

Marraskuu 2017

ipsogen[®] PML-RARA bcr1 -sarjan käsikirja



24

Versio 1

Kvantitatiivinen in vitro -diagnoosi

Tarkoitettu käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q-, ABI PRISM[®]-, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR- järjestelmällä, LightCycler[®]- ja SmartCycler[®]-laitteiden kanssa

IVD

CE

REF



R5 MAT

672123

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden
SAKSA

1108718FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	4
Yhteenveto ja selitykset.....	4
Menetelmän toimintaperiaate.....	6
Toimitetut materiaalit.....	9
Sarjan sisältö.....	9
Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen).....	10
Varoitukset ja varotoimet.....	12
Yleiset varotoimet.....	12
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	13
Menetelmä.....	15
Näytteen RNA:n valmistelu.....	15
Protokolla: Suositeltu standardoitu EAC-käänteistranskriptio.....	15
Protokolla: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- tai Rotor-Gene Q 5plex HRM -laitteella, jossa 72 putken roottori.....	18
Protokolla: qPCR-ajo ABI PRISM 7000-, 7700- ja 7900HT SDS -laitteilla, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmällä ja LightCycler 480 -laitteella.....	22
Protokolla: qPCR-ajo LightCycler 1.2- ja 2.0-laitteilla.....	26
Protokolla: qPCR-ajo SmartCycler-laitteella.....	30
Tulosten tulkinta.....	34
Tietojen analysointiperiaate.....	34
Tulokset.....	35
Ongelmien ratkaisu.....	38

Laadunvarmistus	41
Rajoitukset	41
Suorituskykyominaisuudet	42
Ei-kliiniset tutkimukset	42
Kliiniset tutkimukset	44
Kirjallisuusviitteet	48
Symbolit	49
Tilaustiedot	50

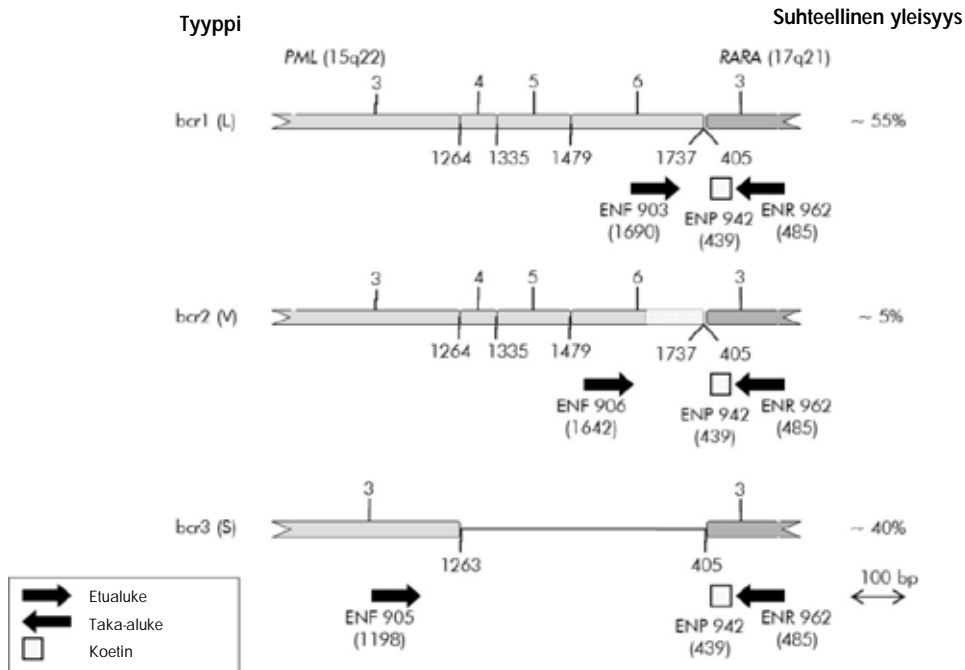
Käyttötarkoitus

ipsogen PML-RARA bcr1 -sarja on tarkoitettu luuytimen tai perifeeristen verinäytteiden PML-RARA-geenin bcr1-fuusiotranskripttien kvantifikaatioon akuuttia myelooista leukemiaa (AML) sairastavien potilaiden alaryhmässä, joilla on diagnosoitu M3-morfologia ja t(15;17)(q22;q21)-translokaatio ja katkoskohta sijoittuu PML-introniin 6. Tulosten perusteella pyritään seuraamaan potilaiden hoidon tehoa ja taudin uusiutumiseen liittyvää vähäistä jäännöstitä (MRD).

Yhteenvedo ja selitykset

PML-RARA-fuusiogeenin (FG) transkriptit, jotka ovat t(15;17)(q22;q21)-translokaation molekulaarisia tuloksia, liittyvät useimpiin akuutin promyelosyyttileukemian (APL) tapauksiin (> 90 %), ja niiden sisällä erilliseen AML-alaryhmään, joka kuuluu morfologisesti M3-luokkaan. Tämän ryhmän osuus AML-tapauksista on 10–15 %. Tasapainoisen translokaation t(15;17) seurauksena promyelosyyttien leukemian geenit eli PML-geenit ja retinoiinihapporeseptori-alfa- eli RARalfa-geenit yhdistyvät. Tuloksena on PML-RARA-fuusioproteiini. Kimeerinen PML-RARA-proteiini on transkriptionaalinen repressori. Sen ilmentyminen liittyy luuytimen erilaistumishäiriöön, joka johtuu tuman repressoriproteiinikompleksin (NcoR) lisääntyneestä yhdistymistäipumuksesta, histonideasetylaasin (HDAC) aiheuttamasta kromatiinirakenteen muutoksesta ja transkription estymisestä. APL:n hoito all trans -retinoiinihapolla (ATRA) on erittäin tehokas hoitomuoto. Se tukee erilaistumista edistämällä NCoR/HDAC-kompleksin vapautumista, jolloin transkriptio palautuu normaaliksi.

RARA-katkoskohdat sijoittuvat aina introniin 2. PML-geenin katkoskohdat vaihtelevat ja sen perusteella on eroteltu kolme PML-RARA-transkriptityyppiä: pitkä (L tai bcr1, katkoskohta intronissa 6), variantti (V tai bcr2, katkoskohta eksonissa 6) ja lyhyt (S tai bcr3, katkoskohta intronissa 3) (kuva 1). Näiden transkriptien osuus tapauksista on 55 %, 5 % ja 40 %.



Kuva 1. Kaavio: PML-RARA-fuusiogeenin transkripti, EAC qPCR -alukkeet ja koetinsarja. Tyyppi bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. Tyyppi bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. Tyyppi bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962. Alukkeiden ja koettimen alla oleva numero tarkoittaa nukleotidin paikkaa normaalissa geenitranskriptiossa. Suhteellinen esiintyvyys tarkoittaa fuusiogeenin transkriptityypin osuutta PML-RARA-varianteista.

APL:n yhdistelmähoidosta antrasykliinipohjaisella solunsalpaajalla ja ATRA:lla on saatu erittäin hyviä tuloksia. Juuri diagnosoiduista potilaista jopa 70 prosentilla on saavutettu pitkäaikainen remissio ja todennäköinen paraneminen. Tauti kuitenkin uusiutuu 15–25 prosentilla potilaista ja heillä eloonjäämisprosentti on pieni. Yksilöllisen PML-RARA-fuusiogeenin tunnistamista tavanomaisella kvalitatiivisella käänteiskopioijaensyymin polymeraasiketjureaktiolla (RT-PCR) on käytetty laajalti nopeaan diagnosointiin ja hoitovasteen ennustamiseen. Menetelmällä on kuitenkin haittansa eikä se ole kovinkaan herkkä.

PML-RARA-kopiomäärän kvantifioinnilla reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR-analyysillä (qPCR) on useita etuja. Se on erittäin herkkä ja toistettava tekniikka, jolla voidaan analysoida myös kinetiikkaa. APL-potilaiden eri hoitovaiheissa käytetyn vakiintuneen standardoidun qPCR-protokollan (EAC-ohjelman) ennustearvon analysointi on osoittanut, että tämä ratkaisumalli on luotettava vaihtoehto vähäisen jäännöstaudin arviointiin ja että uusiutumiseriskin stratifikaatio voidaan selvittää normalisoidun PML-RARA-kopiomäärän perusteella. Konsolidaation jälkeisessä analyysissä positiivinen qPCR-testi ennustaa vahvasti hematologista uusiutumista. Ylläpito-hoidon aikana ja hoidon lopettamisen jälkeen positiivinen qPCR-testi liittyy suurempaan uusiutumiseriskiin ja lyhyempään elinaikaan. Normalisoidun PML-RARA-kopiomäärän kvantifiointiin perustuvassa uusiutumiseriskin luokituksessa potilaat jaetaan kolmeen ryhmään: suuri, keski-suuri ja pieni uusiutumiseriski (1). PML-RARA:n seuranta transkriptin herkällä tunnistamisella pidetään APL:n hoitostrategian olennaisena osana (viitteet 2 ja 3). Seurannan aikana hoidon tyyppiä ja intensiteettiä muokataan potilaiden uusiutumiseriskin mukaan.

Vähäisen jäännöstaudin kvantifiointimenetelmän standardointi ja validointi on tehty EAC:n toteuttamassa monikeskushankkeessa. Julkaisuvuosi on 2003 (4, 5). *ipsogen* PML-RARA bcr1 -sarja perustuu tähän tekniikkaan.

