

# Instrukcja zestawu *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 mbcr Kit



Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>,  
LightCycler<sup>®</sup> oraz SmartCycler<sup>®</sup>



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANY

R2

MAT

1072506PL



## **Technologie badań i analizy firmy QIAGEN**

Firma QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii oczyszczania i analizy próbek, umożliwiając izolację i wykrywanie zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane, wysokiej jakości produkty i usługi zapewniają sukces na każdym etapie - od chwili pobrania próbki do uzyskania wyniku.

### **QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:**

- ⌘ Oczyszczania DNA, RNA i białek
- ⌘ Analizy kwasów nukleinowych i białek
- ⌘ Badań nad mikroRNA oraz RNAi
- ⌘ Automatyzacji technologii obróbki próbek i ich analizy

Naszą misją jest umożliwienie osiągnięcia znakomitych i przełomowych wyników w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

# Spis treści

<b>Przeznaczenie</b>	<b>4</b>
<b>Podsumowanie i wyjaśnienia</b>	<b>4</b>
<b>Zasada procedury</b>	<b>5</b>
<b>Materiały dostarczone</b>	<b>7</b>
Zawartość zestawu	7
<b>Materiały wymagane, ale nie dostarczone</b>	<b>8</b>
<b>Ostrzeżenia i uwagi</b>	<b>9</b>
Uwagi ogólne	9
<b>Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami</b>	<b>10</b>
<b>Procedura</b>	<b>11</b>
Preparatyka RNA	11
Protokół: Wystandaryzowana odwrotna transkrypcja rekomendowana przez EAC	11
Protokół: qPCR na aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 probówki	14
Protokół: qPCR na aparatach ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS oraz LightCycler 480	18
Protokół: qPCR na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0	23
Protokół: qPCR na aparacie SmartCycler	27
<b>Interpretacja wyników</b>	<b>30</b>
Zasada analizy danych	30
Wyniki	31
Rozwiązywanie problemów	33
<b>Kontrola jakości</b>	<b>36</b>
<b>Ograniczenia</b>	<b>37</b>
<b>Charakterystyka wydajności</b>	<b>37</b>
Badania niekliniczne	37
Badania kliniczne	40
<b>Literatura</b>	<b>42</b>
<b>Symbole</b>	<b>43</b>
<b>Informacje kontaktowe</b>	<b>44</b>
<b>Informacje dotyczące zamawiania</b>	<b>44</b>

## Przeznaczenie

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit służy do oceny ilościowej transkryptów BCR-ABL p190 w próbkach szpiku kostnego i krwi obwodowej u Ph-pozytywnych (pozytywnych dla chromosomu Filadelfia) pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. acute lymphoblastic leukemia; ALL), u których uprzednio zdiagnozowano gen fuzyjny (ang. fusion gene; FG) BCR-ABL mbc. Uzyskane wyniki mają na celu monitorowanie efektywności postępów leczenia u pacjentów poddawanych terapii choroby resztkowej (minimal residual disease; MRD) oraz monitorowania nawrotów choroby.

## Podsumowanie i wyjaśnienia

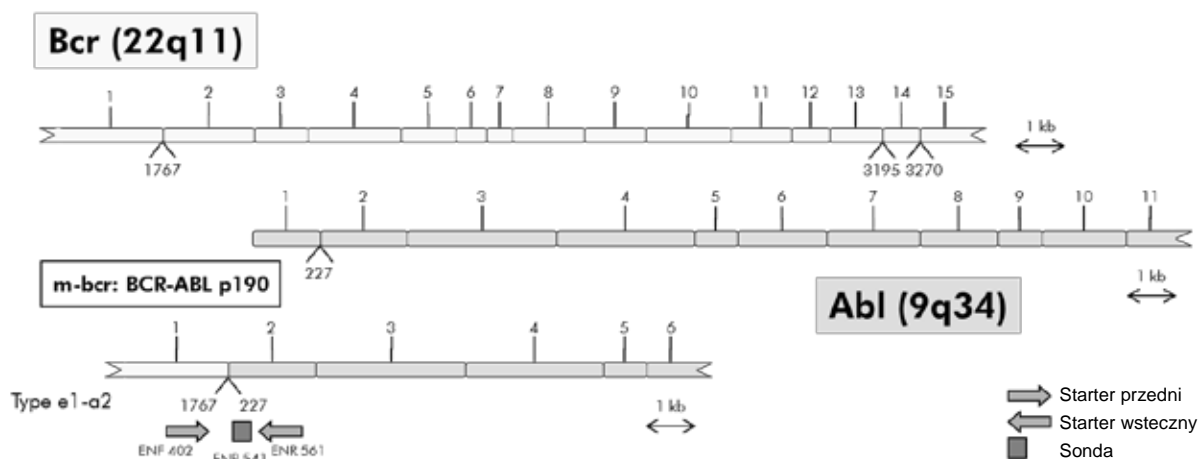
Chromosom Filadelfia (Ph) jest najczęstszą aberracją kariotypową u dorosłych z ALL. Występuje u 20-30% dorosłych pacjentów z ALL i powyżej 50% dla osób w wieku 50 lat i starszych.

W translokacji tej segment 3' protoonkogenu ABL na chromosomie 9 jest zestawiony z segmentem 5' genu BCR na chromosomie 22. Gen fuzyjny BCR-ABL jest wytworem chromosomu Ph i koduje konstytutywnie syntezę aktywnego białka kinazy tyrozynowej.

Pęknięcia w genie ABL zwykle mają miejsce w pierwszym intronie. Pęknięcia w genie BCR zwykle mają miejsce w jednym z następujących 3 regionów: rejon 5,8 kpz (kilo par zasad) obejmujący eksony 12–16 jest zwany głównym regionem klasterowym pęknięć (ang. major breakpoint cluster region; Mbc), rejon 55 kpz w pierwszym intronie jest zwany mniejszym regionem klasterowym pęknięć (ang. minor breakpoint cluster region; mbc) oraz rejon zwany mikro regionem klasterowym pęknięć (ang. micro breakpoint cluster region;  $\mu$ -bcr).

Pęknięcia powstające w rejonie mbc join przyłączają się do eksonu 1 (e1) poprzez drugi ekson genu ABL (a2) skutkując mniejszym transkryptem fuzyjnym e1a2, kodującym chimeryczne białko 190 kDa (p190) (Rysunek 1). Białko p190 BCR-ABL jest obserwowane tylko w ALL Ph+, podczas gdy białko p210 BCR-ABL występuje u 20–40% pacjentów z ALL Ph+ i prawie wszystkich pacjentów z chroniczną leukemią mieloidalną Ph+ (ang. chronic myelogenous leukemia; CML).

Wszystkie formy białek fuzyjnych BCR-ABL mają zwiększoną i rozregulowaną aktywność kinazy tyrozynowej i wykazano, że forma p190 ma większy potencjał transformacyjny niż forma p210. Ponadto to chimeryczne białko zdaje się reozregulowywać normalne cytokino-zależne szlaki sygnalizacyjne, co prowadzi do inhibicji apoptozy lub wzrostu niezależnego od czynnika wzrostu.



**Rysunek 1. Schematyczny diagram transkryptu genu fuzyjnego BCR-ABL wraz z zestawem starterów i sondy qPCR: ENF402–ENP541–ENR561.** Numery pod starterami i sondą odnoszą się do odpowiednich pozycji nukleotydowych w niezmienionym transkrypcie.

Terapia pacjentów ALL Ph+ została zoptymalizowana poprzez wprowadzenie inhibitorów kinazy tyrozynowej, co znacząco przedłużyło czas przeżycia tych pacjentów (publikacja przeglądowa – pozycja 1 Literatury). Pacjenci ci wymagają monitorowania choroby resztkowej (MRD). Obecna metodologia oceny poziomu MRD wymaga użycia technologii ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), gdzie ilość transkryptów BCR-ABL jest porównywana do ilości transkryptów genu kontrolnego. Działanie zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit jest oparte na tej technologii.

