

August 2016

therascreen[®] IDH1 /2 RGQ PCR Kit Handbuch



Version 1

Zum Nachweis von 12 *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen bei
Gliom

IVD

In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM
Instrument

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R4 **MAT**

1075247DE

Sample to Insight



Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erklärung	4
Testprinzip	6
Mitgelieferte Materialien.....	9
Kit-Inhalt	9
Zusätzlich benötigtes Material.....	11
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	13
Sicherheitshinweise.....	13
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	13
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	15
Transportbedingungen	15
Lagerung	15
Haltbarkeit.....	15
Lagerung und Handhabung der Proben	15
Verfahren	17
DNA-Extraktion und -Vorbereitung	17
Protokoll: Nachweis von <i>IDH1/2</i> -Mutationen	20
Interpretation der Ergebnisse.....	27
Wasserkontrollen	27
Qualitätskontrolle mithilfe der C _T -Werte von Kontrollen.....	27

Probenvvalidierung	30
Probenergebnisse	30
Fehlerbehebung	36
Qualitätskontrolle.....	39
Anwendungseinschränkungen	39
Leistungsmerkmale	42
Leerwertgrenze (LOB).....	42
Nachweisgrenze (LOD).....	43
Effekt der verwendeten DNA-Menge	44
Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit	44
Methodenvergleich.....	47
Literatur	50
Symbole	52
Bestellinformationen	54

Verwendungszweck

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ist ein diagnostischer In-vitro-Test auf Basis der PCR-Technik zum qualitativen Nachweis von 7 Mutationen des *IDH1*-Gens und 5 Mutationen des *IDH2*-Gens sowie zur direkten Identifikation von 3 größeren Mutationen in DNA, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) menschlichem Hirngewebe extrahiert wurde.

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit soll als Hilfsmittel für die Klassifizierung von Gliomen dienen.

Zusammenfassung und Erklärung

Mutationen in den Isocitrat-Dehydrogenase-(IDH-)Genen *IDH1* und *IDH2* liegen häufig bei adulten Gliomen des WHO-Grads II und III sowie sekundären Glioblastomen des Grades IV (Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation) vor. Neben dem diagnostischen Nutzen steht das Vorliegen von *IDH1/2*-Mutationen in Zusammenhang mit einer positiven Prognose bei Gliompatienten (1–13).

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ist ein Assay zum Nachweis von 12 spezifischen *IDH1/2*-Mutationen: 6 innerhalb des Codons 132 des *IDH1*-Gens, 5 innerhalb des homologen Codons 172 des *IDH2*-Gens sowie 1 innerhalb des Codons 100 des *IDH1*-Gens (Tabelle 1). Mit dem Kit lassen sich außerdem die größeren *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen identifizieren, die zu den Substitutionen *IDH1* R132H, *IDH1* R132C und *IDH2* R172K führen.

Tabelle 1. IDH1- IDH2-Mutationen, die mit dem theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit nachgewiesen werden können

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

* Die COSMIC-IDs wurden dem Catalog of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) entnommen.

Testprinzip

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit enthält Reagenzien für 9 separate Amplifikationsreaktionen zum Nachweis von 12 Mutationen (Tabelle 1):

- 3 Gesamt-Amplifikationsreaktionen der Codons 132 und 100 des IDH1-Gens und des Codons 172 des IDH2-Gens
- 3 Mutations-Amplifikationsreaktionen der Codons 132 und 100 des IDH1-Gens und des Codons 172 des IDH2-Gens
- 3 mutationspezifische Amplifikationsreaktionen für die Mutationen IDH1 R132H, IDH1 R132C und IDH2 R172K

Gesamtreaktionsgemische

Die Primer- und Sondengemische für die Gesamtreaktion (PPM-Total) amplifizieren mittels Primern und Sonden sowohl mutierte als auch Wildtyp-Zielsequenzen (Abbildung 1).

Reaktionsgemische zum Mutationsnachweis

Die Primer- und Sondengemische zum Mutationsnachweis kombinieren Primer und Sonden zur Amplifikation sowohl von mutierten als auch von Wildtyp-Zielsequenzen mit einem für die Wildtyp-Zielsequenz spezifischen Oligonukleotid, das durch eine Phosphatgruppe an 3' blockiert ist, um eine Elongation zu verhindern (PCR-Clamping).

Wenn das PCR-Template die Wildtyp-Sequenz enthält, dominiert das 3'-Phosphat-Oligonukleotid aufgrund seiner höheren Affinität über die PCR-Primer-Bindung. Es gibt keine oder nur eine geringe Extension durch die DNA-Polymerase, und es wird keine oder eine geringe Amplifikation beobachtet.

Wenn eine mutierte Sequenz vorliegt, dominiert die PCR-Primer-Bindung über die 3'-Phosphat-Oligonukleotid-Bindung, und die Amplifikation läuft ab (Abbildung 1).

Reaktionsgemische zur Mutationsidentifikation

Die allelspezifische Amplifikation wird mit Hilfe der ARMS®-Technologie (Amplification Refractory Mutation System) erreicht, die auf der Fähigkeit der DNA-Polymerase beruht, zwischen einer Übereinstimmung und einer Nichtübereinstimmung am 3'-Ende eines PCR-Primers zu unterscheiden.

Wenn der PCR-Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz. Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, kommt es nur zu einer geringen Amplifikation im Hintergrund (Abbildung 1).

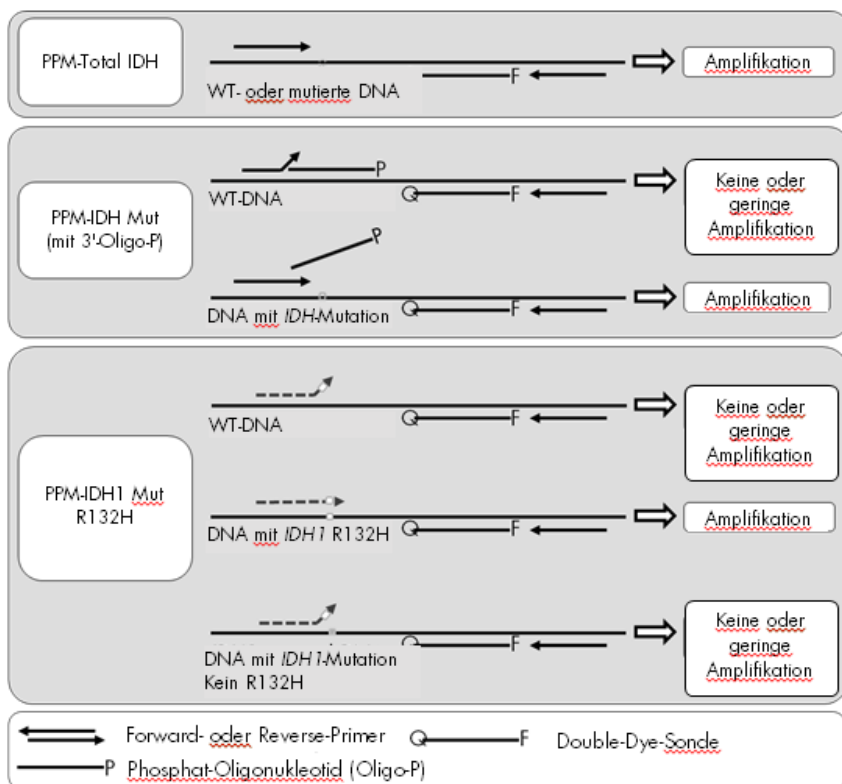


Figure 1. Results obtained with the primers and probe mixes in the *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit. The same principle shown to detect *IDH1* R132H applies for *IDH1* R132C and *IDH2* R172K.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalog-Nr.		873011
Anzahl der Reaktionen		20
Primer- und Sondengemisch zum Nachweis von <i>IDH1/R132</i> gesamt (Wildtyp und mutiert)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch zum Nachweis von <i>IDH2/R172</i> gesamt (Wildtyp und mutiert)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch zum Nachweis von <i>IDH1/R100</i> gesamt (Wildtyp und mutiert)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch (mit Oligo-P) zum Nachweis von mutiertem <i>IDH1/R132</i>	PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch (mit Oligo-P) zum Nachweis von mutiertem <i>IDH2/R172</i>	PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch (mit Oligo-P) zum Nachweis von mutiertem <i>IDH1/R100</i>	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Kit-Inhalt (Fortsetzung)

therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit		(20)
Katalog-Nr.		873011
Anzahl der Reaktionen		20
Primer- und Sondengemisch zur Identifikation der <i>IDH1</i> -Mutation R132H	PPM-IDH1 Mut R132H 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch zur Identifikation der <i>IDH1</i> -Mutation R132C	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Primer- und Sondengemisch zur Identifikation der <i>IDH2</i> -Mutation R172K	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
Genomische <i>IDH1/IDH2</i> -Wildtyp-DNA	IDH1/IDH2 WT Control	270 µl
Mutierte <i>IDH1/IDH2</i> -Positivkontrolle	IDH1/IDH2 Positive Control	270 µl
Gemisch aus <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl ₂ und Puffer für die qPCR	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Nukleasefreies Wasser	Nuclease-Free Water	5 x 525 µl
therascreen <i>IDH1/2 RGQ PCR Kit Handbook</i> (English)		1

Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen, die vom Hersteller des jeweiligen Produkts bereitgestellt werden.

Wichtig: Stellen Sie sicher, dass die in diesem Verfahren verwendeten Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Reagenzien (manuelle DNA-Extraktion)

- DNA-Extraktions-Kit: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 56404)
- RNase A (17.500 U) (Katalog-Nr. 19101)
- Xylen oder Histolemon™ (Carlo Erba, Katalog-Nr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Ethanol (96–100 %)
- 1x TE-Puffer, pH 8,0

Reagenzien (automatisierte DNA-Extraktion)

- DNA-Extraktions-Kit: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (Katalog-Nr. 937236)
- Puffer ATL (Katalog-Nr. 19076 oder 939016)
- RNase A (Katalog-Nr. 19101)
- Xylen oder Histolemon (Carlo Erba, Katalog-Nr. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Ethanol (96–100 %)
- 1x TE-Puffer, pH 8,0

Verbrauchsmaterialien

- Skalpelle

- Nukleasefreie, aerosolbeständige, sterile PCR-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern
- Nukleasefreie 2,0-ml- oder 1,5-ml-Röhrchen
- 0,1-ml-Röhrchenstreifen und Deckel für den Rotor-Gene Q (Katalog-Nr. 981103 oder 981106)
- Eis

Zusätzliche Verbrauchsmaterialien für die automatisierte DNA-Extraktion

- 8-Well-Probenvorbereitungskartuschen (Katalog-Nr. 997002)
- 8-Magnetstab-Schutzhülsen (Katalog-Nr. 997004)
- 200- μ l-Filterspitzen, Qsym SP (Katalog-Nr. 990332) und 1500- μ l-Filterspitzen, Qsym SP (Katalog-Nr. 997024)
- Elutionsmikroröhrchen CL (Katalog-Nr. 19588)
- 2,0-ml-Mikroröhrchen Typ H (Sarstedt®, Katalog-Nr. 72.693, www.sarstedt.com)

Geräte

- Objektträger-Rack und 2 kompatible Objektträgerbäder für Xylen/Histolemon und Ethanol
- Mikroliterpipetten für die PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1 000 μ l)
- Tischzentrifuge mit Rotor für 0,5-ml-/1,5-ml-Reaktionsröhrchen und Mikroplatten (zentrifugierbar bei 13 000–14 000 U/min)
- Tisch-Vortexer
- Echtzeit-PCR-System: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM und zugehöriges Spezialmaterial
- Rotor-Gene Q MDx Software, Version 2.1.0 oder höher
- Biophotometer
- Thermomixer, beheizter Orbitalinkubator, Wärmeblock oder Wasserbad zur Inkubation bei 56 °C und 90 °C

Zusätzliche Geräte für die automatisierte Aufreinigung

- QIA Symphony SP System
QIA Symphony SP Software, Version 4.0 oder höher

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen. Diese sind im PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Sicherheitshinweise für den verwendeten Reinigungs-Kit finden Sie im Handbuch des betreffenden Kits. Sicherheitshinweise zu Geräten finden Sie in den zugehörigen Benutzerhandbüchern.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Der Test ist für gepufferte, formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben aus chirurgischen Resektionen vorgesehen.
- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Die Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

- Die Reagenzien im *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann. Die Verwendung von Reaktionsvolumen (Reaktionsgemisch plus Probe) unter 25 µl wird nicht empfohlen.
- Alle im *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben Kit vorgesehen. Tauschen Sie keine Reagenzien zwischen verschiedenen *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kits aus, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann.
- Weitere Informationen zu Warnhinweisen, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren finden Sie im Benutzerhandbuch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments.
- Die Veränderung der Inkubationsdauer und der Temperaturen kann zu falschen oder widersprüchlichen Ergebnissen führen.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Die Primer- und Sondengemische können sich durch Lichteinwirkung verändern.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Gemische mit synthetischem Material zu vermeiden, das im Positivkontrollreagenz enthalten ist.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination mit DNase zu vermeiden, die zu einer Zersetzung der Template-DNA führen kann.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Reaktionsgemische und die Zugabe der Templates einzelne Pipetten, die ausschließlich für den jeweiligen Vorgang vorgesehen sind.
- Führen Sie die Vorbereitung und Dispensierung der Reaktionsgemische in einem Bereich durch, der von dem Bereich, in dem das Template zugegeben wird, physisch getrennt ist.
- Warten Sie das Ende des Laufs ab, bevor Sie das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument öffnen.
- Öffnen Sie die Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Röhrchen nach dem Lauf nicht.
- Ergreifen Sie alle Vorsichtsmaßnahmen, um sicherzustellen, dass die Proben korrekt analysiert werden. Achten Sie diesbezüglich besonders auf das Einsetzen der Proben, Beladungsfehler und Pipettierfehler.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Transportbedingungen

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versendet. Wenn Bestandteile des *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kits beim Empfang nicht gefroren sind, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde oder die Lieferung keine Stückliste, kein Handbuch oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktinformationen siehe unter www.qiagen.com).

Lagerung

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -15 bis -30 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden.

Haltbarkeit

Bei Lagerung unter den angegebenen Lagerungsbedingungen ist der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bis zum Ablauf des angegebenen Verfallsdatums stabil.

Nach dem Öffnen können die Reagenzien bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei -15 bis -30 °C in der Originalverpackung gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. 5 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden.

Lagerung und Handhabung der Proben

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ist für DNA-Proben vorgesehen, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe extrahiert wurden, das

bei Patienten mit Hirntumoren chirurgisch reseziert wurde. Alle Gewebeproben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.

- Gewebeproben müssen in 4–10 % neutral gepuffertem Formalin (NBF) fixiert werden.
- Aus dem Paraffinblock müssen 10- μ m-Serienschnitte hergestellt und auf Glasobjektträger aufgezogen werden.
- Eine qualifizierte Person (z. B. ein Pathologe) sollte den Tumorgehalt und die Umgebung an einem danebenliegenden, mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Schnitt begutachten. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.
- Für den Test sind nur Schnitte mit ≥ 40 % Tumorgehalt geeignet.
- Bei Schnitten mit einer Gewebefläche von < 50 mm² wird empfohlen, eine ausreichende Zahl von Schnitten zu verarbeiten, um eine Gesamtfläche von mindestens 50 mm² (bzw. 100 mm² bei automatisierter Extraktion auf dem QIASymphony SP) zu erreichen.
- Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Tumorproben, Blöcke, Objektträger und Proben, die für die Extraktion bereit sind, auf kontrollierte Weise und unter Einhaltung der geltenden Vorschriften.
- Lagern Sie FFPE-Blöcke und Objektträger bei Raumtemperatur. Objektträger können vor der DNA-Extraktion zur Untersuchung mit dem theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit bis zu 4 Wochen lang bei Umgebungstemperatur gelagert werden.
- Genomische DNA kann nach der Extraktion bei 2 bis 8 °C bis zu 1 Woche lang oder bei –15 bis –25 °C bis zu 8 Wochen lang gelagert werden.