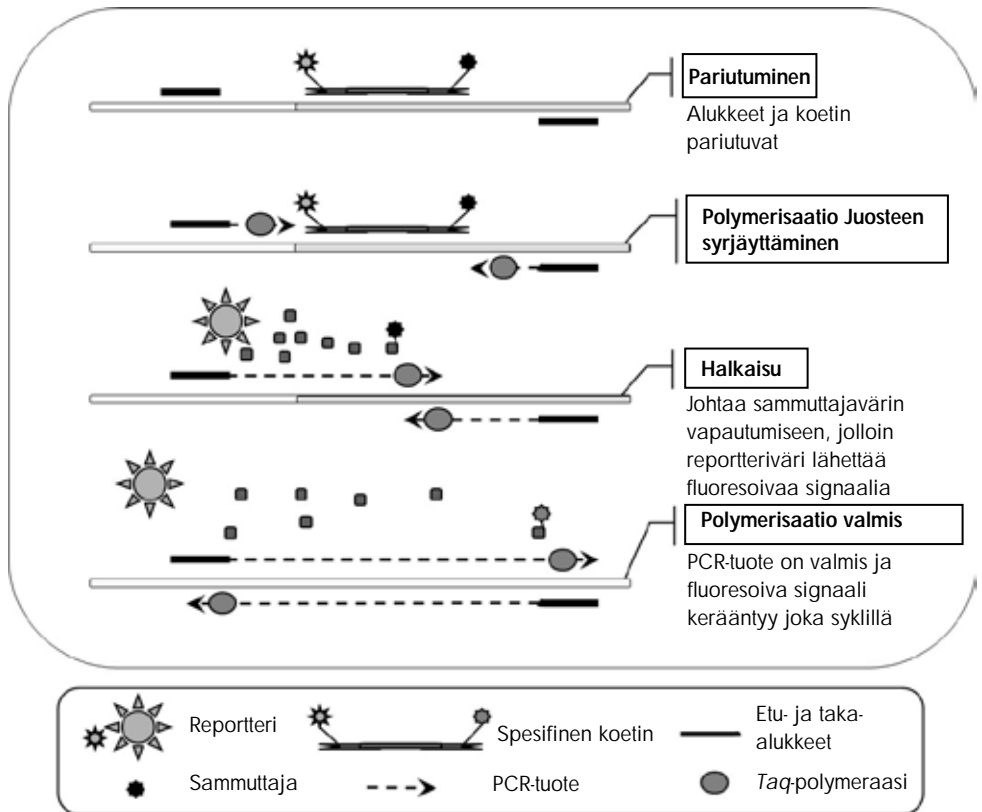
Menetelmän toimintaperiaate

qPCR-tekniikalla polymeerasiketjureaktion (PCR) tuotteet voidaan kvantifioida tarkasti monistamisen eksponentiaalisessa vaiheessa. qPCR-tiedot saadaan nopeasti ilman PCR-jälkikäsittelyä, kun fluoresoivat signaalit tunnistetaan reaaliaikaisesti PCR-syklien aikana ja/tai niiden jälkeen. Tämä vähentää merkittävästi PCR-tuotteiden kontaminaatoriskiä. Tällä hetkellä qPCR-tekniikoissa on kolme päätyyppiä: qPCR-analyysi SYBR® Green I Dye -väriä käyttäen, qPCR-analyysi hydrolyysikoettimia käyttäen ja qPCR-analyysi hybridisaatiokoettimia käyttäen.

Tämä testi hyödyntää kaksoisvärjättyä qPCR-oligonukleotidien hydrolyysiä. PCR:n aikana etu- ja taka-alukkeet hybridisoituvat tiettyyn sekvenssiin. Samassa seoksessa on kaksoisvärjäyksen oligonukleotidi. Tämä koetin, joka koostuu 5'-pään reportterivärillä ja alavirran puoleisella 3'-pään sammuttajavärillä leimatusta oligonukleotidista hybridisoituu kohdesekvenssiin PCR-tuotteessa. Hydrolyysikoettimilla tehtävä qPCR-analyysi hyödyntää *Thermus aquaticus* (Taq) -DNA-polymeraasin eksonukleaasiaktiivisuutta 5'→3'. Koettimen ollessa kiinnittyneenä kohdesekvenssiinsä reportteri- ja sammuttajavärin läheisyys vaimentaa reporterin fluoresenssia pääasiassa Förster-tyyppisellä energiansiirrolla.

PCR:n aikana koetin kiinnittyy spesifisesti etu- ja taka-alukkeiden kohtien välillä, jos kohde on paikalla. DNA-polymeraasin eksonukleaasiaktiivisuus 5'→3' pilkkoo reporterin ja sammuttajan välissä olevan koettimen reporterin ja sammuttajan välissä vain, jos koetin hybridisoituu kohteeseen. Sen jälkeen koettimen palaset irtoavat kohteesta ja juosteen polymerisaatio jatkuu. Koettimen 3'-pää on estetty, jotta koetin ei pitenisi PCR:n aikana (kuva 2). Tämä prosessi tapahtuu jokaisessa sykissä eikä se häiritse tuotteen eksponentiaalista kertymistä.

Fluoresenssisignaalin voimistuminen havaitaan vain, jos kohdesekvenssi on komplementaarinen koettimeen nähden ja siten monistuu PCR-ajon aikana. Siksi epäspesifistä monistumista ei tunnisteta. Fluoresenssin lisäys on suoraan verrannollinen kohteen monistumiseen PCR:n aikana.



Kuva 2. Reaktioperiaate. Kokonais-RNA käänneis kopioidaan ja tuotettu cDNA monistetaan PCR-menetelmällä spesifisen alueparin ja sisäisen kaksoisvärjätyn koettimen avulla (FAM[™]-TAMRA[™]). Koetin sitoutuu amplikoniin PCR:n jokaisessa pariutumisasiheessä. Kun Taq ulottuu koettimen liitoksesta amplikoniin, se irrottaa koettimen 5'-päätä, jota sitten Taq-DNA-polymeraasin eksonukleaasiaktiivisuus 5' → 3' hajottaa. Pilkkominen jatkuu, kunnes jäljelle jäävä koetin sulattaa amplikonin pois. Tämä prosessi vapauttaa fluoroforin ja sammuttajan liuokseen, erottaa ne ja johtaa fluoresenssin lisääntymiseen FAM:stä ja fluoresenssin vähentymiseen TAMRA:sta.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit		(24)
Luettelonumero		672123
Reaktioiden määrä		24
Komponentti	Nimi	Määrä
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-kontrolligeenin standardilaimennus) (10 ³ kopiota / 5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-kontrolligeenin standardilaimennus) (10 ⁴ kopiota / 5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-kontrolligeenin standardilaimennus) (10 ⁵ kopiota / 5 µl)	C3-ABL	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin standardilaimennus) (10 ¹ kopiota / 5 µl)	F1-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin standardilaimennus) (10 ² kopiota / 5 µl)	F2-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin standardilaimennus) (10 ³ kopiota / 5 µl)	F3-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin standardilaimennus) (10 ⁵ kopiota / 5 µl)	F4-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin standardilaimennus) (10 ⁶ kopiota / 5 µl)	F5-PML-RARA bcr1	50 µl

<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i>		(24)
Luettelonumero		672123
Reaktioiden määrä		24
Primers and Probe Mix ABL (Alukkeet ja koetinseos ABL)*	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (Aluke- ja koetinseos PML-RARA bcr1 –fuusiogeeni)†	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 µl
<i>ipsogen PML-RARA bcr1 -sarjan käsikirja</i>		1

* ABL-kontrolligeenin spesifisten taka- ja etualukkeiden seos ja spesifinen FAM–TAMRA-koetin.

† PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin spesifisten taka- ja etualukkeiden seos ja spesifinen FAM–TAMRA-koetin.

Huomautus: sentrifugoi standardilaimennukset sekä aluke- ja koetinseokset kevyesti ennen käyttöä.

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työkenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvallisuustiedotteista, joita on saatavilla tuotteen toimittajalta.

Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Reagenssit

- I Nukleaasiton PCR-vesi
- I Reagenssit käänteistranskriptiota varten: Validoitu reagenssi on Superscript® II (tai Superscript) Reverse Transcriptase, sisältää 5x First-Strand-puskuria, 100 mM DTT (Life Technologies, luettelonumero 18064-022)
- I RNAasin inhibiittori: Validoitu reagenssi on RNaseOUT™ (Life Technologies, luettelonumero 10777-019)

- I dNTP-sarja, PCR-käyttöön sopiva
- I Satunnainen heksameeri
- I MgCl₂
- I Puskuri ja Taq-DNA-polymeraasi: Validoidut reagenssit ovat TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, luettelonumero 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, luettelonumero 04535286001)

Tarvikkeet

- I Nukleaasittomia, aerosolisuojattuja, steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- I 0,5 tai 0,2 ml:n RNAasi- ja DNAasittomia PCR-putkia
- I Jäätä

Laitteet

- I Mikrolitrapipettejä, jotka on tarkoitettu PCR:ään käsittelyyn (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)
- I Pöytämallinen sentrifugi, jossa on roottori 0,2/0,5 ml:n reaktioputkia varten (suurin nopeus 13 000/14 000 rpm)
- I Reaaliaikainen PCR-laite: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tai muut Rotor Gene Q -laitteet, LightCycler 1.2, 2.0 tai 480, ABI PRISM 7000, 7700 tai 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmä tai SmartCycler ja niihin liittyvät materiaalit
- I PCR-laite tai vesihaude (käänteistranskriptiovaihe)

Komplementaariset reagenssit

- I *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit (*ipsogen* PML-RARA bcr1 –kontrollisarja) (luettelonumero 672091) vain tutkimuskäyttöön. Koostuu solulinjoista, joilla on PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin negatiivinen, voimakas ja heikko positiivinen ilmentyminen. RNA:n eristyksen ja käänteistranskription kvalitatiiviseen validointiin.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla PDF-muotoisina verkossa sivulla www.qiagen.com/safety, jossa voit tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.