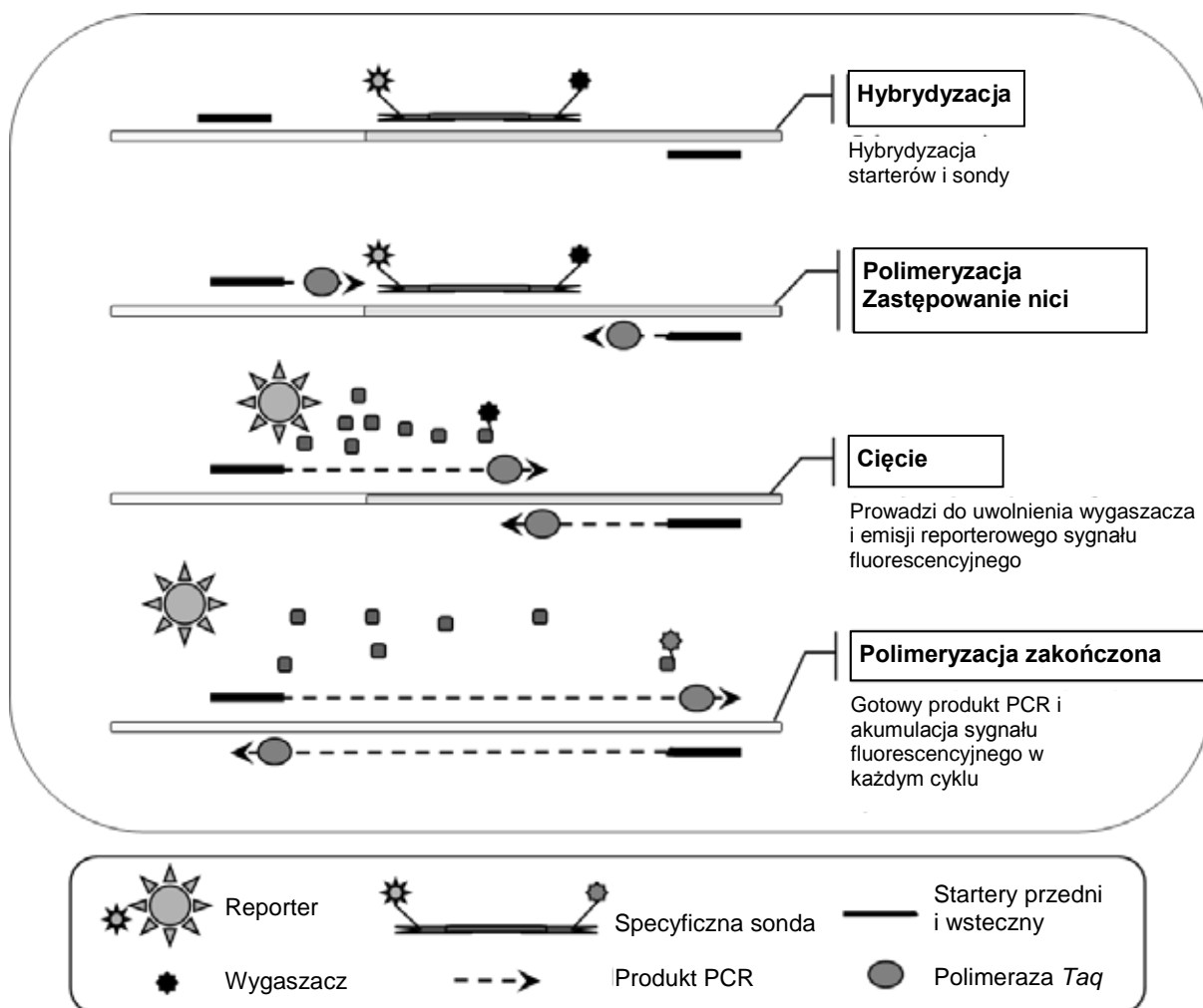
## Zasada procedury

Ilościowy PCR pozwala na dokładną ocenę ilościową produktów podczas fazy wykładniczej amplifikacji PCR. Dane PCR mogą być wygenerowane szybko, bez potrzeby dodatkowej obróbki danych, poprzez detekcję sygnału fluorescencyjnego w czasie rzeczywistym podczas oraz/lub po etapie cyklu PCR, co zasadniczo minimalizuje ryzyko kontaminacji produktów PCR. Obecnie dostępne są trzy główne rodzaje technik qPCR: analiza qPCR z użyciem barwnika SYBR® Green I, analiza qPCR z użyciem sond hydrolizujących oraz sond hybrydujących.

Niniejszy zestaw wykorzystuje technologię qPCR opartą na hydrolizie oligonukleotydów znakowanych dwoma barwnikami. Podczas PCR startery przedni (forward) oraz wsteczny (reverse) hybrydują do specyficznej sekwencji. Podwójnie wybarwiony oligonukleotyd jest zawarty w tej samej mieszaninie. Ta sonda, składająca się z oligonukleotydu znakowanego barwnikiem reporterowym 5' oraz w dalszej części barwnikiem wygaszającym 3', hybryduje do sekwencji docelowej w obrębie produktu PCR. Analiza qPCR z użyciem sond hydrolizujących wykorzystuje aktywność egzonukleazy 5'® 3' polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Gdy sonda jest cała, bliskość barwników reporterowego i wygaszającego powoduje supresję fluorescencji reporterowej, głównie za sprawą transferu energii typu Förstera.

Podczas PCR, gdy sekwencja docelowa jest obecna, sonda wiąże się z nią specyficjnie pomiędzy starterem przednim a wstecznym. Aktywność egzonukleazy 5'@ 3' polimerazy DNA tnie sondę pomiędzy barwnikiem reporterowym a wygaszającym tylko po jej przyłączeniu się do sekwencji docelowej. Wówczas fragmenty sondy odłączają się od sekwencji docelowej i polimeryzacja nici jest kontynuowana. Koniec 3' sondy jest zablokowany celem uniemożliwienia jej wydłużania podczas PCR (Rysunek 2). Proces ten powtarza się w każdym cyklu i nie interferuje z wykładniczą akumulacją produktu.

Przyrost sygnału fluorescencyjnego jest wykrywany tylko gdy sekwencja docelowa jest komplementarna z sondą, a co za tym idzie jest amplifikowany podczas PCR. W związku z tymi uwarunkowaniami, amplifikacja niespecyficzna nie jest wykrywana. W efekcie, przyrost fluorescencji jest wprost proporcjonalny do amplifikacji produktu docelowego w PCR.



**Rysunek 2. Zasada reakcji.** RNA całkowite jest poddawane odwrotnej transkrypcji i generowane cDNA amplifikowane w reakcji PCR z użyciem pary specyficznych starterów oraz specyficznej wewnętrznie podwójnie wyznakowanej sondy (FAM™–TAMRA™). Sonda przyłącza się do amplikonu na każdym etapie hybrydyzacji PCR. Gdy polimeraza *Taq* wydłuża nią ze startera przyłączonego do amplikonu następuje oderwanie końca 5' sondy, która jest następnie degradowana wskutek aktywności egzonukleazowej 5'@ 3' Polimerazy *Taq*. Degradacja ta jest kontynuowana do momentu całkowitego usunięcia sondy z amplikonu. Proces ten uwalnia fluorofor (reporter) oraz wygaszcz do

roztworu, co prowadzi do ich fizycznej separacji (oddalenia), co skutkuje wzrostem fluorescencji z barwnika FAM i osłabieniem fluorescencji z barwnika TAMRA.

## Materiały dostarczone

### Zawartość zestawu

<b>Zestaw <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Numer kat.</b>			<b>670023</b>
<b>Ilość reakcji</b>			<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution <sup>§</sup> (10 <sup>3</sup> kopii/5 µl)	C1-ABL		50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 <sup>4</sup> kopii/5 µl)	C2-ABL		50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 <sup>5</sup> kopii/5 µl)	C3-ABL		50 µl
BCR-ABL mbcr Fusion Gene Standard Dilution <sup>‡</sup> (10 <sup>1</sup> kopii/5 µl)	F1-BCR-ABL e1a2 mbcr		50 µl
BCR-ABL mbcr Fusion Gene Standard Dilution (10 <sup>2</sup> kopii/5 µl)	F2-BCR-ABL e1a2 mbcr		50 µl
BCR-ABL mbcr Fusion Gene Standard Dilution (10 <sup>3</sup> kopii/5 µl)	F3-BCR-ABL e1a2 mbcr		50 µl
BCR-ABL mbcr Fusion Gene Standard Dilution (10 <sup>5</sup> kopii/5 µl)	F4-BCR-ABL e1a2 mbcr		50 µl
BCR-ABL mbcr Fusion Gene Standard Dilution (10 <sup>6</sup> kopii/5 µl)	F5-BCR-ABL e1a2 mbcr		50 µl
Primers and Probe Mix ABL*	PPC-ABL 25x		90 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbcr Fusion Gene <sup>†</sup>	PPF-mbcr 25x		110 µl
Instrukcja zestawu <i>ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit</i>	anglojęzyczna		1

<sup>§</sup> Rozcieńczenie standardów genu kontrolnego ABL

<sup>‡</sup> Rozcieńczenie standardów genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr

\* Mieszanina specyficznych starterów przednich i wstecznych dla genu kontrolnego ABL wraz ze specyficzną sondą FAM–TAMRA.

† Mieszanina specyficznych starterów przednich i wstecznych dla genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr wraz ze specyficzną sondą FAM–TAMRA.

**Uwaga:** Krótco zwiruj standardy oraz mieszanin starterów i sond przed użyciem.

## Materiały wymagane, ale nie dostarczone

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami bezpieczeństwa materiałów (safety data sheets; SDS), dostępnymi u producentów lub dostawców produktów.

### Odczynniki

- ☒ Woda do PCR wolna od nukleaz
- ☒ Odczynniki do odwrotnej transkrypcji: Zwalidowanym odczynnikiem jest odwrotna transkryptaza Superscript<sup>®</sup> II (lub Superscript), zawiera 5x 'first-strand buffer', 100 mM DTT (Life Technologies, nr kat. 18064-022)
- ☒ Inhibitor RNaz: Zwalidowanym odczynnikiem jest RNaseOUT<sup>™</sup> (Life Technologies, nr kat. 10777-019)
- ☒ Zestaw nukleotydów (dNTPs) do PCR
- ☒ Startery do odwrotnej transkrypcji typu 'random hexamer'
- ☒ MgCl<sub>2</sub>
- ☒ Polimeraza DNA *Taq* wraz z buforem: Zwalidowanymi odczynnikami są TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (mieszanka PCR 2x) (Life Technologies, nr kat. 4304437) oraz LightCycler TaqMan Master (mieszanka PCR 5x) (Roche, nr kat. 04535286001)

### Materiały zużywalne

- ☒ Sterylne wolne od nukleaz końcówki do pipet (do PCR, z filtrami)
- ☒ Probówki PCR 0,5 ml lub 0,2 ml wolne od nukleaz
- ☒ Lód

### Sprzęt

- ☒ Pipeta mikrolitrowa\* dedykowana do PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- ☒ Wirówka stołowa\* z rotorem na probówki 0,2 ml/0,5 ml (zdolna do osiągnięcia 10.000 rpm)
- ☒ Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub inny aparat Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0, lub 480; ABI PRISM 7000, 7700, lub 7900HT SDS; lub SmartCycler; wraz z dedykowanymi materiałami
- ☒ Termocykler\* lub łaźnia wodna\* (do odwrotnej transkrypcji)

\* Upewnij się, że urządzenia zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producentów.



## Odczynniki uzupełniające

- ☉ *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit (zestaw kontroli; nr kat. 670091), składający się linii komórkowych z negatywną, niską i wysoką ekspresją genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr do walidacji jakościowej izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji.

## Ostrzeżenia i uwagi

Do użytku diagnostycznego in vitro

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami bezpieczeństwa materiałów (safety data sheets) dostępnymi w internecie w postaci plików PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty dla każdego zestawu oraz poszczególnych komponentów zestawów QIAGEN.

Usuwać odpady próbek i analiz zgodnie z lokalnymi przepisami.

## Uwagi ogólne

Testy qPCR wymagają dobrej praktyki laboratoryjnej, w tym konserwacji sprzętu, dotyczącej procedur biologii molekularnej i zgodnej z odpowiednimi przepisami i standardami.

Ten zestaw jest przeznaczony do użytku diagnostycznego in vitro. Odczynniki i instrukcje dostarczone z tym zestawem zostały zwalidowane dla zapewnienia optymalnej wydajności. Rozcieńczanie odczynników większe od zalecanego lub zmiana czasów i temperatur inkubacji może skutkować błędnymi lub nieważnymi wynikami. Odczynniki PPC i PPF (mieszanki starterów i sond) mogą ulec uszkodzeniu pod wpływem światła. Kompozycja wszystkich odczynników jest dostosowana specyficznie do tego testu i dla zapewnienia optymalnej wydajności testu komponenty te nie powinny być zastępowane innymi.

Ocena poziomu transkryptów z użyciem qPCR wymaga zarówno odwrotnej transkrypcji mRNA, jak i amplifikacji wygenerowanego cDNA przy pomocy PCR. Co za tym idzie, cała procedura musi być wykonywana w środowisku wolnym od RNaz i DNaz.