Verfahren

DNA-Extraktion und -Vorbereitung

Verwenden Sie zur Aufreinigung genomischer DNA aus Proben, aus FFPE-Hirntumorproben hergestellt wurden, den QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 56404) oder den QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Katalog-Nr. 937236).

Hinweis: Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit wurde nur in Kombination mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit bzw. dem QIASymphony DSP DNA Mini Kit validiert. Verwenden Sie kein anderes Produkt zur DNA-Extraktion.

Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits



Lesen Sie aufmerksam die folgenden Veränderungen, die auf das QIAamp Protokoll angewendet werden müssen.

- Informationen zur Vorbereitung der Proben vor der Entparaffinierung und DNA-Extraktion finden Sie unter „Starting material“ (Ausgangsmaterialien) im *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* sowie unter „Lagerung und Handhabung der Proben“ auf Seite 15 im vorliegenden Handbuch.
- Der QIAamp DNA FFPE Tissue Kit darf nur manuell eingesetzt werden.
- Der im *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* beschriebene RNase-Schritt muss ausgeführt werden.
- Die QIAGEN Entparaffinierungslösung darf nicht verwendet werden. Wenden Sie zur Entparaffinierung ausschließlich die unter „Verfahren zur Objekträger-Entparaffinierung bei Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits“ weiter unten beschriebene Xylen-/Ethanolmethode an. Xylen kann durch Histolemon (Xylenurrogat) ersetzt werden.
- Der Proteinase-K-Verdau muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.

- Die Proben müssen zweimal in 30 µl Elutionspuffer (ATE-Puffer) aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit eluiert werden.
- The samples must be eluted twice into 30 µl of elution buffer (Buffer ATE) from the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Verfahren zur Objektträger-Entparaffinierung bei Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits

1. Legen Sie die Objektträger in ein passendes Objektträger-Rack.
2. Stellen Sie das Rack 2 Minuten lang in Objektträgerbad mit Xylen oder Histolemon. Schütteln Sie das Bad mit 2 oder 3 Vor- und Rückwärtsbewegungen.
3. Stellen Sie das Rack 2 Minuten lang in ein zweites Objektträgerbad mit Ethanol (96–100 %). Schütteln Sie das Bad mit 2 oder 3 Vor- und Rückwärtsbewegungen.
4. Trocknen Sie die Objektträger bei 15–37 °C. Dies dauert einige Minuten.
5. Kennzeichnen Sie 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen für jede Probe, und geben Sie in jedes Röhrchen 180 µl ATL-Puffer (aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
6. Geben Sie einige Tropfen ATL-Puffer auf die Gewebeschnitte auf den Objektträgern (genug, um die Gewebefläche zu bedecken).
7. Schaben Sie die Gewebefläche mit einem sterilen Skalpell, und geben Sie das abgeschabte Gewebe in das entsprechend gekennzeichnete Mikrozentrifugenröhrchen.
8. Geben Sie in jedes Röhrchen 20 µl Proteinase K (aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) und mischen Sie die Röhrchen im Vortexer.
9. Inkubieren Sie die Röhrchen 1 Stunde bei 56 °C.

Fahren Sie mit dem 90-°C-Inkubationsschritt aus dem Protokoll des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits fort (Schritt 12 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*, Juni 2012, Seite 13).

Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kits



Lesen Sie aufmerksam die folgenden Veränderungen, die auf das QIASymphony SP Protokoll Tissue_LC_200_V7_DSP angewendet werden müssen:

- Informationen zur Vorbereitung der Proben vor der Entparaffinierung und DNA-Extraktion finden Sie unter „Lagerung und Handhabung der Proben“ auf Seite 15.
- Der im QIASymphony SP Protokoll beschriebene RNase-Schritt muss ausgeführt werden.
- Die QIAGEN Entparaffinierungslösung darf nicht verwendet werden. Wenden Sie zur Entparaffinierung ausschließlich die unter „Verfahren zur Objektträger-Entparaffinierung bei Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kits“ weiter unten beschriebene Xylen-/Ethanolmethode an. Xylen kann durch Histolemon (Xylensurrogat) ersetzt werden.
- Der Proteinase-K-Verdau muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Auf dem Touchscreen muss als Elutionsvolumen 50 µl gewählt werden.

Verfahren zur Objektträger-Entparaffinierung bei Verwendung des QIASymphony DSP DNA Mini Kits

Führen Sie zur Entparaffinierung die folgenden Schritte aus, die sich vom QIASymphony SP Protokoll Tissue_LC_200_V7_DSP unterscheiden.

1. Legen Sie die Objektträger in ein passendes Objektträger-Rack.
2. Stellen Sie das Rack 2 Minuten lang in Objektträgerbad mit Xylen oder Histolemon. Schütteln Sie das Bad mit 2 oder 3 Vor- und Rückwärtsbewegungen.
3. Stellen Sie das Rack 2 Minuten lang in ein zweites Objektträgerbad mit Ethanol (96–100 %). Schütteln Sie das Bad mit 2 oder 3 Vor- und Rückwärtsbewegungen.
4. Trocknen Sie die Objektträger bei 15–37 °C. Dies dauert einige Minuten.
5. Kennzeichnen Sie 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen für jede Probe, und geben Sie in jedes Röhrchen 220 µl ATL-Puffer.

6. Geben Sie einige Tropfen ATL-Puffer auf die Gewebeschnitte auf den Objektträgern (genug, um die Gewebefläche zu bedecken).
7. Schaben Sie die Gewebefläche mit einem sterilen Skalpell, und geben Sie das abgeschabte Gewebe in das entsprechend gekennzeichnete Mikrozentrifugenröhrchen.
8. Geben Sie in jedes Röhrchen 20 µl Proteinase K (aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) und mischen Sie die Röhrchen im Vortexer.

Fahren Sie mit dem 56-°C-Inkubationsschritt aus dem QIAsymphony SP Protokoll Tissue_IC_200_V7_DSP fort (Schritt 12 im Protokoll „Deparaffinization using xylene“ [Entparaffinierung mit Xylen], April 2012). Inkubieren Sie die Röhrchen 1 Stunde bei 56 °C.

Genomische DNA

Genomische DNA kann nach der Extraktion bei 2 bis 8 °C bis zu 1 Woche lang oder bei –15 bis –25 °C bis zu 8 Wochen gelagert werden.

Bestimmen Sie die DNA-Menge durch Messung der optischen Dichte (OD) der Probe bei 260 nm.

Verdünnen Sie die DNA auf eine Konzentration von 5 ng/µl in 1x TE-Puffer mit pH 8,0.

Die PCR-Reaktion ist für Proben optimiert, die 25 ng gereinigte genomische DNA enthalten.

Protokoll: Nachweis von *IDH1/2*-Mutationen

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Zum optimalen Einsatz des theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kits müssen die Proben in Chargen von je 4 Proben aufgeteilt werden. Bei kleineren Chargengrößen verringert sich die Anzahl der Proben, die mit dem theascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit getestet werden können.

- Es wird empfohlen, alle Proben einmal pro PCR-Lauf zu testen, wie in Tabelle 2 angegeben, und den Ladeblock und die Rotoreinrichtung, wie in Tabelle 3 und Abbildung 2 angegeben, einzustellen.