Hävitä näyte- ja analyysijäte paikallisten turvallisuusmääräysten mukaisesti.

Yleiset varotoimet

qPCR-testien käyttäminen edellyttää hyvien laboratorioskäytäntöjen noudattamista, kuten molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden ylläpitoa sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämä sarja on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. Tämän sarjan mukana toimitettujen reagenssien ja ohjeiden laatu on validoitu. Reagenssien lisälaimennus tai inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja. PPC- ja PPF-reagenssit saattavat muuttua, jos ne altistuvat valolle. Kaikki reagenssit on suunniteltu erityisesti tätä testiä varten. Testi toimii parhaiten, kun sen osia ei vaihdeta muihin.

Transkriptiomäärien selvittäminen qPCR:llä edellyttää sekä mRNA:n käänteitranskriptiota että tuotetun cDNA:n monistamista PCR:llä. Siksi koko testaus on tehtävä ribo- ja deoksiribonukleasittomissa olosuhteissa.

Estä varotoimilla seuraavat:

- I RNAasi/Dnaasi-kontaminaatio, joka voi hajottaa mallin mRNA:ta ja tuotettua cDNA:ta

- | mRNA:n tai PCR:n näytteiden välinen kontaminaatio, joka aiheuttaa väärän positiivisen signaalin.

Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita.

- | Käytä nukleeaasittomia laboratoriovälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja) ja käytä käsineitä testiä tehdessäsi.
- | Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojuuttuja pipettikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.
- | Valmistele esi-PCR-pääseos vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (kuten pipetit ja kärjet) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (cDNA:ta, DNA:ta, plasmideja). Lisää malli erillisellä alueella (mieluiten eri huoneessa) siihen tarkoitetuilla materiaaleilla (kuten pipetit ja kärjet).
- | Käsittele standardilaimennuksia (C1–3 ja F1–5) erillisessä huoneessa.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Sarjat toimitetaan kuivajäissä ja vastaanottamisen jälkeen niitä on säilytettävä –30 ... –15 °C:n lämpötilassa.

- | Vältä aluke- ja koetinseosten altistamista valolle (PPC- ja PPF-putket).
- | Sekoita ja sentrifugoi putkia kevyesti ennen avaamista.
- | Säilytä sarjan kaikkia osia alkuperäisissä säiliöissä.

Nämä säilytysolosuhteet koskevat sekä avattuja että avaamattomia komponentteja. Jos komponentteja ei säilytetä merkintöjen mukaisesti, ne eivät välttämättä toimi oikein ja ne voivat haitata testituloksia.

Reagenssien vanhenemispäivät on ilmoitettu kunkin komponentin merkinnöissä. Oikein säilytetyn tuotteen suorituskyky säilyy merkinnässä ilmoitettuun vanhenemispäivään asti.

Tämän tuotteen epävakauden osoittamiseksi ei ole selviä merkkejä. Positiiviset ja negatiiviset kontrollit pitäisi ajaa samanaikaisesti tuntemattomien näytteiden kanssa.

Menetelmä

Näytteen RNA:n valmistelu

Potilaiden näytteistä (veri tai luuydin) tehtävä RNA:n valmistelun on tehtävä validoidulla menetelmällä. RNA:n laatu vaikuttaa merkittävästi testin laatuun. Suosittelemme puhdistetun RNA:n kvalifiointia agarosi*-geellelektroforeesilla tai Agilent® Bioanalyzer® -ajolla ennen analysointia.

Protokolla: Suositeltu standardoitu EAC-käänteistranskriptio

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- I Valmista dNTP:t (10 mM). Säilytä $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa alikvooteissa.
- I Valmista satunnainen heksameeri, 100 μM . Säilytä $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa alikvooteissa.
- I Valmista MgCl_2 , 50 mM. Säilytä $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa alikvooteissa.

Menetelmä

1. Sulata tarvittavat komponentit ja aseta ne jäähauteeseen.
2. Inkuboi 1 μg RNA:ta (1–4 μl) 10 minuuttia $70\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa ja jäähdytä välittömästi jäähauteessa 5 minuutin ajan.
3. Sentrifugoi hetki (noin 10 sekuntia, 10 000 rpm), jotta neste kertyy putken pohjalle. Säilytä jäähauteessa.
4. Valmista seuraava RT-seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan (taulukko 1).

* Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja.

Taulukko 1. RT-seoksen valmistus

Komponentti	Näytekohtainen määrä (µl)	Lopullinen konsentraatio
First-Strand-puskuri (toimitetaan Superscript II Reverse Transcriptase -reagenssin mukana), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP:t (10 mM, valmistetaan aiemmin ja säilytetään -20 °C lämpötilassa alikvooteissa)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, toimitetaan Superscript II Reverse Transcriptase -reagenssin kanssa)	2,0	10 mM
RNAasin inhibiittori (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
RNAasin inhibiittori (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Satunnainen heksameeri (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II tai Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Lämmitetty RNA-näyte (lisätään vaiheessa 5)	1,0–4,0	50 ng/µl
Nukleaasiton PCR-vesi (lisätään vaiheessa 5)	0,0-3,0	–
Lopullinen määrä	20,0	–

5. Pipetoi 16 µl RT-seosta jokaisen PCR-putkeen. Lisää sitten 1–4 µl (1 µg) RNA:ta (vaiheesta 3) ja muuta määräksi 20 µl nukleaasittomalla PCR-vedellä (taulukko 2).

Taulukko 2. Käänteistranskription reaktion valmistelu

Komponentti	Määrä (µl)
RT-seos	16
Lämmitetty näyte-RNA (1 µg)	1-4
Nukleaasiton PCR-vesi	0-3
Lopullinen määrä	20

6. Sekoita hyvin ja sentrifugoi hetki (noin 10 sekuntia, 10 000 rpm), jotta neste kertyy putken pohjalle.
7. Inkuboi 20 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia.
8. Inkuboi 42 °C:n lämpötilassa PCR-laitteessa 45 minuuttia ja sitten heti 99 °C:n lämpötilassa 3 minuuttia.
9. Jäähdytä jäähähteessä (jotta reaktio pysähtyy) 5 minuuttia.
10. Sentrifugoi hetki (noin 10 sekuntia, 10 000 rpm), jotta neste kertyy putken pohjalle. Säilytä jäähähteessä.
11. Laimenna lopullista cDNA:ta nukleaasittomalla PCR-vedellä (30 µl) niin, että lopulliseksi määräksi tulee 50 µl.
12. Tee PCR seuraavien protokollien ja qPCR-laitteen mukaan.

Protokolla: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- tai Rotor-Gene Q 5plex HRM -laitteella, jossa 72 putken roottori

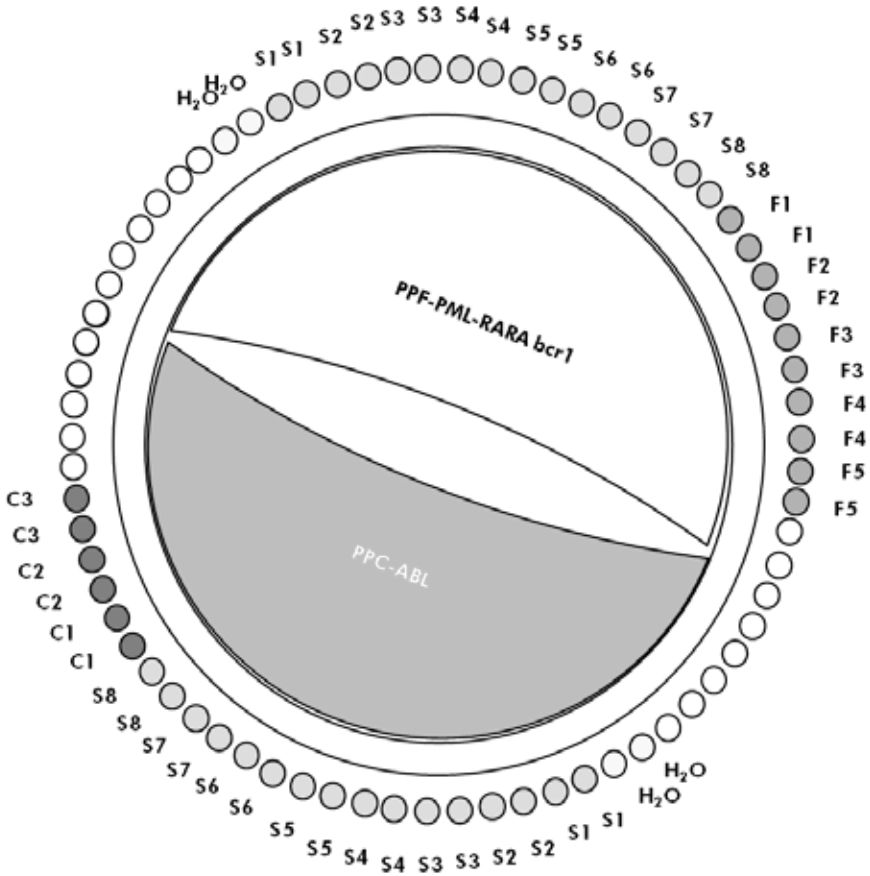
Tällä laitteella suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahdesti, kuten taulukossa 3 esitetään.

