

Rugpjūtis 2016

# *therascreen*<sup>®</sup> IDH1/2 RGQ PGR rinkinio vadovas



1 versija

Skirta 12 *IDH1* ir *IDH2* mutacijų nustatymui gliomos mėginiuose

**IVD**

In vitro diagnostiniam naudojimui

Naudojimui su Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM instrumentu

**CE**

**REF**

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R4 **MAT**

1075247LT

# Turinys

Numatytas naudojimas .....	4
Santrauka ir paaiškinimai .....	4
Procedūros principas .....	6
Tiekiamos medžiagos .....	8
Rinkinio turinys .....	8
Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos .....	10
Perspėjimai ir atsargumo priemonės .....	12
Saugumo informacija .....	12
Bendros atsargumo priemonės .....	12
Reagentų laikymas ir apdorojimas .....	13
Siuntimo sąlygos .....	13
Saugojimas .....	14
Stabilumas .....	14
Mėginių gabenimas ir sandėliavimas .....	14
Procedūra .....	16
DNR išskyrimas ir paruošimas .....	16
Protokolas: <i>IDH1/2</i> mutacijų nustatymas .....	20
Procedūra .....	23
Rezultatų interpretacija .....	25
Vandens kontrolės .....	25
Kokybės kontrolė naudojant $C_T$ kontrolės reikšmes .....	25
Mėginių įvesties patvirtinimas .....	28

---

Mėginio rezultatai .....	28
Trikčių šalinimas.....	34
Kokybės kontrolė .....	37
Apribojimai.....	38
Veikimo charakteristikos.....	40
Tuščios vietos riba (LOB) .....	40
Aptikimo riba (LOD).....	40
DNR kiekio efektas.....	42
Atsikartojamumas ir atkuriamumas .....	42
Metodų palyginimas .....	45
Nuorodos.....	48
Simboliai.....	50
Užsakymų informacija .....	52

# Numatytas naudojimas

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra in vitro diagnostinis testas, paremtas PGR technologija, skirtas kokybiniam 7 mutacijų *IDH1* gene nustatymui ir 5 mutacijų *IDH2* gene nustatymui, bei tiesioginiam identifikavimui 3 pagrindinių mutacijų DNR mėginiuose, išskirtuose iš formalinu fiksuotų į parafiną įterptųjų (FFP) žmogaus smegenų audinių.

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra skirtas naudoti kaip pagalbinė priemonė gliomų klasifikacijai.

## Santrauka ir paaiškinimai

Mutacijos izocitrato dehidrogenazės (~~IDH1/2~~ **IDH1/2**) yra dažnai pasitaikančios suaugusiems, remiantis Pasaulio Sveikatos Organizacijos (PSO) duomenimis, II laipsnio ir III laipsnio gliomose ir remiantis PSO IV laipsnio antrinėse glioblastomose (GBM). Be to, jų diagnostinė vertė, nustatant *IDH1/2* mutacijas, yra susijusi su teigiama prognoze pacientams, sergantiems glioma (1–13).

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra PGR tyrimas, nustatantis 12 specifinių *IDH1/2* mutacijų: 6 *IDH1* geno 132 kodone ir 5 *IDH2* geno homologiniame 172 kodone ir vieną *IDH1* geno 100 kodone (1 lentelė). Rinkinys taip pat tiesiogiai identifikuoja daugumą *IDH1* ir *IDH2* mutacijų lemiančių *IDH1* R132H, *IDH1* R132C ir *IDH2* R172K pokyčius.

**1 lentelė. IDH1 ir IDH2 mutacijos, nustatomos naudojant *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinį**

<b>Genas</b>	<b>Mutacija</b>	<b>Bzės pokytis</b>	<b>COSMIC ID*</b>
<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

\* COSMIC ID yra paimta iš Somatinių Vėžio Mutacijų Katalogo ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

# Procedūros principas

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinyje yra reagentai, skirti atlikti 9 atskiras amplifikacijos reakcijas 12 mutacijų nustatymui (Lentelė 1):

- 3 pilnos amplifikacijos reakcijas 132 kodone ir 100 kodone *IDH1* gene ir 172 kodone *IDH2* gene
- 3 mutacijų amplifikacijos reakcijas 132 kodone ir 100 kodone *IDH1* gene ir 172 kodone *IDH2* gene
- 3 mutacijoms specifines amplifikacijos reakcijas *IDH1* R132H, *IDH1* R132C, ir *IDH2* R172K mutacijoms.

## Bendras reakcijos mišinys

Bendras pradmenų ir zondų mišinys (PPM-bendras) naudoja pradmenis ir zondus amplifikuoti abi mutavusias ir laukinio tipo taikinio sekas (pav. 1).