Tabelle 2. Anzahl der Reaktionen für Rotor-Gene Q MDx Instrumente mit 72-Röhrchen-Rotor

Proben	Reaktionen
n DNA-Proben	n x 1 Reaktion
2 DNA-Kontrollen	2 Reaktionen: Positiv- und WT-Kontrolle, jeweils einmal pro PCR-Lauf getestet
Wasserkontrolle	1 Reaktion

Tabelle 3. Empfohlener Ladeblock für eine Analyse mit dem thetascreen IDH1/2 RQG PCR Kit

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

* PK: Positivkontrolle

† WTK: Wildtyp-Kontrolle

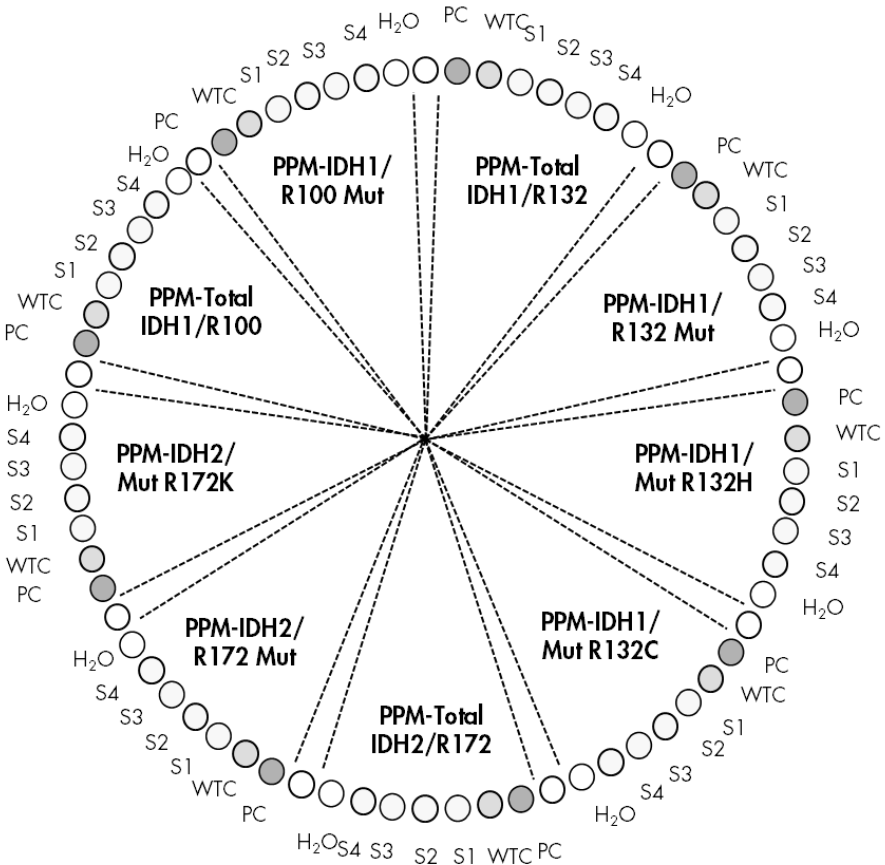


Abbildung 2. Empfohlene Rotoreinrichtung für eine Analyse mit dem *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass immer eine Probe in Position 1 des Rotors steht. Andernfalls führt das Instrument keine Kalibration durch, und es werden falsche Fluoreszenzdaten erfasst.

Verfahren

1. Tauen Sie alle erforderlichen Komponenten auf, und lagern Sie sie auf Eis.
2. Stellen Sie die folgenden PCR-Gemische entsprechend der Anzahl der zu verarbeitenden Proben her.

Alle Konzentrationen beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

In Tabelle 4 ist das Pipettierschema für die Herstellung eines Reagenziengemischs dargestellt. Die Werte sind so berechnet, dass ein Endreaktionsvolumen von 25 µl erreicht wird. Für jedes PPM kann ein Vorgemisch entsprechend der Anzahl der Reaktionen hergestellt werden. Zusätzliches Volumen ist eingerechnet, um Pipettierfehler auszugleichen.

Tabelle 4. Herstellung der PCR-Gemische

Komponente	Vorgemisch*:		
	1 Reaktion (µl)	7 + 1 Reaktionen (µl)	Endkonzentration
qPCR Master Mix, 2x	12.5	100	1x
PPM, * 25x	1	8	1x
Nukleasefreies Wasser	6.5	52	–
Probe oder Kontrolle† (in Schritt 4 zuzugeben)	5	je 5	–
Total volume	25	je 25	–

* Stellen Sie 9 Vorgemische her, aus jedem der im Kit enthaltenen PPM jeweils eines.

† Positivkontrolle, Negativkontrolle oder Wasserkontrolle.

3. Geben Sie in jedes Rotor Gene Röhrrchen 20 µl Vorgemischlösung (Tabelle 3).
4. Geben Sie 5 µl des zu quantifizierenden Materials (25-ng-Probe genomische DNA oder Kontrolle) in das entsprechende Röhrrchen (Gesamtvolumen 25 µl; Tabelle 3).
5. Mischen Sie den Inhalt vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren.
6. Setzen Sie die Röhrrchen in den Adapter, der mit dem Instrument mitgeliefert wird (Abbildung 2).
Nicht verwendete Positionen müssen mit leeren Röhrrchen gefüllt werden.
7. Setzen Sie den gefüllten Adapter in das Rotor Gene Q MDx Instrument.
8. Programmieren Sie das Rotor Gene Q MDx Instrument mit dem Temperaturzyklusprogramm wie in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5. Temperaturprofil

Halten	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 min
Zyklus	40-mal 95 °C für 15 Sek. 60 °C für 60 Sek. mit Messung der FAM™-Fluoreszenz im Kanal „Green: Single“ (Grün: einzeln).

9. Klicken Sie im Dialogfeld „**New Run Wizard**“ (Assistent für neue Läufe) auf „**Gain Optimisation**“ (Verstärkungsoptimierung), um das Dialogfeld „**Auto-Gain Optimisation Setup**“ (Einrichtung der automatischen Verstärkungsoptimierung) zu öffnen. Stellen Sie als Bereich für den Kanal „**Green**“ (Grün) 2 Fl für „**Min Reading**“ (Min. Messwert) und 10Fl für „**Max Reading**“ (Max. Messwert) ein.
10. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen „**Perform Optimisation Before 1st Acquisition**“ (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen), und schließen Sie das Dialogfeld „**Auto-Gain Optimisation Setup**“.
11. Starten Sie das Temperaturzyklusprogramm.
12. Führen Sie nach Ende des Temperaturzyklusprogramms die folgenden Schritte aus.
 - Wählen Sie „**Options**“ (Optionen) und „**Crop Start Cycles**“ (Erste Zyklen löschen). Entfernen Sie die Daten vor Zyklus 10, um Artefakte auszusondern.
 - Wählen Sie „**Analysis**“ (Analyse) und „**Cycling A. Green from 10**“ (Zyklus A. Grün von 10), im Bericht als „**left threshold = 10.00**“ (Linker Schwellenwert = 10,00“) angegeben.
 - Wählen Sie als Normalisierungsmethode „**Dynamic Tube**“ (Dynamisches Röhrchen) und wählen Sie „**Slope Correct**“ (Steigungskorrektur), um die Störsignalsteigung zu korrigieren.
 - Setzen Sie „**Outlier Removal**“ (Ausreißer entfernen) auf 0 % (entsprechend dem NTC-Schwellenwert).
 - Deaktivieren Sie die Option „**Reaction Efficiency Threshold**“ (Reaktionseffizienzschwellenwert).
 - Setzen Sie den Schwellenwert auf 0,03.
 - Setzen Sie den Graphen auf den linearen Bereich.
 - Wählen Sie „**Digital Filter: Light**“ (Digitalfilter: Leicht).

Interpretation der Ergebnisse

Wasserkontrollen

Wasserkontrollen (Kontrollen ohne Template) sollten bei allen Primer- und Sondengemischen C_T -Werte von null ergeben.

Wenn eine Wasserkontrolle einen positiven C_T -Wert liefert, ist eine Kreuzkontamination die Ursache. Hinweise zur Behebung des Problems finden Sie unter „Fehlerbehebung“ auf Seite 36.

