Lipiec 2016

Instrukcja zestawu *ipsogen*®
BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX

Σ 24

Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatmi Rotor-Gene® Q, Applied Biosystems®, ABI PRISM® oraz LightCycler®

CE

REF 670823

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3 MAT 1072511EN

QIAGEN®

Sample & Assay Technologies

Technologie badań i analiz firmy QIAGEN

Firma QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii oczyszczania próbek i ich analizy, 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 Państwu osiągnięcia znakomitych i przełomowych osiągnięć w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis Treści

Przeznaczenie ***5***

Streszczenie i Wyjaśnienia ***5***

Informacje podstawowe o przewlekłej białaczce szpikowej 5

Monitorowanie choroby 6

Zasada Procedury **7**

Materiały Dostarczone **10**

Zawartość zestawu 10

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone **12**

Ostrzeżenia i Uwagi **13**

Ostrzeżenia ogólne 13

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikam **14**

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami **14**

Procedura **15**

Preparatyka RNA 15

Protokół: Odwrotna transkrypcja 15

Protokół: qPCR na aparacie Rotor Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem 72-probówkowym 18

Protokół: qPCR na aparatach Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS oraz LightCycler 480 22

Protokół: qPCR na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0 28

Interpretacja wyników **32**

Zasada analizy danych 32

Krzywe standardowe i kryteria jakości dla danych surowych 33

Znormalizowana liczba kopii (ang. normalized copy number; NCN) 35

Konswersja IS i raportowanie MMR 36

Podsumowanie kryteriów jakości 37

Rozwiązywanie problemów 38

Kontrola Jakości **38**

Ograniczenia **39**

Charakterystyki Wydajności **39**

Limit próby ślepej i limit detekcji 40

Liniowość 40

Ilości wejściowe 40
Precyzja 40
Badanie zgodności: standardy ERM-AD623 BCR-ABL1 dla pojedynczego plazmidu (IRMM) versus *ipsogen* dla pojedynczego plazmidu (QIAGEN) 41
Literatura 43
Symbole 44
Informacje Kontaktowe 44
Informacje Dotyczące Zamawiania 45

Przeznaczenie

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR* DX jest przeznaczony do oceny ilościowej statusu transkryptów BCR-ABL p210 b2a2 lub b3a2 w próbkach szpiku kostnego lub krwi obwodowej pacjentów z ostrą białaczką limfobalstyczną (ang. acute lymphoblastic leukemia; ALL) lub chroniczną białaczką mieloidalną (ang. chronic myeloid leukemia; CML), u których uprzednio zdiagnzowano obecność genu fuzyjnego BCR-ABL. Test jest przeznaczony do oceny poziomu odpowiedzi molekularnej; wyniki mogą zostać wykorzystane do monitorowania minimalnej choroby resztkowej (ang. minimal residual disease; MRD).

* MMR: Major Molecular Response (Większa Odpowiedź Molekularna)

Streszczenie i Wyjaśnienia

Informacje podstawowe o przewlekłej białaczce szpikowej

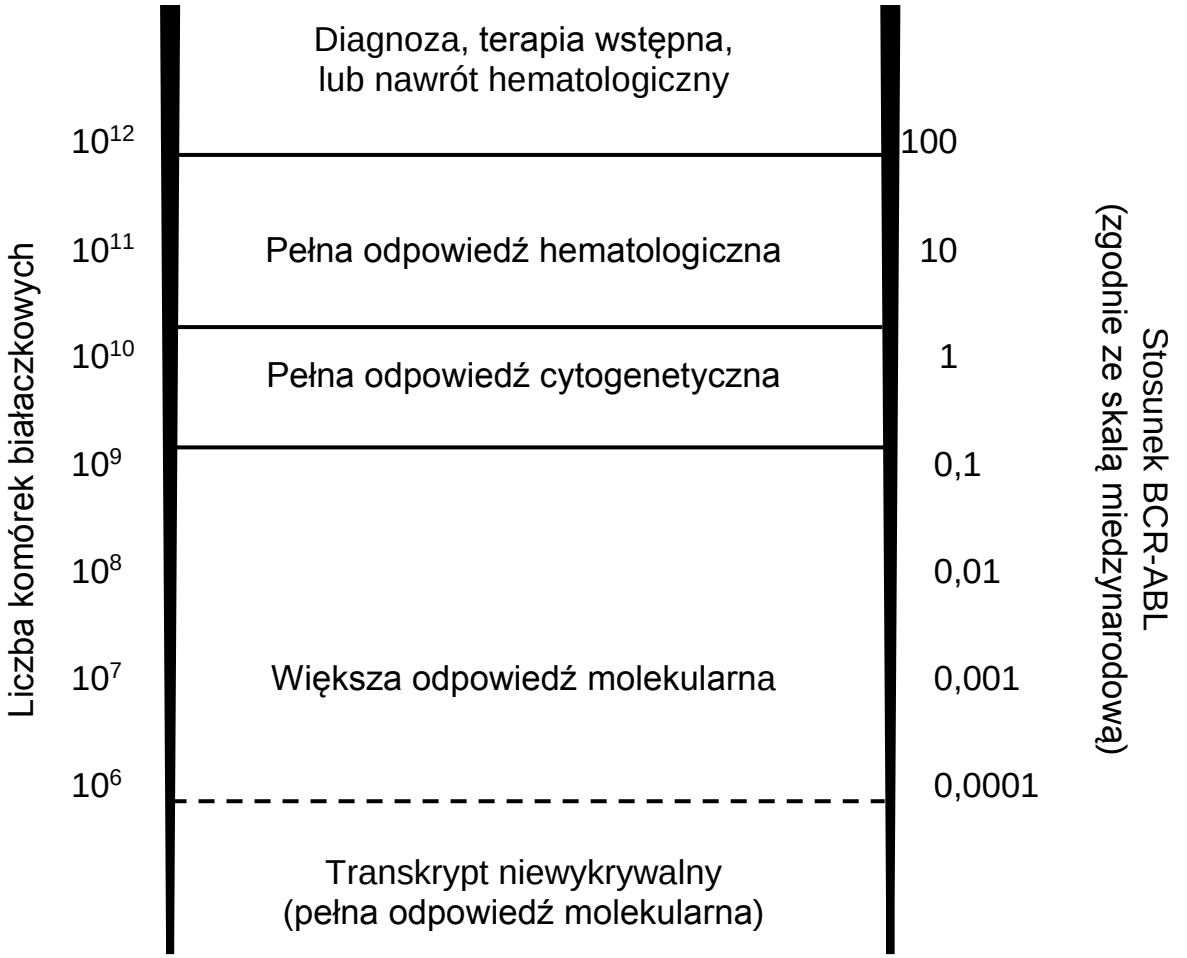
Przewlekła białaczka szpikowa (CML) należy do grupy schorzeń cechujących się neoplazmatycznymi zmianami mieloproliferacyjnymi i jest obserwowana w >90% przypadków powiązanych z obecnością chromosomu Filadelfia (Ph CHRS).

Ten chromosom jest produktem wzajemnej translokacji pomiędzy długimi ramionami chromosomów 9 i 22, t(9;22), z rejonem łamliwym (ang. breakpoint cluster region; BCR) zlokalizowanym na chromosomie 22 oraz onkogenem c-ABL usytuowanym na chromosomie 9. Korespondujący gen fuzyjny BCR-ABL1 jest transkrybowany do RNA o wielkości 8,5 kb (kilo zasad) z dwoma wariantami fuzyjnymi (junction variants), b2a2 (40% przypadków) oraz b3a2 (55% przypadków). Gen fuzyjny koduje białko chimeryczne p210 cechujące się podwyższoną aktywnością kinazy tyrozynowej. Transkrypty b2a3 i b3a3 stanowią mniej niż 5% przypadków. Chromosom Ph jest wykrywany u 35% pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL).

Rocznie wykrywa się około 1-2 przypadków CML na 100.000 osób i schorzenie to stanowi 20% wszystkich białaczek wśród dorosłych. Klinicznie charakteryzuje się nadmiarem komórek mieloidalnych, które podlegają różnicowaniu i funkcjonują normalnie. W 90–95% przypadkach CML, pacjenci zostaną zdiagnozowani w chronicznej lub stabilnej fazie choroby. W przeszłości stan pacjentów przechodził w kryzys blastyczny i ostrą białaczkę kończącą się zejściem śmiertelnym z medianą przeżycia 4-6 lat. Pojawienie się leku imatinib, a następnie inhibitorów kinazy tyrozynowej drugiej generacji (ang. tyrosine kinase inhibitors; TKI) dramatycznie zmieniło naturalny przebieg choroby. Obecnie większość pacjentów pozostaje w remisji, co stwarza potrzebę długofalowego minitorowania choroby.

Monitorowanie choroby

Obecnym celem terapii CML jest osiągnięcie 100% przeżycia i negatywnego statusu chromosomu Ph. Monitorowanie choroby jest zatem kluczowym narzędziem w ocenie odpowiedzi na leczenie i wykrywania nawrotów u każdego pacjenta tak szybko jak to możliwe. Leczenie z użyciem TKI zwykle powoduje, że remisja u pacjentów przechodzi ze stadium hematologicznego do cytogenetycznego, a następnie molekularnego, co koresponduje ze spadkiem liczby komórek białaczkowych oraz transkryptów BCR-ABL1, tak jak to pokazano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Zaadaptowano z pozycji 1 literatury.