## Mutacijos nustatymo reakcijos mišinys

Mutacijos nustatymo pradmenys ir zondų mišinys sujungia pradmenis ir zondus, kad amplifikuotų abi mutavusias ir laukinio tipo taikinio sekas, papildomai oligonukleotidą, 3' blokuotą pridėta fosfato grupe, kad būtų išvengta elongacijos (PGR sukibimas), kuri yra specifinė laukinio tipo taikinių sekose.

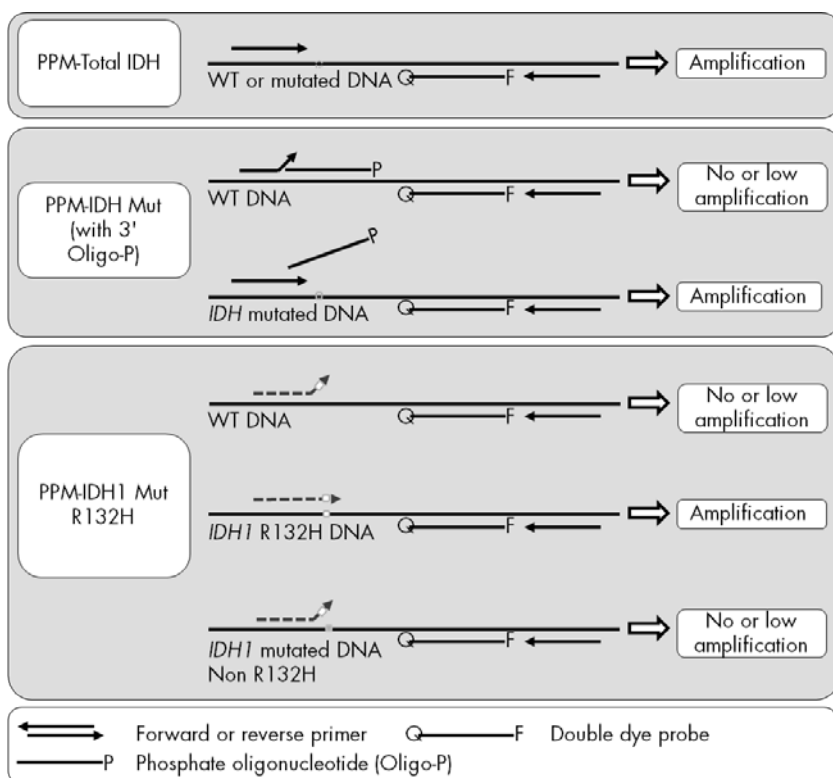
Kaip PGR šablone yra laukinio tipo seka, 3'-fosfato oligonukleotidas dominuos vykstant PGR pradmenų surišimui, dėl didesnio giminingumo. DNR polimerazės prailginimas ir nestebimas arba stebimas su žema amplifikacija.

Kai yra mutavusi seka PGR pradmenų surišimas dominuos prieš 3'-fosfato oligonukleotido surišimą ir vyks amplifikacija. (pav. 1).

## Mutacijos identifikavimo reakcijos mišinys

Alelių specifinė amplifikacija yra pasiekama ARMS (Amplification Refractory Mutation System), kuri paaiškina DNR polimerazės gebėjimą atskirti sutapimus ir nesutapimus 3' PGR pradmenų pabaigoje.

Kaip PGR pradmuo pilnai sutampa, amplifikacija vyksta pilnu pajėgumu. Kai 3' bazė nesutampa, matomas tik nedidelis amplifikacijos fonas (pav. 1).



**Pav. 1. Rezultatai gauti naudojant pradmenis ir zondų mišinius iš *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinio.** Tokiu pačiu principu demonstruojamas nustatymas *IDH1* R132H tinka *IDH1* R132C ir *IDH2* R172K.

# Tiekiamos medžiagos

## Rinkinio turinys

<b><i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinys</b>		<b>(20)</b>
<b>Katalogo Nr.</b>		<b>873011</b>
<b>Reakcijų skaičius</b>		<b>20</b>
Primers and Probe Mix for the detection of total <i>IDH1/R132</i> (Wild Type and Mutated)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the detection of Total <i>IDH2/R172</i> (Wild Type and Mutated)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Primers and Probe mix for the detection of Total <i>IDH1/R100</i> (Wild Type and Mutated)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R132</i>	PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH2/R172</i>	PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe mix (including Oligo-P) for the detection of Mutated <i>IDH1/R100</i>	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132H	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Lentelės tęsinys kitame lape



