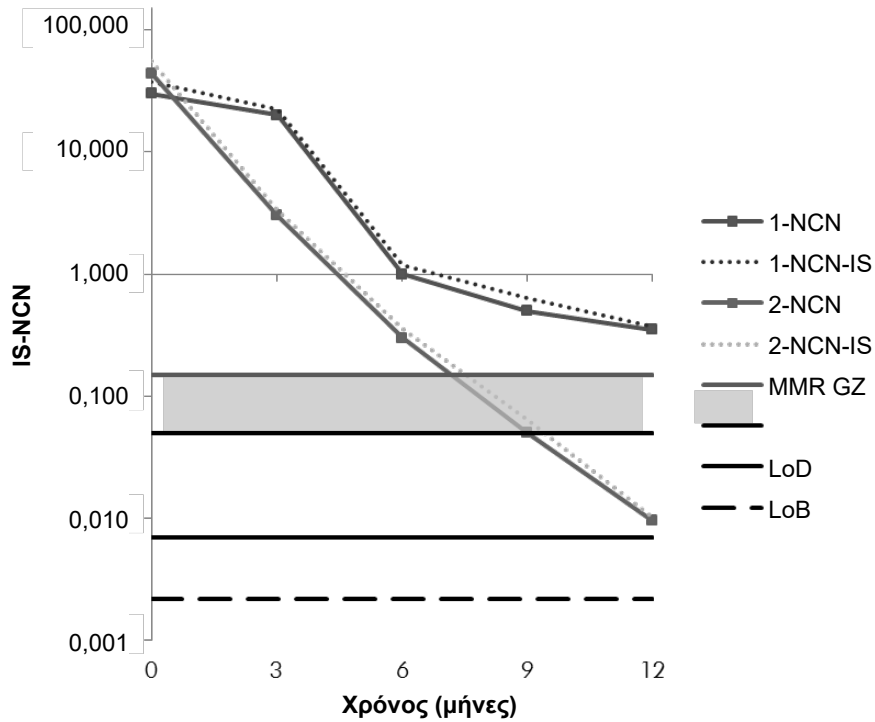
$$IS-NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} = \frac{NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} \times IS-Cal \text{ value}}{NCN_{cal}}$$

Προσδιορίστε την κατάσταση MMR κάθε δείγματος σύμφωνα με τα εξής κριτήρια.

- **$IS-NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} \leq 0,05$:** Σημαντική μοριακή ανταπόκριση
- **$0,05 < IS-NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} < 0,15$:** Γκρίζα ζώνη γύρω από την οριακή τιμή MMR, μη καταληκτικό αποτέλεσμα
- **$IS-NCN_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} \geq 0,15$:** Χωρίς μείζονα μοριακή ανταπόκριση

Το αποτέλεσμα $IS-NCN_{HC}$ (NCN στη διεθνή κλίμακα για το θετικό ορό ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης) δεν θα πρέπει να δείχνει μείζονα μοριακή ανταπόκριση.

Στην Εικόνα 11 φαίνεται ένα παράδειγμα παρακολούθησης ασθενούς με χρήση των αποτελεσμάτων NCN και $IS-NCN$.



Εικόνα 11. Καμπύλες παρακολούθησης ασθενή βάσει της κατάστασης MMR με το *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit*. **NCN:** Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων, **NCN-IS:** κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων σύμφωνα με τη διεθνή κλίμακα, **MMR GZ:** γκρίζα ζώνη MMR (gray zone, GZ), μη καταληκτικό αποτέλεσμα, **LoD:** όριο ανίχνευσης, **LoB:** επίπεδο υποβάθρου.

Περίληψη των κριτηρίων ποιότητας

Στον Πίνακα 14 συνοψίζονται τα διάφορα κριτήρια ποιότητας και οι αντίστοιχες τιμές ή αποτελέσματα.