Standardową metodą do oceny obciążenia nowotworowego u pacjentów CML jest konwencjonalna analiza cytogenetyczna (barwienie Giemsa) komórek szpiku pacjentów podczas metafazy. Odpowiedź cytogenetyczna jest oceniana na podstawie co najmniej 20 komórek szpiku w metafazie. Poziom odpowiedzi cytogenetycznej jest oceniany na podstawie procentowości metafaz z pozytywnym chromosomem Ph (patrz Tabela 1, poz. 2 literatury). Niemniej

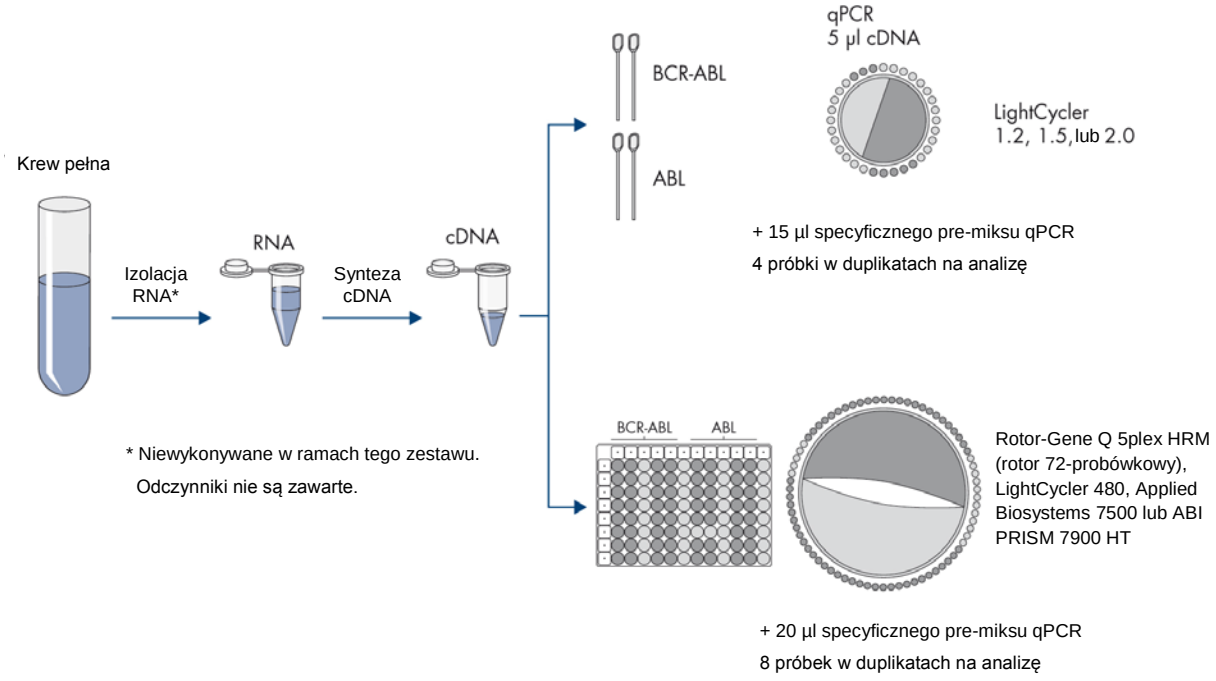
jednak metoda ta jest zależna od poziomu ekspertyzy, którym dysponuje dane laboratorium i cechuje się niską czułością 5% przy analizie 20 metafaz.

Ocena ilościowa mRNA dla BCR-ABL1 Mbcr metodą PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) w próbkach krwi obwodowej definiuje odpowiedź molekularną, co obecnie jest jedną z technologii służących monitorowaniu CML. Jest ona mniej inwazyjna i bardziej czuła w porównaniu do konwencjonalnej analizy cytogenetycznej metafazy komórek szpiku.

Zalecenia dotyczące monitorowania CML zostały również niedawno uaktualnione celem uwzględnienia nowych danych z badań klinicznych jak również ulepszonych narzędzi i metod monitorowania choroby. Najnowsze zalecenia dotyczące definiowania odpowiedzi i monitorowania pacjentów z CML dla TKI pochodzą od ekspertów ELN (European LeukemiaNet) (3).

Z technicznego punktu widzenia, międzynarodowi eksperci czynią wysiłki celem zharmonizowania strategii badań i raportowania dla BCR-ABL1 Mbcr (3–5). Ponadto pod auspicjami WHO został niedawno powołany panel referencyjny mający na celu ułatwioną standaryzację oceny ilościowej BCR-ABL1 (6).

Zasada Procedury



Rysunek 2. Izolacja RNA, synteza cDNA oraz qPCR.

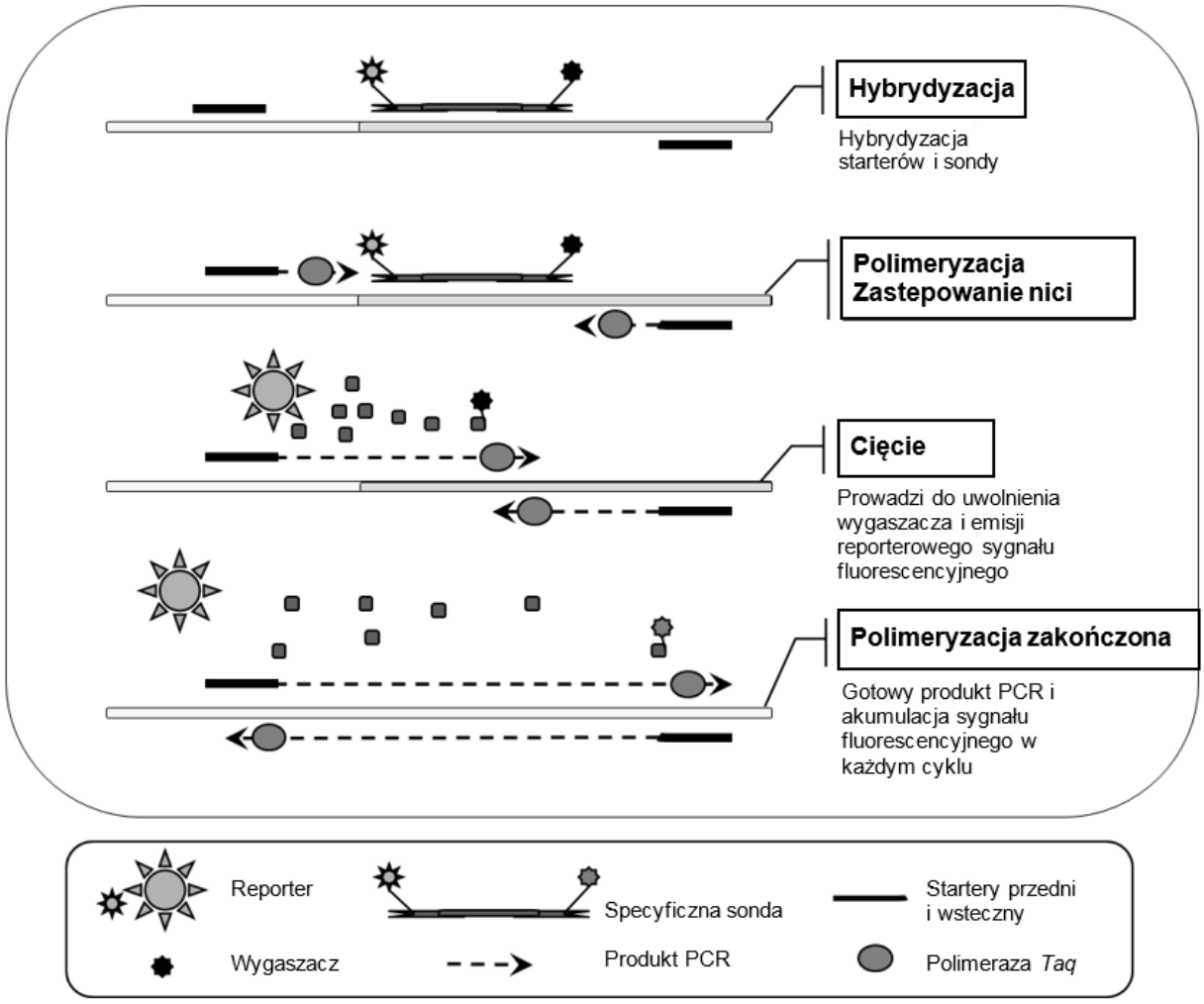
Ilościowy PCR (qPCR) pozwala na dokładną ocenę ilościową produktów podczas fazy wykładniczej amplifikacji PCR. Dane PCR mogą być wygenerowane szybko, bez potrzeby dodatkowej obróbki danych, poprzez detekcję sygnału fluorescencyjnego w czasie rzeczywistym podczas oraz/lub po etapie cykli PCR, co zasadniczo 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 hybrydyzujących.

Niniejszy zestaw wykorzystuje technologię qPCR opartą na hydrolizie oligonukleotydów znakowanych dwoma barwnikami. Podczas PCR, startery przedni oraz wsteczny hybrydyzują 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 wygaszającycm 3', hybrydyzuje do sekwencji docelowej w obrębie produktu PCR. Analiza qPCR z użyciem sond hydrolizujących wykorzystuje aktywnośc 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 specyficznie pomiędzy starterem przednim a wstecznym. Aktywność egzonukleazy 5'→3' polimerazy DNA tnie sondę pomiędzy barwnikami 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 3). 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 3. Zasada reakcji. RNA całkowite jest poddawane odwrotnej transkrypcji i generowane jest cDNA, które jest następnie amplifikowane w reakcji PCR z użyciem pary specyficznych starterów oraz specyficznej wewnętrznej podwójnie wyznakowanej sondy (FAM™–TAMRA™). Sonda przyłącza się do amplikonu na każdym etapie hybrydyzacji PCR. Gdy polimeraza *Taq* wydłuża nić 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 wygaszacz 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

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX		**(24)**
Numer kat.		**670823**
Ilość reakcji		**24**
Odczynniki do odwrotnej transkrypcji (RT)		
Reverse Transcriptase (odwr. transkryptaza)		36 µl
5x RT Buffer for reverse transcription (bufor)		180 µl
dNTP Mix* (mieszanina nukleotydów)		72 µl
Random Primer† (startery do RT)		190 µl
RNase Inhibitor (inhibitor RNaz)		18 µl
DTT‡		45 µl
Kalibracja		
High Positive RNA Control (Kontrola pozytywna RNA, wysoka)		10 µl x 3
IS-MMR Calibrator (Kalibrator)		10 µl x 3
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10^1 kopii/5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10^2 kopii/5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10^3 kopii/5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10^4 kopii/5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10^5 kopii/5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10^6 kopii/5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl

***** Deoxynukleotydy 10 mM każdy.

† Oligonukleotydy typu ‘random’ (9-mery).

‡ Ditiotreitol.