## Rinkinio turinys (tęsinys)

<b><i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinys</b>		<b>(20)</b>
<b>Katalogo Nr.</b>		<b>873011</b>
<b>Reakcijų skaičius</b>		<b>20</b>
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH1</i> Mut R132C	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Primers and Probe Mix for the identification of <i>IDH2</i> Mut R172K	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Wild Type Genomic DNA	IDH1/IDH2 WT Control	270 µl
<i>IDH1/IDH2</i> Mutated Positive Control	IDH1/IDH2 Positive Control	270 µl
Mix of <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , and buffer for qPCR	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	5 x 525 µl
<i>therascreen IDH1/2 RGQ PGR</i> rinkinio vadovas (Lietuviškai)		1

# Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, prašome perskaityti atitinkamus saugos duomenų lapus, kuriuos galite gauti iš produktų tiekėjų.

**Svarbu:** Įsitinkite, kad instrumentas, kurį naudosite šiai procedūrai, buvo patikrintas ir kalibruotas pagal gamintojo rekomendacijas.

## Reagentai (ne automatizuotas DNR išskyrimas)

- DNR išskyrimo rinkinys: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Kat. Nr. 56404)
- RNase A (17,500 U) (Kat. Nr. 19101)
- Ksilenas ar Histolemon™ (Carlo Erba, Kat. Nr. 454911, [www.carloerbareagents.com](http://www.carloerbareagents.com))
- Etanolis (96–100%)
- 1x TE buferis, pH 8.0

## Reagentai (automatizuotas DNR išskyrimas)

- DNR išskyrimo rinkinys: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (Kat. Nr. 937236)
- Buferis ATL (Kat. Nr. 19076 arba 939016)
- RNase A (Kat. Nr. 19101)
- Ksilenas ar Histolemon™ (Carlo Erba, Kat. Nr. 454911, [www.carloerbareagents.com](http://www.carloerbareagents.com))
- Etanolis (96–100%)
- 1x TE buferis, pH 8.0

## Eksploatacinės medžiagos

- Skalpeliai
- Benukleaziai, aerosoliams atsparūs sterilūs PGR pipečių antgaliai su hidrofobiniais filtrais
- 2.0 ml arba 1.5 ml benukleaziai mėgintuvėliai

- Juostiniai mėgintuvėliai ir kepurėlės, 0.1 ml, skirti Rotor-Gene Q (Kat. Nr. 981103 arba 981106)
- Ledas

#### Papildomos eksploatacinės medžiagos automatiniam DNR išskyrimui

- Mėginių paruošimo kasetės 8-šulinėlių (Kat. Nr. 997002)
- 8-Rod užvalkalai (Kat. Nr. 997004)
- Antgaliai su filtru, 200 µl, Qsym SP (Kat. Nr. 990332) ir antgaliai su filtru, 1500 µl, Qsym SP (Kat. Nr. 997024)
- Išplovimo mikro mėgintuvėliai CL (Kat. Nr. 19588)
- Mikro mėgintuvėliai 2.0 ml Type H (Sarstedt<sup>®</sup>, Kat. Nr. 72.693, [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com))

#### Įranga

- Objektinių stiklelių stovas ir 2 suderinamos objektinių stiklelių vonelės, skirtos ksileniui/Histolemon ir etanolui
- Mikro pipetės skirtos PGR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stalinė centrifuga su rotoriumi, skirtu 0.5 ml/1.5 ml reakcijos mėgintuvėliams ir mikro plokštelėms (galinti pasiekti iki 13,000–14,000 rpm)
- Stalinis vorteksas
- Tikro laiko PGR instrumentas: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ir susijusios specifinės medžiagos
- Rotor-Gene Q MDx programinė įranga 2.1.0 arba naujesnė
- Biofotometras
- Termomaišytuvas, šildomas orbitinis inkubatorius, kaitinimo blokas arba vandens vonelė, skirta inkubuoti 56°C ir 90°C temperatūroje

#### Papildoma įranga automatizuotam DNR išskyrimui

- QIASymphony SP instrumentas
- QIASymphony SP programinė įranga 4.0 arba naujesnė

# Perspėjimai ir atsargumo priemonės

In vitro diagnostiniam naudojimui

## Saugumo informacija

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite saugos duomenų lapuose (SDS). Juos rasite internete PDF formatu puslapyje **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**, kur galėsite peržiūrėti ir atsispausdinti SDS kiekvienam QIAGEN rinkiniui ir rinkinio sudedamajai medžiagai.

Saugumo informacijos gryninimo rinkiniui ieškokite rinkinio naudojimo vadove. Saugumo informacijos naudojamiems instrumentams ieškokite atitinkamuose instrumentų naudojimo vadovuose.