Πίνακας 14. Περίληψη κριτηρίων ποιότητας

Κριτήρια	Αποδεκτές τιμές/αποτελέσματα
Διακυμάνσεις των τιμών C_T μεταξύ επαναλήψεων	$\leq 2 C_T$ εάν μέση τιμή $C_T > 36$ $\leq 1,5 C_T$ εάν μέση τιμή $C_T \leq 36$
Κλίση των πρότυπων καμπυλών	Μεταξύ -3,0 και -3,9
R^2 των πρότυπων καμπυλών	Τουλάχιστον $> 0,95$ καλύτερα εάν $> 0,98$
Αραίωση προτύπου SP1 (BCR-ABL 10 αντίγραφα πλασμιδίου)	Πρέπει να είναι ανιχνεύσιμη και να περιλαμβάνεται στην πρότυπη καμπύλη
Ποιοτικός έλεγχος της τιμής ABL_{CN} για δείγματα ασθενών, θετικό ορό ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης και για βαθμονομητή IS-MMR	$ABL_{CN} > 10.000$ αντίγραφα ABL για να επιτευχθεί η βέλτιστη ευαισθησία
Μάρτυρες PCR (δείγμα νερού) και αντίστροφης μεταγραφής (αρνητικός μάρτυρας RT)	Για καθένα: $ABL_{CN} = 0$ και $Mbcr_{CN} = 0$
Λαμβάνεται NCN για τον βαθμονομητή IS-MMR ($NCN_{\beta\alpha\theta\mu}$)	Πρέπει να είναι μεταξύ του διαστήματος 0,05 και 0,3
Θετικός ορός ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης	Πρέπει να ανιχνευτεί
Το NCN που προκύπτει για τον θετικό ορό ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης τροποποιημένο κατά τη διεθνή κλίμακα (IS- NCN_{HC})	Κατάσταση: Χωρίς μείζονα μοριακή ανταπόκριση

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα «Frequently Asked Questions» (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες του τμήματος Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και το πρωτόκολλο που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. «Στοιχεία επικοινωνίας», σελίδα 43).

Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit ελέγχεται σύμφωνα με προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση της ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων. Πιστοποιητικά ανάλυσης είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος στο www.qiagen.com/support/.

Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι και εξοικειωμένοι με την τεχνολογία αυτή προτού χρησιμοποιήσουν τη συσκευή αυτή.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων. Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επικυρώνει την απόδοση του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες απόδοσης της QIAGEN.

Πρέπει να δίδεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

Σημείωση: Το kit έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με τις μελέτες «Europe Against Cancer» (Η Ευρώπη κατά του καρκίνου, EAC) (8, 9) και συμμορφώνεται με τις ενημερωμένες διεθνείς συστάσεις. Το kit περιλαμβάνει ένα βαθμονομητή IS-MMR, τυποποιημένη σύμφωνα με τη διεθνή κλίμακα, που επιτρέπει τη μετατροπή των αποτελεσμάτων NCN σε επίπεδο διεθνούς κλίμακας και την αναφορά αποτελέσματος κατάστασης MMR (μείζων μοριακή ανταπόκριση).

Κάθε παρτίδα του βαθμονομητή IS-MMR έχει μια καθορισμένη τιμή που προκύπτει από την άμεση βαθμονόμηση με το εγκεκριμένο από το Εθνικό Ινστιτούτο Βιολογικών Προτύπων και Ελέγχου (NIBSC) του WHO πρωτεύον υλικό αναφοράς (Διεθνές γενετικός πίνακας αναφοράς για την ποσοτικοποίηση της μετατόπισης του BCR-ABL μέσω RQ-PCR (1ο I.S.), αρ. 09/138).

Σε κάθε kit παρέχεται πιστοποιητικό ανάλυσης που υποδεικνύει την καθορισμένη τιμή του βαθμονομητή IS-MMR.

Το κιτ πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα (βλ. «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται», σελίδα 11). Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

Χαρακτηριστικά επιδόσεων

Σημείωση: Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων έχουν καθοριστεί με χρήση του Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System σε συνδυασμό με το *ipsogen* BCR-ABL Mbcf IS-MMR Kit και με επιπλέον επικυρωμένα αντιδραστήρια (βλ. «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται», σελίδα 11).

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το όριο τυφλού (limit of blank, LoB) και όριο ανίχνευσης (limit of detection, LoD) έχουν προσδιοριστεί σύμφωνα με την οδηγία CLSI/NCCLS EP17-A.

Το επίπεδο υποβάθρου (limit of blank, LoB) έχει προσδιοριστεί σύμφωνα με αρνητικά δείγματα από υγιείς δότες (11 δείγματα, 69 μετρήσεις) και έχει βρεθεί ότι ισούται με NCN 0,0022 BCR-ABL Mbcf.

Το όριο ανίχνευσης (LoD ή αναλυτική ευαισθησία) έχει προσδιοριστεί σύμφωνα με γνωστά χαμηλά θετικά δείγματα ($n = 8$, 74 μετρήσεις) και έχει βρεθεί ότι ισούται με NCN 0,0069 BCR-ABL Mbcf.