Kontynuacja tabeli

Odczynniki do qPCR		
Master Mix for qPCR (mieszanina qPCR)	qPCR Mix 2x	2 x 1275 µl
Primers and Probe Mix ABL[§] (startery i sondy)	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcr Fusion Gene[¶] (startery i sondy)	PPF-Mbcr 25x	110 µl
ROX™ I fluorescent dye for ABI PRISM instruments (barwnik ROX do ABI PRISM)	ROXI	102 µl
ROX II fluorescent dye for Applied Biosystems instruments (barwnik ROX do Applied Biosystems)	ROXII	102 µl
Nuclease-free PCR grade water (Woda do PCR wolna od nukleaz)		1400 µl
Instrukcja zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX (wersja anglojęzyczna)		1

[§] Mieszanina specyficznych starterów przednich i wstecznych dla genu kontrolnego ABL oraz specyficzna sonda FAM–TAMRA.

[¶] Mieszanina specyficznych starterów przednich i wstecznych dla genu kontrolnego BCR-ABL oraz specyficzna sonda FAM–TAMRA.

Uwaga: Przed użyciem delikatnie wymieszaj i krótko zwiruj probówki z odwrotną transkryptazą, master miksami, standardami (SP1–SP6) oraz mieszaninami starterów i sond.

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

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

- Odczynniki do izolacji RNA: Zwalidowanymi odczynnikami są RNeasy Midi Kit, QIAGEN, nr kat. 75144 lub TRIzol® Reagent, Thermo Fisher Scientific, nr kat. 15596-018 lub 15596-026
- Woda do PCR wolna od nukleaz

Materiały zużywalne

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

Sprzęt

- Pipety* dedykowane do PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wirówka stołowa* z rotorem na probówki reakcyjne 0,2 oraz 2 ml (zdolna do osiągania 10.000 rpm)
- Aparat do real-time PCR*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub inny aparat Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0, lub 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS; wraz z wymaganymi akcesoriami
- Termocykler* lub łaźnia wodna* (do etapu odwrotnej transkrypcji)

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

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, gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty dla każdego zestawu oraz poszczególnych komponentów zestawów QIAGEN®.

Usuwaj odpady próbek i analiz zgodnie z lokalnymi procedurami bezpieczeństwa.

Następujące oświadczenia dotyczące niebezpieczeństw i środków ostrożności odnoszą się do zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX:

DTT 0,1M RT

Ostrzeżenie! Powoduje podrażnienia skóry. Jeśli wystąpi podrażnienie skóry, należy poszukać pomocy medycznej.

Ostrzeżenia ogólne

Użytkowanie testów qPCR wymaga przestrzegania zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, w tym właściwego obchodzenia się i zabezpieczania sprzętu dedykowanego do biologii molekularnej oraz zgodnego z odpowiednimi przepisami i standardami.

Ten zestaw jest przeznaczony do diagnostycznego użytku in vitro. Odczynniki i instrukcje dostarczone wraz z tym zestawem zostały zwalidowane dla optymalnej wydajności. Dodatkowe rozcieńczanie odczynników lub zmiany czasów i temperatur inkubacji może skutkować błędnymi lub niespójnymi wynikami. Mieszaniny PPC i PPF mogą zostać uszkodzone pod wpływem swiatła. Wszystkie odczynniki są skomponowane specyficznie do użytku w ramach tego testu. Dla optymalnej wydajności testu nie należy zamieniać odczynników innymi spoza zestawu.

Ocena ilości transkryptów przy uzyciu qPCR wymaga odwrotnej transkrypcji mRNA i amplifikacji wygenerowanego cDNA przez PCR. W związku z tym cała procedura musi być wykonywana w warunkach wolnych od DNaz i RNaz.

Dołóż wszelkich starań aby zapobiegać:

- Kontaminacji RNazą/DNazą, co mogłoby spowodować degradację matrycowego mRNA oraz wygenerowanego cDNA
- Kontaminacji krzyżowaej 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) oraz rękawiczek.
- Używaj świeżych końcówek do pipet z filtrami do wszystkich etapów pipetowania celem uniknięcia zanieczyszczeń krzyżowych odczynników i próbek.
- Przygotowuj mieszaniny 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 (SP1–SP6) w osobnym pomieszczeniu.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikam

Zestawy są transportowane w suchym lodzie i po dostarczeniu muszą być przechowywane w –30°C do –15°C.

- Zminimalizuj dostęp swiatła do mieszanin starterów i sond (probówki PPC i PPF).
- Ostrożnie wymieszaj i zwiruj probówki prze otwarciem.
- 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 wskazujacych na brak stabilności tego produktu, jednkaże kontrole pozytywne i negatywne powinny być analizowane razem z próbkami badanymi (nieznanymi).

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Próbki krwi pełnej powinny być antykoagulowane przy uzyciu K2 EDTA i przechowywane w 2–8°C przez nie więcej niż 5 dni przed izolacją RNA.

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*, aparatu Agilent® Bioanalyzer® lub spektrofotometrii.†

Protokół: Odwrotna transkrypcja

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przygotuj nukleotydy (dNTP), każdy 10 mM. Przechowuj rozporcjowane w –20°C.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane odczynniki i umieść na lodzie.
2. Dobrze wymieszaj (nie worteksuj) i zwiruj krótko (około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki). Następnie przechowuj na lodzie.
3. Doprowadź próbki RNA do stężenia 0,1 µg/µl. Dodaj po 10 µl (1 µg) każdej z próbek RNA do osobnych i opisanych probówek. Dodaj 10 µl kontroli wysoce pozytywnej (high positive), 10 µl kalibratora (IS-MMR Calibrator) oraz 10 µl wody wolnej od nukleaz (jako kontrola negatywna RT) do osobnych i opisanych probówek i poddaj je analizie równolegle z próbkami RNA, jak opsano poniżej.
4. Inkubuj każdą próbkę, kontrole i kalibratory (10 µl każdego) przez 5 minut w 65°C, po czym natychmiast schłodź na lodzie ptrzez 5 minut.
5. Zwiruj krótko (około 10 sekund, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki) i umieść na lodzie.
6. Przygotuj następującą mieszaninę do odwrotnej transkrypcji (RT mix) odpowiednio do ilości analizowanych próbek, kontroli i kalibratora (Tabela 1).

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

† Gęstosc optyczna zmierzona przy 260 i 280 nm: OD = 1,0 przy 260 nm jest równoważne około 40 µg/ml jednoniciowego RNA. Stosunek OD_{260}/OD_{280} wynoszący 1,8 - 2,1 wskazuje na RNA o wysokiej czystości.

Tabela 1. Przygotowanie mieszaniny RT (do odwrotnej transkrypcji)

Składowa	Objętość na próbkę (µl)	Stężenie końcowe
RT Buffer, 5x (dostarczony z odwrotną transkryptazą)	5,0	1x
dNTPs (10 mM każdego, do wcześniejszego przygotowania, rozporcjowania i przechowywania w –20°C)	2,0	0,8 mM
Random nonamer (startery do odwrotnej transkrypcji; 100 µM)	5,25	21 µM
RNase Inhibitor (inhibitor RNaz; 40 U/µl)	0,5	0,8 U/µl
Reverse Transcriptase (odwrotna transkryptaza; 200 U/µl)	1,0	8 U/µl
DTT (dostarczony z odwrotną transkryptazą)	1,25	–
Podgrzana próbka RNA, kontrola lub IS-MMR Calibrator (do dodania w kroku 7)	10,0	40 ng/µl
Objętość końcowa	**25,0**	**–**

7. Dodaj 15 µl mieszaniny RT do każdej probówki PCR. Następnie dodaj 10 µl (1 µg) próbki RNA, kontroli lub kalibratora (z kroku 4).
8. Dobrze wymieszaj (nie worteksuj) i krótko zwiruj (około 10 sekund, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).
9. W termocyklerze zaprogramuj program do odwrotnej transkrypcji zgodnie z zaleceniami w Tabeli 2.

Tabela 2. Profil temperaturowy RT

Odwrotna transkrypcja 1	Temperatura: 25°C Czas: 10 min
Odwrotna transkrypcja 2	Temperatura: 50°C Czas: 60 min
Inaktywacja	Temperatura: 85°C Czas: 5 min
Chłodzenie	Temperatura: 4°C Czas: 5 min

10. Umieść probówki w termocyklerze i rozpocznij program do odwrotnej transkrypcji zgodnie z Tabelą 2.
11. Po zakończeniu programu, zwiruj próbki przez około 10 sekund w 10.000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówek. Do czasu analizy qPCR trzymaj próbki na lodzie lub w –20°C, zgodnie z kolejnymi protokołami i wymogami Twojego aparatu qPCR.

    Uwaga: W przypadku aparatów LightCycler 1.2, 1.5 oraz 2.0, każda praparatyka odwrotnej transkrypcji zapewnia cDNA na dwie analizy.