## Bendros atsargumo priemonės

- Tyrimui naudojami buferiniai formalinu fiksuotų į parafiną įterptųjų (FFP) chirurginės rezekcijos būdu paimtų audinių mėginiai.
- Visos cheminės ir biologinės medžiagos gali būti pavojingos. Bandiniai ir mėginiai gali būti infekuoti, todėl su jais reikia elgtis kaip su biologiniu pažiūriu pavojingomis medžiagomis.
- Išmeskite mėginius ir tyrimų atliekas remiantis savo saugumo procedūromis.
- Medžiagos *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniui yra atskiestos optimaliai. Neskieskite medžiagų, nes tai gali pakenkti tyrimo rezultatams. Nenaudokite reakcijai mažesnio nei 25 µl reakcijos tūrio (reakcijos mišinys su mėginiu).
- Visi reagentai, tiekiami *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinyje, turi būti naudojami tik su kitais reagentais, esančiais šiame rinkinyje. Nekeiskite jokių reagentų iš *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinio, nes tai gali pakenkti rezultatams.

- Perskaitykite Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumento naudojimo vadovą, jame gali būti papildomų įspėjimų, atsargumo priemonių ir procedūrų.
- Inkubacijos laiko ir temperatūros keitimas gali pakenkti rezultatams.
- Nenaudokite pasibaigusio galiojimo ar netinkamai laikytų rinkinio komponentų.
- Pradmenys ir zondų mišiniai gali pakisti, jei nėra apsaugoti nuo šviesos.
- Būkite ypač atidūs, siekdami išvengti mišinių užteršimo sintetinėmis medžiagomis, kurios yra teigiamos kontrolės reagentų sudėtyje.
- Būkite ypač atidūs, siekiant išvengti užteršimo DNaze, nes tai gali lemti DNR degradaciją.
- Naudokite individualias, tam skirtas pipetes reakcijos mišiniui sudaryti ir išpilstyti.
- Pasiruošimą ir reakcijos mišinių dozavimą atlikite kitoje vietoje nei atliksite išpilstymą.
- Neatidarykite Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumento kol reakcija nesibaigė.
- Neatidarykite Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM mėgintuvėlių po to kai reakcija pasibaigė.
- Turi būti laikomasi atidumo, kad būtų užtikrintas teisingas mėginių tyrimas, teisingas mėginių įdėjimas ir išvengta pipetavimo klaidų.

## Reagentų laikymas ir apdorojimas

### Siuntimo sąlygos

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys siunčiamas ant sauso ledo. Jei bet kuri sudedamoji *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinio dalis nėra užšaldyta atvykusi, išorinė pakuotė buvo atidaryta transportavimo metu ar siuntinys neturi supakavimo informacijos, naudotojo vadovo ar reagentų susisieki su QIAGEN technine pagalba arba vietiniu platintoju (žiūrėti [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Saugojimas

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys tik atvykus turi būti saugomas nuo –15 iki –30°C temperatūroje, pastovios temperatūros šaldiklyje ir apsaugotas nuo šviesos.

## Stabilumas

Kai laikomas tinkamose laikymui sąlygose *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra stabilus iki nurodytos galiojimo datos.

Atidaryti reagentai gali būti laikomi originaliose pakuotėse nuo –15 iki –30°C temperatūroje iki ant pakuotės nurodytos galiojimo datos. Pakartotino atšildymo ir užšaldymo turi būti vengiama. Neviršykite daugiausia 5 atšildymo-užšaldymo ciklų.

## Mėginių gabenimas ir sandėliavimas

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra naudojamas DNR mėginiams, išskirtiems iš formalinu fiksuotų į parafiną įterptųjų (FFPI) auglio audinių, surinktų chirurginės rezekcijos būdu, iš smegenų vėžio subjektų. Su visais audinių mėginiais turi būti elgiamasi kaip su biologiniu požiūriu pavojingomis medžiagomis.

- Audinio mėginys turi būti fiksuojamas 4–10% neutraliame buferiniame formaline (NBF).
- 10 µm serijos sekcijos turi būti išpjautos iš parafino bloko ir uždedamos ant objektyvio stiklelio.
- Apmokytas žmogus (patologas) turi įvertinti naviko turinį ir plotą greta hematoksilinu ir eozinu (H&E) nudažytos vietos. Naudokite serijines sekcijas DNR ekstrakcijai.
- Tik tos sekcijos, kuriose yra ≥40% naviko yra tinkamos tyrimui.