Qualitätskontrolle mithilfe der C_T -Werte von Kontrollen

Die *IDH1/2*-Wildtyp-Kontrolle (WTK) und die mutierte *IDH1/2*-Positivkontrolle (Mut.-PK) ermöglichen die Qualifizierung von Analysen.

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R132 Mut} = C_T \text{ IDH1/R132 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2/R172 Mut} = C_T \text{ IDH2/R172 Mut} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1/R100 Mut} = C_T \text{ IDH1/R100 Mut} - C_T \text{ Total IDH1/R100}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132H} = C_T \text{ IDH1 Mut R132H} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH1 Mut R132C} = C_T \text{ IDH1 Mut R132C} - C_T \text{ Total IDH1/R132}$$

$$\Delta C_T \text{ IDH2 Mut R172K} = C_T \text{ IDH2 Mut R172K} - C_T \text{ Total IDH2/R172}$$

Wenn für eine Probe ein C_T -Wert von 0 ermittelt wird, verwenden Sie einen C_T -Wert von 40, um den ΔC_T -Wert zu berechnen.

Kontrollen werden als mutationspositiv eingestuft, wenn die ΔC_T -Werte kleiner oder gleich den betreffenden ΔC_T -Cut-off-Werten sind, die in Tabelle 6 aufgeführt sind.

Tabelle 6. Cut-off-Werte für die einzelnen Mutations-Assays

Mutation assays	Cut-off (ΔC_t)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

- Die IDH1/2-Wildtypkontrolle muss von jedem Mutations-Assay als mutationsnegativ erkannt werden (Tabelle 7).
- Die mutierte IDH1/2-Positivkontrolle muss von jedem Mutations-Assay als mutationspositiv erkannt werden (Tabelle 7).

Wenn nicht beide Bedingungen erfüllt sind, wird die gesamte Analyse verworfen.

Tabelle 7. Beispiel für eine Laufvalidation mit Kontrollen

	Wasser (NTC)	IDH1/IDH2- WT-Kontrolle	IDH1/IDH2- Positivkontrolle
C_T Total IDH1/R132	Nicht nachgewiesen	25.45	23.95
C_T IDH1/R132 Mut	Nicht nachgewiesen	34.32	25.76
ΔC_T IDH1/R132 Mut	Nicht nachgewiesen	8.87	1.81
C_T Total IDH2/R172	Nicht nachgewiesen	25.42	24.93
C_T IDH2/R172 Mut	Nicht nachgewiesen	34.36	26.36
ΔC_T IDH2/R172 Mut	Nicht nachgewiesen	8.94	1.43
C_T Total IDH1/R100	Nicht nachgewiesen	26.30	24.69
C_T IDH1/R100 Mut	Nicht nachgewiesen	33.04	26.39
ΔC_T IDH1/R100 Mut	Nicht nachgewiesen	6.74	1.70
C_T IDH1 Mut R132H	Nicht nachgewiesen	35.20	26.48
ΔC_T IDH1 Mut R132H	Nicht nachgewiesen	9.75	2.53
C_T IDH1 Mut R132C	Nicht nachgewiesen	37.16	27.07
ΔC_T IDH1 Mut R132C	Nicht nachgewiesen	11.71	3.12
C_T IDH2 Mut R172K	Nicht nachgewiesen	40.00	27.97
ΔC_T IDH2 Mut R172K	Nicht nachgewiesen	14.58	3.04

Probenvalidierung

Vor der Interpretation muss eine verwendete Probe validiert werden.

Der C_T -Wert, der mit jedem PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ und $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) für eine Probe ermittelt wird, muss unter 32,00 liegen. $C_{T \text{ Total}}$ -Werte $\geq 32,00$ werden durch eine schlechte DNA-Qualität verursacht. Die Probe muss erneut getestet werden. Wenn die Menge an DNA weiterhin unzureichend ist, extrahieren Sie mehr Tumorgewebe, sofern verfügbar (siehe „Fehlerbehebung“ auf Seite 36).

Probenergebnisse

Nachweis von *IDH1/2*-Mutationen

Berechnen Sie für jede Probe wie folgt die ΔC_T -Werte für die einzelnen Mutationsnachweis-Assays (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut).

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R132 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} = C_{T \text{ IDH2/R172 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} = C_{T \text{ IDH1/R100 Mut}} - C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$$

Wenn für eine Probe ein C_T -Wert von 0 ermittelt wird, verwenden Sie einen C_T -Wert von 40, um den ΔC_T -Wert zu berechnen.

Proben werden als mutationspositiv eingestuft, wenn der ΔC_T -Wert kleiner oder gleich dem betreffenden ΔC_T -Cut-off-Wert ist, der in Tabelle 8 für den betreffenden Mutationsnachweis-Assay angegeben ist.

Tabelle 8. Cut-off-Werte für die einzelnen Mutations-Assays

Mutation assays	Cut-off (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65

Identifikation von *IDH1/2*-Mutationen

Berechnen Sie für jede Probe wie folgt die ΔC_T -Werte für die einzelnen Mutationsidentifikations-Assays (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K).

$$\Delta C_{T \text{ IDH1 Mut R132H}} = C_{T \text{ IDH1 Mut R132H}} - C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH1 Mut R132C}} = C_{T \text{ IDH1 Mut R132C}} - C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$$

$$\Delta C_{T \text{ IDH2 Mut R172K}} = C_{T \text{ IDH2 Mut R172K}} - C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$$

Wenn für eine Probe ein C_T -Wert von 0 ermittelt wird, verwenden Sie einen C_T -Wert von 40, um den ΔC_T -Wert zu berechnen.

Die Mutation der Probe wird identifiziert, wenn der ΔC_T -Wert kleiner oder gleich dem ΔC_T -Cut-off-Wert ist, der in Tabelle 9 für den betreffenden

Tabelle 9. Cut-off-Werte für die einzelnen Mutationsidentifikations-Assays

Mutation assays	Cut-off (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

Tabelle 10. Beispiel für den Nachweis einer IDH1/2-Mutation

Wert	Probe 1	Probe 2
C_T Total IDH1/R132	26.39	26.32
C_T IDH1/R132 Mut	33.86	28.29
ΔC_T IDH1/R132 Mut	7.47	1.97
C_T Total IDH2/R172	26.79	25.79
C_T IDH2/R172 Mut	35.13	35.21
ΔC_T IDH2/R172 Mut	8.34	9.42
C_T Total IDH1/R100	27.20	27.37
C_T IDH1/R100 Mut	33.83	33.76
ΔC_T IDH1/R100 Mut	6.63	6.39
Mutationsnachweis	Keine Mutation nachgewiesen	R132-Mutation nachgewiesen

Tabelle 11. Beispiel für die Identifikation einer *IDH1/2*-Mutation

Wert	Probe 1	Probe 2
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C_T <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i>	33.82	28.27
ΔC_T <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i>	7.43	1.95
C_T Total <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
C_T <i>IDH1</i> Mut <i>R132C</i>	37.94	40.00
ΔC_T <i>IDH1</i> Mut <i>R132C</i>	11.55	13.68
C_T Total <i>IDH2/R172</i>	26.79	25.79
C_T <i>IDH2</i> Mut <i>R172K</i>	40.00	40.00
ΔC_T <i>IDH2</i> Mut <i>R172K</i>	13.21	14.21
Mutationsidentifikation	Keine Mutation nachgewiesen	Mutation nachgewiesen für <i>R132H</i>

Interpretation von *IDH1/2*-Mutationen

Die Vorgehensweise zum Zuordnen des *IDH1/2*-Mutationstyps zu Proben, die positiv auf eine *IDH1/2*-Mutation getestet wurden, ist in Tabelle 12 dargestellt. Ein Beispiel für die Interpretation ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12. Interpretationsleitfaden

		Mutationsidentifikation			
		<i>IDH1</i> Mut R132H nach- gewiesen	<i>IDH1</i> Mut R132C nach- gewiesen	<i>IDH2</i> Mut R172K nach- gewiesen	Keine Mutation nachgewiesen
Mutationsnachweis	R132-Mutation nach-gewiesen	R132H-Mutation nachgewiesen	R132C-Mutation nachgewiesen	–	R132-Mutation, aber weder R132H noch R132C
	R172-Mutation nach-gewiesen	–	–	R172K-Mutation nach-gewiesen	R172-Mutation, aber nicht R172K
	R100-Mutation nach-gewiesen	–	–	–	R100
	Keine Mutation nach-gewiesen	Geringer Gehalt an Mutation R132H nach-gewiesen (1–2 %)*	Geringer Gehalt an Mutation R132C nach-gewiesen (1–4 %)*	Geringer Gehalt an Mutation R172K nach-gewiesen (ca. 1 %)*	Keine Mutation nachgewiesen

* Diese Fälle treten selten auf; alle Proben sowie die technischen Abnahmekriterien müssen überprüft werden, insbesondere der Gehalt an Tumorzellen. Wenn alle Kriterien erfüllt sind, muss die Probe erneut getestet werden.