Protokół: qPCR na aparacie Rotor Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem 72-probówkowym

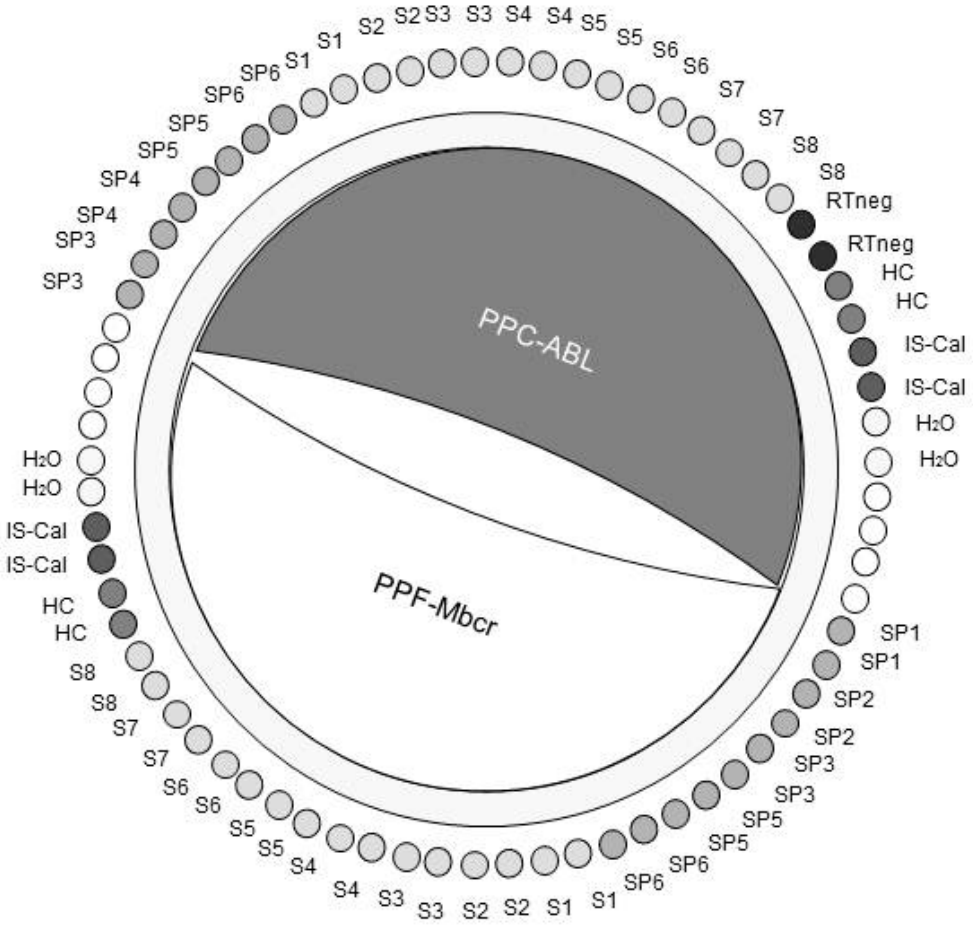
Używając tego aparatu zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach, jak pokazano w Tabeli 3. Ten zestaw jest zaprojektowany do analizy ośmiu różnych próbek cDNA w tym samym eksperymencie, dla trzech osobnych eksperymentów.

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

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL) (32 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 cDNA high positive control	2 reakcje
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Single plasmid standards (Standardy pojedynczych plazmidów)	2 x 4 reakcje (SP3, SP4, SP5 i SP6, każda testowana w duplikacie)
RT negative control (kontr. negatywna)	2 reakcje
Kontrola z wodą	2 reakcje
Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr) (32 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 cDNA high positive control	2 reakcje
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Standardy pojedynczych plazmidów	2 x 5 reakcji (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6, każda testowana 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. Schemat rotora na Rysunku 4 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Rysunek 4. Sugerowane rozmieszczenie próbek na rotorze dla każdego eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX. **SP1–SP6:** standardy BCR-ABL Mbcr oraz ABL; **HC**: High cDNA positive control (kontrola wysoce pozytywna); **IS-Cal:** IS-MMR calibrator; **RTneg:** kontrola negatywna odwr. transkrypcji; **S:** próbka cDNA; **H_2O:** kontrola z wodą.

Uwaga: Zawsze umieszczaj w pozycji 1 rotora próbkę badaną, gdyż w przciwnym 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 na lodzie.
2. Zworteksuj probówki ze standardami, PPF-Mbcr oraz PPC-ABL i zwiruj krótko (około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).

3. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR odpowiednio do ilości analizowanych próbek.

   Podane stężenia dotyczą końcowej objętości reakcji.

   Tabela 4 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 kompensujace błędy pipetowania zostały uwzględnione.

Tabela 4. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR

Składowa	1 reakcja (µl)	ABL: 32+1 reakcje (µl)	BCR-ABL mbcr: 32+1 reakcje (µl)	Stężenie końcowe
qPCR Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers and probe mix, 25x	1	33	33	1x
Woda wolna od nukleaz	6,5	214,5	214,5	–
Próbka (do dodania w kroku 5)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość końcowa	**25**	**25 każda**	**25 każda**	**–**

4. Rozdozuj po 20 µl mieszaniny (pre-mix) qPCR do probówek.
5. Dodaj 5 µl produktu RT (cDNA, ekwiwalent 200 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz ‘Protokół: Odwrotna Transkrypcja’, strona 15) do odpowiedniej probówki (objętość całkowita 25 µl).
6. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
7. Umieść próbki w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
8. Zaprogramuj aparat Rotor-Gene Q zgodnie z programem podanym w Tabeli 5.

Tabela 5. Profil temperaturowy

Typ analizy	Quantitation
Inkubacja 1 (Hold 1)	Temperatura: 95ºC Czas: 10 s
Cykle	50 razy 95ºC przez 5 s 60ºC przez 30 s z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM w pojedynczym kanale zielonym (channel Green: Single)
Inkubacja 2 (Hold 2)	Temperatura: 36ºC Czas: 1 min

9. Wybierz ‘Gain Optimisation’ w oknie przewodnika ‘New Run Wizard’ – otworzy się okno ‘Auto-Gain Optimisation Setup’. Wybierz ‘Optimise acquiring’ i w kolejnym oknie ustaw dla kanału Green zakres ‘Target sample range’ od ‘5 FI’ do ‘10 FI’ oraz ‘Acceptable gain range’ na –10 do 10. Potwierdź klikając ‘OK’.
10. Zaznacz pole ‘Perform Optimisation Before 1st Acquisition’ i zamknij okno ‘Auto-Gain Optimisation Setup’ klikając ‘Close’.
11. Rozpocznij pracę aparatu wybierając ‘Start’ (w kolejnym oknie ‘New Run Wizard’).
12. Podczas analizy wybierz opcję ‘Slope Correct’. Zalecamy ustawienie wartości progu odcięcia (threshold) na 0,03.

Protokół: qPCR na aparatach Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS oraz LightCycler 480

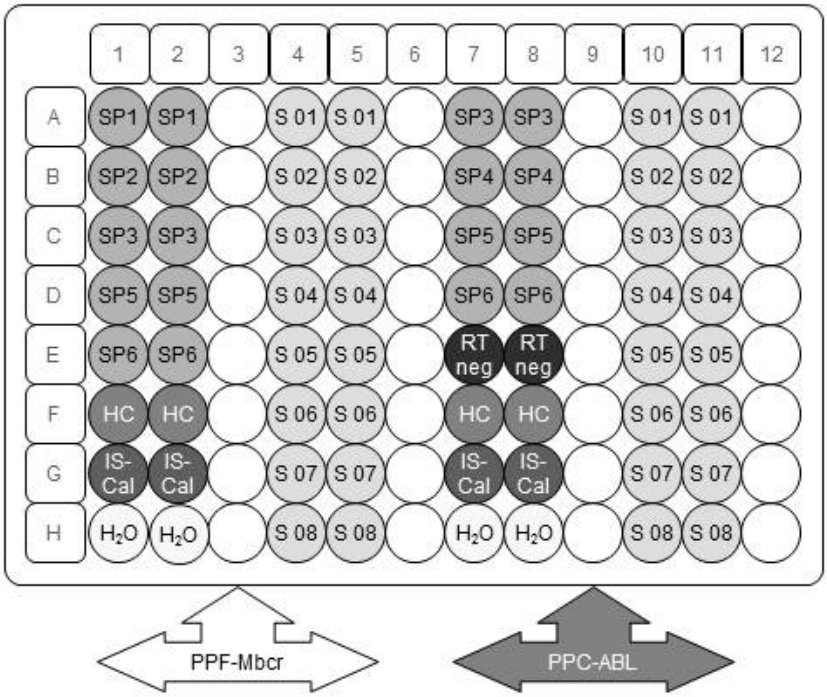
Używając sprzętu qPCR o formacie 96-dołkowym, zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach, jak pokazano w Tabeli 6. Ten zestaw jest zaprojektowany do analizy ośmiu różnych próbek cDNA w tym samym eksperymencie, dla trzech osobnych eksperymentów.

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

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL) (32 reakacje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 cDNA high positive control	2 reakcje
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Single plasmid standards (Standardy pojedynczych plazmidów)	2 x 4 reakcje (SP3, SP4, SP5 i SP6, każda testowana w duplikacie)
RT negative control (kontr. negatywna)	2 reakcje
Kontrola z wodą	2 reakcje
Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr) (32 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 cDNA high positive control	2 reakcje
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Single plasmid standards (Standardy pojedynczych plazmidów)	2 x 5 reakcji (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6, każda testowana w duplikacie)
Kontrola z wodą	2 reakcje

Analiza próbek na aparatach Applied Biosystems, ABI PRISM 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 5 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Rysunek 5. Sugerowany układ płytki dla jednego eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX. **SP1–SP6:** standardy BCR-ABL Mbcr i ABL; **HC:** High cDNA positive control (kontrola wysoce pozytywna); **IS-Cal:** IS-MMR calibrator; **RTneg:** kontrola negatywna odwr. transkrypcji; **S:** próbka cDNA; **H_2O:** kontrola z wodą

qPCR na aparatach Applied Biosystems, ABI PRISM lub LightCycler 480

Uwaga: Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane komponenty i umieść na lodzie.
2. Zworteksuj probówki ze standardami, PPF-Mbcr oraz PPC-ABL i zwiruj krótko (około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).
3. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR odpowiednio do ilości analizowanych próbek. Używając aparatów qPCR o formacie 96-dołkowym, zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach.

   Wszystkie stężenia dotyczą końcowych objętości reakcji.

   Tabela 7 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszaniny odczynnikowej dla aparatów Applied Biosystems i ABI PRISM, obliczonej do otrzymania końcowej objętości reakcji 25 µl. Tabela 8 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszaniny odczynnikowej dla aparatów LightCycler 480 instrument, 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 dla aparatów Applied Biosystems i ABI PRISM

Składowa	1 reakcja (µl)	ABL: 32+1 reakcje (µl)	BCR-ABL mbcr: 32+1 reakcje (µl)	Stężenie końcowe
qPCR Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers and probe mix, 25x	1	33	33	1x
Barwnik ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) lub barwnik ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Woda wolna od nukleaz	6	198	198	–
próbka (do dodania w kroku 5)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość końcowa	25	25 każda	25 każda	–

Tabela 8. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR dla aparatów LightCycler 480

Składowa	1 reakcja (µl)	ABL: 32+1 reakcje (µl)	BCR-ABL mbcr: 32+1 reakcje (µl)	Stężenie końcowe
qPCR Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers and probe mix, 25x	1	33	33	1x
Woda wolna od nukleaz	6,5	214,5	214,5	–
próbka (do dodania w kroku 5)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość końcowa	25	25 każda	25 każda	–

4. Rozdozuj po 20 µl mieszaniny (pre-mix) qPCR do dołków.
5. Dodaj 5 µl produktu RT (cDNA, ekwiwalent 200 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz ‘Protokół: Odwrotna transkrypcja’, strona 15) do odpowiedniego dołka (objętość całkowita 25 µl).
6. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
7. Zamknij płytkę i krótko zwiruj (300 x *g*, około 10 s).
8. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta. Zaprogramuj aparat zgodnie z programem podanym w Tabeli 9 dla aparatów Applied Biosystems oraz ABI PRISM lub w Tabeli 10 dla aparatu LightCycler 480.

