

2020 m. liepos mėn.

„*therascreen*[®] IDH1/2 RGQ PCR Kit“ vadovas



20

1 versija

Skirtas 12 *IDH1* ir *IDH2* gliomos mutacijoms nustatyti

IVD

Skirtas in vitro diagnostikai

Skirtas naudoti su „Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM“ instrumentu.

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R5 **MAT**

1119896LT

Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Santrauka ir paaiškinimas	6
Procedūros principas	8
Pateikiamos medžiagos.....	10
Rinkinio turinys.....	10
Būtinios, bet nepateikiamos priemonės.....	12
Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	14
Saugos informacija.....	14
Bendrosios atsargumo priemonės.....	14
Reagentų laikymas ir naudojimas.....	16
Gabenimo sąlygos	16
Laikymas	16
Stabilumas	16
Bandinių naudojimas ir laikymas	17
Procedūra.....	18
DNR išskyrimas ir paruošimas	18
Protokolas: <i>IDH1/2</i> mutacijų aptikimas.....	22
Rezultatų aiškinimas.....	27
Vandens kontrolinės medžiagos	27
Kokybės kontrolė naudojant kontrolinių medžiagų C _T reikšmes.....	27
Mėginio įvesties patvirtinimas.....	30
Mėginių rezultatai	30

Trikčių šalinimo vadovas	36
Kokybės kontrolė	39
Apribojimai	40
Eksploatacinių savybių charakteristikos	42
Tuštumos riba („Limit of blank“, LOB)	42
Aptikimo riba („Limit of Detection“, LOD)	42
DNR įvesties poveikis	44
Pasikartojamumas ir atkartojamumas	44
Metodų palyginimas	47
Literatūra	50
Simboliai	52
Užsakymo informacija	54
Dokumento peržiūrų istorija	57

Numatytoji paskirtis

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ yra in vitro diagnostinis testas, paremtas PCR technologija, skirtas kokybiniam *IDH1* geno 7 mutacijų ir *IDH2* geno 5 mutacijų aptikimui ir tiesioginiam 3 pagrindinių mutacijų DNR, išskirtoje iš formalinu fiksuoto parafine esančio (FFPE) žmogaus smegenų audinio, nustatyti.

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ skirtas naudoti kaip pagalbinė priemonė, padedanti klasifikuoti gliomas.

Santrauka ir paaiškinimas

Mutacijos izocitrato dehidrogenazės (IDH) genuose, *IDH1* ir *IDH2*, dažnai aptinkamos Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) II ir III laipsnio gliomose ir PSO IV laipsnio antrinėse glioblastomose (GBM). Be mutacijų teikiamos diagnostinės vertės, *IDH1/2* mutacijų buvimas yra susijęs su teigiama glioma sergančių pacientų prognoze (1–13).

„*therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*“ yra tyrimas, skirtas 12 specifinių *IDH1/2* mutacijų aptikti: 6 *IDH1* geno 132 kodone, 5 *IDH2* 172 homologiniame kodone ir 1 *IDH1* 100 kodone (1 lentelė). Taip pat rinkiniu tiesiogiai nustatomos pagrindinės *IDH1* ir *IDH2* mutacijos, dėl kurių atsiranda *IDH1* R132H, *IDH1* R132C ir *IDH2* R172K pakaitalai.

1 lentelė. IDH1 ir IDH2 mutacijos aptiktos naudojant „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“

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

* COSMIC ID paimti iš „Catalog of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Procedūros principas

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ yra reagentų 9 atskiroms amplifikacijos reakcijoms, skirtoms 12 mutacijų aptikti, atlikti (1 lentelė):

- Iš viso 3 *IDH1* geno 132 ir 100 kodonų ir *IDH2* geno 172 kodono amplifikacijos reakcijos
- 3 *IDH1* geno 132 ir 100 kodonų ir *IDH2* geno 172 kodono mutacijos amplifikacijos reakcijos
- 3 *IDH1* R132H, *IDH1* R132C ir *IDH2* R172K mutacijų mutacijoms būdingos amplifikacijos reakcijos

Bendri reakcijos mišiniai

Bendruose pradmenų ir zondų mišiniuose (Bendras PPM) naudojami pradmenys ir zondai skirti amplifikuoti tiek mutavusias, tiek laukinio tipo tikslines sekas (1 pav.).

Mutacijų aptikimo reakcijų mišiniai

Mutacijų aptikimo pradmenų ir zondų mišiniuose pradmenys ir zondai, skirti amplifikuoti tiek mutavusias, tiek laukinio tipo tikslines sekas, sujungiami su oligonukleotidu, 3' blokuotu pridėjus fosfato grupę, siekiant išvengti elongacijos (PGR sukibimo), būdingos laukinio tipo tikslinėms sekoms.

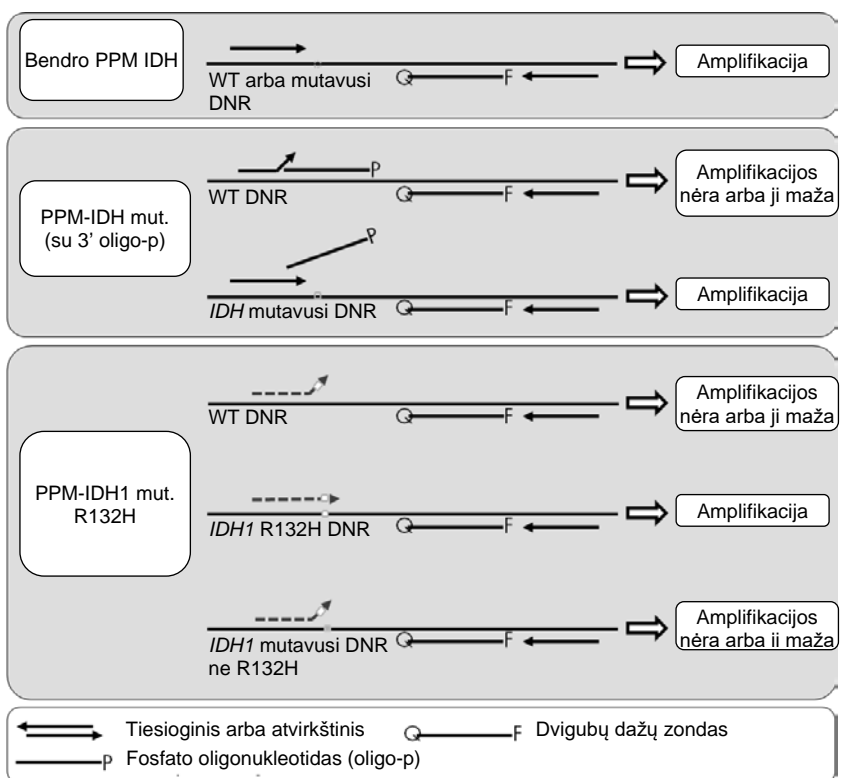
Kai PGR matricoje yra laukinio tipo tikslinė seka, 3'-fosfato oligonukleotidas paveiks PGR pradmens prisijungimą, nes jam būdingas didesnis afiniškumas. DNR polimerazės išplėtimo nėra arba jis mažas ir amplifikacija neaptinkama arba ji maža.

Kai yra mutavusi seka, PGR pradmens prisijungimas paveiks 3'-fosfato oligonukleotido prisijungimą ir amplifikacija bus tęsiama (1 pav.).

Mutacijų nustatymo reakcijų mišiniai

Aleliams būdingą amplifikaciją užtikrina amplifikacijos refrakcinė mutacijų sistema (Amplification Refractory Mutation System, ARMS), kurioje išnaudojama DNR polimerazės galimybė atskirti atitikimą ir neatitikimą PGR pradmens 3' gale.

Kai PGR pradmuo visiškai sutampa, amplifikacija vyksta visu greičiu. Kai nesutampa 3' bazė, amplifikacija vyksta fone nedideliu greičiu (1 pav.).