Tabelle 13. Beispiel für einen IDH1/2-Mutationsbericht mit Interpretation

	Probe 1	Probe 2
Mutationsnachweis	Keine Mutation nachgewiesen	R132-Mutation nachgewiesen
Mutationsidentifikation	Keine Mutation nachgewiesen	Mutation nachgewiesen für R132H
Interpretation der Ergebnisse	Keine Mutation nachgewiesen oder identifiziert	R132H mutiert

Hinweis: Wenn eine Probe 2 oder mehr ΔC_T -Werte aufweist, die kleiner oder gleich den ΔC_T -Cut-off-Werten sind, wird der Mutation mit der größten Differenz zwischen Cut-off-Wert und dem ermittelten ΔC_T -Wert der Mutantenstatus zugewiesen. Siehe Beispiel in Tabelle 14.

Tabelle 14. Beispiel für die Interpretation im Fall mehrerer Positivergebnisse

	Probe 3	Probe 4
ΔC_T IDH1/R132 Mut	1.24	5.24
ΔC_T cutoff IDH1/R132 Mut	5.34	5.34
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ IDH1/R132 Mut	4.10	0.10
ΔC_T IDH2/R172 Mut	5.32	5.95
ΔC_T cutoff IDH2/R172 Mut	6.42	6.42
$(\Delta C_T \text{ cutoff} - \Delta C_T)$ IDH2/R172 Mut	1.10	0.47
Interpretation der Ergebnisse	R132 mutiert	R172 mutiert

Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie unter www.qiagen.com.

Kommentare und Vorschläge

Verstopfte Säule während der DNA-Extraktion

Unvollständige Lyse	Proben erneut zentrifugieren. Das übrige Lysat kann in eine neue Säule übertragen werden. Extraktionslauf mit weniger FFPE-Gewebe wiederholen.
---------------------	--

Zu wenig DNA im Extraktionseluat

Unzureichende FFPE-Gewebefläche	Extraktionslauf mit mehr FFPE-Gewebeschnitten wiederholen.
---------------------------------	--

Keine *IDH1/2*-WT-Kontrolle erkannt

- | | |
|--|--|
| a) Pipettierfehler oder vergessene Reagenzien; Verwechslung von Röhrchen oder Positionen | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. PCR-Testlauf wiederholen. |
| b) Falsche Lagerung von Kit-Komponenten | <i>therascreen IDH1/2</i> RGQ PCR Kit bei -15 °C bis -30 °C lagern und Primer- und Sondengemische vor Lichteinwirkung schützen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 15).
5 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden. |
| c) <i>therascreen IDH1/2</i> RGQ PCR Kit abgelaufen | Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) überprüfen, und bei Bedarf einen neuen <i>therascreen IDH1/2</i> RGQ PCR Kit verwenden. |

Kommentare und Vorschläge

Keine *IDH1/2*-Positivkontrolle erkannt

- | | |
|--|--|
| a) Pipettierfehler oder vergessene Reagenzien; Verwechslung von Röhren oder Positionen | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen.
PCR-Testlauf wiederholen. |
| b) Falsche Lagerung von Kit-Komponenten | <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> bei -15 °C bis -30 °C lagern und Primer- und Sondengemische vor Lichteinwirkung schützen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 15).
5 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden. |
| c) <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> abgelaufen | Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) überprüfen, und bei Bedarf einen neuen <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> verwenden. |

Kein Signal, auch nicht für Kontrollen

- | | |
|--|--|
| a) Kein Reaktionsröhrchen an Position 1 des Rotor-Gene Q MDx Instruments | Sicherstellen, dass immer eine Probe in Position 1 des Rotors steht. Andernfalls führt das Instrument keine Kalibration durch, und es werden falsche Fluoreszenzdaten erfasst. |
| b) Pipettierfehler oder vergessene Reagenzien; Verwechslung von Röhren oder Positionen | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen.
PCR-Testlauf wiederholen. |
| c) Falsche Lagerung von Kit-Komponenten | <i>therascreen IDH1/2 RGQ PCR Kit</i> bei -15 °C bis -30 °C lagern und Primer- und Sondengemische vor Lichteinwirkung schützen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 15).
5 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden. |

Kommentare und Vorschläge

- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit abgelaufen Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) überprüfen, und bei Bedarf einen neuen *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit verwenden.
- e) Falscher Detektionskanal gewählt Detektionskanal auf „Cycling Green“ oder 530 nm/640 nm setzen.
- f) Kein Datenerfassungsprogramm Zyklusprogramm überprüfen (siehe Tabelle 5 auf Seite 25).
Am Ende jedes Annealing-Segments des PCR-Programms den Erfassungsmodus „Single“ (Einzel) wählen.

Schwankende Fluoreszenzintensität

- Pipettierfehler oder vergessene Reagenzien; Verwechslung von Röhren oder Positionen Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. PCR-Testlauf wiederholen.

Zu schwache Fluoreszenzintensität

- a) Falsche Lagerung von Kit-Komponenten *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern und Primer- und Sondengemische vor Lichteinwirkung schützen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 15).
5 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden.
- b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit abgelaufen Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) überprüfen, und bei Bedarf einen neuen *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit verwenden.

Kommentare und Vorschläge

- c) Ziel-DNA-Menge sehr gering
Vor Beginn stets die DNA-Konzentration prüfen (siehe „DNA-Extraktion und -Vorbereitung“ auf Seite 17).

Positivergebnis bei Negativkontrolle (H₂O)

Kreuzkontamination,
Reagenzienkontamination,
Instrumentenfehler,
Verwechslung von
Positionen oder Röhren,
Probenzersetzung

Alle kritischen Reagenzien austauschen oder einen neuen *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit verwenden.
Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsmaterialien stets gemäß den allgemein akzeptierten Verfahren handhaben, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden.

Primer- und Sondengemische vor Lichteinwirkung schützen.

Fluoreszenzkurven auf falsch-positive Ergebnisse überprüfen.

Reaktionseinrichtung überprüfen (siehe „Protokoll: Nachweis von *IDH1/2-Mutationen*“ auf Seite 20).

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet. Analysenzertifikate sind auf Anfrage unter www.qiagen.com/support erhältlich.

Anwendungseinschränkungen

Das Kit ist zur Anwendung im professionellen Bereich vorgesehen.

Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die für die Anwendung molekularbiologischer Verfahren und das hier beschriebene System speziell eingewiesen und geschult wurden.

Der Kit darf nur mit einem validierten, unter „Zusätzlich benötigtes Material“ auf Seite 11 aufgeführten Instrument verwendet werden. Bei der Verwendung des Kits sind die Anweisungen im vorliegenden Handbuch zu beachten.

Die Verfallsdaten, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, müssen unbedingt beachtet werden. Komponenten mit abgelaufenem Verfallsdatum nicht verwenden.

Das *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ist ausschließlich für gepuffertes, formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Hirngewebe validiert.