Tabela 8. Profil temperaturowy dla aparatów Applied Biosystems oraz ABI PRISM

Typ analizy	**Standard Curve — Absolute Quantitation**
Inkubacja 1 (hold 1)	Temperatura: 95°C Czas: 10 s
Cykle	50 razy 95°C przez 5 s 60°C przez 30 s z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM: Single; wygaszacz: TAMRA
Inkubacja 2 (Hold 2)	Temperatura: 36°C Czas: 1 min

Tabela 10. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 480

Typ analizy	Absolute Quantification (“Abs Quant”)
Detection formats (formaty detekcji)	Wybierz ‘Simple Probe’ w oknie ‘Detection formats’
Inkubacja 1 (Hold 1)	Temperatura: 95°C Czas: 10 s
Cykle	50 razy 95°C przez 5 s 60°C przez 30 s z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM, co koresponduje z (483–533 nm) dla LC wersja 01 oraz (465–510 nm) dla LC wersja 02
Inkubacja 2 (Hold 2)	Temperatura: 36°C Czas: 1 min

9. Dla aparatów Applied Biosystems 7500 oraz ABI PRISM 7900HT SDS, przejdź do kroku 9a. Dla aparatu LightCycler 480 przejdź do kroku 9b.

9a. Applied Biosystems oraz ABI PRISM: Podczas analizy zalecamy ustawienie progu odcięcia (threshold) na 0,1. Rozpocznij program zgodny z Tabelą 9.

9b. LightCycler 480: Podczas analizy zalecamy tryb ‘Fit point analysis mode’ z wartością tła 2,0 i progu odcięcia (threshold) 2,0. Rozpocznij program zgodny z Tabelą 10.

Protokół: qPCR na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0

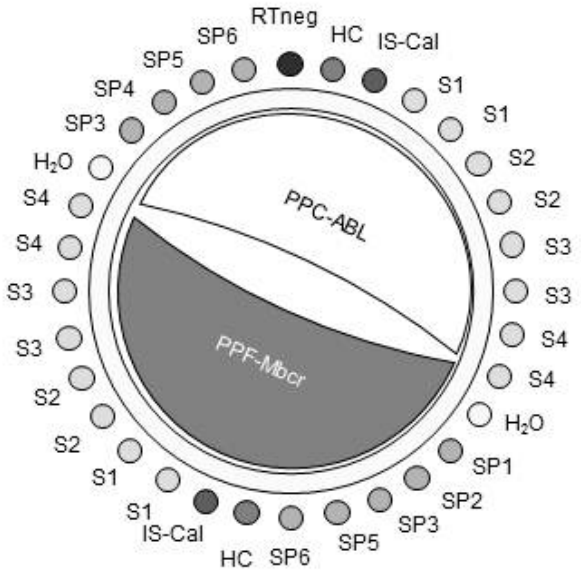
Używając aparatów kapilarnych, zalecamy wykonanie pomiarów próbek w duplikatach, natomiast kontroli pojedynczo, jak pokazano w Tabeli 11. Ten zestaw jest zaprojektowany do analizy czterech różnych próbek cDNA w tym samym eksperymencie, dla sześciu osobnych eksperymentów.

Tabela 11. **Ilość reakcji z użyciem aparatów LightCycler 1.2 oraz 2.0**

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL) (16 reakcji)	
4 próbki cDNA	4 x 2 reakcje
1 cDNA high positive control	1 reakcja
1 cDNA IS-MMR Calibrator	1 reakcja
Single plasmid standards (Standardy pojedynczych plazmidów)	1 x 4 reakcje (SP3, SP4, SP5 i SP6)
RT negative control (kontr. negatywna)	1 reakcja
Kontrola z wodą	1 reakcja
Z mieszaniną starterów i sond BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr) (16 reakcji)	
4 próbki cDNA	4 x 2 reakcje
1 cDNA high positive control	1 reakcja
1 cDNA IS-MMR Calibrator	1 reakcja
Single plasmid standards (Standardy pojedynczych plazmidów)	1 x 5 reakcji (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6)
Kontrola z wodą	1 reakcja

Analiza próbek na aparatach LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz mieszanin starterów i sond, zalecamy testowanie przynajmniej 4 próbek cDNA w tym samym eksperymencie. Schemat kapilar pokazany na Rysunku 6 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Rysunek 6. Sugerowany układ rotora dla jednego eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX. **SP1–SP6:** standardy BCR-ABL Mbcr i ABL; **HC:** High cDNA positive control (kontrola wysoce poytywna); **IS-Cal:** IS-MMR calibrator; **RTneg:** kontrola negatywna odwr. transkrypcji; **S:** próbka cDNA; **H_2O:** kontrola z wodą.

qPCR na aparatach LightCycler 1.2 oraz 2.0

Uwaga: Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane komponenty i umieść na lodzie.
2. Zworteksuj probówki ze standardami, PPF-Mbcr oraz PPC-ABL i zwiruj krótko (około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).
3. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR odpowiednio do ilości analizowanych próbek.

   Wszystkie stężenia dotyczą końcowych objętości reakcji.

   Tabela 12 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 12. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR dla aparatów LightCycler 1.2, 1.5 oraz 2.0

Składowa	1 reakcja (µl)	ABL: 16+1 reakcji (µl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reakcji (µl)	Stężenie końcowe
qPCR Mix, 2x	10	170	170	1x
Primers and probe mix, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Woda do PCR wolna od nukleaz	4,2	71,4	71,4	–
Próbka (do dodania w kroku 5)	5	5 każda	5 każda	–
Objętość całkowita	**20**	**20 każda**	**20 każda**	**–**

4. Rozdozuj po 15 µl mieszaniny (pre-mix) qPCR do każdej z kapilar.
5. Dodaj 5 µl produktu RT (cDNA, ekwiwalent 200 ng RNA) otrzymanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz ‘Protokół: Odwrotna transkrypcja', strona 15) do odpowiedniej kapilary (objętość całkowita 20 µl).
6. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
7. Umieść kapilary w adapterach dostarczonych i zwiruj krótko (około 10 s, 700 x *g*,).
8. Umieść kapilary w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
9. Zaprogramuj aparat LightCycler 1.2, 1.5 lub 2.0 zgodnie z programem przedstawionym w Tabeli 13.

Tabela 13. Profil temperaturowy

Typ analizy	Quantification
Inkubacja 1 (Hold 1)	Temperatura: 95°C Czas: 10 s Ramp: 20
Cykle	50 razy 95°C przez 5 s; ramp: 20 60°C przez 30 s; ramp: 20; z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM: Single
Inkubacja 2 (Hold 2)	Temperatura: 36°C Czas: 1 min Ramp: 20

10. Dla LightCycler 1.2 oraz 1.5, przejdź do kroku 10a. Dla LightCycler 2.0, przejdź do kroku 10b.

10a. LightCycler 1.2 oraz 1.5: Rekomendowanym typem analizy jest F1/F2 oraz '2nd derivative analysis' (analiza drugiej pochodnej). Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 13.

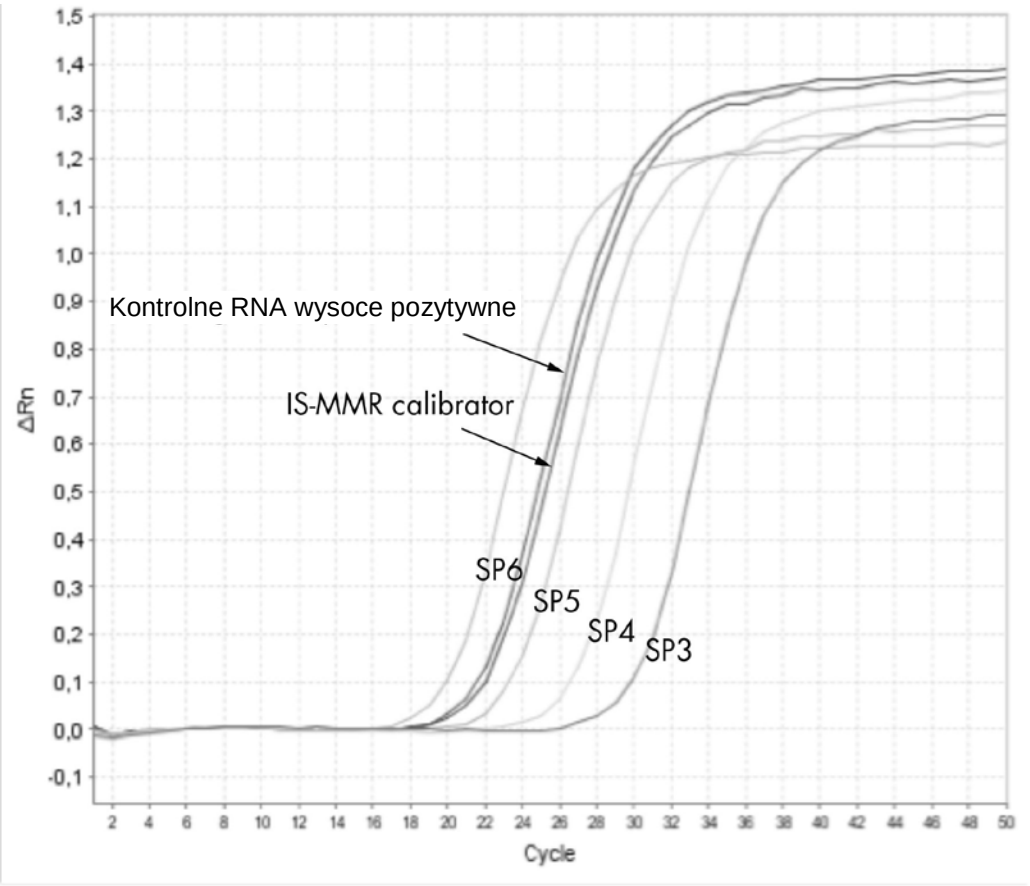
10b. LightCycler 2.0: Zalecamy stosowanie analizy automatycznej - Automated (F''max) z oprogramowaniem LightCycler 2.0 Software wersja 4.0. Rozpocznij program zgodny z wytycznymi w Tabeli 13.