1 pav. Rezultatai, gauti naudojant pradmenų ir zondu mišinius „*therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*“ rinkinyje. Tas pats principas, nurodytas *IDH1 R132H* aptikti, taikomas *IDH1 R132C* ir *IDH2 R172K*.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalogo numeris		873011
Reakcijų skaičius		20
„Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> “ (Pradmenų ir zondų mišinys, skirtas bendrai <i>IDH1/R132</i> aptikti) (laukinio tipo ir mutavusi)	Bendro PPM <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
„Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> “ (Pradmenų ir zondų mišinys, skirtas bendrai <i>IDH2/R172</i> aptikti) (laukinio tipo ir mutavusi)	Bendro PPM <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
„Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> “ (Pradmenų ir zondų mišinys, skirtas bendrai <i>IDH1/R100</i> aptikti) (laukinio tipo ir mutavusi)	Bendro PPM <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
„Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i> “ (Pradmenų ir zondų mišinys (įskaitant oligo-p), skirtas mutavusiai <i>IDH1/R132</i> aptikti)	PPM- <i>IDH1/R132</i> mut. 25x	40 µl
„Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i> “ (Pradmenų ir zondų mišinys (įskaitant oligo-p), skirtas mutavusiai <i>IDH2/R172</i> aptikti)	PPM- <i>IDH2/R172</i> mut. 25x	40 µl
„Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i> “ (Pradmenų ir zondų mišinys (įskaitant oligo-p), skirtas mutavusiai <i>IDH1/R100</i> aptikti)	PPM- <i>IDH1/R100</i> mut. 25x	40 µl
„Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H“ (Pradmenų ir zondų mišinys, skirtas <i>IDH1</i> mut. R132H nustatyti)	PPM- <i>IDH1</i> mut R132H 25x	40 µl

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

Rinkinio turinys (tęsinys)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalogo numeris		873011
Reakcijų skaičius		20
„Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C“ (Pradmenų ir zondų mišinys, skirtas <i>IDH1</i> mut. R132C nustatyti)	PPM-IDH1 mut. R132C 25x	40 µl
„Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> Mut R172K“ (Pradmenų ir zondų mišinys, skirtas <i>IDH2</i> mut. R172K nustatyti)	PPM-IDH2 mut R172K 25x	40 µl
„ <i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA“ (<i>IDH1/IDH2</i> laukinio tipo genominė DNR)	„ <i>IDH1/IDH2</i> WT Control“ (<i>IDH1/IDH2</i> WT kontrolinė medžiaga)	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> mutavusi teigiama kontrolinė medžiaga	<i>IDH1/IDH2</i> teigiama kontrolinė medžiaga	270 µl
„Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ , and buffer for qPCR“ (Taq DNR polimerazės, dNTPs, MgCl ₂ ir qPCR skirto buferinio tirpalo mišinys)	qPCR pagrindinis mišinys 2x	5 x 900 µl
„Nuclease-Free Water“ (vanduo be nukleazės)	Vanduo be nukleazės	5 x 525 µl
„therascreen <i>IDH1/2</i> RGQ PCR Kit“ vadovas (anglų k.)		1

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinę pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose („Safety Data Sheet“, SDS), kuriuos gali pateikti gaminio tiekėjas.

Svarbu. Įsitikinkite, kad visi šioje procedūroje naudojami instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Reagentai (DNR išskyrimas rankiniu būdu)

- DNR išskyrimo rinkinys: „QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. nr. 56404)
- „RNase A“ (17,500 U) (kat. nr. 19101)
- Ksilenas arba „Histolemon™“ („Carlo Erba“, kat. nr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanolis (96–100 %)
- 1x TE buferinis tirpalas, pH 8,0

Reagentai (automatizuotas DNR išskyrimas)

- DNR išskyrimo rinkinys: „QIASymphony® DSP DNA Mini Kit“ (kat. nr. 937236)
- „Buffer ATL“ (kat. Nr. 19076 arba 939016)
- „RNase A“ (kat. nr. 19101)
- Ksilenas arba „Histolemon“ („Carlo Erba“, kat. nr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanolis (96–100 %)
- 1x TE buferinis tirpalas, pH 8,0

Eksploataciniai reikmenys

- Skalpeliai
- Aerosoliui atsparūs sterilūs PGR pipečių antgaliai be nukleazės su hidrofobiniais filtrais
- 2,0 ml arba 1,5 ml mėgintuvėliai be nukleazės
- „Strip Tubes and Caps, 0.1 ml“, skirti „Rotor-Gene Q“ (kat. nr. 981103 arba 981106)
- Ledas

Papildomi eksploataciniai reikmenys automatizuotas DNR išskyrimui

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

Įranga

- Objektinių stiklelių stovas su 2 objektinių stiklelių vonelėmis ksileniui / „Histolemon“ ir etanoliumi
- Mikrolitrinės pipetės, skirtos PGR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stalinė centrifuga su rotoriumi, skirta 0,5 ml arba 1,5 ml reakcijų mėgintuvėliams ir mikroplokštelėms (galinti pasiekti 13 000–14 000 aps./min.)
- Stalinis purtytuvas
- „Real-time PCR“ instrumentas: „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ ir susijusios konkrečios medžiagos
- 2.1.0 arba naujesnės versijos „Rotor-Gene Q MDx“ programinė įranga
- Biofotometras

- Termostatinis maišytuvas, šildomas žiedinis maišymo inkubatorius, kaitinimo blokas arba vandens vonelė, galinti inkubuoti esant 56 °C ir 90 °C temperatūrai

Papildoma įranga automatizuotam išgryninimui

- „QIASymphony SP“ instrumentas
- 4.0 arba naujesnės versijos „QIASymphony SP“ programinė įranga

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas in vitro diagnostikai

Saugos informacija

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose („Safety Data Sheets“, SDS). Jie pateikiami PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Norėdami gauti su naudojimu gryninimo rinkiniu susijusios saugos informacijos, žr. atitinkamo rinkinio vadovą. Norėdami gauti su instrumentais susijusios saugos informacijos, žr. atitinkamo instrumento naudotojo vadovą.

Bendrosios atsargumo priemonės

- Tyrimas skirtas naudoti su buferiniame formaline fiksuotais parafine esančiais (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) chirurginės rezekcijos audinių mėginiais.
- Visos cheminės ir biologinės medžiagos yra potencialiai pavojingos. Mėginiai yra potencialiai užkrečiami ir turi būti naudojami kaip biologiškai pavojingos medžiagos.

- Mėginių ir tyrimų atliekas išmeskite laikydamiesi vietinių saugos procedūrų.
- „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ reagentai yra optimaliai atskiesti. Daugiau reagentų neskieskite, nes gali sumažėti jų veiksmingumas. Nenaudokite mažesnių kaip 25 µl reakcijos tūrių (reakcijos mišinys su mėginiu).
- Visi „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties rinkinio. Nekeiskite skirtinguose „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ esančių reagentų, nes tai gali turėti įtakos veiksmingumui.
- Papildomi įspėjimai, atsargumo priemonės ir procedūros pateiktos „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento naudotojo vadove.
- Pakeitus inkubavimą ir temperatūrą gali būti gauti klaidingi arba prieštaringi duomenys.
- Pasibaigus tinkamumo laikui, komponentų naudoti negalima.
- Pradmenų ir zondų mišinius galima pakeisti, jei jie buvo laikomi šviesoje.
- Būkite ypač atsargūs, kad išvengtumėte mišinių užteršimo sintetinėmis medžiagomis, kurių yra teigiamos kontrolinės medžiagos reagente.
- Būkite ypač atsargūs, kad išvengtumėte užteršimo DNaze, nes tai gali lemti DNR matricos irimą.
- Ruošdami reakcijų mišinius ir pridėdami matricos naudokite atskiras specialias pipetes.
- Reakcijų mišinius ruoškite ir lašinkite kitoje vietoje, atskirtoje nuo tos, kurioje pridinama matricos.
- Neatidarykite „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento, kol nebaigsite tyrimo.
- Užbaigę tyrimą, neatidarykite „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ mėgintuvėlių.
- Norint užtikrinti tinkamą mėginių tyrimą reikia būti atidiems ir ypač atkreipti dėmesį į netinkamą mėginio įvedimą, įkėlimo klaidą ir lašinimo pipete klaidą.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Gabenimo sąlygos

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ pateikiamas ant sauso ledo. Jei pristačius „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ kuris nors jo komponentas nėra užšaldytas, pervežant buvo atidaryta išorinė pakuotė, nėra važtaraščio, naudojimo vadovo arba reagentų, susiekite su vienu iš QIAGEN techninės priežiūros skyrių arba vietinių platintojų (žr. viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Laikymas

Gavus „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“, jį iš karto reikia padėti laikyti nuo –30 iki –15 °C temperatūroje, pastovią temperatūrą palaikančiame ir apsaugotame nuo šviesos šaldiklyje.

Stabilumas

Laikant nurodytomis laikymo sąlygomis, „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ išlieka stabilus iki nurodytos galiojimo datos.

Atidarytus reagentus galima laikyti jų originalioje pakuotėje nuo –30 iki –15 °C temperatūroje iki ant pakuotės nurodytos datos. Venkite pakartotinai atšildyti ir užšaldyti. Atlikite ne daugiau kaip 5 atšildymo ir užšaldymo ciklus.

Bandinių naudojimas ir laikymas

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ skirtas naudoti su DNR mėginiais, išskirtais iš formalinu fiksuoto parafine esančio (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) auglio audinio, paimto atlikus chirurginę smegenų vėžiu sergančių žmonių rezekciją. Su visais audinių mėginiais turi būti elgiamasi kaip su potencialiai pavojingais.