- 
- Sekcijoms, kuriose yra  $<50 \text{ mm}^2$  audinio, rekomenduojama apdoroti pakankamą sekcijų skaičių, kad būtų padidintas naviko plotas iki mažiausiai  $50 \text{ mm}^2$  ( $100 \text{ mm}^2$  jei bus atliekamas automatizuotas išskyrimas su QIASymphony SP).
  - Pažymėkite, tvarkykite ir saugokite naviko mėginius, blokus, objektinius stiklelius ir mėginius, paruoštus ekstrakcijai, pagal savo vietines procedūras.
  - Saugokite FFPJ blokus ir objektinius stiklelius kambario temperatūroje. Objektiniai stikleliai gali būti saugomi aplinkos temperatūroje iki 4 savaičių prieš DNR ekstrakciją ir tyrimą *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniu.
  - Po išskyrimo, genominė DNR gali būti saugoma iki savaitės  $2\text{--}8^\circ\text{C}$  temperatūroje arba 8 savaičių  $-15$  iki  $-25^\circ\text{C}$  temperatūroje.

# Procedūra

## DNR išskyrimas ir paruošimas

Naudokite QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Kat. Nr. 56404) arba QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Kat. Nr. 937236) genomines DNR išskyrimui iš mėginių, paruoštų iš FFPJ smegenų vėžio mėginių.

**Pastaba:** *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys buvo patvirtintas tik naudojant su QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ir QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Nenaudokite jokio kito DNR išskyrimui skirto produkto.

### Naudojant QIAamp DNA FFPE Tissue Kit



Atidžiai perskaitykite sekančias modifikacijas, kurias būtina atlikti QIAamp protokole.

- Žiūrėkite “Pradinė medžiaga” *QIAamp DNA FFPE Tissue naudojimo vadove* ir “Mėginių gabenimas ir sandėliavimas”, puslapis 14 šiame vadove, mėginių paruošimui prieš deparafinizaciją ir DNR išskyrimą.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit turi būti naudojamas tik rankiniu būdu.
- RNazės žingsnis, aprašytas *QIAamp DNA FFPE Tissue naudojimo vadove*, turi būti atliktas.
- Nenaudokite QIAGEN deparafinizavimo tirpalo. Naudokite tik ksileno/etanolio metoda deparafinizavimui, kaip aprašyta “Objektinių stiklelių deparafinizavimo procedūra kai naudojamas QIAamp DNA FFPE Tissue Kit”, žemiau. Ksilenas gali būti pakeistas Histolemon (ksileno pakaitalas).
- Skaidymas proteinaze K turi būti atliekamas 1 valandą.
- Mėginiai turi būti išplaunami du karus 30 µl išplovimo buferiu (Buferis ATE) iš QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.



## Objektyvių stiklelių deparafinizavimo procedūra naudojant DNA FFPE Tissue Kit

1. Įdėkite objektyvius stiklelius į specialų objektyvių stiklelių stovą.
2. Įdėkite objektyvių stiklelių stovą į objektyvių stiklelių vonelę su ksilenu ar Histolemon 2 minutėms. Pakratykite 2 ar 3 judesiais pirmyn ir atgal.
3. Įdėkite stovą į kitą objektyvių stiklelių vonelę su etanolu (96–100%) 2 minutėms. Pakratykite 2 ar 3 judesiais pirmyn ir atgal.
4. Išdžiovinkite objektyvius stiklelius 15–37°C temperatūroje. Tai truks kelias minutes.
5. Pažymėkite 1.5 ml mikrocentrifuginius mėgintuvėlius kiekvienam mėginiui ir įpilkite 180 µl ATL buferio (iš QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) į kiekvieną mėgintuvėlį.
6. Užlašinkite kelis lašus ATL buferio ant audinių sekcijų ant objektyvių stiklelių (pakankamai, kad uždengtų audinio paviršių).
7. Pagramdykite audinio zoną steriliu skalpeliu ir perkelkite nugramdytą audinį į atitinkamą pažymėtą mėgintuvėlį.
8. Pridėkite 20 µl proteinazės K (iš QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) į kiekvieną mėgintuvėlį ir išmaišykite vorteksuodami.
9. Inkubuokite 56°C temperatūroje 1 valandą.

Tęskite 90°C temperatūros inkubacijos žingsnyje QIAamp DNA FFPE Tissue Kit protokole (žingsnis 12 *QIAamp DNA FFPE Tissue naudojimo vadovas*, birželis 2012, puslapis 13).

## Naudojant QIASymphony DSP DNA Mini Kit



Atidžiai perskaitykite sekančias modifikacijas, kurias būtina atlikti QIASymphony SP protokolo lape: Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP.