- **NCN \leq LoB:** δεν ανιχνεύεται BCR-ABL Mbcf
- **LoB < NCN < LoD:** ανιχνεύεται BCR-ABL Mbcf αλλά δεν ποσοτικοποιείται
- **NCN \geq LoD:** ποσοτικοποιημένο BCR-ABL Mbcf

Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με την οδηγία CLSI/NCCLS EP6-A.

Η μελέτη διενεργήθηκε σε μείγματα θετικών και αρνητικών RNA εκχυλισμένα από κυτταρικές σειρές. Εξετάστηκαν έντεκα διαφορετικά επίπεδα εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτά τα δείγματα δείχνουν ότι ο προσδιορισμός με *ipsogen* BCR-ABL Mbcf IS-MMR είναι γραμμικός σε εύρος NCN από 0,003 έως 65 BCR-ABL Mbcf.

Όγκοι εισαγωγής

Για τη μελέτη επιλέχθηκαν πέντε διαφορετικά RNA με ποικίλα επίπεδα NCN BCR-ABL Mbcf. Αναλύθηκαν διαφορετικές ποσότητες RNA και cDNA ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση των όγκων εισαγωγής στα αποτελέσματα NCN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταβλητότητα των όγκων εισαγωγής έχει περιορισμένη επίδραση στα αποτελέσματα NCN, ενώ ο όγκος εισαγωγής cDNA αποδείχθηκε περισσότερο ευαίσθητος παράγοντας κατά τη χρήση περισσότερου ή λιγότερου υλικού. Ως αποτέλεσμα, οι όγκοι εισαγωγής 1 µg RNA και 5 µl cDNA προτείνονται για τη δοκιμασία.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια προσδιορίστηκε σύμφωνα με την οδηγία CLSI/NCCLS EP5-A2.

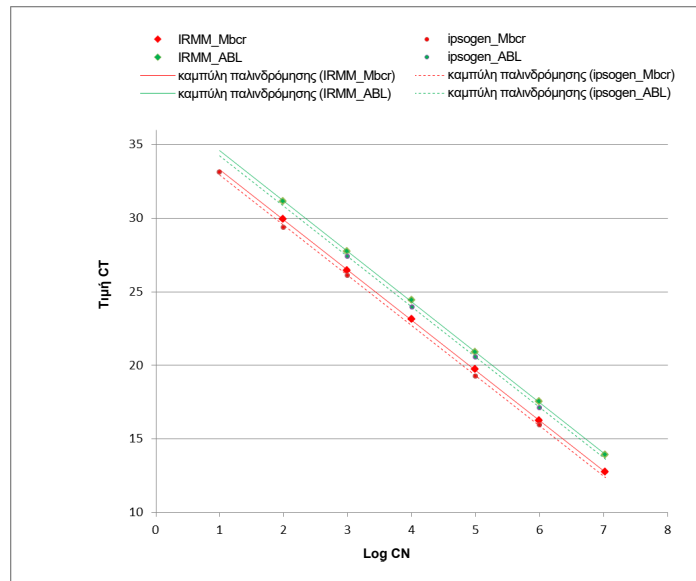
Η μελέτη ακρίβειας διενεργήθηκε σε 13 διαφορετικά δείγματα που εξετάστηκαν 42 φορές σε αντίγραφα (n = 84). Τα δείγματα αυτά ήταν αντιπροσωπευτικά διαφορετικών επιπέδων έκφρασης BCR-ABL Mbcf σε δείγματα ασθενών γύρω και πάνω από την τιμή MMR. Ο καθολικός συντελεστής διακύμανσης γύρω από την τιμή MMR βρέθηκε ότι ισούται με 25%.