- Audinio bandinys turi būti užfiksuotas 4–10 % neutraliu buferiniu skysčiu atskiestame formaline (Neutral Buffered Formalin, NBF).
- 10 µm sekos atpjovos turi būti atpjautos nuo parafino bloko ir uždėtos ant objektinių stiklelių.
- Patyręs asmuo (pvz., patalogas) turėtų įvertinti hematoksilinu ir eozinu (Hematoxylin and Eosin, H&E) nudažytą auglio ląstelių atpjovą ir plotą. DNR išskirti naudokite sekos atpjovas.
- Galima tirti tik tas atpjovas, kurių ≥ 40 % ploto užima auglio ląstelės.
- Jei atpjovų audinio plotas yra $< 50 \text{ mm}^2$, rekomenduojame apdoroti pakankamą atpjovų skaičių, kad bendras audinio plotas būtų padidintas bent iki 50 mm^2 (100 mm^2 naudojant automatizuotą išskyrimą „QIASymphony SP“).
- Auglio mėginius, blokus, objektinius stiklelius ir mėginius žymėkite, naudokite ir laikykite paruoštus išskyrimui valdomu būdu pagal vietines procedūras.
- FFPE blokus ir objektinius stiklelius laikykite kambario temperatūroje. Norint naudoti su „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ objektinius stiklelius galima laikyti kambario temperatūroje iki 4 savaičių prieš pradėdant išskirti DNR.
- Išskirta genominė DNR gali būti laikoma iki 1 savaitės temperatūroje 2–8 °C arba 8 savaites temperatūroje nuo –25 iki –15 °C.


Procedūra

DNR išskyrimas ir paruošimas

Naudokite „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. nr. 56404) arba „QIASymphony DSP DNA Mini Kit“ (kat. nr. 937236), kad išgrynintumėte genominę DNR iš mėginių, paruoštų iš FFPE smegenų auglio bandinių.

Pastaba. „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ buvo patvirtintas naudoti tik su „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ arba „QIASymphony DSP DNA Mini Kit“. Nenaudokite kitų DNR išskyrimo rodunktų.

„QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ naudojimas

<p>DĖMESIO</p> 	<p>Atidžiai perskaitykite toliau nurodytus pakeitimus, kuriuos reikia pritaikyti „QIAamp“ protokolui.</p>
---	---


- Norėdami sužinoti, kaip paruošti mėginius prieš deparafinavimą ir DNR išskyrimą, žr. „Pradinės medžiagos“ „QIAamp DNA FFPE Tissue“ vadove ir šio vadovo 17 psl. esantį skyrių Bandinių naudojimas ir laikymas.
- „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ turi būti naudojamas tik rankiniu būdu.
- Turi būti atliktas „QIAamp DNA FFPE Tissue“ vadove aprašytas RNazės veiksmas.
- Nenaudokite QIAGEN „Deparaffinization Solution“. Deparafinizuokite naudodami tik ksileno / etanolio metoda, aprašytą „Objektyvių stiklelių deparafinavimo procedūra naudojant „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“, žemiau. Ksileno galima pakeisti „Histolemon“ (ksileno pakaitalu).
- Proteinazės K skaidymas turi būti vykdomas 1 valandą.
- Mėginiai turi būti išplauti į 30 µl buferinio tirpalo („Buffer ATE“) iš „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ du kartus.

Objektynių stiklelių deparafinavimo procedūra naudojant „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“

1. Objektinius stiklelius sudėkite į specialų objektynių stiklelių stovą.
2. Objektinių stiklelių stovą įdėkite į objektynių stiklelių vonelę su ksilenu arba „Histolemon“ 2 minutėms. 2 ar 3 judesiais pakratykite atgal ir į priekį.
3. Įdėkite stovą į antrą objektynių stiklelių vonelę su etanoliu (96–100 %) 2 minutėms. 2 ar 3 judesiais pakratykite atgal ir į priekį.
4. Išdžiovinkite objektinius stiklelius temperatūroje 15–37 °C. Tai užtruks keletą minučių.
5. Pažymėkite kiekvieno mėginio 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius ir į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite 180 µl „Buffer ATL“ (iš „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“).
6. Kelis „Buffer ATL“ lašus užlašinkite ant audinio atpjavų ant objektynių stiklelių (kad uždengtumėte audinio paviršių).
7. Steriliu skalpeliu nugrandykite audinio plotą ir nugrandytą audinį įdėkite į atitinkamą pažymėtą mikrocentrifugos mėgintuvėlį.
8. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite 20 µl proteinazės K (iš „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“) ir purtydami sumaišykite.
9. Inkubuokite 56 °C temperatūroje 1 val.

Toliau atlikite 90 °C inkubavimo veiksmą, nurodytą „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ protokole (2012 m. birželio mėn. „QIAamp DNA FFPE Tissue“ vadovo 13 psl. nurodytas 12 veiksmas).

„QIASymphony DSP DNA Mini Kit“ naudojimas

DĖMESIO 	Atidžiai perskaitykite toliau pateikiamus pakeitimus, kurie turi būti pritaikyti „QIASymphony SP“ protokolo lape. Tissue_LC_200_V7_DSP.
--	---

- Norėdami sužinoti, kaip paruošti mėginius prieš deparafinavimą ir DNR išskyrimą, žr. „Bandinių naudojimas ir laikymas“, 17 psl.
- Turi būti atliktas „QIASymphony SP“ protokolo lape aprašytas RNazės veiksmas.
- Nenaudokite QIAGEN „Deparaffinization Solution“. Deparafinizuokite naudodami tik ksileno / etanolio metodą, aprašytą Objektinių stiklelių deparafinavimo procedūra naudojant „QIASymphony DSP DNA Mini Kit“ žemiau. Ksileną galima pakeisti „Histolemon“ (ksileno pakaitalu).
- Proteinazės K skaidymas turi būti vykdomas 1 valandą.
- Jutikliniame ekrane turi būti pasirinktas 50 µl eliuavimo tūris.

Objektinių stiklelių deparafinavimo procedūra naudojant „QIASymphony DSP DNA Mini Kit“

Deparafinavimą atlikite vadovaudamiesi toliau pateikiamais veiksmais, kurie skiriasi nuo protokolo, pateikiamo „QIASymphony SP“ protokolo lape: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Objektinius stiklelius sudėkite į specialų objektinių stiklelių stovą.
2. Objektinių stiklelių stovą įdėkite į objektinių stiklelių vonelę su ksilenu arba „Histolemon“ 2 minutėms. 2 ar 3 judesiais pakratykite atgal ir į priekį.
3. Įdėkite stovą į antrą objektinių stiklelių vonelę su etanoliumi (96–100 %) 2 minutėms. 2 ar 3 judesiais pakratykite atgal ir į priekį.
4. Išdžiovinkite objektinius stiklelius temperatūroje 15–37 °C. Tai užtruks keletą minučių.
5. Pažymėkite kiekvieno mėginio 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius ir į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite 220 µl „Buffer ATL“.

6. Kelis „Buffer ATL“ lašus užlašinkite ant audinio atpjavų ant objektinių stiklelių (kad uždengtumėte audinio paviršius).
7. Steriliu skalpeliu nugrandykite audinio plotą ir nugrandytą audinį įdėkite į atitinkamą pažymėtą mikrocentrifugos mėgintuvėlį.
8. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite 20 µl proteinazės K (iš „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“) ir purtydami sumaišykite.

Toliau atlikite 56 °C inkubavimo veiksmą, nurodytą „QIASymphony SP“ protokolo lape: Tissue_LC_200_V7_DSP protokole (2012 m. balandžio mėn. protokole „Deparafinavimas naudojant ksileną“ nurodytas 12 veiksmas). Inkubuokite 56 °C temperatūroje 1 val.

Genominė DNR

Išskirtą genominę DNR laikykite iki 1 savaitės temperatūroje 2–8 °C arba 8 savaites temperatūroje nuo –25 iki –15 °C.

DNR kiekis turi būti nustatytas matuojant mėginio optinį tankį (Optical Density, OD) ties 260 nm.

Atskieskite DNR iki 5 ng/µl koncentracijos 1x TE buferiniame tirpale esant pH 8,0.

PGR reakcija pritaikyta mėginiams, kuriuose yra 25 ng išgrynintos genominės DNR.

Protokolas: *IDH1/2* mutacijų aptikimas

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Norėdami optimaliai naudoti „*therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*“, mėginius sugrupuokite į partijas po 4. Naudodami mažesnes partijas, „*therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit*“ rinkiniu ištirsite mažiau mėginių.
- Rekomenduojame visus mėginius iširti vieną kartą per PGR tyrimą, kaip nurodyta 2 lentelėje, ir naudoti 3 lentelėje ir 2 pav. nurodytą įkrovos bloką ir rotoriaus nustatymą.