- Žiūrėkite “Mėginių gabenimas ir sandėliavimas”, puslapis 14, mėginių paruošimui prieš deparafinizaciją ir DNR išskyrimą.
- RNazės žingsnis QIASymphony SP protokolo lape turi būti atliktas.

- Nenaudokite QIAGEN deparafinizavimo tirpalo. Naudokite tik ksileno/etanolio metoda deparafinizavimui, kaip aprašyta “Objektynių stiklelių deparafinizavimo procedūra kai naudojamas QIASymphony DSP DNA Mini Kit” žemiau. Ksilenas gali būti pakeistas Histolemon (ksileno pakaitalas).
- Skaidymas proteinaze K turi būti atliekamas 1 valandą.
- 50 µl išplovimo tūris turi būti pasirinktas lietimui jautriame ekrane.

### Objektynių stiklelių deparafinizavimo procedūra kai naudojamas QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Atlikite deparafinizaciją remiantis sekančiais žingsniais, kurie skiriasi nuo protokolo QIASymphony SP protokolo laps: Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP.

1. Įdėkite objektynius stiklelius į specialų objektynių stiklelių stovą.
2. Įdėkite objektynių stiklelių stovą į objektynių stiklelių vonelę su ksilenu ar Histolemon 2 minutėms. Pakratykite 2 ar 3 judesiais pirmyn ir atgal.
3. Įdėkite stovą į kitą objektynių stiklelių vonelę su etanolium (96–100%) 2 minutėms. Pakratykite 2 ar 3 judesiais pirmyn ir atgal.
4. Išdžiovinkite objektynius stiklelius 15–37°C temperatūroje. Tai truks kelias minutes.
5. Pažymėkite 1.5 ml mikrocentrifuginius mėgintuvėlius kiekvienam mėginiui ir įpilkite 220 µl ATL buferio į kiekvieną mėgintuvėlį.
6. Užlašinkite kelis lašus ATL buferio ant audinių sekcijų ant objektynių stiklelių (pakankamai, kad uždengtų audinio paviršius).
7. Pagramdykite audinio zoną steriliu skalpeliu ir perkelkite nugramdytą audinį į atitinkamą pažymėtą mėgintuvėlį.
8. Pridėkite 20 µl proteinazės K (iš QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) į kiekvieną mėgintuvėlį ir išmaišykite vorteksuodami.

Tęskite 56°C temperatūros inkubacijos žingsnyje QIASymphony SP protokolo lape: Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP protokolas (žingsnis 12 “Deparafinizacija naudojant ksileną” protokolas, balandis 2012). Inkubuokite 56°C temperatūroje 1 valandą.

---

## Genominė DNR

Saugokite genominę DNR 2–8°C temperatūroje iki 1 savaitės po išskyrimo arba 8 savaites –15 to –25°C temperatūroje.

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

Praskieskite DNR iki 5 ng/μl koncentracijos su 1x TE buferiu pH 8.0.

PGR reakcija yra optimizuota naudoti mėginius, kuriuose yra 25 ng išskirtos genominės DNR.

## Protokolas: *IDH1/2* mutacijų nustatymas

### Svarbūs punktai prieš pradėdant

- Kad *therascreen* *IDH1/2* RGQ PGR rinkinys būtų panaudotas optimaliai, mėginiai turi būti sugrupuoti po 4. Mažesnis mėginių skaičius, tiriamas vienu metu, reiškia, kad mažiau mėginių bus galima iširti *therascreen* *IDH1/2* RGQ PGR rinkiniu.
- Mes rekomenduojame tirti visus mėginius vienu metu PGR procedūra, kaip nurodyta 2 lentelėje ir sudėjimo bloko schemeje ir rotoriaus nustatymuose kaip parodyta 3 lentelėje ir 2 paveiksle.