Der *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit ist ausschließlich für die Verwendung in Kombination mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit bzw. dem QIASymphony DSP DNA Mini Kit validiert.

Nur das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument (für die PCR) und das QIASymphony SP (zur Probenvorbereitung) wurden validiert.

Eine Verwendung dieses Produkts für einen anderen als den vorgesehenen Zweck oder eine Modifikation der Komponenten führt zum Erlöschen der Haftung von QIAGEN.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.

Der Test ist darauf ausgelegt, 7 Mutationen in den Codons 132 und 100 des *IDH1*-Gens sowie 5 Mutation in Codon 172 des *IDH2*-Gens nachzuweisen. Proben, für die das Ergebnis „Keine Mutation nachgewiesen“ angegeben wird, können *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen enthalten, die vom Assay nicht erkannt werden.

Ob Mutationen nachgewiesen werden, hängt von der Qualität der Proben, dem Tumorgehalt und der Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe ab.

Jegliche diagnostische Ergebnisse, die mit dem Produkt ermittelt werden, sind im Licht aller relevanten klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.

Leistungsmerkmale

Leerwertgrenze (LOB)

Die Leerwertgrenze (LOB: *Limit of Blank*) wurde (gemäß Leitlinie CLSI/NCCLS EP17-A; 14) an negativen Proben ermittelt (FFPE-Normalhirn, 8 Proben, 64 Messungen/Charge, 2 Chargen).

Die LOB-Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Leerwertgrenze (LOB)

Assay	LOB	Finale LOB
R132 Mut	Validierung Charge 1: 6.57	6.32
	Validierung Charge 2: 6.32	
R132H Mut	Validierung Charge 1: 7.91	7.91
	Validierung Charge 2: 8.22	
R132C Mut	Validierung Charge 1: 8.04	8.04
	Validierung Charge 2: 8.20	
R172 Mut	Validierung Charge 1: 7.74	7.59
	Validierung Charge 2: 7.59	
R172K Mut	Validierung Charge 1: 9.93	9.93
	Validierung Charge 2: 10.58	
R100 Mut	Validierung Charge 1: 6.52	5.17
	Validierung Charge 2: 5.19	

Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze (LOD: *Limit of Detection*; auch analytische Sensitivität) wurde anhand des in der Leitlinie CLSI/NCCLS EP17-A (14) beschriebenen „Präzisionsprofilansatzes“ ermittelt. Es wurden 5 schwachpositive Proben (mit Plasmid-DNA versehene Gliom-Wildtyp-DNA) pro Mutation verwendet (30 bis 110 Messungen pro Mutationstyp und Mutationsanteil).

Die LOD-Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Nachweisgrenze (LOD)

Assay	Mutationen	LOD	Assay-Cut-off	Sensitivität (%)
R132H Mut	R132H	6.87	6.87	0.78
R132C Mut	R132C	7.14	7.14	1.19
R172K Mut	R172K	8.49	8.49	0.61
R132 Mut	R132H	5.50	5.34	2.32
	R132C	5.34		4.35
	R132L	5.42		2.30
	R132G	5.61		2.23
	R132S	5.42		2.75
	R132V	5.56		2.24
R172 Mut	R172K	6.42	6.42	1.06
	R172G	6.58		3.00

Assay	Mutationen	LOD	Assay-Cut-off	Sensitivität (%)
	R172M	6.66		3.31
	R172S	6.42		14.93
	R172W	6.68		2.36
R100 Mut	R100Q	4.65	4.65	3.45

Eine Mutation wird erkannt, wenn ΔC_T kleiner oder gleich der LOD ist.

Effekt der verwendeten DNA-Menge

Die DNA wurde aus 4 verschiedenen Gliom-Tumorproben extrahiert: 2 mit Wildtyp-*IDH1/2* und 2 mit der *IDH1*-Mutation R132H (395G>A).

Drei verschiedene DNA-Mengen (einschließlich der im Protokoll empfohlenen) wurden getestet, um die Auswirkung der verwendeten DNA-Menge auf die qualitativen Ergebnisse zu bewerten. Die Ergebnisse zeigten, dass die verwendete DNA-Menge keine Auswirkung auf die qualitativen Ergebnisse hat. Es wurden jedoch mehr technische Fehler (Versagen der $C_{T \text{ Total-QC}}$) beobachtet, wenn eine geringere als die empfohlene DNA-Menge verwendet wurde (< 25 ng DNA). Deshalb wird für die Testausführung eine Menge von 25 ng DNA in einem Flüssigkeitsvolumen von 5 μ l empfohlen.

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit

Die Genauigkeitsprüfung erfolgte an 4 verschiedenen Proben (mit Plasmid-DNA versehene Gliom-Wildtyp-DNA, repräsentativ für Wildtyp- [WT-], Mutant- und Cut-off-Probe), die 40 Mal in Duplikaten getestet wurden (n = 80 Messungen).

Die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (CV) sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17. Genauigkeitsergebnisse

Assay	Probe	Mittelwert (ΔC_T)	SD _W *	SD _{Lauf} †	SD _{Gesamt} ‡	CV _{Gesamt} (%)‡	„Correct Calls“-Quote
R132C Mut	WT	11.58	1.08	0.00	1.11	10	100% (78/78)
	5%	5.19	0.26	0.23	0.46	9	100% (76/76)
	10%	4.37	0.27	0.14	0.48	11	100% (78/78)
	30%	2.62	0.20	0.21	0.46	18	100% (78/78)
R132H Mut	WT	10.87	1.48	0.00	1.48	14	100% (78/78)
	5%	4.46	0.27	0.05	0.31	7	100% (78/78)
	10%	3.57	0.28	0.14	0.31	9	100% (76/76)
	30%	1.86	0.21	0.20	0.30	16	100% (72/72)
R172K Mut	WT	12.20	0.31	0.17	0.39	3	100% (66/66)
	5%	6.19	0.50	0.00	0.63	10	100% (76/76)
	10%	5.23	0.32	0.20	0.48	9	100% (76/76)
	30%	3.68	0.18	0.11	0.36	10	100% (76/76)

* W: Wiederholbarkeit

† Lauf: Reproduzierbarkeit von einem Lauf zum anderen

‡ Gesamt: Gesamtgenauigkeit (einschl. über verschiedene Instrumente, Bediener und Chargen hinweg)

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 17. Genauigkeitsergebnisse (Fortsetzung)

Assay	Probe	Mittelwert (ΔC_t)	SD _W *	SD _{Lauf} [†]	SD _{Gesamt} [‡]	CV _{Gesamt} (%) [‡]	„Correct Calls“- Quote
R100 Mut	WT	7.21	0.41	0.27	0.52	7	100% (70/70)
	5%	3.68	0.27	0.16	0.33	9	100% (76/76)
	10%	2.93	0.24	0.15	0.32	11	100% (76/76)
	30%	1.56	0.25	0.07	0.26	17	100% (76/76)
R132 Mut	WT	8.01	0.76	0.00	0.78	10	100% (152/152)
	R132H 5%	4.29	0.30	0.15	0.48	11	99% (151/152)
	R132C 5%	4.44	0.30	0.00	0.56	13	
	R132H 10%	3.49	0.27	0.22	0.46	13	99% (151/152)
	R132C 10%	3.69	0.27	0.23	0.53	14	
	R132H 30%	1.87	0.21	0.02	0.33	18	
	R132C 30%	2.00	0.26	0.28	0.59	29	100% (152/152)

* W: Wiederholbarkeit

† Lauf: Reproduzierbarkeit von einem Lauf zum anderen

‡ Gesamt: Gesamtgenauigkeit (einschl. über verschiedene Instrumente, Bediener und Chargen hinweg)

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 17. Genauigkeitsergebnisse (Fortsetzung)

Assay	Sample	Mean ΔC_T	SD _R [*]	SD _{Run} [†]	SD _{Total} [‡]	CV _{Total} (%) [‡]	Correct calls rate
R172 Mut	WT	9.47	0.91	0.87	1.45	15	100% (66/66)
	5%	4.45	0.35	0.12	0.56	13	100% (76/76)
	10%	3.55	0.29	0.02	0.53	15	100% (76/76)
	30%	2.05	0.18	0.15	0.47	23	100% (76/76)

* W: Wiederholbarkeit

† Lauf: Reproduzierbarkeit von einem Lauf zum anderen

‡ Gesamt: Gesamtgenauigkeit (einschl. über verschiedene Instrumente, Bediener und Chargen hinweg)

Methodenvergleich

Vergleich mit Immunhistochemie (IHC) zum Nachweis von *IDH1/R132H*

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die Übereinstimmung des mit dem *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bestimmten Mutationsstatus und des mittels IHC (Anti-humaner IDH1R132H-Antikörperklon H09, DIANOVA) bestimmten Mutationsstatus zu belegen.