Μελέτη συμφωνίας: Πρότυπο κοινού πλασμιδίου ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) έναντι προτύπου κοινού πλασμιδίου *ipsogen* (QIAGEN)

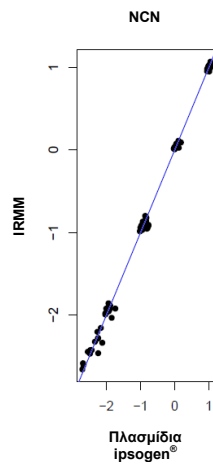
Οι πιο πρόσφατοι ορισμοί εργασίας της μοριακής ανταπόκρισης BCR-ABL1 Mbcf στη ΧΜΛ προέρχονται από την Ομάδα μοριακής παρακολούθησης του European LeukemiaNet/European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS), προτείνοντας τη χρήση του πλασμιδίου ERM-AD623 BCR-ABL1, από το Ινστιτούτο Υλικών Αναφοράς και Μετρήσεων (IRMM, Βέλγιο): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Προς συμμόρφωση με την εν λόγω σύσταση, η QIAGEN διεξήγαγε μια μελέτη συμφωνίας για τη σύγκριση του κοινού πλασμιδίου πολλαπλών στόχων *ipsogen*, του κοινού πλασμιδίου που χρησιμοποιείται στο *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit (24) CE (αρ. κατ. 670723), με το πλασμίδιο ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

Η σύγκριση βασίστηκε στον κανονικοποιημένο λόγο αριθμών αντιγράφων (NCN) του BCR-ABL1 Mbcf/ABL1 και αξιολόγησε με χρήση και των αραιώσεων των δύο προτύπων (*ipsogen* ή ERM-AD623 BCR-ABL1) σε δείγματα ορών ελέγχου που περιλαμβάνονται στα κιτ *ipsogen* και του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς από το Εθνικό Ινστιτούτο Βιολογικών Προτύπων και Ελέγχου (NIBSC), White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.



Εικόνα 12. οι πρότυπες καμπύλες πλασμιδίων *ipsogen* και ERM-AD623 BCR-ABL1 είναι ευθυγραμμισμένες.



ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit.

Εικόνα 13. τιμές NCN ERM-AD623 BCR-ABL1 έναντι τιμών NCN *ipsogen*.

Η μελέτη της QIAGEN συμπεραίνει ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά: τα πρότυπα κοινού πλασμιδίου ERM-AD623 BCR-ABL1 και κοινού πλασμιδίου *ipsogen* δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

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

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση:



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Στοιχεία επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support, καλέστε στο 00800-22-44-6000 ή επικοινωνήστε με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf IS-MMR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Πρότυπα κοινών πλασμιδίων Mbcf και ABL, θετικός ορός ελέγχου RNA υψηλής συγκέντρωσης, βαθμονομητής IS-MMR, Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών ABL, μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf	670723
Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση real-time PCR σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
<i>ipsogen</i> RT Kit — για αντίστροφη μεταγραφή		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Αντίστροφη μεταγραφάση, τυχαίος εκκινητής, DTT, dNTP, αναστολέας Rnaσών, ρυθμιστικό διάλυμα RT	679923
RNeasy Midi Kit — για τον καθαρισμό ολικού RNA		
RNeasy Midi Kit (50)	Για 50 παρασκευές RNA: 50 στήλες RNeasy Midi Spin, σωληνάρια συλλογής (15 ml), αντιδραστήρια και ρυθμιστικά διαλύματα ελεύθερα RNασών	75144

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο kit QIAGEN ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια και τα εγχειρίδια χρήστη των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας διανομέα.

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

Οι πληροφορίες στο παρόν έγγραφο μπορεί να αλλάξουν χωρίς προειδοποίηση. Η QIAGEN δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για τυχόν σφάλματα που ενδέχεται να υπάρχουν στο παρόν έγγραφο. Αυτό το έγγραφο θεωρείται ότι είναι πλήρες και ακριβές κατά το χρόνο της δημοσίευσης. Σε καμία περίπτωση η QIAGEN δεν φέρει ευθύνη για τυχόν θετικές, ειδικές, πολλαπλές ή αποθετικές ζημιές που σχετίζονται ή προκύπτουν από τη χρήση του εγγράφου αυτού.

Τα προϊόντα *ipsogen* είναι εγγυημένα ότι πληρούν τις δηλωμένες προδιαγραφές τους. Η μόνη υποχρέωση της QIAGEN και η μόνη αποζημίωση του αγοραστή περιορίζονται στη δωρεάν αντικατάσταση των προϊόντων στην περίπτωση που αυτά δεν αποδίδουν σύμφωνα με την εγγύηση.

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

Συμφωνία περιορισμένης αδειας

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit των εξής όρων:

1. Η χρήση του *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το Εγχειρίδιο *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο Εγχειρίδιο *ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit* και στα πρόσθετα πρωτόκολλα που διατίθενται στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

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

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

www.qiagen.com