2 lentelė. „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentų su 72 mėgintuvėlių rotoriumi reakcijų skaičius

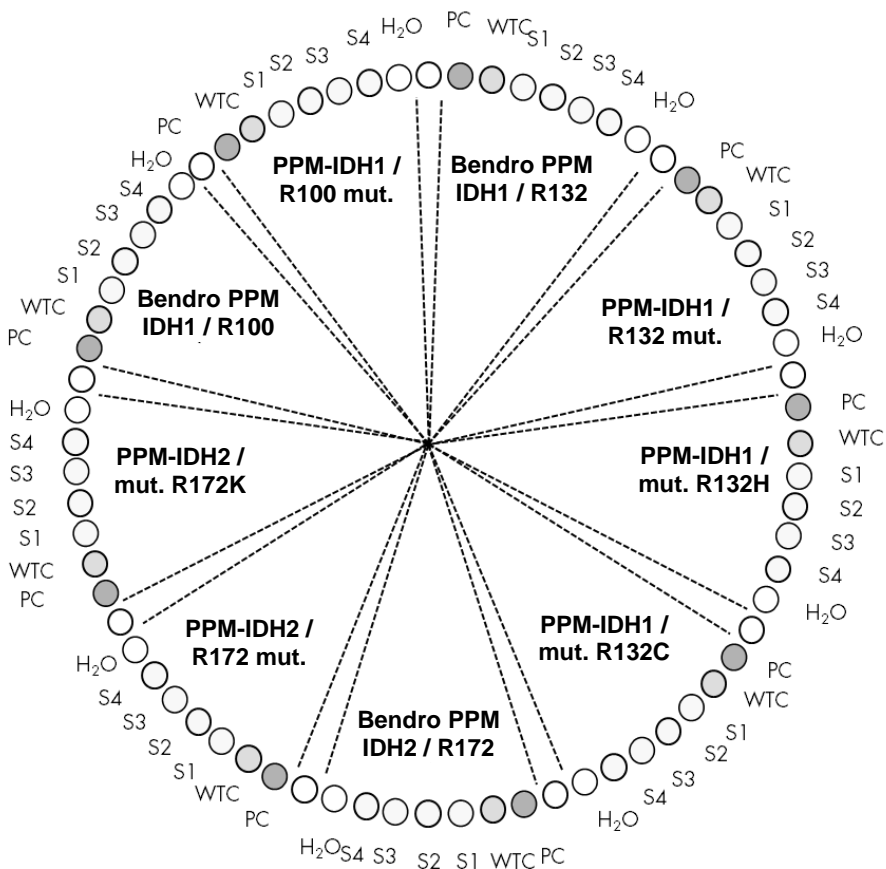
Mėginiai	Reakcijos
n DNR mėginiai	n x 1 reakcija
2 DNR kontrolinės medžiagos	2 reakcijos: teigiama ir WT kontrolinės medžiagos, kiekviena iširta vieną kartą per PGR tyrimą
Vandens kontrolinė medžiaga	1 reakcija

3 lentelė. Eksperimentui naudojant „therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“ siūlomas įkrovos blokas

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

* PC: Teigiama kontrolinė medžiaga.

† WTC: Laukinio tipo kontrolinė medžiaga.



2 pav. Eksperimentui naudojant „therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“ siūlomas rotoriaus nustatymas.

Svarbu. Mėginį visada įdėkite į 1 rotoriaus vietą. Kitu atveju instrumentu nebus atliktas kalibravimas ir bus gauti neteisingi fluorescencijos duomenys.

Procedūra

1. Ištirpykite visus būtinus komponentus ir padėkite ant ledo.
2. Paruoškite toliau nurodytus PGR mišinius atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių.

Pastaba. Visos koncentracijos skirtos galutiniam reakcijos tūriui.

4 lentelėje aprašoma lašinimo pipete schema, naudojama ruošiant vieną reagentų mišinį, apskaičiuotą taip, kad galutinis reakcijos tūris būtų 25 µl. Išankstinis mišinys gali būti paruoštas visiems PPM atsižvelgiant į reakcijų skaičių. Įtraukti papildomi tūriai siekiant kompensuoti lašinimo pipete klaidas.

4 lentelė. PGR mišinių paruošimas

Komponentas	1 reakcija (µl)	Išankstinis mišinys: 7 + 1 reakcija (µl)	Galutinė koncentracija
„qPCR“ pagrindinis mišinys, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Vanduo be nukleazės	6,5	52	–
Mėginys arba kontrolinė medžiaga† (bus dedamas atliekant 4 veiksmą)	5	Po 5	–
Bendrasis tūris	25	Po 25	–

* Paruoškite 9 išankstinius mišinius su kiekvienu rinkinyje pateiktu PPM.

† Teigiama kontrolinė medžiaga, neigiama kontrolinė medžiaga ir vandens kontrolinė medžiaga.

3. 20 µl iš anksto paruošto tirpalo išpilkite į kiekvieną „Rotor-Gene“ mėgintuvėlį (3 lentelė).
4. Įpilkite 5 µl medžiagos, kurią reikia kiekybiškai įvertinti (25 ng mėginio genominės DNR arba kontrolinės medžiagos), į atitinkamą mėgintuvėlį (bendrasis tūris – 25 µl; 3 lentelė).
5. Lėtai sumaišykite traukinėdami pipete aukštyn ir žemyn.
6. Mėgintuvėlius įdėkite į kartu su instrumentu pateiktą adapterį (2 pav.).

Pastaba. Į neužimtas vietas turi būti įdėti tušti mėgintuvėliai.

7. Visą adapterį įdėkite į „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą.
8. Užprogramuokite „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą naudodami šiluminio ciklo programą, kaip nurodyta 5 lentelėje.

5 lentelė. Temperatūros profilis

„Hold“ (Sulaikymas)	Temperatūra: 95 °C Laikas: 10 min.
„Cycling“ (Ciklai)	40 kart. 95 °C temperatūroje 15 sek. 60 °C temperatūroje 60 sek. su „FAM™“ fluorescencijos gavimu žaliame kanale: „Single“ (vienas)

9. Dialogo lange „New Run Wizard“ (naujo tyrimo vedlys) spustelėkite **„Gain Optimisation“** (Gavimo optimizavimas), kad atidarytumėte dialogo langą „Auto-Gain Optimisation Setup“ (automatinio gavimo optimizavimo nustatymas). Nustatykite žalio kanalo intervalą nuo **„2FI“**, skirtą **„Min Reading“** (Min. rodmeniui), iki **„10FI“**, skirtą **„Max Reading“** (Maks. rodmeniui).
10. Pažymėkite langelį **„Perform Optimisation Before 1st Acquisition“** (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą) ir uždarykite dialogo langą „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Automatinio gavimo optimizavimo nustatymas).
11. Paleiskite šiluminio ciklo programą.
12. Kai šiluminis ciklas bus užbaigtas, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
 - 12a. Pasirinkite **„Options“** (Parinktys) > **„Crop Start Cycles“** (Panaikinti pradinius ciklus). Pašalinkite duomenis prieš **10** ciklą, kad išmestumėte bet kokius artefaktus.
 - 12b. Pasirinkite **„Analysis“** (Analizė) > **„Cycling A. Green from 10“** („Cycling A. Green“ nuo 10), ataskaitoje nurodytą kaip „kairė slenkstinė reikšmė = 10,00“.
 - 12c. Pasirinkite **„Dynamic Tube“** (Dinaminis mėgintuvėlis) kaip normalizavimo metodą ir **„Slope Correct“** (Teisingas nuolydis), kad ištaisytumėte triukšmo nuolydį.
 - 12d. Nustatykite **„Outlier Removal“** (Išsiskiriančiojo pašalinimas) į **0%** (0 %) (atitinka NTC slenkstinę reikšmę).
 - 12e. Nustatykite, kad **„Reaction Efficiency Threshold“** (Reakcijos efektyvumo slenkstinė reikšmė) būtų išjungta.
 - 12f. Nustatykite slenkstinę reikšmę, lygią **0.03** (0,03).
 - 12g. Nustatykite diagramą kaip linijinę skalę.
 - 12h. Pasirinkite **Digital Filter: Light** (Skaitmeninis filtras: apšvietimas).

Rezultatų aiškinimas

Vandens kontrolinės medžiagos

Tiriant visus pradmenų ir zondų mišinius vandens kontrolinės medžiagos (ne matricos kontrolinės medžiagos) turėtų pateikti nulines C_T reikšmes.

Jei naudojant vandens kontrolinę medžiagą gaunama teigiama C_T reikšmė, taip yra dėl kryžminio užteršimo. Norėdami rasti sprendimą, žr. „Trikčių šalinimo vadovas“, 36 psl.

Kokybės kontrolė naudojant kontrolinių medžiagų C_T reikšmes

IDH1/2 laukinio tipo kontroline medžiaga („Wild-Type Control“, WTC) ir mutavusia *IDH1/2* teigiama kontroline medžiaga (Mutated Positive Control, Mut-PC) leidžiamas eksperimento patvirtinimas.