Taulukko 3. Reaktioiden määrä Rotor-Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Näytteet	Reaktiot
ABL-alue- ja koetinseoksella (PPC-ABL)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
ABL-standardi	2 x 3 reaktiota (3 laimennusta, kaksi testiä kullakin)
Vesikontrolli	2 reaktiota
PML-RARA bcr1 -alue- ja koetinseoksella (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
PML-RARA-standardi	2 x 5 reaktiota (5 laimennusta, kaksi testiä kullakin)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Näytteiden käsittely Rotor-Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Suosittellemme testaamaan vähintään 8 cDNA-näytettä samassa kokeessa. Näin optimoidaan standardien ja alue- ja koetinseosten käyttö.



Kuva 3. Ehdotetut roottorin asetukset, kun koe tehdään *ipsogen* PML-RARA *bcr1* -sarjalla. F1–5: PML-RARA *bcr1* -standardit, C1–3: ABL-standardit, S: cDNA-näyte, H₂O: vesikontrolli.

Huomautus: Muista asettaa testattava näyte aina roottorin paikkaan 1. Muutoin laite ei tee kalibroitusta kalibroitivaiheessa ja testistä saadaan virheellisiä fluoresenssitietoja.

Täytä kaikki muut paikat tyhjillä putkilla.

qPCR-ajo Rotor-Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Huomautus: tee kaikki vaiheet jäässä.

Menetelmä

1. Sulata tarvittavat komponentit ja aseta ne jäähäuteeseen.
2. Valmista seuraava qPCR-seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki konsentraatiot koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 4 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten.

Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella (PPC-ABL tai PPF-PML-RARA bcr1). Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Taulukko 4. qPCR-seoksen valmistus

Komponentti	1 reaktio (µl)	ABL: 24 + 1 reaktiota (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reaktiota (µl)	Lopullinen konsentraatio
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Aluke- ja koetinseos, 25x	1	25	29	1x
Nukleasiton PCR-vesi	6,5	162,5	188,5	–
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5/kpl	5/kpl	–
Kokonaismäärä	25	25/kpl	25/kpl	–

3. Annostele 20 µl qPCR-esiseosta putkea kohti.
4. Lisää 5 µl käänteitranskriptiosta saatua RT-tuotetta (cDNA, 100 ng, RNA:ta vastaava) (lisätietoja on kohdassa Protokolla: Suositeltu standardoitu EAC-käänteitranskriptio, sivulla 15) vastaavaan putkeen (kokonaismäärä 25 µl).

5. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
6. Aseta putket PCR-laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
7. Ohjelmoi Rotor-Gene Q -laitteeseen taulukon 5 mukainen PCR-ohjelma.

Taulukko 5. Lämpötilaprofiili

Analyysi	Kvantitaatio
Pito	Lämpötila: 50 astetta Aika: 2 minuuttia
Pito 2	Lämpötila: 95 astetta Aika: 10 minuuttia
Syklit	50 kertaa 95 astetta 15 sekuntia 60 astetta 1 minuutti, FAM-fluoresenssin keruu kanavalla Vihreä: Yksi

8. Käynnistä PCR-ohjelma taulukon 5 mukaan.
9. Valitse Rotor-Gene Q -laitteessa analyysille Slope Correct. Suositeltava kynnys on 0,03.

Protokolla: qPCR-ajo ABI PRISM 7000-, 7700- ja 7900HT SDS -laitteilla, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmällä ja LightCycler 480 -laitteella

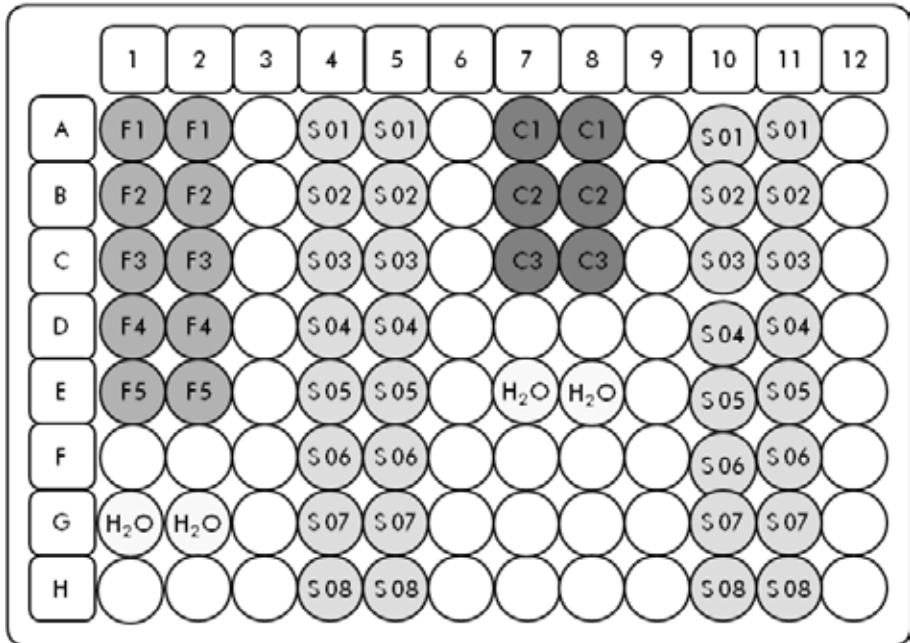
96-kuoppaisella qPCR-laitteella suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahdesti, kuten taulukossa 6 esitetään.

Taulukko 6. Reaktioiden määrä 96-kuoppaisella qPCR-laitteella

Näytteet	Reaktiot
ABL-aluke- ja koetinseoksella (PPC-ABL)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
ABL-standardi	2 x 3 reaktiota (3 laimennusta, kaksi testiä kullakin)
Vesikontrolli	2 reaktiota
PML-RARA bcr1 -aluke- ja koetinseoksella (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
PML-RARA-standardi	2 x 5 reaktiota (5 laimennusta, kaksi testiä kullakin)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Näytteiden käsittely ABI PRISM 7000-, 7700- ja 7900 SDS -laitteilla, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmällä ja LightCycler 480 -laitteella

Suositlemme testaamaan vähintään 8 cDNA-näytettä samassa kokeessa. Näin optimoidaan standardien ja aluke- ja koetinseosten käyttö. Kuvan 4 levymallissa on esimerkki kyseisestä kokeesta.



Kuva 4. Ehdotettu levyjärjestys yhtä koetta varten. S: cDNA-näyte, F1–5: PML-RARA bcr1 -standardit, C1–3: ABL-standardit, H₂O: vesikontrolli.

qPCR-ajo ABI PRISM 7000-, 7700- ja 7900 SDS -laitteilla, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmällä ja LightCycler 480 -laitteella

Huomautus: Tee kaikki vaiheet jäässä.

Menetelmä

1. Sulata tarvittavat komponentit ja aseta ne jäähäuteeseen.
2. Valmista seuraava qPCR-seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki konsentraatiot koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 7 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella (PPC-ABL tai PPF-PML-RARA bcr1). Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Taulukko 7. qPCR-seoksen valmistus

Komponentti	1 reaktio (µl)	ABL: 24 + 1 reaktiota (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reaktiota (µl)	Lopullinen konsentraatio
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Aluke- ja koetinseos, 25x	1	25	29	1x
Nukleaasiton PCR-vesi	6,5	162,5	188,5	–
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5/kpl	5/kpl	–
Kokonaismäärä	25	25/kpl	25/kpl	–

3. Annostele 20 µl qPCR-esiseosta kuoppaa kohti.
4. Lisää 5 µl käänteitranskriptiosta saatua RT-tuotetta (cDNA, 100 ng, RNA:ta vastaava) (lisätietoja on kohdassa Protokolla: Suositeltu standardoitu EAC-käänteitranskriptio, sivulla 15) vastaavaan kuoppaan (kokonaismäärä 25 µl).
5. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
6. Sulje levy ja sentrifugoi kevyesti (300 x g, noin 10 sekuntia).
7. Aseta levy PCR-laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.

Ohjelmoi PCR-laitteeseen taulukon 8 mukainen PCR-ohjelma, jos käytössä on ABI PRISM 7000-, 7700- tai 7900HT SDS -laite tai Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmä, tai taulukon 9 mukainen ohjelma, jos käytössä on LightCycler 480 -laite.