Dołóż wszelkich starań aby zapobiegać:

- ☉ Kontaminacji RNazą/DNazą, co mogłoby spowodować degradację matrycowego mRNA oraz wygenerowanego cDNA
- ☉ Kontaminacji krzyżowej mRNA lub podczas PCR, co mogłoby spowodować wyniki fałszywie pozytywne

W związku z tym zalecamy jak następuje.

- ☉ Używaj sprzętu i materiałów wolnych od nukleaz (np. pipety, końcówki, probówki)

- ☉ Używaj świeżych końcówek do pipet z filtrami do wszystkich etapów pipetowania celem uniknięcia zanieczyszczeń krzyżowych odczynników i próbek.
- ☉ Przygotowuj mieszanki pre-PCR z użyciem dedykowanych akcesoriów (pipety, końcówki etc.) w dedykowanych obszarach wolnym od matryc DNA (cDNA, plazmidy, produkty PCR etc.). Dodawaj matryce w odseparowanym obszarze (najlepiej osobnym pomieszczeniu) z użyciem dedykowanych akcesoriów (pipety, końcówki etc.).
- ☉ Używaj rozcieńczeń standardów (C1–3 i F1–5) w osobnym pomieszczeniu.

## **Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami**

Zestawy są transportowane w suchym lodzie i po dostarczeniu muszą być przechowywane w  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ .

- ☉ Zminimalizuj dostęp światła do mieszanin starterów i sond (próbówki PPC i PPF).
- ☉ Ostrożnie wymieszaj i zwiruj próbki przez otwarcie.
- ☉ Przechowuj wszystkie komponenty zestawu w oryginalnych pojemnikach.

Wymienione warunki przechowywania dotyczą zarówno otwieranych jak i nieotwieranych komponentów. Komponenty przechowywane w warunkach innych niż te określone na opakowaniach mogą nie funkcjonować prawidłowo i znacząco zaburzyć wyniki analiz.

Daty przydatności do użycia każdego z odczynników są podane na etykietach każdego z komponentów. Przy zachowaniu wymaganych warunków przechowywania, produkt będzie zachowywał swoje właściwości aż do daty utraty ważności określonej na etykietach.

Nie ma żadnych oczywistych przesłanek wskazujących na brak stabilności tego produktu, jednakże kontrole pozytywne i negatywne powinny być analizowane razem z próbkami badanymi (nieznanymi).

## Procedura

### Preparatyka RNA

Preparatyka RNA z próbek pacjentów (krew lub szpik kostny) musi być wykonywana przy zastosowaniu zwalidowanej procedury. Jakość analizy jest w dużej mierze zależna od jakości początkowej RNA, a co za tym idzie, przed przystąpieniem do analizy, zalecamy ocenę jakości oczyszczonego RNA przy pomocy elektroforezy agarozowej\* lub aparatu Agilent® Bioanalyzer®.

### Protokół: Wystandaryzowana odwrotna transkrypcja rekomendowana przez EAC

EAC (ang. Europe Against Cancer)

#### Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- ☉ Przygotuj nukleotydy (dNTP), każdy 10 mM. Przechowuj rozporcjowane w  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane odczynniki i umieść na lodzie.
2. Inkubuj 1  $\mu\text{g}$  RNA (1–4  $\mu\text{l}$ ) przez 10 minut w  $70^{\circ}\text{C}$ , po czym natychmiast schłódź na lodzie przez 5 minut.
3. Zwiruj krótko (około 10 sekund, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki) i umieść na lodzie.
4. Przygotuj następującą mieszaninę do odwrotnej transkrypcji (RT mix) odpowiednio do ilości analizowanych próbek (Tabela 1).

\* Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś odpowiednią odzież ochronną, taką jak okulary, fartuch i rękawiczki jednorazowe.

**Tabela 1. Przygotowanie mieszaniny RT (do odwrotnej transkrypcji)**

<b>Składowa</b>	<b>Objętość na próbkę (µl)</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
First-Strand Buffer (dostarczony z Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTPs (nukleotydy; każdy 10 mM, do wcześniejszego przygotowania, rozporcjowania i przechowywania w -20°C)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, dostarczony z Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
RNase inhibitor (inhibitor RNaz; 40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Random hexamer (startery do odwrotnej transkrypcji; 100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II lub Superscript Reverse Transcriptase (odwr. transkryptaza; 200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Podgrzana próbka RNA (do dodania w kroku 5)	1,0 - 4,0	50 ng/µl
Woda do PCR wolna od nukleaz (do dodania w kroku 5)	0,0 - 3,0	–
Objętość końcowa	20,0	–

5. Dodaj 16 µl mieszaniny RT do każdej próbki PCR. Następnie dodaj 1–4 µl (1 µg) RNA (z kroku 3) i jeśli potrzeba dopełnij wodą wolną od nukleaz do objętości 20 µl (patrz Table 2).

**Tabela 2. Przygotowywanie reakcji odwrotnej transkrypcji**

<b>Składowa</b>	<b>Objętość (µl)</b>
Mieszanina RT	16
Podgrzana próbka RNA (1 µg)	1–4
Woda do PCR wolna od nukleaz	0–3
Objętość końcowa	20

6. Dobrze wymieszaj i krótko zwirowuj (około 10 sekund, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).
7. Inkubuj w 20°C przez 10 minut.
8. Inkubuj w 42°C w termocyklerze przez 45 minut, a następnie natychmiast w 99°C przez 3 minuty.
9. Schłódź na lodzie (celem zatrzymania reakcji) przez 5 minut.
10. Krótko zwirowuj (około 10 sekund, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki) i umieść na lodzie.
11. Rozcieńcz końcowe cDNA dodając 30 µl wody do PCR wolnej od nukleaz, tak aby objętość końcowa wyniosła 50 µl.
12. Przeprowadź PCR zgodnie z następującymi protokołami i zgodnie z wymaganiami Twojego aparatu qPCR.

## Protokół: qPCR na aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 próbki

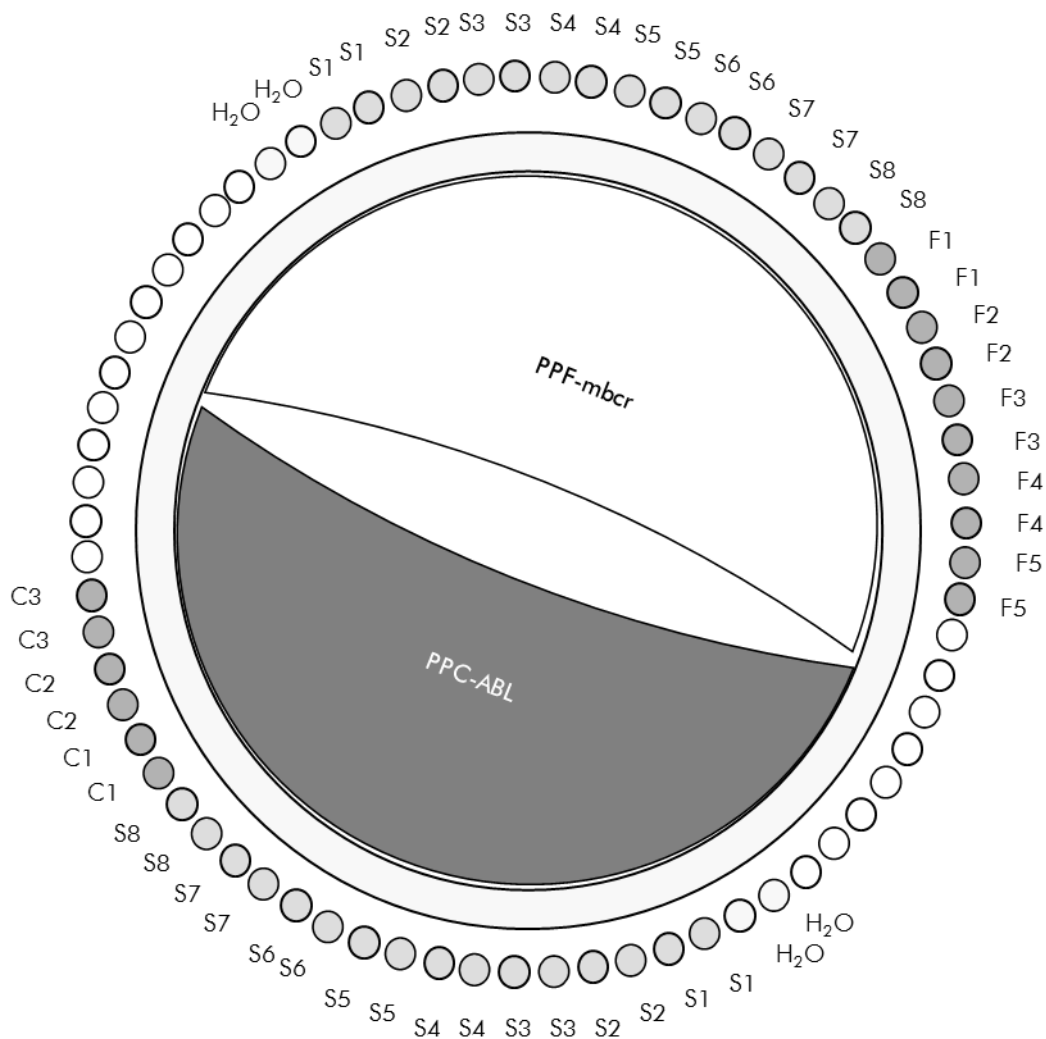
Używając tego aparatu zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach, jak pokazano w Tabeli 3.

**Tabela 3. Ilość reakcji dla aparatów Rotor-Gene Q z rotorem 72-probówkowym**

<b>Próbki</b>	<b>Reakcje</b>
<b>Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
ABL standard	2 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia, każde w duplikacie)
Kontrola z wodą	2 reakcje
<b>Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
mbcr standard	2 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń, każde w duplikacie)
Kontrola z wodą	2 reakcje

### **Analiza próbek na aparatach Rotor-Gene Q z rotorem 72-probówkowym**

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz mieszanin starterów i sond, zalecamy testowanie przynajmniej 8 próbek cDNA w tym samym eksperymencie.



**Rysunek 3. Sugerowane rozmieszczenie próbek na rotorze dla każdego eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kit. F1–5: standardy BCR-ABL mbcR; C1–3: standardy ABL; S: próbka cDNA; H<sub>2</sub>O: kontrola z wodą.**

**Uwaga:** Zawsze umieszczaj w pozycji 1 rotora próbkę badaną, gdyż w przeciwnym razie aparat nie dokona kalibracji i nastąpi nieprawidłowy odczyt danych fluorescencji.