- Jei C_T reikšmės nėra, kontrolinė medžiaga klasifikuojama kaip neigiamos mutacijos atitinkamame aptikimo tyrime.
- Jei C_T reikšmės aptinkamos, kiekvienos kontrolinės medžiagos ΔC_T apskaičiuokite toliau nurodytu būdu

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132 mut.} = C_T \text{ IDH1/R132 mut.} - C_T \text{ Bendras IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172 mut.} = C_T \text{ IDH2/R172 mut.} - C_T \text{ Bendras IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100 mut.} = C_T \text{ IDH1/R100 mut.} - C_T \text{ Bendras IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 mut. R132H} = C_T \text{ IDH1 mut. R132H} - C_T \text{ Bendras IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 mut. R132C} = C_T \text{ IDH1 mut. R132C} - C_T \text{ Bendras IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 mut. R172K} = C_T \text{ IDH2 mut. R172K} - C_T \text{ Bendras IDH2/R172}$$

Kontrolinės medžiagos klasifikuojamos kaip teigiamos mutacijos, jei ΔC_T reikšmės yra mažesnės už 6 lentelėje nurodytas atitinkamas ΔC_T ribines reikšmes arba joms lygios. Jei ΔC_T reikšmė yra didesnė už ribinę reikšmę, svarstomo mutacijos tyrimo kontrolinė medžiaga klasifikuojama kaip neigiamos mutacijos.

6 lentelė. Kiekvieno mutacijos tyrimo ribinės reikšmės

Mutacijų tyrimas	Ribinė reikšmė (ΔC_T)
IDH1/R132 mut.	5,34
IDH2/R172 mut.	6,42
IDH1/R100 mut.	4,65
IDH1 mut. R132H	6,87
IDH1 mut. R132C	7,14
IDH2 mut. R172K	8,49

- Atlikus visus mutacijos tyrimus *IDH1/2* laukinio tipo kontrolinė medžiaga turi būti neigiamos mutacijos (7 lentelė).
- Atlikus visus mutacijos tyrimus mutavusi *IDH1/2* teigiama kontrolinė medžiaga turi būti teigiamos mutacijos (7 lentelė).

Visas eksperimentas pripažįstamas netinkamu, jei viena arba abi sąlygos nėra įvykdytos.

7 lentelė. Kontrolinių medžiagų patvirtinimo atlikimo pavyzdys

Reikšmė	Vanduo (NTC)	IDH1/IDH2 WT kontrolinė medžiaga	IDH1/IDH2 teigiama kontrolinė medžiaga
C _T Bendras IDH1/R132	Neaptikta	25,45	23,95
C _T IDH1/R132 mut.	Neaptikta	34,32	25,76
ΔC _T IDH1/R132 mut	Neaptikta	8,87	1,81
C _T Bendras IDH2/R172	Neaptikta	25,42	24,93
C _T IDH2/R172 mut.	Neaptikta	34,36	26,36
ΔC _T IDH2/R172 mut	Neaptikta	8,94	1,43
C _T Bendras IDH1/R100	Neaptikta	26,30	24,69
C _T IDH1/R100 mut.	Neaptikta	33,04	26,39
ΔC _T IDH1/R100 mut	Neaptikta	6,74	1,70
C _T IDH1 mut. R132H	Neaptikta	35,20	26,48
ΔC _T IDH1 mut. R132H	Neaptikta	9,75	2,53
C _T IDH1 mut. R132C	Neaptikta	37,16	27,07
ΔC _T IDH1 mut. R132C	Neaptikta	11,71	3,12
C _T IDH2 mut. R172K	Neaptikta	Nėra aptikta	27,97
ΔC _T IDH2 mut. R172K	Neaptikta	Nėra	3,04

Mėginio įvesties patvirtinimas

Mėginio įvestis turi būti patvirtinta prieš aiškinimą.

C_T reikšmė, gauta mėginiui su kiekvienu bendru PPM ($C_{T \text{ Bendras IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Bendras IDH2/R172}}$ ir $C_{T \text{ Bendras IDH1/R100}}$), turi būti žemesnė už 32,00. $C_{T \text{ Bendras}}$ reikšmės, kurios yra $\geq 32,00$, gautos dėl prastos kokybės DNR. Mėginį reikia iširti dar kartą. Jei DNR kiekis vis dar per mažas, išskirkite daugiau auglio audinio, jei yra (žr. „Trikčių šalinimo vadovas“, 36 psl.).

Mėginių rezultatai

IDH1/2 mutacijų aptikimas

Apskaičiuokite kiekvieno mėginio ΔC_T reikšmes, gautas atlikus kiekvieną mutacijos aptikimo tyrimą (PPM-IDH1/R132 mut., PPM-IDH2/R172 mut., PPM-IDH1/R100 mut.), kaip nurodyta toliau.

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132 mut.}} = C_{T \text{ IDH1/R132 mut.}} - C_{T \text{ Bendras IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172 mut.}} = C_{T \text{ IDH2/R172 mut.}} - C_{T \text{ Bendras IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100 mut.}} = C_{T \text{ IDH1/R100 mut.}} - C_{T \text{ Bendras IDH1/R100}}$$

Jei mutacijos aptikimo tyrimo C_T reikšmės nėra, svarstomos mutacijos mėginys turi būti klasifikuojamas kaip neigiamos mutacijos.

Mėginiai klasifikuojami kaip teigiamos mutacijos, jei atitinkamo mutacijos aptikimo tyrimo ΔC_T ribinė reikšmė yra mažesnė už 8 lentelėje nurodytą ΔC_T ribinę reikšmę arba jai lygi.

8 lentelė. Kiekvieno mutacijos aptikimo tyrimo ribinės reikšmės

Mutacijų tyrimas	Ribinė reikšmė (ΔC_T)
IDH1/R132 mut.	5,34
IDH2/R172 mut.	6,42
IDH1/R100 mut.	4,65

IDH1/2 mutacijos nustatymas

Apskaičiuokite kiekvieno mėginio ΔC_T reikšmes, gautas atlikus kiekvieną mutacijos nustatymo tyrimą (PPM-IDH1 mut. R132H, PPM-IDH1 mut. R132C, PPM-IDH2 mut. R172K), kaip nurodyta toliau.

$$\Delta C_T \text{ IDH1 mut. R132H} = C_T \text{ IDH1 mut. R132H} - C_T \text{ Bendras IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 mut. R132C} = C_T \text{ IDH1 mut. R132C} - C_T \text{ Bendras IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 mut. R172K} = C_T \text{ IDH2 mut. R172K} - C_T \text{ Bendras IDH2/R172}$$

Jei mutacijos nustatymo tyrimo C_T reikšmės nėra, mėginys turi būti klasifikuojamas kaip neigiamos mutacijos.

Mėginio mutacija nustatoma, jei atitinkamo mutacijos nustatymo tyrimo ΔC_T ribinė reikšmė yra mažesnė už 9 lentelėje nurodytą ΔC_T ribinę reikšmę arba jai lygi. ΔC_T aiškinimo pavyzdžiai rodomi 10 lentelėje ir 11 lentelėje.

9 lentelė. Kiekvieno mutacijos nustatymo tyrimo ribinės reikšmės

Mutacijų tyrimas	Ribinė reikšmė (ΔC_T)
IDH1 mut. R132H	6,87
IDH1 mut. R132C	7,14
IDH2 mut. R172K	8,49

10 lentelė. IDH1/2 mutacijos aptikimo pavyzdys

Reikšmė	1 mėginys	2 mėginys
C _T Bendras IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1/R132 mut.	33,86	28,29
ΔC _T IDH1/R132 mut.	7,47	1,97
C _T Bendras IDH2/R172	26,79	25,79
C _T IDH2/R172 mut.	35,13	35,21
ΔC _T IDH2/R172 mut.	8,34	9,42
C _T Bendras IDH1/R100	27,20	27,37
C _T IDH1/R100 mut.	33,83	33,76
ΔC _T IDH1/R100 mut.	6,63	6,39
Mutacijos aptikimas	Mutacija neaptikta	R132 mutacija aptikta

11 lentelė. IDH1/2 mutacijos identifikavimo pavyzdys

Reikšmė	1 mėginys	2 mėginys
C _T Bendras IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1 mut. R132H	33,82	28,27
ΔC _T IDH1 mut. R132H	7,43	1,95
C _T Bendras IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1 mut. R132C	37,94	Nėra aptikta
ΔC _T IDH1 mut. R132C	11,55	Nėra
C _T Bendras IDH2/R172	26,79	25,79
C _T IDH2 mut. R172K	Nėra aptikta	Nėra aptikta
ΔC _T IDH2 mut. R172K	Nėra	Nėra
Mutacijos nustatymas	Mutacija neaptikta	Aptikta R132H mutacija

IDH1/2 mutacijų aiškinimas

Procedūra, naudota IDH1/2 mutacijai prie mėginių, kurie yra teigiamos IDH1/2 mutacijos, priskirti, nurodyta 12 lentelėje. Aiškinimo pavyzdys rodomas 13 lentelėje.