Es wurden insgesamt 103 klinische Gliomproben ausgewählt. Der älteste Block war 10 Jahre alt.

Alle Proben bestanden die Qualitätskontrollen sowohl für den *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit als auch die IHC.

Die Ergebnisse zeigten eine positive Übereinstimmung von 100 %, eine negative Übereinstimmung von 98 % und eine Gesamtübereinstimmung von 99 % (Tabelle 18).

Tabelle 18. Analyse der Übereinstimmung von *therascreen* RGQ PCR Kit und IHC

Übereinstimmungsparameter	Häufigkeit (%)	95 % Konfidenzintervall
Positive Übereinstimmung	45/45 (100%)	[92;100]
Negative Übereinstimmung	57/58 (98%)	[91;100]
Gesamtübereinstimmung	102/103 (99%)	[96;100]

Vergleich mit bidirektionaler Sequenzierung

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die Übereinstimmung des mit dem *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit bestimmten Mutationsstatus und des mittels bidirektionaler Sequenzierung bestimmten Mutationsstatus zu belegen.

Es wurden insgesamt 103 klinische Tumorproben von Gliompatienten ausgewählt. Der älteste Block war 10 Jahre alt.

Alle 103 Proben bestanden die Qualitätskontrollen für den *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit, und 101 Proben lieferten bei der bidirektionalen Sequenzierung Ergebnisse.

Die Ergebnisse zeigten eine positive Übereinstimmung von 100 %, eine negative Übereinstimmung von 92 % und eine Gesamtübereinstimmung von 96 % (Tabellen 19 und 20).

Tabelle 19. *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit im Vergleich zur bidirektionalen Sequenzierung

		Bidirektionale Sanger-Sequenzierung				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172†	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

* R132 bedeutet, dass bei der Probe eine R132-Mutation erkannt wurde, aber weder R132H noch R132C.

† R172 bedeutet, dass bei der Probe eine R172-Mutation erkannt wurde, aber nicht R172K.

Tabelle 20. Analyse der Übereinstimmung mit der bidirektionalen Sequenzierung

Übereinstimmungsparameter	Häufigkeit (%)	95 % Konfidenzintervall
Positive Übereinstimmung	50/50 (100%)	[93;100]
Negative Übereinstimmung	47/51 (92%)	[81;97]
Gesamtübereinstimmung	97/101 (96%)	[90;98]

Literatur

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

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

Symbole

In der folgenden Tabelle sind die Symbole beschrieben, die auf den Produktetiketten oder in diesem Dokument verwendet werden.



<N>

Kit enthält Reagenzien für <N> Reaktionen



Verwendbar bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer (d. h. Komponenten-Etikett)



Komponenten (d. h. eine Inhaltsliste)



Inhalt



Anzahl (d. h. Gefäße, Flaschen)

Rn

R = Revision des Handbuchs; n = Revisionsnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Gebrauchsanleitung beachten



Vorsicht

Bestellinformationen

Produkt	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Für 20 Reaktionen: 9 Primer- und Sondengemische, WT-Kontrolle, Positivkontrolle, Master-Mix, nukleasefreies Wasser	873011
Rotor-Gene Q MDx und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung, Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot), Notebook, Software, Zubehör; 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung; Installation und Schulung nicht inbegriffen	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionseinrichtung mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1 ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 Streifen mit jeweils 4 Röhrchen und Deckeln für 1 000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit jeweils 4 Röhrchen und Deckeln für 10 000 Reaktionen	981106

Produkt	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – zur Aufreinigung genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe		
QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Für 192 Präparationen von je 200 µl; mit 2 Reagenzkartuschen sowie Enzym-Racks und Zubehör	56404
QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit – zur automatischen Aufreinigung von DNA aus 1 bis 96 Proben		
QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)	For 192 preps of 200 µl each: includes 2 reagent cartridges and enzyme racks and accessories	937236
QIAAsymphony SP und Zubehör		
QIAAsymphony SP System	QIAAsymphony Probenvorbereitungsmodul einschließlich Installation und Schulung; 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	9001751
QIAAsymphony SP	QIAAsymphony Probenvorbereitungsmodul; 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Probenvorbereitungskartuschen mit 8 Wells zur Verwendung mit dem QIAAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Magnetstab-Schutzhülsen zur Verwendung mit dem QIAAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Einwegfilterspitzen, im Rack (8 x 128); zur Verwendung mit dem QIAcube und dem QIAAsymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Einwegfilterspitzen, im Rack (8 x 128); zur Verwendung mit dem QIAAsymphony SP/AS	997024

Produkt	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Unsterile Polypropylenröhrchen (maximale Kapazität 0,85 ml; Reservoirkapazität weniger als 0,7 ml, Elutionskapazität 0,4 ml); 2304 in Racks zu je 96; mit Deckelstreifen	19588
Reagenzien		
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 Einheiten/ml, Lösung)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Gewebelysepuffer für 1 000 Präparationen	19076

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem Händler vor Ort angefordert werden.

Dieses Produkt ist für den Gebrauch als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen. QIAGEN Produkte dürfen ohne die schriftliche Genehmigung von QIAGEN nicht weiterverkauft, zum Weiterverkauf abgeändert oder zur Herstellung von zum Verkauf bestimmten Produkten verwendet werden.

Die Informationen in diesem Dokument können ohne Ankündigung geändert werden. QIAGEN übernimmt keine Haftung für mögliche Fehler in diesem Dokument. Dieses Dokument wurde zum Zeitpunkt der Veröffentlichung als vollständig und richtig erachtet. QIAGEN haftet keinesfalls für Schadensersatzansprüche jeglicher Art, die im Zusammenhang mit oder aufgrund der Verwendung dieses Produktes entstehen.

QIAGEN sichert zu, dass seine Produkte den angegebenen Spezifikationen entsprechen. In dem Fall, dass Produkte nicht wie zugesichert funktionieren, ist QIAGEN lediglich zum kostenfreien Austausch der Produkte verpflichtet. Darüber hinaus können vom Kunden keine weiteren Ansprüche geltend gemacht werden.

Mit dem Kauf dieses Produkts erwirbt der Käufer die Berechtigung zur Bereitstellung In-vitro-diagnostischer Dienstleistungen an humanen Proben. Außer dieser speziellen Berechtigung wird durch den Kauf kein allgemeines Patent und keine Lizenz jeglicher Art erworben.

IDH1/2-Mutationen und deren Verwendung sind durch Patente geschützt, unter anderem die europäischen Patentanmeldungen EP2326735 und EP2546365, die US-amerikanischen Patentanmeldungen US2011229479 und US2012202207 sowie entsprechende Patente anderer Länder.

Der Kauf dieses Produkts berechtigt nicht dazu, dieses für klinische Studien zu an IDH1/2 ansetzenden Arzneimitteln einzusetzen. Für solche Verwendungszwecke bietet QIAGEN spezielle Lizenzprogramme an. Wenden Sie sich diesbezüglich unter idllicenses@qiagen.com an unsere Rechtsabteilung.

Markennamen: QIAGEN®, QIAamp®, QIAasympfony®, MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group);™ (Life Technologies Corporation.); HistoLeomon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.
HB-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/shop | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com