Puste miejsca wypełnij pustymi probówkami.

### **Analiza qPCR na aparatach Rotor-Gene Q z rotorem 72-probówkowym**

**Uwaga:** Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

#### **Procedura**

- 1. Rozmroź wszystkie wymagane odczynniki i umieść w lodzie.**
- 2. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR odpowiednio do ilości analizowanych próbek.**

Podane stężenia dotyczą końcowej objętości reakcji.

Tabela 4 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszanki odczynnikowej obliczonej do otrzymania końcowej objętości reakcji 25 µl. Mieszanka wstępna (pre-mix) może zostać przygotowana, zgodnie z ilością reakcji, przy użyciu tej samej mieszanki starterów i sond (PPC-ABL lub PPF-mbcr). Dodatkowe objętości kompensujące błędy pipetowania zostały uwzględnione.

**Tabela 4. Przygotowanie mieszanki (pre-mix) qPCR**

<b>Składowa</b>	<b>1 reakcja (µl)</b>	<b>ABL: 24+1 reakcje (µl)</b>	<b>BCR-ABL mbcr: 28+1 reakcje (µl)</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mieszanka starterów i sond, 25x	1	25	29	1x
Woda do PCR wolna od nukleaz	6,5	162,5	188,5	–
Próbka (do dodania w kroku 4)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość końcowa	25	25 każda	25 każda	–

3. Rozdozuj po 20 µl mieszanki (pre-mix) qPCR do probówek.
4. Dodaj 5 µl produktu RT (cDNA, ekwiwalent 100 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz 'Protokół: Wystandaryzowana odwrotna transkrypcja rekomendowana przez EAC', strona 11) do odpowiedniej probówki (objętość całkowita 25 µl).
5. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
6. Umieść próbki w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
7. Zaprogramuj aparat Rotor-Gene Q zgodnie z programem podanym w Tabeli 5.



**Tabela 5. Profil temperaturowy**

<b>Typ analizy</b>	Quantitation
<b>Inkubacja (hold)</b>	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
<b>Inkubacja 2 (hold 2)</b>	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
<b>Cykle</b>	50 razy 95°C przez 15 sek 60°C przez 1 min z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM w pojedynczym kanale zielonym (channel Green: Single)

8. Dla aparatów Rotor-Gene Q przy analizie danych wybierz opcję 'Slope Correct'. Zalecamy ustawienie progu odcięcia (threshold) na 0,03. Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 5.

## Protokół: qPCR na aparatach ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS oraz LightCycler 480

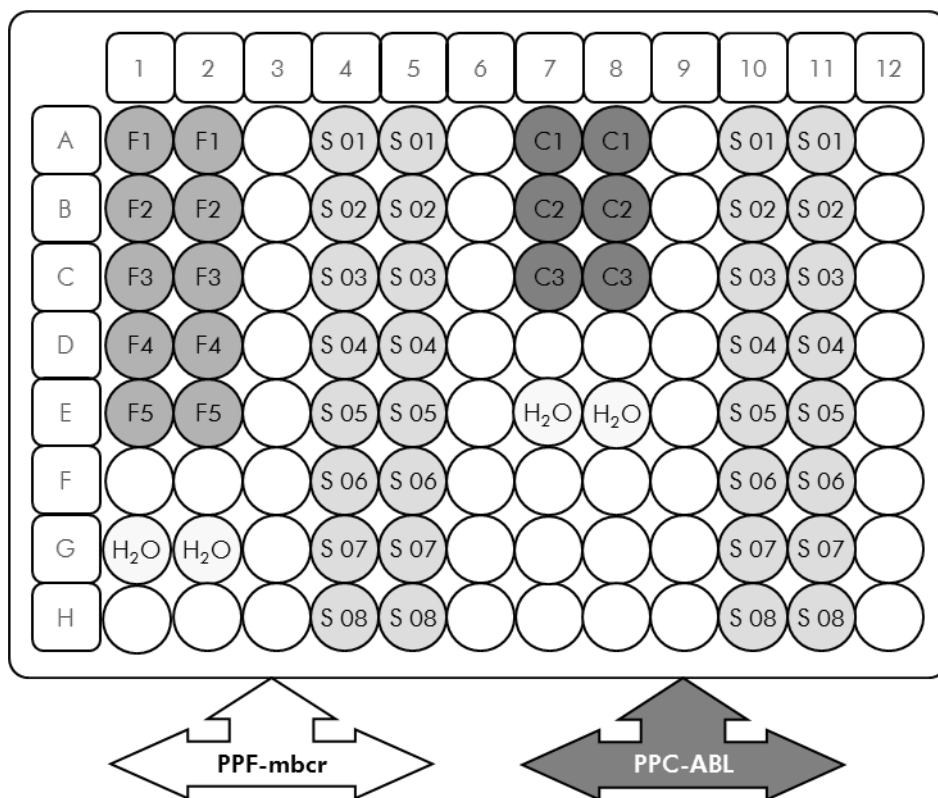
Używając sprzętu qPCR o formacie 96-dołkowym, zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach, jak pokazano w Tabeli 6.

**Tabela 6. Ilość reakcji z użyciem sprzętu qPCR o formacie 96-dołkowym**

<b>Próbki</b>	<b>Reakcje</b>
<b>Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Standard ABL	2 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia, każde w duplikacie)
Kontrola z wodą	2 reakcje
<b>Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Standard mbcr	2 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń, każde w duplikacie)
Kontrola z wodą	2 reakcje

### Analiza próbek na aparatach ABI PRISM 7000, 7700 i 7900 SDS oraz LightCycler 480

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz mieszanin starterów i sond, zalecamy testowanie przynajmniej 8 próbek cDNA w tym samym eksperymencie. Schemat płytki pokazany na Rysunku 4 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



**Rysunek 4. Sugerowany układ płytki dla jednego eksperymentu. S:** próbka cDNA; **F1–5:** standardy BCR-ABL mbcr; **C1–3:** standardy ABL; **H<sub>2</sub>O:** kontrola z wodą.

## qPCR na aparatach ABI PRISM 7000, 7700 i 7900 SDS oraz LightCycler 480

**Uwaga:** Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

### Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane komponenty i umieść na lodzie.
2. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR zgodnie z ilością analizowanych próbek. W przypadku używania sprzętu qPCR o formacie 96-dołkowym, zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach.

Podane stężenia dotyczą końcowej objętości reakcji.

Tabela 7 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszaniny odczynnikowej obliczonej do otrzymania końcowej objętości reakcji 25 µl. Mieszanina wstępna (pre-mix) może zostać przygotowana, zgodnie z ilością reakcji, przy użyciu tej samej mieszaniny starterów i sond (PPC-ABL lub PPF-mbcr). Dodatkowe objętości kompensujące błędy pipetowania zostały uwzględnione.

**Tabela 7. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR**

<b>Składowa</b>	<b>1 reakcja (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24+1 reakcje (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL mbcr: 28+1 reakcje (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 25x	1	25	29	1x
Woda do PCR wolna od nukleaz	6,5	162,5	188,5	–
Próbka (do dodania w kroku 4)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość końcowa	25	25 każda	25 każda	–

3. Rozdozuj po 20  $\mu$ l mieszaniny (pre-mix) qPCR do probówek.
4. Dodaj 5  $\mu$ l produktu RT (cDNA, ekwiwalent 100 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz 'Protokół: Wystandaryzowana odwrotna transkrypcja rekomendowana przez EAC', strona 11) do odpowiedniej probówki (objętość całkowita 25  $\mu$ l).
5. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
6. Zaklej płytkę i zwiruj krótko (300 x g, około 10 sekund).
7. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta. Zaprogramuj termocykler zgodnie z programem przedstawionym w Tabeli 8 dla aparatów ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS lub Tabeli 9 dla aparatu LightCycler 480.

**Tabela 8. Profil temperaturowy dla ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS**

<b>Typ analizy</b>	Standard Curve – Absolute Quantitation
<b>Inkubacja (hold)</b>	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
<b>Inkubacja 2 (hold 2)</b>	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
<b>Cykle</b>	50 razy 95°C przez 15 sek 60°C przez 1 min z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM; wygaszacz: TAMRA

**Tabela 9. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 480**

<b>Typ analizy</b>	Absolute Quantification ('Abs Quant')
<b>Detection formats (formaty detekcji)</b>	Wybierz 'Simple Probe' w oknie 'Detection formats'
<b>Inkubacja (hold)</b>	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
<b>Inkubacja 2 (hold 2)</b>	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
<b>Cykle</b>	50 razy 95°C przez 15 sek 60°C przez 1 min z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM odpowiadającej (483-533 nm) dla LC wersja 01 oraz (465-510 nm) dla LC wersja 02

8. Dla ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS przejdź do kroku 8a. Dla LightCycler 480 przejdź do kroku 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS: Zalecamy ustawienie progu odcięcia (threshold) na 0,1 jak opisano w protokole EAC w etapie analizy dla ABI PRISM SDS i ustawienie linii bazowej pomiędzy cyklem 3 a 15. Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 8.

**8b. LightCycler 480: Zalecamy użycie opcji 'Fit point analysis' z poziomem tła 2,0 i progiem odcięcia (theshold) 2,0. Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 9.**

## Protokół: qPCR na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0

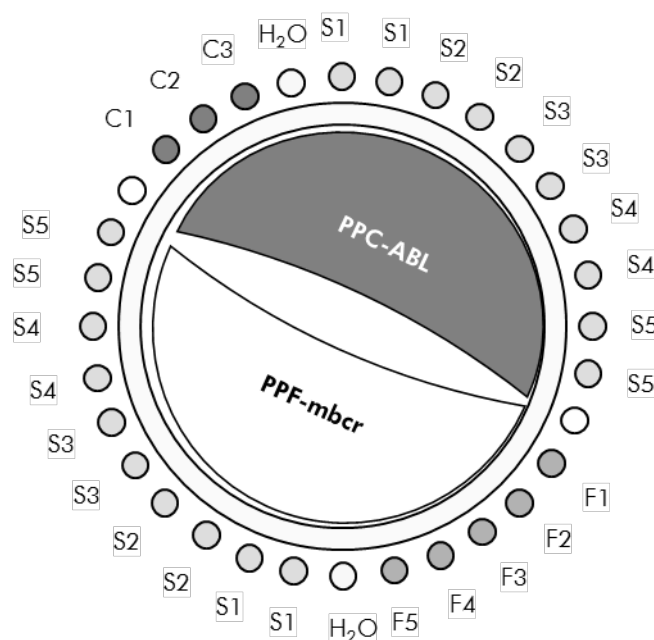
Używając aparatów kapilarnych, zalecamy wykonanie pomiarów próbek w duplikatach, natomiast kontroli pojedynczo, jak pokazano w Tabeli 10.