12 lentelė. Aiškinimo vadovas

		Mutacijos nustatymas			
		Aptikta IDH1 mut. R132H	Aptikta IDH1 mut. R132C	Aptikta IDH2 mut. R172K	Mutacija neaptikta
Mutacijos aptikimas	R132 mutacija aptikta	R132H mutacija aptikta	R132C mutacija aptikta	–	R132 mutacija, bet ne R132H ir R132C
	R172 mutacija aptikta	–	–	R172K mutacija aptikta	R172 mutacija, bet ne R172K
	R100 mutacija aptikta	–	–	–	R100
	Mutacija neaptikta	Aptiktas mažas mutacijos R132H kiekis (nuo 1 % iki 2 %)*	Aptiktas mažas mutacijos R132C kiekis (nuo 1 % iki 4 %)*	Aptiktas mažas mutacijos R172K kiekis (apie 1 %)*	Mutacija neaptikta

* Šie atvejai gali pasitaikyti retai. Visus mėginius ir techninio priimtumo kriterijus, ypač auglio ląstelių kiekį, reikia patikrinti. Jei patenkinti visi kriterijai, mėginys turi būti iširtas dar kartą.

13 lentelė. IDH1/2 mutacijos ataskaitos teikimo ir aiškinimo pavyzdys

	1 mėginys	2 mėginys
Mutacijos aptikimas	Mutacija neaptikta	R132 mutacija aptikta
Mutacijos nustatymas	Mutacija neaptikta	Aptikta R132H mutacija
Rezultatų aiškinimas	Mutacijų neaptikta ir nenustatyta	Mutavusi R132H

Pastaba. Jei mėginyje yra 2 arba daugiau ΔC_T ribinių verčių, kurios yra mažesnės nei ΔC_T ribinės vertės arba joms lygios, mutacijos būseną priskiriama mutacijai, kurios skirtumas tarp ribinės vertės ir gauto ΔC_T yra didžiausia. Žr. pavyzdį 14 lentelėje.

14 lentelė. Aiškinimo pavyzdys, jei yra keli teigiami rezultatai

	3 mėginys	4 mėginys
ΔC_T IDH1/R132 mut.	1,24	5,24
ΔC_T ribinė reikšmė IDH1/R132 mut.	5,34	5,34
$(\Delta C_T \text{ ribinė reikšmė} - \Delta C_T)$ IDH1/R132 mut.	4,10	0,10
ΔC_T IDH2/R172 mut.	5,32	5,95
ΔC_T ribinė reikšmė IDH2/R172 mut.	6,42	6,42
$(\Delta C_T \text{ ribinė reikšmė} - \Delta C_T)$ IDH2/R172 mut.	1,10	0,47
Rezultatų aiškinimas	Mutavusi R132	Mutavusi R172

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Norėdami gauti daugiau informacijos, apsilankykite svetainėje www.qiagen.com.

Pastabos ir pasiūlymai

Išskiriant DRN užsikimšo kolonėlė

Nebaigta lizė

Centrifuguokite dar kartą.

Likęs lizatas gali būti perkeltas į naują kolonėlę.

Pakartokite išgavimo vykdymą naudodami mažiau FFPE audinio.

Išgavimo eliuote nepakanka DNR

Nepakanka FFPE audinio ploto

Pakartokite išgavimo vykdymą naudodami daugiau FFPE audinio atpjovos.

IDH1/2 WT kontrolinė medžiaga neaptikta

a) Lašinimo pipete klaidos arba praleisti reagentai; mėgintuvėlio arba šulinėlio apvertimai

Patikrinkite lašinimo pipete schemą ir reakcijos nustatymą.

Kartokite PGR tyrimą.

b) Netinkamas rinkinio komponentų laikymas.

Laikykite „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir saugokite pradmenų ir sondų mišinius nuo šviesos. Žr. „Reagentų laikymas ir naudojimas“, 16 psl.

Atlikite ne daugiau kaip 5 atšildymo ir užšaldymo ciklus.

c) Baigėsi „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ tinkamumo laikas

Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“.

Neaptikta IDH1/2 teigiama kontrolinė medžiaga

Pastabos ir pasiūlymai

- a) Lašinimo pipete klaidos arba praleisti reagentai; mėgintuvėlio arba šulinėlio apvertimai Patikrinkite lašinimo pipete schemą ir reakcijos nustatymą. Kartokite PGR tyrimą.
- b) Netinkamas rinkinio komponentų laikymas Laikykite „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir saugokite pradmenų ir zondų mišinius nuo šviesos. Žr. „Reagentų laikymas ir naudojimas“, 16 psl.
Atlikite ne daugiau kaip 5 atšildymo ir užšaldymo ciklus.
- c) Baigėsi „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ tinkamumo laikas Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“.

Signalas nėra, taip pat nėra kontrolinėms medžiagoms skirtas signalas

- a) „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento 1 padėtyje nėra reakcijos mėginį visada įdėkite į 1 rotoriaus vietą. Kitu atveju instrumentu nebus atliktas kalibravimas ir bus gauti neteisingi fluorescencijos duomenys.
- b) Lašinimo pipete klaidos arba praleisti reagentai; mėgintuvėlio arba šulinėlio apvertimai Patikrinkite lašinimo pipete schemą ir reakcijos nustatymą. Kartokite PGR tyrimą.
- c) Netinkamas rinkinio komponentų laikymas. Laikykite „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir saugokite pradmenų ir zondų mišinius nuo šviesos. Žr. „Reagentų laikymas ir naudojimas“, 16 psl.
Atlikite ne daugiau kaip 5 atšildymo ir užšaldymo ciklus.
- d) Baigėsi „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ tinkamumo laikas Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“.

Pastabos ir pasiūlymai

- | | | |
|----|---|--|
| e) | Neteisingas pasirinkto kanalo aptikimas | Aptikimo kanalą nustatykite į „Cycling Green“ arba 530 nm / 640 nm. |
| f) | Duomenų gavimo programos nėra | Patikrinkite ciklų programą. Žr. 5 lentelę, 26 psl.

Kiekvienos PGR programos atkaitinimo segmento pabaigoje pasirinkite gavimo režimą „ Single “ (vienas). |

Fluorescencijos intensyvumas skiriasi

- | | |
|--|--|
| Lašinimo pipete klaidos arba praleisti reagentai; mėgintuvėlio arba šulinėlio apvertimai | Patikrinkite lašinimo pipete schemą ir reakcijos nustatymą.

Kartokite PGR tyrimą. |
|--|--|

Fluorescencijos intensyvumas per mažas

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Netinkamas rinkinio komponentų laikymas | Laikykite „ <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit“ temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir saugokite pradmenų ir zondų mišinius nuo šviesos. Žr. „Reagentų laikymas ir naudojimas“, 16 psl.

Atlikite ne daugiau kaip 5 atšildymo ir užšaldymo ciklus. |
| b) | Baigėsi „ <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit“ tinkamumo laikas | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują „ <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit“. |
| c) | Labai mažas tikslinės DNR kiekis | Prieš pradėdami, visada patikrinkite DNR koncentraciją. Žr. „DNR išskyrimas ir paruošimas“, 18 psl. |

Pastabos ir pasiūlymai

Neigiamos kontrolinės medžiagos (H₂O) rezultatas yra teigiamas

Kryžminis užteršimas, reagentų užteršimas, instrumento klaida, šulinėlių ar kapiliarų apvertimai arba zondų degradacija	<p>Pakeiskite visus svarbius reagentus arba naudokite naują „<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit“.</p> <p>Mėginius, rinkinio komponentus ir eksploatacinius reikmenis visada naudokite vadovaudamiesi visuotinai pripažįstama praktika, kad išvengtumėte pernešimo užteršimo.</p> <p>Pradmenų ir zondų mišinius saugokite nuo šviesos.</p> <p>Fluorescencijos kreivėse patikrinkite, ar nėra klaidingai teigiamų rezultatų.</p> <p>Patikrinkite reakcijos nustatymą. Žr. „Protokolas: IDH1/2 mutacijų <i>aptikimas</i>“, 22 psl.</p>
---	--

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę. Svetainėje www.qiagen.com/support/ užsakius galima gauti analizės sertifikata.

Apribojimai

Rinkinys skirtas profesionaliam naudojimui.

Produktą turi naudoti tik personalas, specialiai instruktuoatas ir išmokytas naudoti molekulinės biologijos metodus ir susipažinęs su šia technologija.

Šį rinkinį būtina naudoti vadovaujantis šiame vadove pateiktais nurodymais ir su patvirtintais instrumentais, nurodytais skyriuje „Būtinoms, bet nepateikiamoms priemonėms“, 12 psl.

Reikia atkreipti dėmesį į tinkamumo datas, išspausdintas ant dėžutės ir visų komponentų etikečių. Nenaudokite komponentų, kurių galiojimo laikas baigėsi.

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ patvirtintas naudoti tik su formalinu fiksuotu parafine esančiu smegenų audiniu.

„*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ patvirtintas naudoti tik su „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ arba „QIASymphony DSP DNA Mini Kit“.

Tik „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ (skirtas PGR) ir „QIASymphony SP“ (mėginiui paruošti) buvo patvirtinti.