Interpretacja wyników

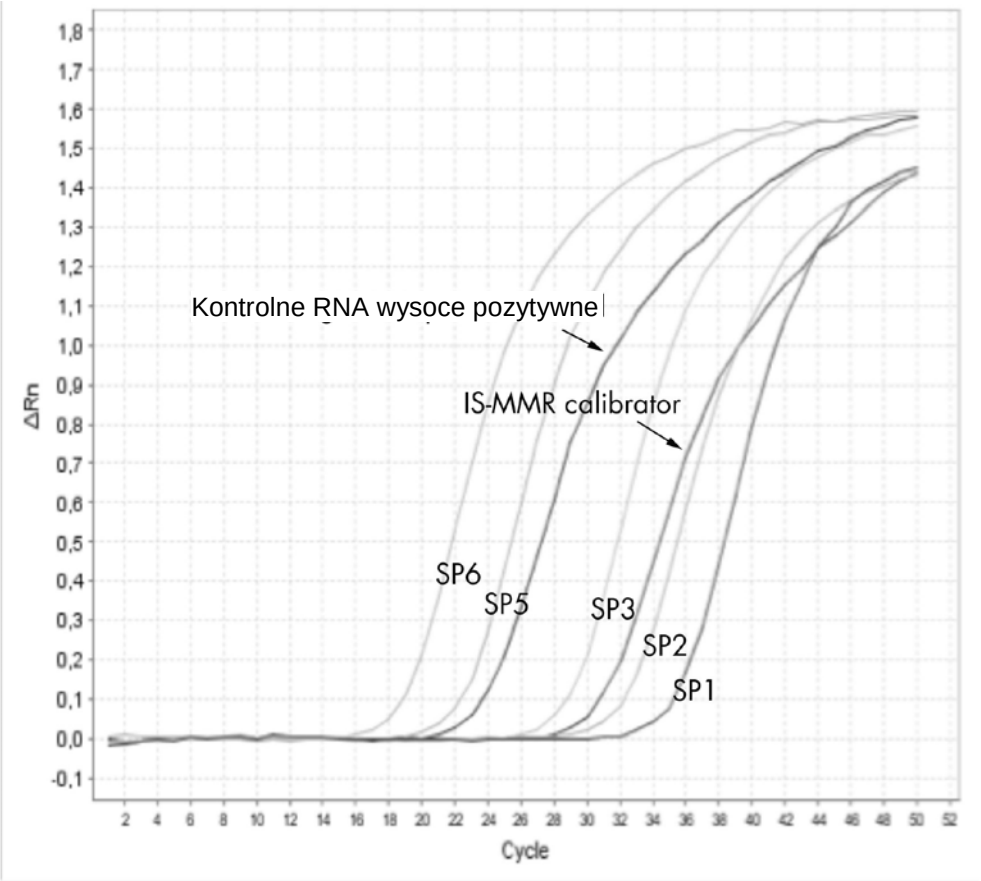
Zasada analizy danych

Używając technologii TaqMan, ilość cykli PCR potrzebnych do wykrycia sygnału powyżej progu odcięcia (threshold) 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 czterech rozcieńczeń standardów dla ABL oraz pięciu rozcieńczeń standardów dla Mbcr. Zestaw zawiera również kalibrator IS-MMR pozwalający na konwersję wyników na skalę międzynarodową (IS). Rysunki 7 i 8 przedstawiają przykładowe krzywe amplifikacji TaqMan, podobne do tych dla kalibratora IS-MMR i wysoce poytywnej kontroli RNA dla zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX.



Rysunek 7. Detekcja ABL ze standardami SP3, SP4, SP5 i SP6. 10^3, 10^4, 10^5 i 10^6 kopii/5 µl.



Rysunek 8. Detekcja BCR-ABL ze standardami SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6. 10^1, 10^2, 10^3, 10^5, 10^6 kopii/5 µl.

Krzywe standardowe i kryteria jakości dla danych surowych

Odtwarzalność pomiędzy replikatami

Zmienność wartości C_T pomiędzy replikatami powinna być <2, co koresponduje z 4-krotną zmianą liczby kopii.

Zmienność wartości C_T pomiędzy replikatami jest zasadniczo <1,5 jeśli średnia wartość C_T replikatów <36 (7).

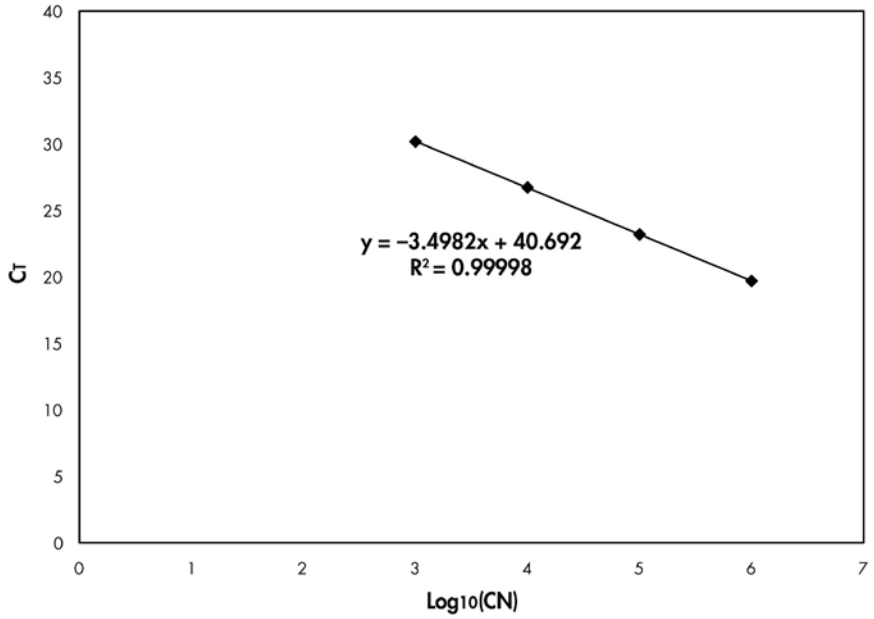
Uwaga: Każdy użytkownik powinien sprawdzić odtwarzalność w swoim własnym laboratorium.

Krzywe standardowe

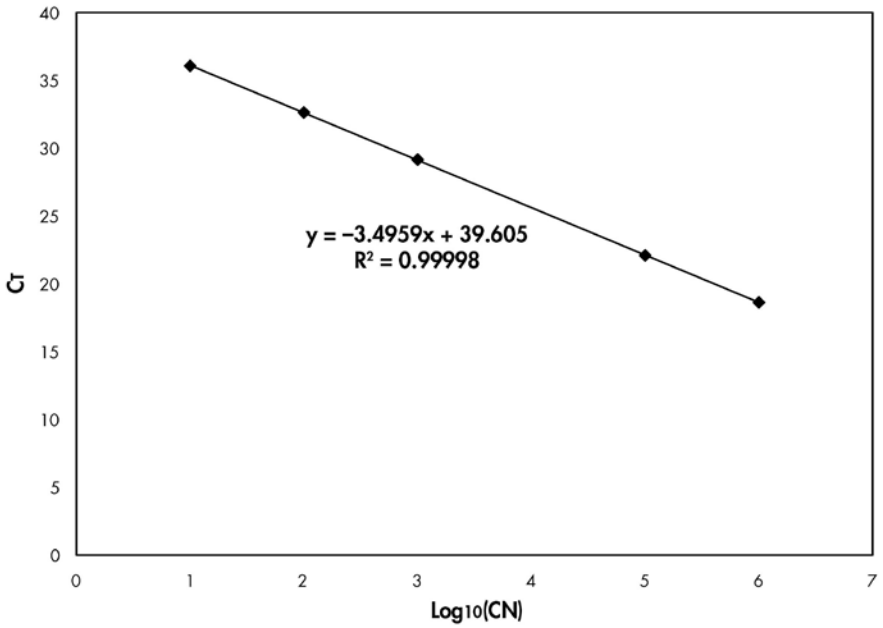
Surowe (raw) dane mogą zostać wklejone do programu Excel® celem analizy.

Dla każdego genu (ABL oraz BCR-ABL), surowe wartości C_T otrzymane z rozcieńczeń standardów plazmidowych są naniesione na wykres zgodnie z ilością kopii w skali logarytmicznej (3, 4, 5 i 6 dla SP3, SP4, SP5 i SP6; 1, 2, 3, 5 i 6 dla SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6). Rysunek 9 przedstawia przykład teoretycznej krzywej dla ABL obliczonej na podstawie 4 rozcieńczeń

standardów. Rysunek 10 przedstawia przykład teoretycznej krzywej dla BCR-ABL Mbcr obliczonej na podstawie 5 rozcieńczeń standardów.



Rysunek 9. Teoretyczna krzywa dla ABL obliczona na podstawie 4 rozcieńczeń standardów. Obliczona regresja liniowa krzywej (y = ax + b), gdzie ‘a’ jest nachyleniem krzywej, ‘b’ jest punktem przecięcia krzywej z osią Y. Wzór wraz ze współczynnikiem determinacji (R^2) są przedstawione na wykresie.



Rysunek 9. Teoretyczna krzywa dla BCR-ABL obliczona na podstawie 5 rozcieńczeń standardów. Regresja liniowa krzywej (y = ax + b) jest obliczona 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 (7). Niemniej jednak, dla precyzyjnych wyliczeń, pożądana jest wartość R^2 >0,98 (3).