**Tabela 10. Ilość reakcji z użyciem aparatów LightCycler 1.2 oraz 2.0**

<b>Próbki</b>	<b>Reakcje</b>
<b>Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
ABL standard	1 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia, każde testowane jeden raz)
Kontrola z wodą	1 reakcja
<b>Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
mbcr standard	1 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń, każde testowane jeden raz)
Kontrola z wodą	1 reakcja

### Analiza próbek na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz mieszanin starterów i sond, zalecamy testowanie przynajmniej 5 próbek cDNA w tym samym eksperymencie. Schemat kapilar pokazany na Rysunku 5 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



**Rysunek 5. Sugerowany układ rotora dla jednego eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. F1–5: BCR-ABL standardy mbcr; C1–3: standardy ABL; S: nieznana próbka DNA do analizy; H<sub>2</sub>O: kontrola z wodą.**

### qPCR na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0

**Uwaga:** Z uwagi na pewne wymogi technologiczne, eksperymenty na aparatach LightCycler muszą być przeprowadzane z użyciem specyficznych odczynników. Zalecamy używanie mieszanki 'LightCycler TaqMan Master' i stosowanie się do zaleceń producenta celem przygotowania mieszanki 'Master Mix 5x'.

**Uwaga:** Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

### Procedura

1. **Rozmroź wszystkie wymagane komponenty i umieść na lodzie.**
2. **Przygotuj następującą mieszaninę qPCR zgodnie z ilością analizowanych próbek.**

Podane stężenia dotyczą końcowej objętości reakcji.

Tabela 11 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszanki odczynnikowej obliczonej do otrzymania końcowej objętości reakcji 20 µl. Mieszanina wstępna (pre-mix) może zostać przygotowana, zgodnie z ilością reakcji, przy użyciu tej samej mieszanki starterów i sond (PPC-ABL lub PPF-mbcr). Dodatkowe objętości kompensujące błędy pipetowania zostały uwzględnione.



**Tabela 11. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR**

<b>Składowa</b>	<b>1 reakcja (µl)</b>	<b>ABL: 14+1 reakcje (µl)</b>	<b>BCR-ABL mbc: 16+1 reakcje (µl)</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
Świeżo przygotowana mieszanina LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60	68,0	1x
Mieszanina sond i starterów, 25x	0,8	12	13,6	1x
Woda do PCR wolna od nukleaz	10,2	153	173,4	–
Próbka (do dodania w kroku 4)	5,0	5 każda	5,0 każda	–
Objętość całkowita	20,0	20 każda	20,0 każda	–

3. Rozdozuj po 15 µl mieszaniny (pre-mix) qPCR do każdej z kapilar.
4. Dodaj 5 µl produktu RT (cDNA, ekwiwalent 100 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz 'Protokół: Wystandaryzowana odwrotna transkrypcja rekomendowana przez EAC', strona 11) do odpowiedniej probówki (objętość całkowita 25 µl).
5. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
6. Umieść kapilary w adapterach dostarczonych z zwiuruj krótko (700 x g, około 10 sekund).
7. Umieść kapilary w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
8. Zaprogramuj aparat LightCycler 1.2 lub 2.0 zgodnie z programem przedstawionym w Tabeli 12.

**Tabela 12. Profil temperaturowy**

<b>Typ analizy</b>	<b>Quantification</b>
Inkubacja (Hold)	Temperatura: 95°C Czas: 10 min Ramp: 20
Cykle	50 razy 95°C przez 10 sek; ramp: 20 60°C przez 1 min; ramp: 20; z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM: Single
Inkubacja 2 (Hold 2)	45°C przez 1 min; ramp: 20

9. Dla LightCycler 1.2 przejdź do kroku 9a. Dla LightCycler 2.0 przejdź do kroku 9b.
- 9a. LightCycler 1.2: Rekomendowanym typem analizy jest F1/F2 oraz '2<sup>nd</sup> derivative analysis' (analiza drugiej pochodnej). Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 12.
- 9b. LightCycler 2.0: Celem uzyskania powtarzalnych wyników zalecamy stosowanie analizy automatycznej - Automated (F' max) z oprogramowaniem LightCycler 2.0 Software wersja 4.0. Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 12.

## Protokół: qPCR na aparacie SmartCycler

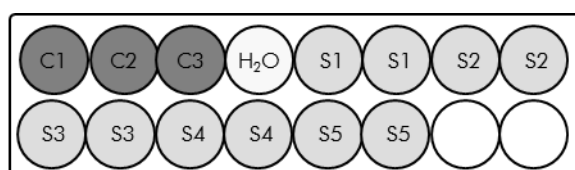
Używając tego aparatu, zalecamy wykonanie pomiarów próbek w duplikatach, natomiast kontroli pojedynczo, jak pokazano w Tabeli 13.

**Tabela 13. Ilość reakcji z użyciem aparatu SmartCycler**

Próbki	Reakcje
<b>Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
ABL standard	1 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia, każde testowane jeden raz)
Kontrola z wodą	1 reakcja
<b>Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)</b>	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
mbcr standard	1 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń, każde testowane jeden raz)
Kontrola z wodą	1 reakcja

### Analiza próbek na aparacie SmartCycler

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz mieszanin starterów i sond, zalecamy testowanie przynajmniej 5 próbek cDNA w tym samym eksperymencie. Schemat dwublokowy pokazany na Rysunku 5 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Wszystkie analizy w pierwszym bloku są wykonywane z użyciem PPC-ABL.



Wszystkie analizy w drugim bloku są wykonywane z użyciem PPF-mbcr.

**Rysunek 6. Sugerowany układ płytek dla jednego eksperymentu. S:** próbka cDNA; **F1–5:** standardy BCR-ABL mbcr; **C1–3:** standardy ABL; **H<sub>2</sub>O:** kontrola z wodą.

## qPCR na aparacie SmartCycler

**Uwaga:** Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

### Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane komponenty i umieść na lodzie.
2. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR zgodnie z ilością analizowanych próbek.

Podane stężenia dotyczą końcowej objętości reakcji.

Tabela 14 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszaniny odczynnikowej obliczonej do otrzymania końcowej objętości reakcji 20 µl. Mieszanina wstępna (pre-mix) może zostać przygotowana, zgodnie z ilością reakcji, przy użyciu tej samej mieszaniny starterów i sond (PPC-ABL lub PPF-mbcr). Dodatkowe objętości kompensujące błędy pipetowania zostały uwzględnione.

**Tabela 14. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR**

<b>Składowa</b>	<b>1 reakcja (µl)</b>	<b>ABL: 14+1 reakcje (µl)</b>	<b>BCR-ABL mbcr: 16+1 reakcje (µl)</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Mieszanina sond i starterów, 25x	1	15	17	1x
Woda do PCR wolna od nukleaz	6,5	97,5	110,5	–
Próbka (do dodania w kroku 4)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość całkowita	25	25 każda	25 każda	–

3. Rozdozuj po 20 µl mieszaniny (pre-mix) qPCR do dołków.

4. Dodaj po 5 µl produktu RT (cDNA, ekwiwalent 100 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz 'Protokół: Wystandaryzowana odwrotna transkrypcja rekomendowana przez EAC', strona 11) do odpowiednich dołków (objętość całkowita 25 µl).
5. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
6. Umieść próbki w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
7. Zaprogramuj aparat SmartCycler zgodnie z programem przedstawionym w Tabeli 15.

**Tabela 15. Profil temperaturowy**

Inkubacja (Hold)	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
Inkubacja 2 (Hold 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
Cykle	50 razy 95°C przez 15 sek 60°C przez 1 minutę z odczytem danych (acquisition) fluorescencji: Single

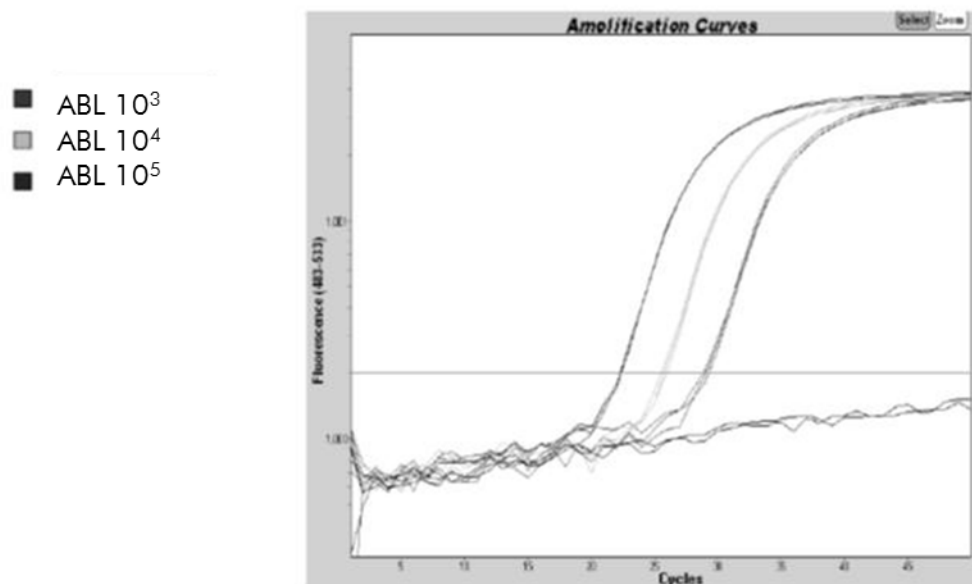
8. Rekomendujemy ustawienie progu odcięcia (thershold) na 30. Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 15.

# Interpretacja wyników

## Zasada analizy danych

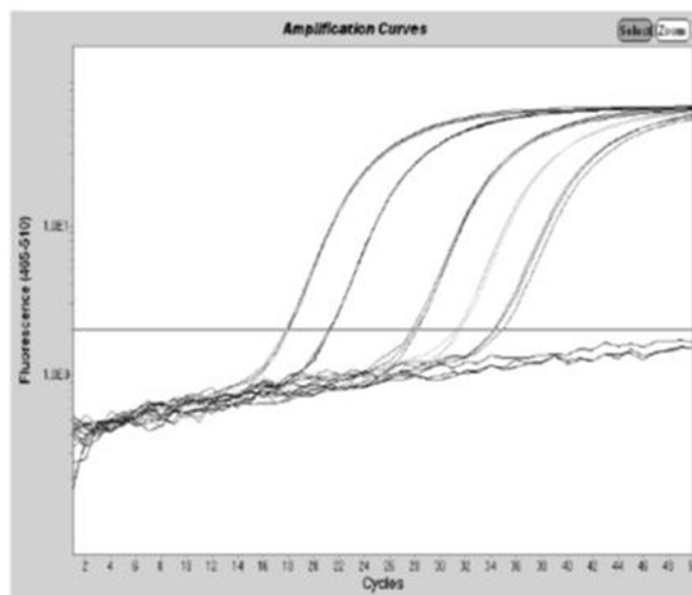
Używając technologii TaqMan, ilość cykli PCR potrzebnych do wykrycia sygnału powyżej progu odcięcia jest nazywana cyklem progu odcięcia (ang. threshold cycle:  $C_T$ ) i jest wprost proporcjonalna do ilości matrycy obecnej na początku reakcji.