Taulukko 8. Lämpötilaprofiili: ABI PRISM 7000-, 7700- ja 7900HT SDS -laitteet ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmä

Analyysi	Standardikäyrä — Absoluuttinen kvantitaatio
Pito	Lämpötila: 50 °C Aika: 2 minuuttia
Pito 2	Lämpötila: 95 °C Aika: 10 minuuttia
Syklit	50 kertaa 95 °C 15 sekuntia 60 °C 1 minuutti, FAM-fluoresenssin keruu, sammuttaja: TAMRA

Taulukko 9. Lämpötilaprofiili: LightCycler 480 -laite

Analyysi	Absoluuttinen kvantitaatio ("Abs Quant")
Detektoinnit	Valitse detektointi-ikkunasta "Simple Probe"
Pito	Lämpötila: 50 °C Aika: 2 minuuttia
Pito 2	Lämpötila: 95°C Aika: 10 minuuttia
Syklit	50 kertaa 95 °C 15 sekuntia 60 °C 1 minuutti, FAM-fluoresenssin keruu, vastaavuus (483–533 nm) LC-versio 01 ja (465–510 nm) LC- versio 02

8. Jos käytössä on ABI PRISM 7000-, 7700- tai 7900HT SDS -laite tai Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmä, noudata vaihetta 8a. Jos käytössä on LightCycler 480, noudata vaihetta 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000-, 7700- ja 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR -järjestelmä: Suositeltava kynnys on 0,1 analyysivaiheen EAC-protokollaan mukaisesti ja perustaso 3 ja 15 syklin välillä. Aloita PCR-ohjelma taulukon 8 mukaan.
- 8b. LightCycler 480: Suositeltava analyysimenetelmä on Fit point, tausta 2,0 ja kynnys 2,0. Aloita PCR-ohjelma taulukon 9 mukaan.

Protokolla: qPCR-ajo LightCycler 1.2- ja 2.0-laitteilla

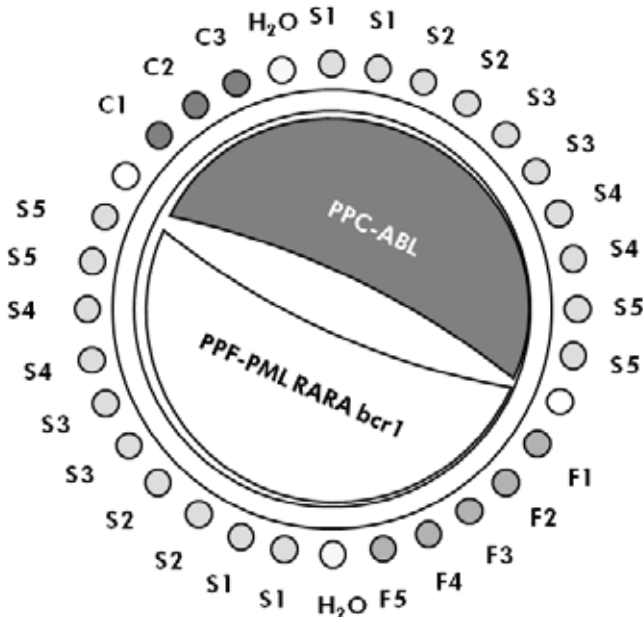
Kapillaarisilla laitteilla on suositeltavaa mitata näytteet kahdesti ja kontrollit vain kerran taulukon 10 mukaisesti.

Taulukko 10. Reaktioiden määrä: LightCycler 1.2- ja 2.0-laitteet

Näytteet	Reaktiot
ABL-aluke- ja koetinseoksella (PPC-ABL)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
ABL-standardi	1 x 3 reaktiota (3 standardilaimennusta, jokainen testataan kerran)
Vesikontrolli	1 reaktio
PML-RARA bcr1 -aluke- ja koetinseoksella (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
PML-RARA-standardi	1 x 5 reaktiota (5 standardilaimennusta, jokainen testataan kerran)
Vesikontrolli	1 reaktio

Näytteiden käsittely LightCycler 1.2- ja 2.0-laitteilla

Suosittelemme testaamaan vähintään 5 cDNA-näytettä samassa kokeessa. Näin optimoidaan standardien ja aluke- ja koetinseosten käyttö. Kuvan 5 kapillaarimallissa on esimerkki kokeesta.



Kuva 5. Ehdotetut roottorin asetukset, kun koe tehdään *ipsogen* PML-RARA *bcr1* -sarjalla.

F1–5: PML-RARA *bcr1* -standardit, C1–3: ABL-standardit, S: analysoitava tuntematon DNA-näyte, H2O: vesikontrolli.

qPCR-ajo LightCycler 1.2- ja 2.0-laitteilla

Huomautus: Teknisten vaatimusten takia LightCycler-kokeet on tehtävä tietyillä reagensseilla. Suosittelemme käyttämään LightCycler TaqMan Master -reagenssia ja valmistamaan Master Mix 5x valmistajan ohjeiden mukaan.

Huomautus: tee kaikki vaiheet jäässä.

Menetelmä

1. Sulata tarvittavat komponentit ja aseta ne jäähauteeseen.
2. Valmista seuraava qPCR-seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki konsentraatiot koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 11 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten.

Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 20 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella (PPC-ABL tai PPF-PML-RARA bcr1). Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Taulukko 11. qPCR-seoksen valmistus

Komponentti	1 reaktio (µl)	ABL: 14 + 1 reaktiota (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaktiota (µl)	Lopullinen konsentraatio
Tuore LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Aluke- ja koetinseos, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Nukleaaasiton PCR-vesi	10,2	153,0	173,4	–
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5/kpl	5/kpl	–
Kokonaismäärä	20	20/kpl	20/kpl	–

3. Annostele 15 µl qPCR-esiseosta kapillaaria kohti.
4. Lisää 5 µl käänteistranskriptiosta saatua RT-tuotetta (cDNA, 100 ng, RNA:ta vastaava) (lisätietoja on kohdassa Protokolla: Suositeltu standardoitu EAC-käänteistranskriptio, sivulla 15) vastaavaan putkeen (kokonaismäärä 20 µl).
5. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

6. Aseta kapillaarit laitteen mukana tulleisiin sovittimiin ja sentrifugoi kevyesti (700 x g, noin 10 sekuntia).
7. Aseta kapillaarit PCR-laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
8. Ohjelmoi LightCycler 1.2- tai 2.0-laitteeseen taulukon 12 mukainen PCR-ohjelma.

Taulukko 12. Lämpötilaprofiili

Analyysi	Kvantifikaatio
Pito	Lämpötila: 95 °C Aika: 10 minuuttia Lämpötilan muutosnopeus: 20
Syklit	50 kertaa 95 °C 10 sekuntia, lämpötilan muutosnopeus: 20 60 °C 1 minuutti, lämpötilan muutosnopeus: 20, FAM-fluoresenssin keruu: Yksi
Pito 2	45°C 1 minuutti, lämpötilan muutosnopeus: 20

9. Jos käytössä on LightCycler 1,2, noudata vaihetta 9a. Jos käytössä on LightCycler 2,0, noudata vaihetta 9b.
 - 9a. LightCycler 1,2: Suositus: F1/F2 ja 2nd derivative analysis -tila. Aloita PCR-ohjelma taulukon 12 mukaan.
 - 9b. LightCycler 2,0: LightCycler 2.0 -ohjelman versiossa 4.0 suositeltava analyysi on automaattinen (Automated, F''max), jotta tulokset ovat toistettavissa. Aloita PCR-ohjelma taulukon 12 mukaan.

Protokolla: qPCR-ajo SmartCycler-laitteella

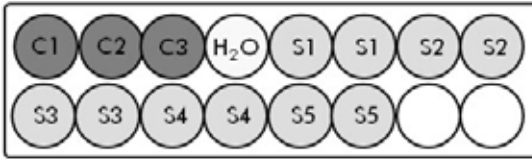
Tällä laitteella on suositeltavaa mitata näytteet kahdesti ja kontrollit vain kerran taulukon 13 mukaisesti.

Taulukko 13. Reaktioiden määrä SmartCycler-laitteella

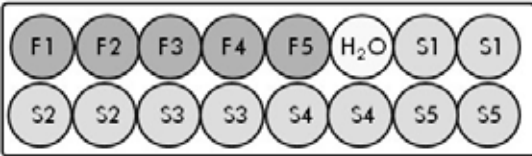
Näytteet	Reaktiot
ABL-alue- ja koetinseoksella (PPC-ABL)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
ABL-standardi	1 x 3 reaktiota (3 standardilaimennusta, jokainen testataan kerran)
Vesikontrolli	1 reaktio
PML-RARA bcr1 -alue- ja koetinseoksella (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-näytettä	n x 2 reaktiota
PML-RARA-standardi	1 x 5 reaktiota (5 standardilaimennusta, jokainen testataan kerran)
Vesikontrolli	1 reaktio

Näytteiden käsittely SmartCycler-laitteella

Suosittellemme testaamaan vähintään 5 cDNA-näytettä samassa kokeessa. Näin optimoidaan standardien ja alue- ja koetinseosten käyttö. Kuvassa 6 on kahden lohkon malli.



Tämän ensimmäisen lohkon kaikki testit tehdään PPC-ABL:llä



Tämän toisen lohkon kaikki testit tehdään PPF-PML-RARA bcr1:llä

Kuva 6. Ehdotettu levyjärjestys yhtä koetta varten. S: cDNA-näyte, F1–5: PML-RARA bcr1 -standardit, C1–3: ABL-standardit, H2O: vesikontrolli.

qPCR-ajo SmartCycler-laitteella

Huomautus: tee kaikki vaiheet jäässä.