Produktą naudojant ne pagal etiketėje nurodytą paskirtį ir (arba) modifikuojant komponentus panaikinama QIAGEN atsakomybė.

Naudotojas atsako už sistemos eksploatacines savybes, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima QIAGEN eksploatacinių savybių tyrimai.

Testas skirtas 7 mutacijoms *IDH1* geno 132 ir 100 kodonuose ir 5 mutacijoms *IDH2* geno 172 kodone aptikti. Mėginiuose, kurių pateiktas rezultatas buvo „mutacijų neaptikta“, gali būti *IDH1* arba *IDH2* mutacijų, kurių tyrimas neaptinka.

Mutacijų aptikimas priklauso nuo mėginio vientisumo, auglio ląstelių ir bandinyje esančio amplifikuotinos DNR kiekio.

Visus naudojant produktą sugeneruotus diagnostinius rezultatus būtina aiškinti visų susijusių klinikinių arba laboratorinių tyrimų rezultatų kontekste.

Eksploatacinių savybių charakteristikos

Tuštumos riba („Limit of blank“, LOB)

Tuštumos riba („Limit of blank“, LOB) buvo nustatyta (vadovaujantis CLSI/NCCLS EP17-A rekomendacijomis; 14) tiriant neigiamus mėginius (FFPE nepažeistos smegenys, 8 mėginiai, 64 matavimai vienai partijai, 2 partijos).

LOB rezultatai pateikiami 15 lentelėje.

15 lentelė. Tuštumos riba („Limit of blank“, LOB)

Tyrimas	LOB	Galutinė LOB
R132 mut.	1 patvirtinimo partija: 6,57 2 patvirtinimo partija: 6,32	6,32
R132H mut.	1 patvirtinimo partija: 7,91 2 patvirtinimo partija: 8,22	7,91
R132C mut.	1 patvirtinimo partija: 8,04 2 patvirtinimo partija: 8,20	8,04
R172 mut.	1 patvirtinimo partija: 7,74 2 patvirtinimo partija: 7,59	7,59
R172K mut.	1 patvirtinimo partija: 9,93 2 patvirtinimo partija: 10,58	9,93
R100 mut.	1 patvirtinimo partija: 6,52 2 patvirtinimo partija: 5,19	5,17

Aptikimo riba („Limit of Detection“, LOD)

Aptikimo riba („Limit of Detection“, LOD arba analitinis jautrumas) buvo nustatytas remiantis „tikslumo profilio metodu“, aprašytu CLSI/NCCLS EP17-A rekomendacijose (14). Penki silpnai teigiami mėginiai (plazmidžių DNR, įterptos į gliomos laukinio tipo DNR) buvo naudojami vienai mutacijai (nuo 30 iki 110 matavimų vienam mutacijos tipui ir mutacijų procentinei daliai).

LOD rezultatai pateikiami 16 lentelėje.

16 lentelė. Aptikimo riba („Limit of Detection“, LOD)

Tyrimas	Mutacijos	LOD	Tyrimo ribinė vertė	Jautrumas (%)
R132H mut.	R132H	6,87	6,87	0,78
R132C mut.	R132C	7,14	7,14	1,19
R172K mut.	R172K	8,49	8,49	0,61
R132 mut.	R132H	5,50	5,34	2,32
	R132C	5,34		4,35
	R132L	5,42		2,30
	R132G	5,61		2,23
	R132S	5,42		2,75
	R132V	5,56		2,24
R172 mut.	R172K	6,42	6,42	1,06
	R172G	6,58		3,00
	R172M	6,66		3,31
	R172S	6,42		14,93
	R172W	6,68		2,36
R100 mut.	R100Q	4,65	4,65	3,45

Mutacija aptinkama, jei ΔC_T reikšmė yra mažesnė už LOD arba jai lygi.

DNR įvesties poveikis

DNR buvo išskirta iš 4 skirtingų glioma sergančių pacientų auglio mėginių: 2 mėginių su laukinio tipo *IDH1/2* ir 2 mėginių, turinčių *IDH1* R132H (395G>A) mutaciją.

Buvo ištirti trys skirtingi DRN kiekiai (įskaitant rekomenduojamą protokolui) siekiant įvertinti DNR įvesties poveikį kokybiniais rezultatams. Rezultatai parodė, kad DNR įvestis neturėjo poveikio kokybiniais rezultatams. Tačiau buvo aptikta daugiau DNR įvesties, žemesnės už rekomenduojamą įvestį (<25 ng DNR), techninių gedimų (C_T Total KK gedimai). Todėl vykdant tyrimą rekomenduojama naudoti 25 ng DNR įvestį 5 μ l tūryje.

Pasikartojamumas ir atkartojamumas

Tikslumo tyrimas buvo atliktas naudojant 4 skirtingus mėginius (plazmidžių DNR, įterptos į gliomos laukinio tipo DNR, atitinkančios laukinį tipą („Wild-type“, WT), mutavusį ir ribinės reikšmės mėginius), ištirtus 40 kartų po du kartus (n = 80 matavimų).

Standartiniai nuokrypiai („Standard Deviations“, SD) ir kintamumo koeficientai („Coefficients of Variation“, CV) pateikiami 17 lentelėje.

17 lentelė. Tikslumo rezultatai

Tyrimas	Mėginys	Vid. ΔC_T	SD _R *	SD _{Tyrimas} [†]	SD _{Bendras} [‡]	CV _{Bendras} (%) [‡]	Tinkamų aptikimų dažnis
R132C mut.	WT	11,58	1,08	0,00	1,11	10	100 % (78/78)
	5 %	5,19	0,26	0,23	0,46	9	100 % (76/76)
	10 %	4,37	0,27	0,14	0,48	11	100 % (78/78)
	30 %	2,62	0,20	0,21	0,46	18	100 % (78/78)
R132H mut.	WT	10,87	1,48	0,00	1,48	14	100 % (78/78)
	5 %	4,46	0,27	0,05	0,31	7	100 % (78/78)
	10 %	3,57	0,28	0,14	0,31	9	100 % (76/76)
	30 %	1,86	0,21	0,20	0,30	16	100 % (72/72)
R172K mut.	WT	12,20	0,31	0,17	0,39	3	100 % (66/66)
	5 %	6,19	0,50	0,00	0,63	10	100 % (76/76)
	10 %	5,23	0,32	0,20	0,48	9	100 % (76/76)
	30 %	3,68	0,18	0,11	0,36	10	100 % (76/76)

* R: pakartojamumas.

† Tyrimas: atkuriamumas tarp tyrimų.

‡ Bendras: bendras tikslumas (įskaitant tarp instrumentų, tarp operatorių ir tarp partijų).

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

17 lentelė. Tikslumo rezultatai (tęsinys)

Tyrimas	Mėginys	Vid. ΔC_T	SD_R^*	$SD_{Tyrimas}^\dagger$	$SD_{Bendras}^\ddagger$	$CV_{Bendras} (\%)^\ddagger$	Tinkamų aptikimų dažnis
R100 mut.	WT	7,21	0,41	0,27	0,52	7	100 % (70/70)
	5%	3,68	0,27	0,16	0,33	9	100 % (76/76)
	10%	2,93	0,24	0,15	0,32	11	100 % (76/76)
	30%	1,56	0,25	0,07	0,26	17	100 % (76/76)
R132 mut.	WT	8,01	0,76	0,00	0,78	10	100 % (152/152)
	R132H 5 %	4,29	0,30	0,15	0,48	11	99 % (151/152)
	R132C 5 %	4,44	0,30	0,00	0,56	13	99 % (151/152)
	R132H 10 %	3,49	0,27	0,22	0,46	13	99 % (151/152)
	R132C 10 %	3,69	0,27	0,23	0,53	14	99 % (151/152)
	R132H 30 %	1,87	0,21	0,02	0,33	18	100 % (152/152)
R172 mut.	WT	9,47	0,91	0,87	1,45	15	100 % (66/66)
	5 %	4,45	0,35	0,12	0,56	13	100 % (76/76)
	10 %	3,55	0,29	0,02	0,53	15	100 % (76/76)
	30 %	2,05	0,18	0,15	0,47	23	100 % (76/76)

* R: pakartojamumas.

† Tyrimas: atkuriamumas tarp tyrimų.

‡ Bendras: bendras tikslumas (įskaitant tarp instrumentų, tarp operatorių ir tarp partijų).

Metodų palyginimas

Palyginimas su imunohistochemija (IHC) *IDH1/R132H* aptikti.

Tyrimas buvo atliktas siekiant parodyti mutacijų būsenos, įvertintos naudojant „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“ ir IHC (antikūnų prieš žmogaus *IDH1R132H* kloną H09, DIANOVA), atitikimą.

Iš viso buvo pasirinkti 103 klinikiniai gliomos mėginiai. Seniausias blokas buvo 10 metų senumo.