Używając standardów o znanej ilości molekuł możliwe jest wygenerowanie krzywej standardowej pozwalającej na precyzyjne ustalenie ilości matrycy obecnej w testowanej próbce. Krzywe standardowe *ipsogen* oparte są na matrycach plazmidowych; celem zapewnienia precyzji, używamy 3 rozcieńczeń standardów dla CG (ang. control gene; gen kontrolny) oraz 5 dla FG (ang. fusion gene; gen fuzyjny). Rysunki 7 i 8 pokazują przykładową amplifikację z TaqMan i użyciem zestawu *ipsogen* BCR-ABL mbcr Kit.



Rysunek 7. Detekcja standardów ABL (C1, C2, C3). 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> i 10<sup>5</sup> kopii/5 µl.

- m-bcr 10<sup>1</sup>
- m-bcr 10<sup>2</sup>
- m-bcr 10<sup>3</sup>
- m-bcr 10<sup>5</sup>
- m-bcr 10<sup>6</sup>



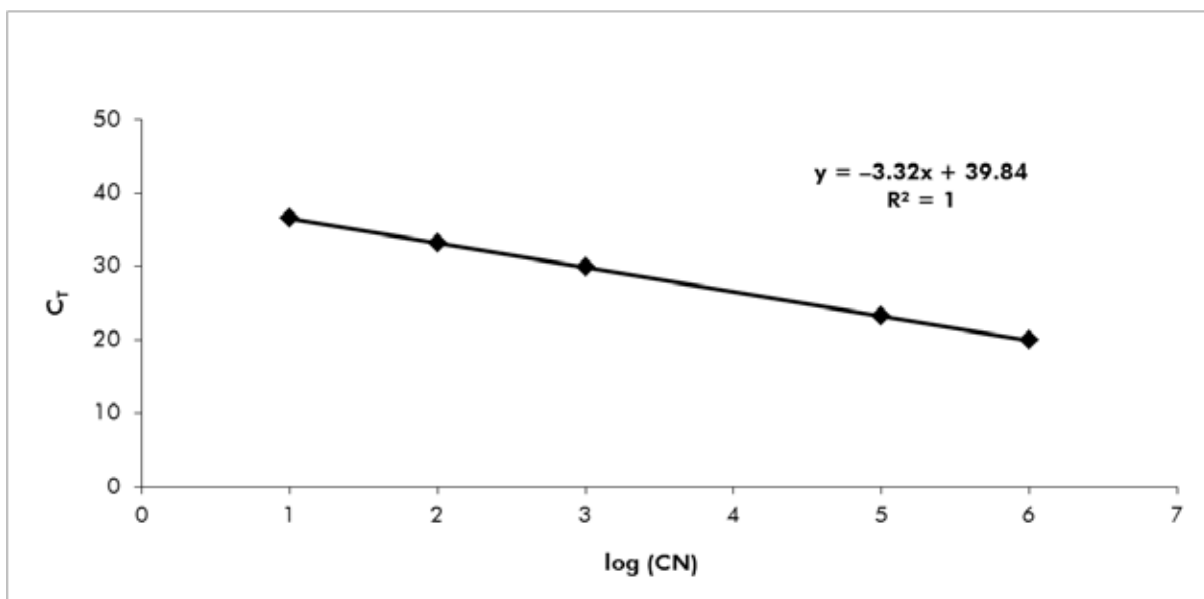
Rysunek 8. Detekcja standardów BCR-ABL (F1–F5). 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> kopii/5  $\mu$ l.

## Wyniki

### Krzywa standardowa i kryteria jakościowe

Surowe (raw) dane mogą zostać wklejone do programu Excel<sup>®</sup> celem analizy.

Dla każdego genu (ABL oraz BCR-ABL), surowe wartości C<sub>T</sub> otrzymane z rozcieńczeń standardów plazmidowych są naniesione na wykres zgodnie z ilością kopii w skali logarytmicznej (3, 4 i 5 dla C1, C2 i C3; 1, 2, 3, 5 i 6 dla F1, F2, F3, F4 i F5). Rysunek 9 przedstawia przykład teoretycznej krzywej obliczonej na podstawie 5 rozcieńczeń standardów.



**Rysunek 9. Teoretyczna krzywa obliczona na podstawie 5 rozcieńczeń standardów.** Regresja liniowa krzywej ( $y = ax + b$ ) jest obliczona dla każdego genu (ABL oraz BCR-ABL), gdzie 'a' jest nachyleniem krzywej, 'b' jest punktem przecięcia krzywej z osią Y. Wzór wraz ze współczynnikiem determinacji ( $R^2$ ) są przedstawione na wykresie.

Jako że standardy są w 10-krotnych rozcieńczeniach, teoretyczne nachylenie krzywej wynosi  $-3,3$ . Nachylenie o wartości  $-3,0$  do  $-3,9$  jest akceptowalne o ile wartość  $R^2$  jest  $>0,95$  (2). Niemniej jednak, dla precyzyjnych wyliczeń, pożądana jest wartość  $R^2 >0,98$  (3).

### Znormalizowana liczba kopii (ang. normalized copy number; **NCN**)

Równanie krzywej standardowej dla ABL powinno być używane do zamiany surowych wartości  $C_T$  (otrzymanych z PPC-ABL) dla próbek nieznanymi, na liczbę kopii ABL ( $ABL_{CN}$ ).

Równanie krzywej standardowej dla BCR-ABL powinno być używane do zamiany surowych wartości  $C_T$  (otrzymanych z PPF-mbcr) dla próbek nieznanymi, na liczbę kopii BCR-ABL ( $BCR-ABL_{m bcr_{CN}}$ ).

Stosunek tych wartości CN daje znormalizowaną ilość kopii (NCN):

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

### Wartość MRD

Wartość dla choroby resztkowej (MRD) jest stosunkiem pomiędzy ekspresją FG (gen fuzyjny) znormalizowaną względem CG (gen kontrolny) ( $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ ) oraz próbkami badanymi ( $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ ).

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



## Czułość

Czułość (SENS<sub>v</sub>) jest obliczana zgodnie ze względną ekspresją FG przy diagnozie (FG<sub>CN</sub>/CG<sub>CN</sub>)<sub>DX</sub> oraz ekspresją CG (CG<sub>CN,FUP</sub>) w próbce.

$$\text{Czułość (SENS}_v\text{)} = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

## Kontrola jakości dla wartości ABL

Niska jakość RNA lub problemy podczas qPCR prowadzą do niskiego ABL<sub>CN</sub>. Zaleca się odrzucenie wyników z próbek dających ABL<sub>CN</sub> <1318 (niższa wartość 95% CI z próbek pacjentów w badaniach EAC, referencja 4).

## Odtwarzalność pomiędzy replikatami

Zmienność wartości C<sub>T</sub> pomiędzy replikatami powinna być <2, co koresponduje do 4-krotnej zmiany liczby kopii.

Zmienność wartości C<sub>T</sub> pomiędzy replikatami jest zasadniczo <1,5 jeśli średnia wartość C<sub>T</sub> replikatów <36 (2).

**Uwaga:** Każdy użytkownik powinien sprawdzić odtwarzalność w swoim własnym laboratorium.

## Kontrole z wodą

Kontrole negatywne powinny dawać zerową wartość dla CN.

Pozytywny wynik dla kontroli z wodą jest wynikiem zanieczyszczenia krzyżowego. Celem rozwiązania problemu patrz 'Rozwiązywanie problemów' poniżej.

## Rozwiązywanie problemów

Niniejszy poradnik rozwiązywania problemów może być pomocny w przypadku pojawienia się trudności i kwestii niejasnych. Więcej informacji dotyczących rozwiązywania problemów można znaleźć na stronie internetowej 'Frequently Asked Questions' (często zadawane pytania) w centrum pomocy technicznej: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Specjaliści w centrum pomocy technicznej QIAGEN są zawsze gotowi udzielić wszelkich informacji dotyczących zarówno treści niniejszej instrukcji, jak i innych problemów związanych z rozwiązaniami QIAGEN – od próbki do wyniku. (informacje kontaktowe patrz 'Informacje kontaktowe', strona 44).

## Komentarze i sugestie

---

### Wyniki negatywne dla genu kontrolnego (ABL) oraz BCR-ABL mbcr we wszystkich próbkach (gdy wyniki dla standardów są dobre)

- a) Niska jakość RNA                      Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj jakość i stężenie RNA.  
Uwzględnij kontrolę pozytywną RNA linii komórkowej ('High positive control' z zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, nr kat. 670091).
- b) Nieudana odwrotna transkrypcja                      Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj jakość i stężenie RNA.  
Uwzględnij kontrolę pozytywną RNA linii komórkowej (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, nr kat. 670091).

### Wyniki negatywne dla genu kontrolnego (ABL) dla próbek

- a) Niska jakość RNA                      Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj jakość i stężenie RNA.  
Uwzględnij kontrolę pozytywną RNA linii komórkowej (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, nr kat. 670091).
- b) Nieudana odwrotna transkrypcja                      Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj jakość i stężenie RNA.  
Uwzględnij kontrolę pozytywną RNA linii komórkowej (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls Kit, nr kat. 670091).

### Brak sygnału dla standardu

- a) Błąd pipetowania                      Sprawdź prawidłowość pipetowania i przygotowania reakcji.  
Powtórz PCR.
- b) Nieprawidłowe przechowywanie komponentów zestawu                      Przechowuj zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit w –15 do –30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPC and PPF) przed światłem. Patrz 'Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami', strona **Fehler! Textmarke nicht definiert.**  
Unikaj wielokrotnego rozmrażania-zamrażania.  
Przechowuj odczynniki rozporcjowane.