Menetelmä

1. Sulata tarvittavat komponentit ja aseta ne jäähautteeseen.
2. Valmista seuraava qPCR-seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki konsentraatiot koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 14 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten.

Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella (PPC-ABL tai PPF-PML-RARA bcr1). Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Taulukko 14. qPCR-seoksen valmistus

Komponentti	1 reaktio (μl)	ABL: 14 + 1 reaktiota (μl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaktiota (μl)	Lopullinen konsentraatio
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Aluke- ja koetinseos, 25x	1	15	17	1x
Nukleaasiton PCR-vesi	6,5	97,5	110,5	–
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5/kpl	5/kpl	–
Kokonaismäärä	25	25/kpl	25/kpl	–

3. Annostele 20 μ l qPCR-esiseosta kuoppaa kohti.
4. Lisää 5 μ l käänteitranskriptiosta saatua RT-tuotetta (cDNA, 100 ng, RNA:ta vastaava) (lisätietoja on kohdassa Protokolla: Suositeltu standardoitu EAC-käänteitranskriptio, sivulla 15) vastaavaan putkeen (kokonaismäärä 25 μ l).
5. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
6. Aseta näytteet PCR-laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
7. Ohjelmoi SmartCycler-laitteeseen taulukon 15 mukainen PCR-ohjelma.

Taulukko 15. Lämpötilaprofiili

Pito	Lämpötila 50 °C Aika: 2 minuuttia
Pito 2	Lämpötila: 95 °C Aika: 10 minuuttia
Syklit	50 kertaa 95 °C 15 sekuntia 60 °C 1 minuutti, keräys: Yksi

8. Suositeltava kynnys on 30. Käynnistä PCR-ohjelma taulukon 15 mukaan.

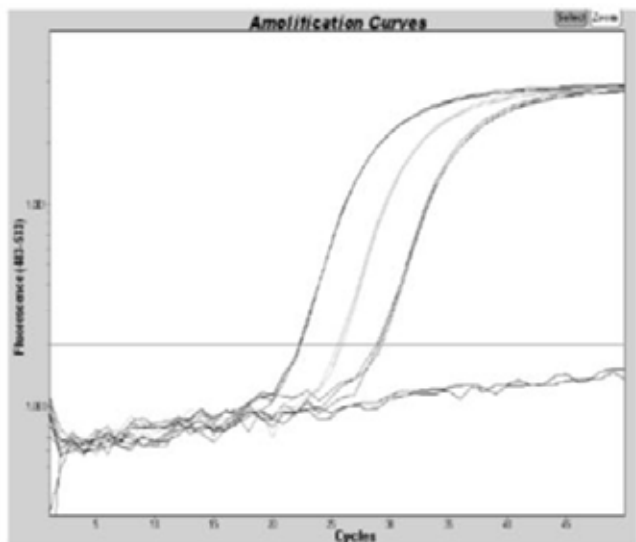
Tulosten tulkinta

Tietojen analysointiperiaate

TaqMan-tekniikassa kynnysykyllillä (C_T) tarkoitetaan kynnyksen ylittävän signaalin tunnistamista varten tarvittavaa PCR-sykliden määrää. Se on suoraan verrannollinen reaktion alussa olevaan kohdemäärään.

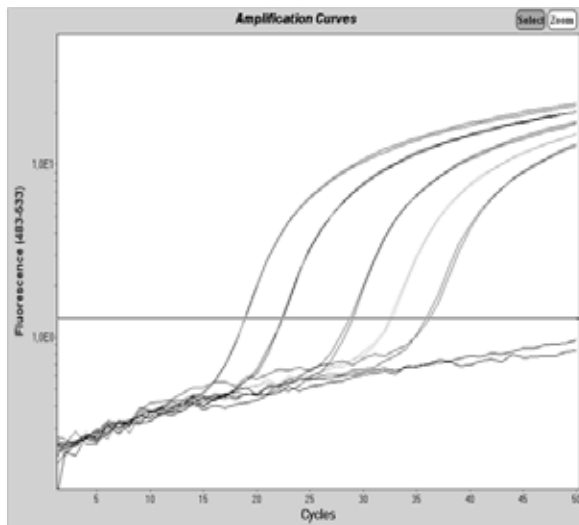
Käyttämällä standardeja, joiden molekyylimäärä tunnetaan, voidaan muodostaa standardikäyrä ja selvittää tarkasti testinäytteessä olevan kohteen määrä. *Ipsogen*-standardikäyrät pohjautuvat plasmideihin. Käytämme 3 plasmidin standardilaimennusta ABL-kontrolligeenille ja 5 standardilaimennusta fuusiogeenille (PML-RARA bcr1), jotta standardikäyriin ei tule virheitä. Kuvissa 7 ja 8 on esimerkki *ipsogen* PML-RARA bcr1 -sarjalla saaduista TaqMan-monistuskäyristä.

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



Kuva 7. ABL-standardien tunnistus (C_1 , C_2 , C_3). 10^3 , 10^4 ja 10^5 kopiota / 5 μ l.

- PML-RARA bcr1 10¹
- PML-RARA bcr1 10²
- PML-RARA bcr1 10³
- PML-RARA bcr1 10⁵
- PML-RARA bcr1 10⁶



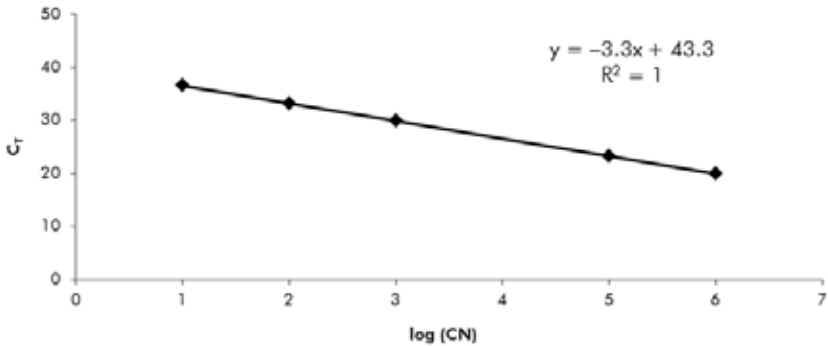
Kuva 8. PML-RARA bcr1 -standardien tunnistus (F1–F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ ja 10⁶ kopiota / 5 µl.

Tulokset

Standardikäyrä ja laatukriteerit

Käsittelemättömät tiedot voidaan liittää Excel®-tiedostoon analysointia varten.

Kunkin geenin (ABL ja PML-RARA) plasmidien standardilaimennuksista saadut käsittelemättömät C_T-arvot lasketaan lokin kopiomäärän mukaan (3, 4 ja 5 - C1, C2 ja C3; 1, 2, 3, 5 ja 6 - F1, F2, F3, F4 ja F5). Kuvassa 9 on esimerkki 5 standardilaimennuksen perusteella lasketusta teoreettisesta käyrästä.



Kuva 9. 5 standardilaimennuksesta laskettu teoreettinen käyrä. Kullekin geenille (ABL ja PML-RARA) lasketaan lineaarinen regressiokäyrä ($y = ax + b$), missä a on viivan kulmakerroin ja b on y -leikkauskohta eli sen pisteen y -koordinaatti, jossa viiva leikkaa y -akselin. Sen yhtälö ja determinaatikerroin (R^2) tulostetaan kaavioon.

Koska standardit ovat kymmenkertaisia laimennuksia, käyrän teoreettinen kulmakerroin on $-3,3$. Välillä $-3,0$ ja $-3,9$ oleva kulmakerroin on hyväksyttävä, kunhan R^2 on $> 0,95$ (6). $R^2 > 0,98$:n arvo on toivottava, jotta tulokset ovat tarkkoja (7).

Normalisoitu kopiomäärä (normalized copy number, NCN)

Tuntemattomien näytteiden (PPC-ABL:llä saadut) käsittelemättömät C_T -arvot tulisi muuntaa ABL-standardikäyrän yhtälöllä ABL-kopiomääräksi (ABL_{CN}).

Tuntemattomien näytteiden (PPF-PML-RARA:lla saadut) käsittelemättömät C_T -arvot tulisi muuntaa PML-RARA-standardikäyrän yhtälöllä PML-RARA-kopiomääräksi ($PML-RARA_{CN}$).

Näiden CN-arvojen suhteesta saadaan normalisoitu kopiomäärä (NCN):

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

MRD-arvo

Jäännöstaudin MRD-arvo on seurannan fuusiogeenin kontrolligeenin normalisoidun ilmentymisen $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ ja diagnostisten näytteiden $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ välinen suhde.

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

Herkkyys

Herkkyys ($SENS_v$) lasketaan fuusiogeenin suhteellisen ilmentymisen perusteella diagnoosivaiheessa $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ ja seurantanäytteen kontrolligeenin ilmentymisen $(CG_{CN,FUP})$ perusteella.

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

ABL-arvojen laadunvarmistus

RNA:n huono laatu ja qPCR-vaiheisiin liittyvät ongelmat voivat aiheuttaa pieniä ABL_{CN} -arvoja. Tulosten hylkääminen on suositeltavaa, jos näytteiden $ABL_{CN} < 1\ 318$ (EAC-tutkimuksen potilasnäytteiden 95 prosentin luotettavuusväliä pienempi arvo, viite 5).