Uwaga: Rozcieńczenie standardu SP1 (plazmid BCR-ABL, 10 kopii) musi zostać wykryty i uwzględniony w krzywej standardowej dla BCR-ABL.

Kontrola jakości dla wszystkich wartości ABL

Niska jakość RNA lub problemy podczas qPCR prowadzą do niskiej ilości kopii ABL (ang. ABL copy numer; ABL_{CN}). Optymalna czułość jest osiągana dla próbek dających ABL_{CN} ≥10.000 kopii. To kryterium dla ABL_{CN} ma zastosowanie również dla wysoce poztytwnej kontroli RNA oraz kalibratora IS-MMR.

Kontrole negatywne RT i z wodą

Kontrole bez matrycy (NTC) na etapie PCR (kontrola z wodą) oraz kontrola odwrotnej transkrypcji (kontrola negatywna RT) powinny dać zerowe CN dla ABL oraz BCR-ABL Mbcr. Wynik pozytywny dla tych kontroli NTC wskazuje na zanieczyszczenie krzyżowe podczas odwrotnej transkrypcji oraz/lub qPCR.

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 nieznanych, 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 nieznanych, na liczbę kopii BCR-ABL (BCR-ABL $mbcr_{CN}$).

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

$$NCN = \frac{\text{BCR-ABL Mbcr}_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Oblicz wynik NCN wysoce pozytywnej kontroli RNA (NCN_{HC}), kalibratora IS-MMR (NCN_{cal}) oraz każdej próbki ($NCN_{próbki}$).

Wysoce pozytywna kontrola RNA oraz kalibrator IS-MMR

Kontrole te pozwalają na monitorowanie etapów odwrotnej tranckrypcji oraz amplifikacji dla ABL oraz BCR-ABL Mbcr podczas oceny ilościowej transkryptów.

Kontrola jakości wyników dla NCN_{cal}

Uwaga: Wynik dla NCN uzyskany dla IS-MMR-Calibrator, testowany zetsawem *ipsogen* BCR-ABL Mbcr IS-MMR DX w połączeniu ze zwalidowanymi odczynnikami i urządzeniami (patrz ‘Materiały Dostarczone’,

strona 10 oraz ‘Materiały Wymagane, ale Niedostarczone’, strona 12) musi być w przedziale 0,05–0,3. W przeciwnym razie wartości NCN nie mogą być przeliczone na sklalę międzynarodową (IS). Ponadto, wyniki całego eksperymentu musza zostać odrzucone w przypadku braku wykrycia kontroli wysoce pozytywnego RNA.

Konswersja IS i raportowanie MMR

Uwaga: Przed przystąpieniem do interpretacji należy odnieść się do wartości oznaczonej na etykiecie probówki IS-MMR Calibrator lub do certyfikatu analizy dostarczonego z zestawem.

Aby obliczyć znormailizowaną liczbę kopii w skali międzynarodowej ($IS\text{-}NCN_{próbki}$) użyj eksperymentalnego wyniku dla IS-MMR Calibrator NCN (NCN_{cal}) oraz przypisanej mu wartości (wartość IS-Cal) oznaczonej na certyfikacie analizy.

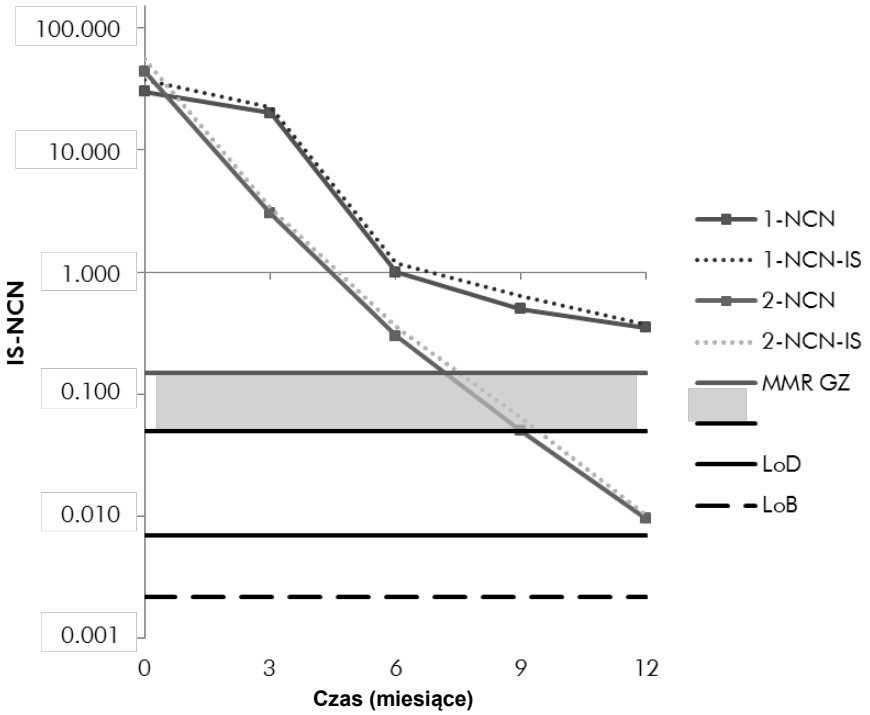
$$IS\text{-}NCN_{próbki} = \frac{NCN_{próbki} \text{ x wartość IS-Cal}}{NCN_{cal}}$$

Ustal status MMR dla każdej próbki zgodnie z następującymi kryteriami.

- $IS\text{-}NCN_{próbki} \leq 0{,}05$: MMR (Większa Odpowiedź Molekularna)
- $0{,}05 < IS\text{-}NCN_{próbki} < 0{,}15$: Szara strefa (GZ) w pobliżu wartości odcięcia dla MMR, wynik niejasny.
- $IS\text{-}NCN_{próbki} \geq 0{,}15$: Brak MMR (brak Większej Odpowiedzi Molekularnej)

Wynik $IS\text{-}NCN_{HC}$ (NCN na skali międzynarodowej dla wysoce pozytywnej kontroli RNA) powinien być MMR-negatywny.

Rysunek 11 pokazuje przykład monitorowania pacjenta przy użyciu wyników NCN oraz IS-NCN.



Rysunek 11. Krzywe monitorowania statusu MMR pacjenta z użyciem zetawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX. NCN: znormalizowana liczba kopii; **NCN-IS:** znormalizowana liczba kopii w skali międzynarodowej; **MMR GZ:** MMR szara strefa (GZ) wynik niejasny; **LoD:** limit detekcji; **LoB:** poziom tła.

Podsumowanie kryteriów jakości

Tabela 14 podsumowuje rozmaite kryteria jakości wraz z powiązanymi wynikami i wartościami.

Tabela 14. Podsumowanie kryteriów jakości

Kryteria	Akceptowalne wartości/wyniki
Zmienność C_T dla replikatów	≤2 C_T jeśli średnie C_T >36 ≤1,5 C_T jeśli średnie C_T ≤36
Nachylenie krzywej dla standardów	Pomiędzy –3,0 a –3,9
R^2 dla krzywych standardowych	Przynajmniej >0,95, ale lepiej >0,98
Rozcieńczenie standardu SP1 (BCR-ABL 10 kopii plazmidu)	Musi być wykryty i uwzględniony w krzywej standardowej
Kontrola jakości dla wartości ABL_{CN} próbek pacjentów, wysoce pozytywnej kontroli RNA oraz IS-MMR-Calibrator	ABL_{CN} >10.000 kopii ABL do uzyskania optymalnej czułości
Kontrole PCR (woda) i odwrotnej transkrypcji (RT negatywna)	Dla każdego ABL_{CN} = 0 oraz $Mbcr_{CN}$ = 0
NCN uzyskane dla IS-MMR Calibrator (NCN_{cal})	Musi być w przedziale 0,05–0,3
Wysoce pozytywna kontrola RNA	Musi zostać wykryta
NCN uzyskane dla wysoce pozytywnej kontroli RNA przeliczonej na skalę międzynarodową (IS-NCN_{HC})	Status: Brak MMR (brak Większej Odpowiedzi Molekularnej)

Rozwiązywanie problemów

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. 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).

Kontrola Jakości

Celem zapewnienia stałej jakości produktu, każda partia zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX jest testowana względem predeterminowanych specyfikacji zgodnie z Systemem Zarządzania Jakością potwierdzonym

certyfikatem ISO firmy QIAGEN. Certyfikaty analizy są dostępne na żądanie pod adresem 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) (8, 9) i jest zgodny z bieżącymi zaleceniami międzynarodowymi. Zestaw zawiera IS-MMR Calibrator, wystandaryzowany względem sklai międzynarodowej, co pozwala na konwersję wyników NCN na skalę międzynarodową i raportowanie statusu MMR (wieksza odpowiedź molekularna).

Każda partia IS-MMR Calibrator ma przypisaną wartość wynikającą bezpośrednio z kalibracji względem certyfikowanego materiału referencyjnego NIBSC WHO (Międzynarodowy Genetyczny Panel Referencyjny dla oceny ilościowej translokacji BCR-ABL przy pomocy RQ-PCR; ang. International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138).

Certyfikat analizy określający właściwą wartość dla IS-MMR Calibrator jest zawarty w każdym zestawie.

Zestaw powinien być używany zgodnie z zawartymi w nim instrukcjami w połączeniu ze zwalidowanymi odczynnikami i aparaturą (patrz ‘Materiały Wymagane, ale Niedostarczone’, strona 12). Każde użycie tego produktu niezgodne z wytycznymi oraz/lub modyfikacje jego komponentów unieważnią odpowiedzialność QIAGEN.

Charakterystyki Wydajności

Uwaga: Ocena wydajności została wykonana na aparacie Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR połączeniu z zestawem *ipsogen* BCR-ABL Mbcr IS-MMR i zwalidowanymi odczynnikami dodatkowymi (patrz ‘Materiały Wymagane, ale Niedostarczone’, strona 12).

Limit próby ślepej i limit detekcji

Limit próby ślepej (ang. Limit of Blank; LoB) oraz limit detekcji (ang. Limit of detection; LoD) zostały ustalone zgodnie z wytycznymi CLSI/NCCLS EP17-A.