### 2 lentelė. Reakcijų skaičius Rotor-Gene Q MDx instrumentui su 72-mėgintuvėlių rotoriumi

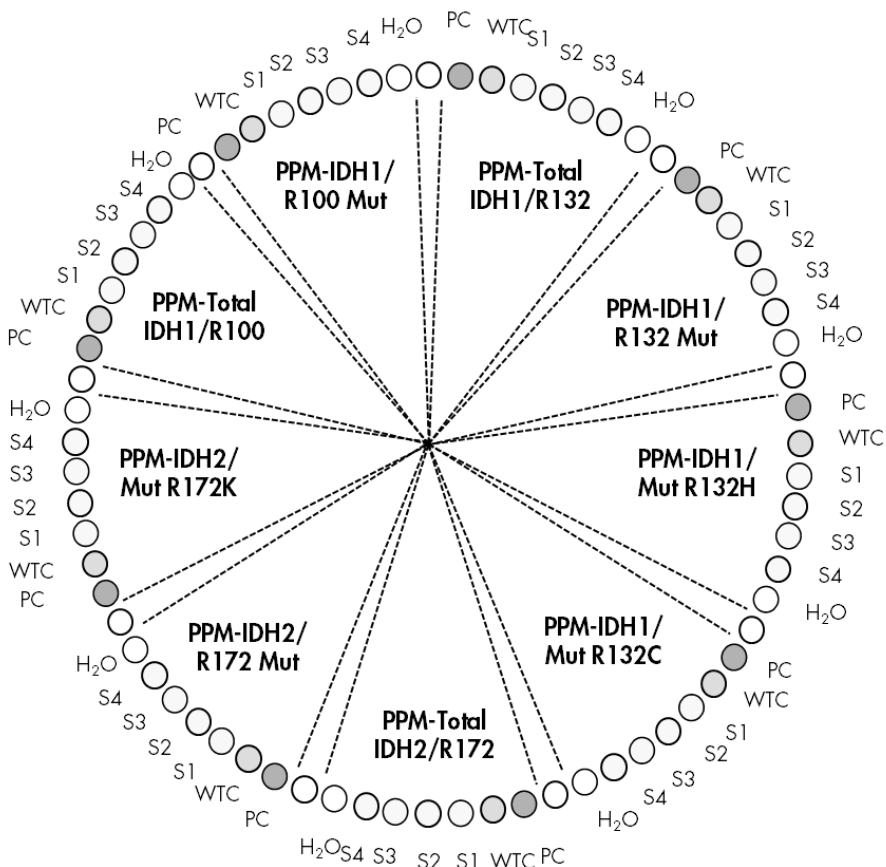
Mėginiai	Reakcijos
n DNR mėginiai	n x 1 reakcija
2 DNR kontrolės	2 reakcijos: Teigiama ir WT kontrolės, kiekviena tiriama vieną kartą PGR procedūroje
Vandens kontrolės	1 reakcija

**3 lentelė. Siūloma sudėjimo bloko schema eksperimentui su *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniu**

Mėginys	Viso IDH1/ R132 Mut	IDH1 R132H Mut	IDH1 Mut R132C	Viso IDH2/ R172 Mut	IDH2/ R172 Mut	IDH2 Mut R172K	Viso IDH1/ R100 Mut		
Mut PC*	1	9	17	25	33	41	49	57	65
WTC <sup>†</sup>	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 <sub>2</sub> O	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Tuščias mėgintuvėlis	8	16	24	32	40	48	56	64	72

\* PC: Teigiama kontrolė.

<sup>†</sup> WTC: Laukinio tipo kontrolė.



**Pav. 2. Siūlomas rotoriaus nustatymas eksperimentui su *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniu.**

**Pastaba:** Įsitinkinkite, kad visada mėginį dedate į 1 poziciją rotoriuje. Kitaip instrumentas neatliks kalibravimo ir bus surinkta neteisinga fluorescencijos informacija.

## Procedūra

1. Atšildykite visas reikiamas sudedamąsias dalis ir padėkite jas ant ledo.
2. Paruoškite sekančius PGR mišinius priklausomai nuo to kiek mėginių bus tiriama.

Visos nurodytos koncentracijos yra paskaičiuotos galutiniam reakcijos tūriui.

4 lentelė aprašo pipetavimo schemą, pasiruošti vienam reagentų mišiniui, paskaičiuota, kad būtų pasiektas bendras reakcijos tūris 25  $\mu$ l. Prieš mišinys gali būti paruoštas kiekvienam PPM, remiantis reakcijų skaičiumi. Papildomas tūris yra įskaičiuotas, kad kompensuotų galimas pipetavimo paklaidas.

### 4 lentelė. PGR mišinio paruošimas

Sudedamoji dalis	1 reakcija ( $\mu$ l)	Prieš mišinys: 7 + 1 reakcija ( $\mu$ l)	Galutinė koncentracija
qPCR pagrindinis mišinys, 2x	12.5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Benukleazinis vanduo	6.5	52	–
Mėginys arba kontrolė <sup>†</sup> (bus pridėta 4 žingsnyje)	5	5 kiekvienam	–
<b>Galutinis tūris</b>	<b>25</b>	<b>25 kiekvienam</b>	–

\* Paruoškite 9 prieš mišinius, kiekvieną su vienu iš PPM pateikiamu rinkinyje.

<sup>†</sup> Teigiama kontrolė, neigiama kontrolė arba vandens kontrolė.