Toistettavuus replikaattien välillä

Replikaattien välisten C_T -arvojen vaihtelun tulisi olla < 2 , joka vastaa nelinkertaista muutosta kopiomäärien arvoissa.

Replikaattien välisten C_T -arvojen vaihtelu on yleensä $< 1,5$, jos replikaattien keskimääräinen C_T -arvo on < 36 (6).

Huomautus: käyttäjien pitää mitata toistettavuus omassa laboratoriossaan.

Vesikontrollit

Negatiivisista kontrolleista tulisi saada nolla CN.

Positiivinen vesikontrolli aiheutuu ristikontaminaatiosta. Ratkaisuehjeita on kohdassa Ongelmien ratkaisu.

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisuopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja saat kliiniseltä koordinaattorilta ja osoitteesta www.qiagen.com.

Kommentteja ja ehdotuksia

Kontrolligeenin (ABL) ja PML-RARA bcr1:n negatiivinen tulos kaikissa näytteissä — standardi on ok

- a) RNA:n huono laatu Tarkista aina RNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.
Aja solulinjan RNA:n positiivinen kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091*) rinnakkain.
- b) Käänteistranskription vaihe epäonnistuu Tarkista aina RNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.
Aja solulinjan RNA:n positiivinen kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091*) rinnakkain.

Kontrolligeenin (ABL) negatiivinen tulos näytteissä — standardi on ok

- a) RNA:n huono laatu Tarkista aina RNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.
Aja solulinjan RNA:n positiivinen kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091*) rinnakkain.
- b) Käänteistranskription vaihe epäonnistuu Tarkista aina RNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.
Aja solulinjan RNA:n positiivinen kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091*) rinnakkain.

Standardin signaali on negatiivinen

- a) Pipetointivirhe Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Kommentteja ja ehdotuksia

- b) Sarjan komponenttien väärä säilytys Säilytä *ipsogen* PML-RARA bcr1 -sarjaa lämpötilassa -15 ... -30 °C ja pidä aluke- ja koetinseokset (PPC ja PPF) valolta suojattuna. Lisätietoja on kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely sivulla 13.
- Vältä toistuvaa jäädytystä ja sulatusta.
- Jaa reagenssit alikvootteihin säilytystä varten.

Negatiiviset kontrollit ovat positiivisia

- Ristikontaminaatio Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit.
- Toista koe käyttäen kaikista reagensseista uusia alikvootteja.
- Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita hyvien käytäntöjen mukaisesti, jotta näytteiden välistä kontaminaatiota ei tapahdu.

Ei signaalia, edes standardikontrolleissa

- a) Pipetointivirhe tai reagensseja jäänyt pois Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.
- b) Riittämättömästä puhdistuksesta johtuvat näytemateriaalin inhibitoriset vaikutukset Toista RNA:n valmistelut.
- c) LightCycler: Väärä havaintkanava on valittu Määritä kanava-asetukseksi F1/F2 tai 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Tiedonkeruuta ei ole ohjelmoitu Tarkista sykliohjelmat.
- Valitse keruumenetelmäksi Single PCR-ohjelman kunkin pariutumissegmentin lopussa.

Näytteiden signaali on heikko tai poissa, mutta standardikontrolleissa ei ongelmia

- a) RNA:n huono laatu tai riittämätön konsentraatio Tarkista aina RNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.
- Aja solulinjan RNA:n positiivinen kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091*) rinnakkain.

Kommentteja ja ehdotuksia

- b) Käänteistranskription vaihe epäonnistuu
- Tarkista aina RNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.
- Aja solulinjan RNA:n positiivinen kontrolli (*ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091*) rinnakkain.

Fluoresenssin voimakkuus ei riitä

- a) Sarjan komponenttien väärä säilytys
- Säilytä *ipsogen* PML-RARA bcr1 -sarjaa lämpötilassa $-15 \dots -30 \text{ }^\circ\text{C}$ ja pidä aluke- ja koetinsekset (PPC ja PPF) valolta suojattuna. Lisätietoja on kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely sivulla 13.
- Vältä toistuvaa jäädytystä ja sulatusta.
- Jaa reagenssit alikvootteihin säilytystä varten.
- b) Kohde-RNA:n hyvin pieni aloitusmäärä
- Lisää näyte-RNA:n määrää.
- Huomautus:** inhibitorisia vaikutuksia saattaa ilmetä valitun RNA-valmistelutavan mukaan.

LightCycler: Fluoresenssin voimakkuus vaihtelee

- a) Pipetointivirhe
- Pipetointivirheen aiheuttamaa vaihtelua voidaan vähentää analysoimalla tiedot F1/F2- tai 530 nm/640 nm -tilassa.
- b) Kapillaarien sentrifugointi ei riitä
- Valmistettu PCR-seos voi yhä olla kapillaarin yläosassa tai kapillaarin kärjessä voi olla ilmakupla.
- Sentrifugoi reaktioseoksella täytetyt kapillaarit aina laitteen käyttöohjeiden mukaan.
- c) Kapillaarin kärjen ulkopinta on likainen
- Käytä aina käsiineitä kapillaareja käsitellessäsi.

LightCycler: Standardikäyrän virhe

- Pipetointivirhe
- Pipetointivirheen aiheuttamaa vaihtelua voidaan vähentää analysoimalla tiedot F1/F2- tai 530 nm/640 nm -tilassa.

***Huomautus:** *ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091, on tarkoitettu vain tutkimuskäyttöön. Sitä ei saa käyttää diagnostiikkaan. Minkään väittämän tai esityksen tarkoituksena ei ole antaa tietoa sairauden diagnosoinnista, ehkäisystä tai hoidosta.

Laadunvarmistus

Koko sarjan laadunvarmistus on tehty LightCycler 480 -laitteella. Tämä sarja on valmistettu ISO 13485:2003 -standardin mukaisesti. Analyysin sertifiikaatteja voidaan tilata osoitteesta www.qiagen.com/support.

Rajoitukset

Käyttäjien on saatava koulutusta ja heidän on perehdyttävä tämän laitteen tekniikkaan ennen sen käyttöä. Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun, kohdassa Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen) sivulla 10 esitetyn laitteen kanssa.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa. Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratorioissa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Huomautus: Sarja on suunniteltu "Europe Against Cancer" (EAC) -tutkimusten mukaan (4, 5). Sitä on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoitujen reagenssien ja laitteiden kanssa. Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai osien muokkaaminen mitätöi QIAGENin vastuun.

Suorituskykyominaisuudet

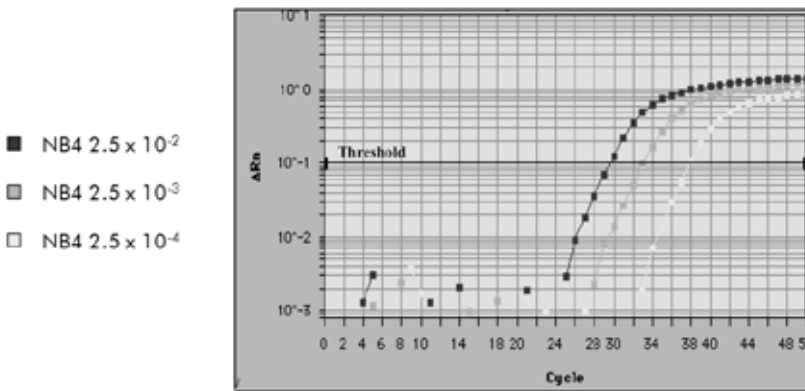
Ei-kliiniset tutkimukset

Materiaalit ja menetelmät

Suorituskykyä arvioitiin ABI PRISM 7700 SDS -laitteella ja kohdassa Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen) sivulla 10 esitetyillä reagensseilla. Ekvivalenssitutkimukset validoivat sen käytön seuraavissa laitteissa: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor-Gene 3000 ja SmartCycler.

Ei-kliinisissä tutkimuksissa selvitettiin *ipsogen* PML-RARA bcr1 -sarjan analyttistä suorituskykyä. Nämä ei-kliiniset laboratoriotutkimukset tehtiin NB4-solulinjan kokonais-RNA:lla, joka laimennettiin MV4-11-solulinjan kokonais-RNA:n vakiodussa lopullisessa määrässä.

Testin toistettavuuden määrittämiseksi NB4:n kokonais-RNA:n 5 eri konsentraatiota (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg ja 0,5 pg) laimennettiin MV4-11:n kokonais-RNA:n vakiodussa lopullisessa kokonaismäärässä 200 ng ja analysoitiin 5 replikaatissa ajoa kohti ja 4 eri ajossa. Näytteet, joiden NB4:n RNA-konsentraatio oli 5 pg ja 0,5 pg, olivat niin pieniä, ettei tuloksia saatu (kuva 10).



Kuva 10. Monistuskäyrät: NB4-solulinjan kokonais-RNA:n ja MV4-11-solulinjan negatiivisen kokonais-RNA:n laimennukset $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng) ja $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng).