Visi mėginiai atitiko kokybės kontrolės reikalavimus naudojant tiek „*therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit“, tiek IHC.

Rezultatai parodė 100 % teigiamų rezultatų procentinį atitikimą (Positive Percentage Agreement, PPA), 98 % neigiamų rezultatų procentinį atitikimą (Negative Percentage Agreement, NPA) ir 99 % bendrą atitikimą (Overall Agreement, OA) (18 lentelė).

18 lentelė. Atitikimo tarp „therascreen RGQ PCR Kit“ ir IHC analizė

Sutapimo matas	Dažnis (%)	95 % patikimumo intervalas
PPA	45/45 (100 %)	[92;100]
NPA	57/58 (98 %)	[91;100]
OA	102/103 (99 %)	[96;100]

Palyginimas su dvikrypčiu sekvenavimu

Tyrimas buvo atliktas siekiant parodyti mutacijų būsenos, įvertintos naudojant „therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“ ir dvikryptį sekvenavimą, atitikimą.

Iš viso buvo pasirinkti 103 klinikiniai glioma sergančių pacientų auglio mėginiai. Seniausias blokas buvo 10 metų senumo.

Visi 103 mėginiai atitiko kokybės kontrolės reikalavimus naudojant „therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“, o naudojant dvikryptį sekvenavimą buvo pateikti 101 mėginio rezultatai.

Rezultatai parodė 100 % teigiamų rezultatų procentinį atitikimą (Positive Percentage Agreement, PPA), 92 % neigiamų rezultatų procentinį atitikimą (Negative Percentage Agreement, NPA) ir 96 % bendrą atitikimą (Overall Agreement, OA) (19 ir 20 lentelės).

19 lentelė. „therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“ ir dvikrypčio sekvenavimo palyginimas

		Sangerio dvikryptis sekvenavimas				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
„therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 reiškia, kad mėginyje buvo aptikta R132 mutacija, bet nebuvo aptikta nei R132H, nei R132C mutacija.

† R172 reiškia, kad mėginyje buvo aptikta R172 mutacija, bet nebuvo aptikta R172K mutacija.

20 lentelė. Sutapimo su dvikrypčiu sekvenavimu analizė

Sutapimo matas	Dažnis (%)	95 % patikimumo intervalas
PPA	50/50 (100 %)	[93;100]
NPA	47/51 (92 %)	[81;97]
OA	97/101 (96 %)	[90;98]

Literatūra

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

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

Simboliai

Toliau esančioje lentelėje aprašomi simboliai, pateikiami etiketėse arba šiame dokumente.



<N>

Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti



Tinka naudoti iki

IVD

In vitro diagnostikos medicinos prietaisas

REF

Katalogo numeris

LOT

Partijos numeris

MAT

Medžiagos numeris (t. y. komponento ženklavimas etikete)

COMP

Komponentai (t. y. pakuotės medžiagų sąrašas)

CONT

Sudėtyje yra (turinys)

NUM

Skaičius (t. y. mėgintuvėlių, buteliukų)

Rn

R – vadovo peržiūra, o n – peržiūros numeris



Visuotinis prekės numeris



Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Žr. naudojimo instrukcijas



Dėmesio

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. nr.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	20 reakcijoms: 9 pradmenų ir zondų mišiniai, WT kontrolinė medžiaga, teigiama kontrolinė medžiaga, pagrindinis mišinys, vanduo be nukleazės	873011
„Rotor-Gene Q MDx“ ir priedai		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	„Real-time PCR“ ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu) ir HRM kanalu, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai (1 metų garantija dalims, darbui, įrengimui ir mokymui)	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	„Real-time PCR“ ciklų valdiklis su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai: apima 1 metų garantiją dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete 72 x 0,1 ml mėgintuvėliuose	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 1000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangteliai 10 000 reakcijų	981106
„QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“, skirtas genominei DNR išgryninti iš parafine esančių audinių		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR preparatų: 50 „QIAamp MinElute® Columns“, „Proteinase K“, buferiniai tirpalai, „Collection Tubes (2 ml)“	56404

Produktas	Turinys	Kat. nr.
„QIASymphony DSP DNA Mini Kit“, skirtas automatizuotam DNR išgryninimui iš 1–96 mėginių		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	192 ruošiniams (kiekvienas po 200 µl): su 2 reagentų kasetėmis ir fermentų stoveliais bei reikmenimis	937236
„QIASymphony SP“ ir reikmenys		
QIASymphony SP System	„QIASymphony“ mėginių ruošimo modulis: su įrengimu ir mokymu, 1 metų garantija dalių ir darbo kokybei	9001751
QIASymphony SP	„QIASymphony“ mėginių ruošimo modulis: su 1 metų garantija dalių ir darbo kokybei	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8 šulinėlių mėginio paruošimo kasetės, skirtos naudoti su „QIASymphony SP“	997002
8-Rod Covers (144)	„8-Rod Covers“, skirti naudoti su „QIASymphony SP“	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Vienkartiniai filtrų antgaliai stovelyje (8 x 128). Skirti naudoti su „QIACube“ ir „QIASymphony SP/AS“ instrumentais	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Vienkartiniai filtrų antgaliai stovelyje (8 x 128). Skirtas naudoti su „QIASymphony SP/AS“ prietaisais.	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Nesterilūs polipropileno mėgintuvėliai (0,85 ml maksimali talpa, mažiau nei 0,7 ml laikymo talpa, 0,4 ml eliuavimo talpa), 2 304 stoveliuose po 96, su dangtelių juostelėmis	19588
Reagentai		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 vnt./ml, tirpalas)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml audinio lizės buferinis tirpalas 1000 paruošimų	19076

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinių vadovai arba naudotojo vadovai pasiekiami svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninės priežiūros skyriaus ar vietinio platintojo.

Dokumento peržiūrų istorija

Data	Keitimai
R5, 2020 m. liepos mėn.	<p>Peržiūrėtas rezultatų aiškinimo skyrius ir įtraukta informacija apie kontrolinių medžiagų ir mėginių klasifikaciją atsižvelgiant į CT reikšmės aptikimą</p> <p>Peržiūrėtas C_T IDH mut. R172K ir ΔC_T IDH2 mut. R172K IDH1/IDH2 WT kontrolinės medžiagos stulpelis 7 lentelėje</p> <p>Peržiūrėti C_T IDH1 mut. R132C, ΔC_T IDH1 mut. R132C, C_T IDH2 mut. R172K ir ΔC_T IDH2 mut. R172K verčių 1 mėginio ir 2 mėginio stulpeliai 11 lentelėje</p>

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

„therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit“ Ribotosios licencijos sutartis

Naudodamas šį produktą pirkėjas ar naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos galima rasti www.qiagen.com. QIAGEN naudotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencijos sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencijos sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

Šis produktas skirtas naudoti „in vitro“ diagnostikai. QIAGEN negalima perparduoti, modifikuoti norint perparduoti ar naudoti gaminant komercinius produktus be raštinio QIAGEN sutikimo.

Šio dokumento informacija gali būti keičiama be perspėjimo. QIAGEN neatsako už jokiais klaidas, kurių gali būti šiame dokumente. Išleidimo metu šis dokumentas laikomas išsamiu ir tiksliu. Jokiomis aplinkybėmis QIAGEN neprisiima jokios atsakomybės už atsitiktinę, specialią, pasikartojančią ar šalutinę žalą, kuri gali būti susijusi su šio dokumento naudojimu.

Garantuojama, kad QIAGEN produktai atitinka nustatytas specifikacijas, QIAGEN vienintelis įsipareigojimas ir vienintelis kliento reikalavimų patenkinimo būdas yra nemokamas produktų pakeitimas, jei produktas neveikia taip, kaip buvo garantuota.

Šio gaminio įsigijimas leidžia pirkėjui jį naudoti žmogaus mėginių in vitro diagnostikos tikslais. Joks bendras patentas ar kita licencija, išskyrus šią konkrečią įsigijimo suteikiamą teisę, nesuteikiama.

IDH1/2 mutacijos ir jų naudojimai saugomi patento teisių, įskaitant Europos patento paraišką EP2326735 ir EP2546365, JAV patento paraišką US2011229479 ir US2012202207 ir jų atitiktis užsienio šalyse.

Įsigijus šį produktą nesuteikiama jokia teisė naudoti jį atliekant klinikinius IDH1/2 skirtų vaistų tyrimus. QIAGEN kuria specialias licencijavimo programas tokiems naudojimui atvejams. Susisiekite su mūsų teisės skyriumi adresu idhlicenses@qiagen.com.

Prekių ženklai: QIAGEN®, QIAmp®, QIASymphony® MinElute®, Rotor-Gene®, „therascreen“SM (QIAGEN Group); „FAM“TM („Life Technologies Corporation“); „Histolemon“TM („Carlo Erba“); „Sarstedt“SM („Sarstedt AG“).

1119896 07-2020 HB-1566-005 © 2020 QIAGEN, visos teisės saugomos.