Poziom tła (LoB) został ustalony na podstawie próbek negatywnych pozyskanych od zdrowych dawców (11 próbek, 69 pomiarów) i wyniósł 0,0022 BCR-ABL Mbcr NCN.

Limit detekcji (LoD lub czułość analityczna) został ustalony na podstawie próbek pozytywnych (n = 8, 74 pomiary) i wyniósł 0,0069 BCR-ABL Mbcr NCN.

- NCN ≤LoB: BCR-ABL Mbcr nie wykryte
- LoB <NCN <LoD: BCR-ABL Mbcr wykryte, ale bez oceny ilościowej
- NCN ≥LoD: BCR-ABL Mbcr wykryty z oceną ilościową

Liniowość

Liniowość została ustalona zgodnie z zaleceniami CLSI/NCCLS EP6-A.

Badanie zostało wykonane na mieszaninach z pozytywnym i negatywnym RNA wyizolowanym z linii komórkowych. Przetestowanych zostało 11 różnych poziomów (ilości), każde w trzech powtórzeniach. Wyniki uzyskane na podstawie tych próbek pokazują, że test *ipsogen* BCR-ABL Mbcr IS-MMR zachowuje liniowośc w zakresie 0,003 do 65 BCR-ABL Mbcr NCN.

Ilości wejściowe

Do badania wybranych zostało pięć różnych próbek RNA z różnymi poziomami NCN BCR-ABL Mbcr. Celem oceny wpływu ilości wejściowej na wyniki NCN, testowane były różne ilości RNA i cDNA. Wyniki wykazały ograniczony wpływ zmiennych ilości wejściowych RNA na wyniki NCN, podczas gdy ilości wejściowe cDNA okazały się mieć bardziej znaczący wpływ na wynik. W konsekwencji, do przeprowadzenia testu rekomenduje się ilość wejściową 1 µg RNA oraz 5 µl cDNA.

Precyzja

Precyzja została określona zgodnie z zaleceniami CLSI/NCCLS EP5-A2.

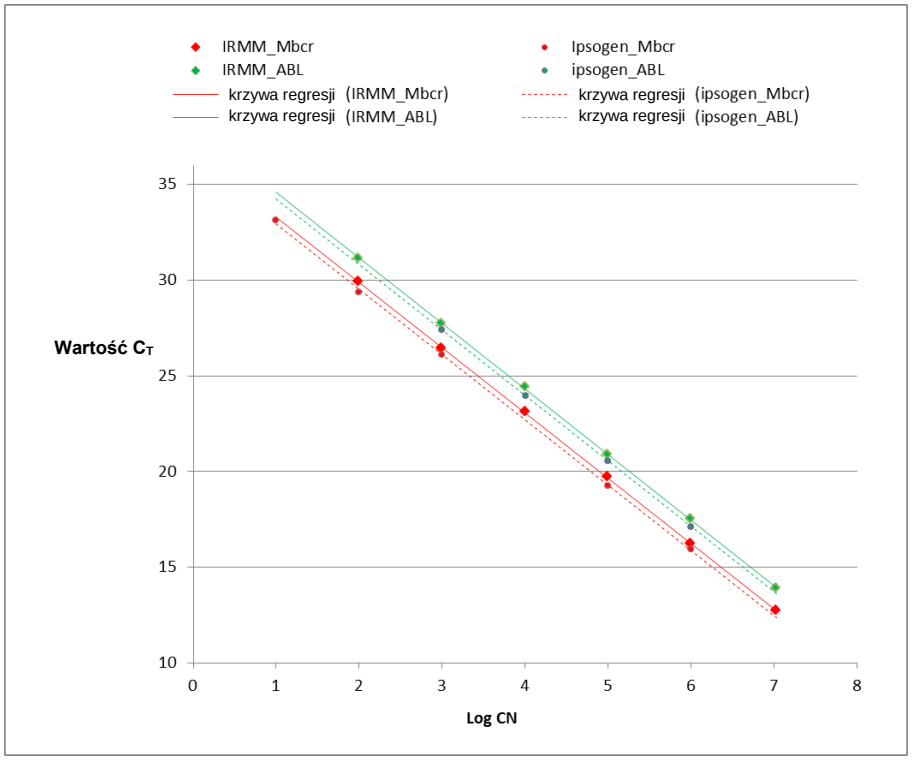
Badanie precyzji zostało wykonane na 13 różnych próbkach testowanych 42 razy w duplikatach (n = 84). Próbki te były reprezentatywne dla różnych poziomów ekspresji BCR-ABL Mbcr w próbkach pacjentów z wartościami zbliżonymi i większymi od MMR. Całkowite względne odchylenie standardowe w okolicach wartości MMR zostało ustalone na 25%.

Badanie zgodności: standardy ERM-AD623 BCR-ABL1 dla pojedynczego plazmidu (IRMM) versus *ipsogen* dla pojedynczego plazmidu (QIAGEN)

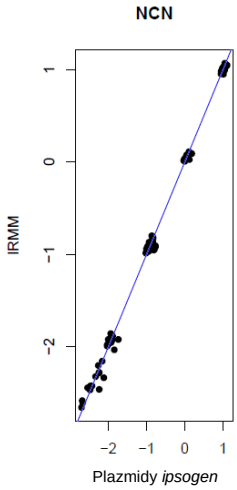
Najnowsze robocze definicje odpowiedzi molekularnej dla BCR-ABL1 Mbcr w CML są podawane przez ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, rekomendującą użycie plazmidu ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Belgia): Cross, N.C., et al. 'Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia' (2015) Leukemia. 29, 999.

Celem osiągnięcia zgodności z tymi zaleceniami, QIAGEN przeprowadził testy zgodności porównujące wielomatrycowy pojedynczy plazmid *ipsogen* używany w zestawie *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR (24) CE (nr kat. 670723) do polazmidu ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

Porównainie było oparte na stosunku NCN dla BCR-ABL1 Mbcr/ABL1, gdzie oceniano rozcieńczenia dla obu standardów (*ipsogen* or ERM-AD623 BCR-ABL1) w próbkach kontrolnych zawartych w zestawach *ipsogen* oraz na certyfikowanych materiałach referencyjnych z NIBSC; White, H.E., et al. (2010) 'Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA'. Blood 116, e111.



Rysunek 12. Krzywe standardowe plazmidów dla *ipsogen* oraz ERM-AD623 BCR-ABL1 pokrywają się ze sobą.



Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR

Rysunek 13. Wartości NCN dla ERM-AD623 BCR-ABL1 versus *ipsogen*.

Badania QIAGEN potwierdzają brak statystycznej różnicy: standardy pojedynczych plazmidów dla ERM-AD623 BCR-ABL1 oraz *ipsogen* dają równoważne wyniki.

Literatura

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

Symbole

Następujące symbole mogą się pojawić na opakowaniach i etykietach:

	Zawiera odczynniki wystarczające na <N> reakcji
	Użyj do
	Do diagnostycznego użytku medycznego in vitro
	Numer katalogowy
	Numer partii (lot)
	Numner materiału
	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** lub zadzwoń na 00800-22-44-6000 lub do kontaktu z jednym z wydziałów pomocy technicznej QIAGEN lub z lokalnym dystrybutorem lub odwiedź stronę **www.qiagen.com**.

Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX (24)	Na 24 reakcje: Reverse transcriptase (odwrotna transkryptaza), 5x RT buffer (bufor do odwr. transkrypcji), dNTP mix (mieszanina nukleotydów), Random primer (startery RT), RNase Inhibitor (inhibitor RNaz), DTT, qPCR Master mix (mieszanina qPCR), Mbcr and ABL Single Plasmid Standards (standardy plazmidowe Mbcr i ABL), High RNA Positive Control (wysoce pozytywna kontrola RNA), IS-MMR Calibrator (kalibrator), ROX I fluorescent dye (barwnik fluorescencyjny ROX I), ROX II fluorescent dye (barwnik fluorescencyjny ROX II), Primers and Probe Mix ABL, Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcr Fusion Gene (mieszaniny starterów i sond)	670823
Aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM – do zwalidowanej analizy PCR w czasie rzeczywistym w zastosowaniach klinicznych (IVD)		
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
Zestawy RNeasy – do izolacji całkowitego RNA		
RNeasy Mini Kit (50)	Na 50 izolacji RNA: 50 kolumn wirówkowych RNeasy Mini Spin Columns, probówki Collection Tubes (1,5 ml i 2 ml), RNase-free Reagents and Buffers (odczynniki i bufory wolne od RNaz)	74104
RNeasy Midi Kit (50)	Na 50 izolacji RNA: 50 kolumn wirówkowych RNeasy Midi Spin Columns, probówki Collection Tubes (15 ml), RNase-free Reagents and Buffers (odczynniki i bufory wolne od RNaz)	75144

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**. Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

This page intentionally left blank

This page intentionally left blank

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 uprzedzenia. 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.

Ten produkt zawiera SuperScript® III Reverse Transcriptase, który to odczynnik jest podmiotem jednego lub więcej wniosków patentowych w USA i odpowiedników poza USA, których właścicielem jest Life Technologies Corporation i jest sprzedawany w porozumieniu pomiędzy Life Technologies Corporation i Ipsogen. Cena zakupu tego produktu zawiera ograniczone, nietransferowalne prawa związane z określonymi patentami do użytkowania danej ilości produktu tylko do użytku w ramach pomiarów transkryptów BCR-ABL p210. Żadne inne prawa nie są udzielone, wliczając brak praw do użytku tego produktu w zastosowaniach kryminalistycznych. Więcej informacji dotyczących nabycia praw podlegających patentom należącym do Life Technologies Corporation można uzyskać kontaktując się z Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-mail: Outlicensing@lifetech.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); TRIzol® (Molecular Research Center, Inc.).

Ograniczona Umowa Licencyjna

Używanie tego produktu oznacza zgodę nabywcy bądź użytkownika zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX na następujące warunki:

1. Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX może być używany wyłącznie zgodnie z wytycznymi zawartymi w instrukcji zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX 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 MbcrIS-MMR DX i w dodatkowych protokołach dostępnych pod adresem 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 niepodejmowanie ani niepozwalanie 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.

HB-1393-003 © 2013–2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com