Analyysitiedot

Taulukoissa 16–19 esitetään testien väliset analyysit, jotka sisältävät keskimääräisen kynnysyklin (threshold cycle, C_T), keskihajonnan (standard deviation, SD), näytteiden määrän (number of samples, n), vaihtelukertoimen (coefficient of variation, CV), keskimääräisen kopiomäärän (copy number, CN) ja keskimääräisen normalisoidun kopiomäärän (normalized copy number, NCN).

Taulukko 16. Testien välinen ja testin sisäinen analyysi — solulinjat PML-RARA ja ABL

Solulinja	Laimennus	Testien välinen analyysi				Testin sisäinen analyysi	
		C_T -keskiarvo	SD	n	CV (%)	Keskimääräinen CV	Suurin CV
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	–	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

Taulukko 17. Testien välinen analyysi — plasmidit

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

Taulukko 18. Testien välinen analyysi — solulinjat PML-RARA bcr1 ja ABL (keskimääräinen CN)

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

Taulukko 19. Testien välinen analyysi — solulinja PML-RARA bcr1 (keskimääräinen NCN)

Solulinja	Laimennus	Keskimääräinen NCN*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 µg)	271,4	150,00	20	55,56
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14

* Koskee vain näitä tutkimustuloksia:
NCN lasketaan kaavalla

$$\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$$

Kliiniset tutkimukset

Suorituskykyä arvioitiin ABI PRISM 7700 SDS -laitteella ja kohdassa Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen) sivulla 10 esitetyillä reagensseilla. Ekvivalenssitutkimukset validoivat sen käytön seuraavissa laitteissa: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor-Gene 3000 ja SmartCycler.

10 Euroopan maan 26 laboratorion ryhmä järjesti EAC:n koordinoiman hankkeen, jossa käytettiin *ipsogenin* plasmideja ja laadittiin standardoitu protokolla merkittävien leukemiaan liittyvien fuusiogeenien qPCR-analyysiä varten kliinisessä asetelmassa. PML-RARA bcr1 -transkripti oli yksi tutkimukseen kuuluvista fuusiogeeneista. Esitämme tässä yhteenvedon kyseisestä validointitutkimuksesta, jonka tulokset julkaistiin vuonna 2003 (4, 5).

Kontrolli- ja fuusiogeenien plasmidistandardien laboratorioden välinen toistettavuus 11 laboratoriossa tehtiin laboratorioden välinen toistettavuuskoe, jolla arvioitiin kontrolli- ja fuusiogeenien plasmidistandardien laimennusten mittausvaihtelua. Laimennukset tehtiin kahteen kertaan jokaisessa laitoksessa. Taulukko 20 sisältää laimennusten keskiarvon, keskihajonnan ja vaihtelukertoimen (%).

Taulukko 20. Kontrolli- ja fuusiogeenien plasmidistandardien laboratorioden välinen toistettavuus

Geeni	Laimennus	Keskiarvo	C _r SD	CV (%)
ABL-kontrolligeeni	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
PML-RARA bcr1 -fuusiogeeni	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin transkriptiin ilmentymisarvot

Taulukoista 21 ja 22 nähdään PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin transkriptin ja ABL-kontrolligeenin, NB4-solulinjan, APL-potilaiden diagnoosivaiheen ja negatiivisten kontrollipotilaiden ilmentymisarvot.

Taulukko 21. PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin transkriptin ja ABL-kontrolligeenin ilmentymisarvot — CT-arvot

	C _T -arvot (alue 95 %)	
	PML-RARA bcr1	ABL
NB4-solulinja	24,7	23,7
APL-potilaiden näytteet		
Luuydin (n = 14)	25,6 (23,1–27,5)	24,5 (21,7–28,5)
Perifeerinen veri (n = 9)	25,7 (23,7–29,4)	24,6 (22,0–27,4)
Negatiiviset potilasnäytteet		
Luuydin (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Perifeerinen veri (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

ABL:n C_T-arvot eivät poikkea merkittävästi normaalien ja leukeemisten näytteiden välillä eivätkä näytetyypin (PB tai BM) tai APL-potilaiden leukemianäytteiden välillä.

Taulukko 22. PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin transkriptin ja ABL-kontrolligeenin ilmentymisarvot — CN- ja NCN-arvot

	CN-arvot (alue 95 %)		NCN-arvot (alue 95 %)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Potilaiden näytteet			
Luuydin (n = 14)	5 129 (1 480–25 704)	1 538,7 (133,2–46 781,28)	0,30 (0,09–1,82)
Perifeerinen veri (n = 9)	3891 (475–14 454)	1400,76 (50,27–11 274)	0,36 (0,11–0,78)
Negatiiviset potilasnäytteet			
Luuydin (n = 26)	–	19 201 (12 922–25 480)	–
Perifeerinen veri (n = 74)	–	21 136 (17 834–24 437)	–

Väerien positiivisten ja väerien negatiivisten määrä

Väerien positiivisten ja negatiivisten määrä laskettiin seuraavilla kontrolleilla.

- I Positiiviset kontrollit: NB4-solut eli solulinja, joka on tunnettu positiivisuudestaan PML-RARA bcr1 -fuusiogeenille, potilaiden näytteet, jotka on jo analysoitu PML-RARA bcr1 -positiivisuuden suhteen
- I Negatiiviset kontrollit: Negatiiviset RNA-näytteet, NAC (no amplification control) -kontrollit, jotka on tehty *E. coli* -bakteerin RNA:sta ihmisen RNA:n sijasta PCR-kontaminaation tarkistamiseksi, ja NTC (no template control) -kontrollit, joissa oli vettä ihmisen RNA:n sijasta

Fuusiogeenin RNA-näytteiden monistus tehtiin kolme kertaa ja kontrolligeenin kaksi kertaa.

Väärä negatiivinen näyte määritettiin positiiviseksi RNA-näytteeksi, jossa oli alle 50 % positiivisista kuopista (0/2, 0/3 tai 1/3).

Väärä positiivinen näyte määritettiin negatiiviseksi näytteeksi, jossa oli vähintään 50 % positiivisista kuopista (1/2, 2/3 tai 3/3).

Taulukko 23 sisältää väerien negatiivisten ja positiivisten näytteiden määrän ja prosenttiosuuden.

Taulukko 23. Väärät negatiiviset ja väärät positiiviset näytteet

Väärä negatiivinen		Väärä positiivinen	
10^{-3}	10^{-4}	Fuusiogeenin negatiivinen kontrolli	NAC/NTC
0 % (0/29)	0 % (0/28)	11 % (5/45)	5 % (5/100)

Kirjallisuusviitteet

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

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:



<N>

Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon



Viimeinen käyttöpäivämäärä



Diagnostinen in vitro -lääkintälaite



Luettelonumero



Eränumero



Materiaalinumero (komponentin merkintä)



Maailmanlaajuinen kauppanimikkeiden yksilöintinumero



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet

Asiakirjan muutoshistoria

R5, marraskuu 2017

Huomautus lisätty: *ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091, on tarkoitettu vain tutkimuskäyttöön. Kirjoitusvirheitä korjattu.

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Kataloginumero
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	24 reaktiota varten: ABL-kontrolligeenistandardit, PML-RARA bcr1 - fuusiogeenistandardit, aluke- ja koetinseos ABL, aluke- ja koetinseos PML-RARA bcr1 -fuusiogeeni	672123
Rotor-Gene Q MDx — IVD-validoituun reaaliaikaiseen PCR-analyysiin kliinisessä käytössä		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sis. asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033

***ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja — PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin RNA:n eristyksen ja käännteistranskription kvalitatiiviseen validointiin**

ipsogen PML-RARA bcr1
Controls Kit

Solulinjat, joilla on PML-RARA bcr1 -fuusiogeenin negatiivinen, voimakas ja heikko positiivinen ilmentyminen

672091*

**ipsogen* PML-RARA bcr1 -kontrollisarja, luettelonumero 672091, on tarkoitettu vain tutkimuskäyttöön. Sitä ei saa käyttää diagnostiikkaan. Minkään väittämän tai esityksen tarkoituksena ei ole antaa tietoa sairauden diagnosoinnista, ehkäisystä tai hoidosta.

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä tuote on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. *ipsogen*-tuotteiden jälleenynty, muokkaus jälleenyntyä varten tai käyttö kaupallisten tuotteiden valmistukseen on kielletty ilman QIAGENin kirjallista lupaa.

Tässä asiakirjassa olevia tietoja saatetaan muuttaa ilman erillistä ilmoitusta. QIAGEN ei ole vastuussa mistään tässä asiakirjassa mahdollisesti olevista virheistä. Tämän asiakirjan uskotaan olevan julkaisuhetkenään kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, monenkertaisista tai seurannaisvahingoista, jotka liittyvät tämän asiakirjan käyttöön tai ovat seurausta sen käytöstä.

ipsogen-tuotteille on myönnetty takuu siitä, että ne ovat ilmoitettujen ominaisuuksiensa mukaisia. QIAGENin ainoa velvollisuus ja asiakkaan saama ainoa korvaus rajoittuu tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuun kertomalla tavalla.

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

***ipsogen* PML-RARA bcr1 -sarjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus**

Tämän tuotteen käyttö merkitsee tuotteen ostajan tai käyttäjän suostumusta seuraaviin ehtoihin:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käyttöoppaassa ja lisämateriaalissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
2. QIAGEN ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi kaantaa minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellon ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

HB-1358-005 1108718 mar-2017 © 2013-2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