## Komentarze i sugestie

---

### Kontrole negatywne dają wynik pozytywny

Kontaminacja krzyżowa	Wymień wszystkie kluczowe odczynniki. Powtórz eksperyment z użyciem nowych porcji odczynników. Celem zapobiegania zanieczyszczeniom krzyżowym, zawsze obchodź się z próbkami, komponentami zestawu i innymi elementami zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.
-----------------------	---

### Brak sygnału, również dla standardów

- |  |   |
|--|---|
| a) Błąd pipetowania lub pominięte odczynniki                                   | Sprawdź prawidłowość pipetowania i przygotowania reakcji.<br>Powtórz PCR.   |
| b) Inhibicja w materiale próbki spowodowana niedostatecznym jej oczyszczeniem. | Powtórz preparatykę RNA.  |
| c) LightCycler: Wybór nieprawidłowego kanału detekcji.                         | Ustaw 'Channel Setting' na F1/F2 lub 530 nm/640 nm.   |
| d) LightCycler: Nie zaprogramowano odczytu sygnału (data acquisition)          | Sprawdź zaprogramowane cykle.<br>Na końcu każdego etapu hybrydyzacji programu PCR wybierz opcje odczytu sygnału 'single'. |

### Sygnał dla próbek jest nieobecny lub słaby (gdy wyniki dla standardów są dobre)

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| a) Niska jakość RNA               | Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj jakość i stężenie RNA.<br>Uwzględnij kontrolę pozytywną RNA linii komórkowej ( <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit, nr kat. 670091). |
| b) Nieudana odwrotna transkrypcja | Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj jakość i stężenie RNA.<br>Uwzględnij kontrolę pozytywną RNA linii komórkowej ( <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit, nr kat. 670091). |

## Komentarze i sugestie

---

### Intensywność fluorescencji jest zbyt mała

- a) Nieprawidłowe przechowywanie komponentów zestawu      Przechowuj zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit w –15 do –30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPC and PPF) przed światłem. Patrz ‘Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami’, strona **Fehler! Textmarke nicht definiert..**  
Unikaj wielokrotnego rozmrażania-zamrażania.  
Przechowuj odczynniki rozporcjowane.
- b) Bardzo mała początkowa ilość RNA      Zwiększ ilość RNA.  
**Uwaga:** Zależnie od wybranej metody preparatyki RNA, może wystąpić efekt inhibicji.

### LightCycler: Zmienna intensywność fluorescencji

- a) Błąd pipetowania      Zmienność spowodowana błędami w pipetowaniu może być zredukowana przez analizę danych z użyciem opcji F1/F2 lub 530 nm/640 nm.
- b) Niewystarczające zwirowanie kapilar      Mieszanina PCR może się wciąż znajdować w górnym zbiorniczku kapilary lub pęcherz powietrza może być uwięziony w kapilarze.  
Zawsze wiruj kapilary z mieszaniną reakcyjną zgodnie z zaleceniami dedykowanej instrukcji aparatu.
- c) Zewnętrzna powierzchnia kapilary jest brudna      Zawsze noś rękawiczki podczas obchodzenia się z kapilarami.

### LightCycler: Błąd krzywej standardowej

- Błąd pipetowania      Zmienność spowodowana błędami w pipetowaniu może być zredukowana przez analizę danych z użyciem opcji F1/F2 lub 530 nm/640 nm.

## Kontrola jakości

Kontrola jakości dla kompletnego zestawu została dokonana na aparacie LightCycler 480. Ten zestaw został wyprodukowany zgodnie z normą ISO 13485:2003. Certyfikaty analizy są dostępne na żądanie pod adresem [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Ograniczenia

Przed rozpoczęciem użytkowania tego zestawu użytkownicy muszą zostać przeszkoleni i zapoznani z jego technologią.

Wszelkie wygenerowane wyniki diagnostyczne muszą być interpretowane wraz z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi. Za walidację wydajności tego systemu względem innych procedur w danym laboratorium, które nie są uwzględnione w badaniach wydajności QIAGEN, odpowiedzialny jest jego użytkownik.

Należy zwracać uwagę na daty przydatności do użytku widniejące na opakowaniach i etykietach wszystkich odczynników. Nie używaj odczynników przeterminowanych.

**Uwaga:** Niniejszy zestaw został zaprojektowany zgodnie z wytycznymi badań EAC (ang. Europe Against Cancer) (4) i jest zgodny z bieżącymi zaleceniami międzynarodowymi (3, 5). Powinien on być używany zgodnie z wytycznymi ujętymi w niniejszej instrukcji w połączeniu ze zwalidowanymi odczynnikami i aparaturą (patrz 'Materiały wymagane, ale nie dostarczone', strona **Fehler! Textmarke nicht definiert.**). Każde użycie tego produktu niezgodne z wytycznymi oraz/lub modyfikacje jego komponentów unieważnią odpowiedzialność QIAGEN.

## Charakterystyka wydajności

### Badania niekliniczne

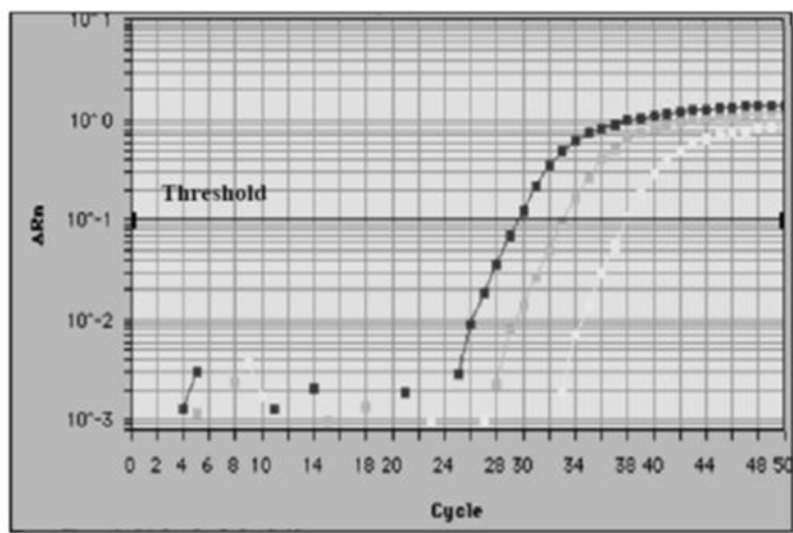
#### Materiały i metody

Ocena wydajności została wykonana na aparacie ABI PRISM 7700 SDS w połączeniu z odczynnikami wymienionymi w 'Materiały wymagane, ale nie dostarczone', strona **Fehler! Textmarke nicht definiert.**. Testy porównawcze pozwoliły na zwalidowanie jego użycia dla następujących aparatów: ABI PRISM 7000 i 7900HT SDS, LightCycler 1.2 i 480, Rotor-Gene 3000 oraz SmartCycler (6).

Badania niekliniczne zostały przeprowadzone celem ustalenia wydajności analitycznej zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit. Te laboratoryjne badania niekliniczne zostały przeprowadzone na RNA całkowitym z linii komórkowej TOM1 rozcieńczonej w stałej ilości końcowej RNA całkowitego linii komórkowej MV4-11.

Celem oceny powtarzalności analiz, 5 różnych stężeń RNA całkowitego TOM1 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg i 0,5 pg) rozcieńczone w RNA całkowitym MV4-11 w stałej ilości końcowej 1000 ng zostało przeanalizowanych w 5 powtórzeniach dla każdej reakcji i w 4 osobnych reakcjach (Rysunek 10).

- TOM1  $5 \times 10^{-3}$
- TOM1  $5 \times 10^{-4}$
- TOM1  $5 \times 10^{-5}$



Rysunek 10. Wykresy amplifikacji dla rozcieńczeń RNA całkowitego TOM1  $5 \times 10^{-3}$  (5 ng),  $5 \times 10^{-4}$  (0,5 ng) oraz  $5 \times 10^{-5}$  (0,05 ng) w negatywnym RNA całkowitym MV4-11.

### Dane analityczne

Tabele 16–19 pokazują wyniki porównawcze pomiędzy analizami z uwzględnieniem średnich wartości  $C_T$ , odchyleniem standardowym (SD), ilością próbek (n), współczynnikiem zmienności (CV), średnią ilością kopii (CN) oraz średnią znormalizowaną ilością kopii (NCN).

Tabela 16. Wyniki porównawcze pomiędzy analizami — linie komórkowe mbcr oraz ABL

Linia komórkowa	Rozcieńczenie	Średnie $C_T$	SD	n	CV (%)
mbcr	$5 \times 10^{-3}$ (5 ng/1 $\mu$ g)	29,19	0,26	20	0,88
	$5 \times 10^{-4}$ (0,5 ng/1 $\mu$ g)	33,70	0,48	20	1,47
	$5 \times 10^{-5}$ (0,05 ng/1 $\mu$ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	—	25,01	0,87	100	3,46

**Tabela 17. Wyniki porównawcze pomiędzy analizami — plazmidy**

Gen	Plazmid	Średnie C <sub>T</sub>	SD	n	CV (%)
mbcr	F1 (10 <sup>1</sup> kopii)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 <sup>2</sup> kopii)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 <sup>3</sup> kopii)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 <sup>5</sup> kopii)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 <sup>6</sup> kopii)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 <sup>3</sup> kopii)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 <sup>4</sup> kopii)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 <sup>5</sup> kopii)	22,53	0,42	12	1,86

**Tabela 18. Wyniki porównawcze pomiędzy analizami — linie komórkowe BCR-ABL mbcr oraz ABL (średnia CN)**

Linia komórkowa	Rozcieńczenie	Średnia CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 <sup>-3</sup> (5 ng/1 µg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 <sup>-4</sup> (0,5 ng/1 µg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 <sup>-5</sup> (0,05 ng/1 µg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	—	22.038,22	9459,17	100	42,92

**Tabela 19. Wyniki porównawcze pomiędzy analizami — linia komórkowa BCR-ABL mbcr (średnia NCN)**

Linia komórkowa	Rozcieńczenie	Średnia NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 <sup>-3</sup> (5 ng/1 µg)	267,46	93,22	20	34,85
	5 x 10 <sup>-4</sup> (0,5 ng/1 µg)	23,54	7,36	20	31,28
	5 x 10 <sup>-5</sup> (0,05 ng/1 µg)	2,60	2,80	20	107,66

\* Tylko dla tych wyników NCN jest podane jako  $\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$ .

## Badania kliniczne

Ocena wydajności została wykonana na aparacie ABI PRISM 7700 SDS w połączeniu z odczynnikami wymienionymi w 'Materiały wymagane, ale nie dostarczone', strona **Fehler! Textmarke nicht definiert.**. Testy porównawcze pozwoliły na zwalidowanie jego użycia dla następujących aparatów: ABI PRISM 7000 i 7900HT SDS, LightCycler 1.2 i 480, Rotor-Gene 3000 oraz SmartCycler (6).

Grupa 26 współpracujących laboratoriów z 10 krajów europejskich należących do EAC (ang. Europe Against Cancer) użyła plazmidów IPSOGEN do stworzenia wystandaryzowanego protokołu do analizy qPCR głównych genów fuzyjnych związanych z białaczką (ang. major leukemia-associated fusion genes) w środowisku klinicznym. Transkrypt BCR-ABL p190 był jednym z genów fuzyjnych (FG) zawartych w badaniach. Prezentujemy tutaj podsumowanie tych badań walidacyjnych; pełne wyniki zostały opublikowane w roku 2003 (4, 7).

### Odtwarzalność międzylaboratoryjna dla standardów plazmidowych CG i FG

Jedenaście laboratoriów brało udział w międzylaboratoryjnych badaniach odtwarzalności celem oceny zmienności pomiarów dla rozcieńczeń standardów plazmidowych CG i FG. Rozcieńczenia były wykonane w duplikatach w każdym z laboratoriów. Tabela 20 pokazuje średnie wartości  $C_T$ , odchylenie standardowe oraz CV (%) dla każdego z rozcieńczeń.

**Tabela 20. Odtwarzalność międzylaboratoryjna dla standardów plazmidowych CG i FG**

Gen	Rozcieńczenie	Średnie		
		$C_T$	$C_T$ SD	CV (%)
Gen kontrolny (CG) ABL	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
Gen fuzyjny (FG) BCR-ABL mbc	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57



## Wartości ekspresji dla transkryptu genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr

Tabele 21 i 22 pokazują wartości ekspresji dla transkryptu genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr oraz dla genu kontrolnego ABL dla linii komórkowej TOM1, wszystkich diagnozowanych pacjentów oraz pacjentów negatywnych.

**Tabela 21. Wartości ekspresji dla transkryptu genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr oraz genu kontrolnego ABL – wartości C<sub>T</sub>**

	Wartości C <sub>T</sub> (zakres 95%)	
	BCR-ABL mbcr	ABL
<b>Linia komórkowa TOM1</b>	22,8	21,8
<b>Próbki wszystkich pacjentów</b>		
Szpik (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
Krew (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
<b>Negatywne próbki pacjentów</b>		
Szpik (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Krew (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

**Tabela 22. Wartości ekspresji dla transkryptu genu fuzyjnego BCR-ABL mbcr oraz genu kontrolnego ABL - wartości CN i NCN**

	Wartości CN (zakres 95%)		Wartości NCN (zakres 95%)
	BCR-ABL mbcr	ABL	CN BCR-ABL mbcr/CN ABL
<b>Próbki wszystkich pacjentów</b>			
Szpik (n = 17)	9550 (1738–97,724)	11,912 (5012–70,795)	0,8 (0,35–1,38)
Krew (n = 7)	91,201 (1905–208,930)	134,896 (4786–114,815)	0,68 (0,4–1,82)
<b>Negatywne próbki pacjentów</b>			
Szpik (n = 26)	–	19,201 (12,922–25,480)	–
Krew (n = 74)	–	21,136 (17,834–24,437)	–

Wartości  $C_T$  dla ABL nie różniły się znacząco pomiędzy próbkami normalnymi i białaczkowymi ani pomiędzy rodzajami próbek (krew obwodowa lub szpik kostny) lub pomiędzy różnymi próbkami białaczkowymi (ALL, AML, CML).

### **Częstotliwość wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych**

Częstotliwość występowania wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych została obliczona z użyciem następujących kontroli.

- ☉ Kontrole pozytywne: TOM1 to linia komórkowa cechująca się pozytywnym statusem dla genu fuzyjnego BCR-ABL p190; próbki pacjentów zbadanych pod kątem pozytywności dla p190
- ☉ Kontrole negatywne: Negatywne próbki RNA, kontrole bez amplifikacji (ang. no amplification controls; NAC) pochodzące z RNA *E. coli* zamiast z RNA ludzkiego służące do sprawdzania kontaminacji PCR oraz kontrole bez matrycy (ang. no template controls; NTC), gdzie zamiast matrycy ludzkiego RNA dodano wody

Amplifikacja próbek RNA genu fuzyjnego (FG) była wykonana w trzech powtórzeniach, a dla genu kontrolnego (CG) w dwóch powtórzeniach.

Próbka fałszywie negatywna została zdefiniowana jako pozytywna próbka RNA z mniej niż 50% pozytywnych dołków (reakcji) (0/2, 0/3 lub 1/3).

Próbka fałszywie pozytywna została zdefiniowana jako próbka negatywna z przynajmniej 50% pozytywnych dołków (reakcji) (1/2, 2/3 lub 3/3).

Tabela 23 przedstawia ilość i procentowość próbek fałszywie negatywnych oraz fałszywie pozytywnych.

**Tabela 23. Próbki fałszywie negatywne oraz fałszywie pozytywne**

Fałszywa negatywność		Fałszywa pozytywność	
$10^{-3}$	$10^{-4}$	Kontrola negatywna FG	NAC/NTC
0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

## **Literatura**

QIAGEN prowadzi dużą i aktualną bazę danych publikacji naukowych zawierających dane dotyczące produktów QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania pozwalają na znalezienie pożądaných publikacji i informacji z wykorzystaniem słów kluczowych lub przez określenie zastosowania, obszaru badawczego, tytułu etc.

Kompletną listę literatury można znaleźć w bazie danych 'QIAGEN Reference Database' pod adresem [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) albo kontaktując się z pomocą techniczną QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem.

## Cytowana literatura

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2007, 435.
2. 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.
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. 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.
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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. Leukemia 19, 305.
7. 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.

## Symbole

Następujące symbole mogą się pojawić na opakowaniach i etykietach:



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające na <N> reakcji



Użyj do



Do diagnostycznego użytku medycznego in vitro



Numer katalogowy

**LOT**

Numer partii (lot)

**MAT**

Numer materiału

**GTIN**Globalny Numer Jednostki Handlowej  
(Global Trade Item Number)

Ograniczenia temperaturowe



Producent



Zapoznaj się z instrukcją użytkowania

## Informacje kontaktowe

Aby uzyskać pomoc techniczną i znaleźć więcej informacji, zapraszamy do naszego Centrum Pomocy Technicznej [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) lub zadzwoń na 00800-22-44-6000 lub skontaktuj się z jednym z wydziałów pomocy technicznej QIAGEN lub z lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub odwiedź [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	Na 24 reakcje: ABL Control Gene Standards (standardy CG dla ABL), BCR-ABL mbc Fusion Gene Standards (standardy FG dla BCR-ABL mbc), Primer and Probe Mix ABL (mieszanina starterów i sond ABL), Primer and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene (mieszanina starterów i sond BCR-ABL mbc)	670023
<b>Rotor-Gene Q MDx — do zwalidowanej analizy PCR w czasie rzeczywistym w zastosowaniach klinicznych</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym z analizatorem HRM (High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, karmazynowy) i dodatkowy kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji na części i serwis, instalacja i szkolenie nie są zawarte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym z analizatorem HRM (High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, karmazynowy) i dodatkowy kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji na części i serwis, instalacja i szkolenie są zawarte	9002033
<b>Zestaw <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit — do jakościowej walidacji izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji genu fuzyjnego BCR-ABL mbc</b>		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Linie komórkowe z negatywną oraz wysoko- i nisko-pozytywną ekspresją genu fuzyjnego BCR-ABL mbc	670091

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z podręcznika odpowiedniego zestawu lub z instrukcji obsługi QIAGEN. Podręczniki zestawów QIAGEN i instrukcje obsługi są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.



Ten produkt jest przeznaczony do diagnostycznego użytku in vitro. Produkty *ipsogen* nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane do odsprzedaży ani używane celem produkcji artykułów komercyjnych bez pisemnej zgody QIAGEN.

Informacje zawarte w tym dokumencie mogą zostać zmienione bez ostrzeżenia. QIAGEN nie ponosi odpowiedzialności za żadne błędy mogące pojawić się w tym dokumencie. Ten dokument powinien zawierać kompletne i prawdziwe informacje w momencie jego publikacji. W żadnym wypadku QIAGEN nie będzie odpowiedzialny za przypadkowe, zamierzone, wielokrotne lub będące konsekwencją szkody powstałe w skutek korzystania z tego dokumentu.

Produkty *ipsogen* są gwarantowane w zakresie spełniania przez nie określonych dla nich parametrów. Jedynym zobowiązaniem QIAGEN oraz jedyną możliwością zgłaszania reklamacji przez klienta, w przypadku gdy produkt nie działa zgodnie z gwarancją, jest wyłącznie wymiana produktów bez opłaty.

Znaki towarowe: QIAGEN<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ABI PRISM<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).

### Ograniczona Umowa Licencyjna

Używanie tego produktu oznacza zgodę nabywcy bądź użytkownika zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* na następujące warunki:

1. Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* Kit może być używany wyłącznie zgodnie z wytycznymi zawartymi w instrukcji zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* Kit i tylko wraz z komponentami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników nie zawartych w tym zestawie z wyjątkiem tego co opisano w instrukcji zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* Kit Handbook i w dodatkowych protokołach dostępnych pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodjęcie ani niepozwolenie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** | techservice-au@qiagen.com

**Austria** | techservice-at@qiagen.com

**Belgia** | techservice-bnl@qiagen.com

**Brazylia** | suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Kanada** | techservice-ca@qiagen.com

**Chiny** | techservice-cn@qiagen.com

**Dania** | techservice-nordic@qiagen.com

**Finlandia** | techservice-nordic@qiagen.com

**Francja** | techservice-fr@qiagen.com

**Niemcy** | techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** | techservice-hk@qiagen.com

**Indie** | techservice-india@qiagen.com

**Irlandia** | techservice-uk@qiagen.com

**Włochy** | techservice-it@qiagen.com

**Japonia** | techservice-jp@qiagen.com

**Korea (Południowa)** | techservice-kr@qiagen.com

**Luksemburg** | techservice-bnl@qiagen.com

**Meksyk** | techservice-mx@qiagen.com

**Holandia** | techservice-bnl@qiagen.com

**Norwegia** | techservice-nordic@qiagen.com

**Singapur** | techservice-sg@qiagen.com

**Szwecja** | techservice-nordic@qiagen.com

**Szwajcaria** | techservice-ch@qiagen.com

**UK** | techservice-uk@qiagen.com

**USA** | techservice-us@qiagen.com