3. Įdėkite 20  $\mu$ l kiekvieno prieš mišinio tirpalo į Rotor-Gene mėgintuvėlį (Lentelė 3).
4. Pridėkite 5  $\mu$ l medžiagos, kuri bus tiriama (25 ng mėginio genominės DNR ar kontrolės) į atitinkamą mėgintuvėlį (visas tūris 25  $\mu$ l; Lentelė 3).
5. Švelniai sumaišykite pipetuodami.
6. Įdėkite mėgintuvėlius į adapterį pateikiamą su instrumentu (Paveikslas 2).

Nepanaudotos pozicijos turi būti užpildytos tuščiais mėgintuvėliais.

7. Įdėkite užpildytą adapterį į Rotor-Gene Q MDx instrumentą.
8. Užprogramuokite Rotor-Gene Q MDx instrumentą šiluminio ciklo programa kaip parodyta 5 lentelėje.

#### 5 lentelė. Temperatūros profilis

Palaikymas	Temperatūra: 95°C Laikas: 10 min
Ciklai	40 karų 95°C 15 sekundžių 60°C 60 sekundžių su įsigijimu FAM™ fluorescencija žaliame kanale: vienas

9. Paspauskite **Gain Optimisation** esantį **New Run Wizard** dialogo lange, kad atidarytumėte **Auto-Gain Optimisation Setup** dialogo langą. Nustatykite Žalio kanalo diapazoną nuo **2FI** skirtą **Min Reading** iki **10FI** skirtą **Max Reading**.
10. Pažymėkite **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** langą ir uždarykite **Auto-Gain Optimisation Setup** dialogo langą.
11. Pradėkite šiluminio ciklo programą.
12. Kai tik šiluminis ciklinimas pasibaigia atlikite šiuos veiksmus.
  - Pasirinkite **Options** ir **Crop Start Cycles**. Pašalinkite duomenis iki ciklo **10**, kad būtų pašalintos bet kokios klaidos.
  - Pasirinkite **Analysis** ir **Cycling A. Green from 10**, esantį ataskaitoje kaip "left threshold = 10.00".
  - Pasirinkite **Dynamic Tube** kaip normalizavimo metodą ir **Slope Correct** kad pataisytumėte triukšmo nuožulnumą.
  - Nustatykite **Outlier Removal** ties **0%** (atitinkamai NTC slenkstis).
  - Nustatykite **Reaction Efficiency Threshold** kad būtų išjungtas.
  - Nustatykite slenkstį ties **0.03**.
  - Nustatykite grafiką į tiesinę skalę.
  - Pasirinkite **Digital Filter: Light**.



# Rezultatų interpretacija

## Vandens kontrolės

Vandens kontrolės (ne šablono kontrolės) turi būti nulinės  $C_T$  reikšmės visiems pradmenims ir zondų mišiniams.

Jei yra teigiama  $C_T$  reikšmė vandens kontrolėje tai reiškia, kad buvo kryžminis užteršimas. Žiūrėkite "Trikčių šalinimas", puslapis 34, kad rastumėte sprendimą.

## Kokybės kontrolė naudojant $C_T$ kontrolės reikšmes

*IDH1/2* laukinio tipo kontrolė (WTC) ir mutavusi *IDH1/2* teigiama kontrolė (Mut-PC) leidžia įvertinti eksperimentą.

Kiekvienai kontrolei, paskaičiuokite  $\Delta C_T$  reikšmes kaip parodyta žemiau.

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

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

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

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

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

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

Jei 0  $C_T$  reikšmė yra gauta mėginiui, naudokite  $C_T$  reikšmę lygią 40, kad apskaičiuotumėte  $\Delta C_T$  reikšmę.

Kontrolės yra priskiriamos mutacijai teigiamomis jei  $\Delta C_T$  reikšmė yra mažesnė arba lygi atitinkamoms  $\Delta C_T$  nukrypimo reikšmėms, išvardintoms 6 lentelėje.

## 6 lentelė. Nukrypimo reikšmės kiekvienam mutacijos tyrimui

Mutacijos tyrimas	Nukrypimas ( $\Delta C_T$ )
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

- *IDH1/2* laukinio tipo kontrolė turi būti aptikta kaip mutacijai neigiama kiekvienam mutacijos tyrimui (Lentelė 7).
- Mutavusi *IDH1/2* teigiama kontrolė turi būti aptinkama kaip mutacijai teigiama kiekvienam mutacijos tyrimui (Lentelė 7).

Visas tyrimas turi būti pripažintas netinkamu jei abi šios sąlygos nėra išpildytos.

**7 lentelė. Tyrimo patvirtinimo, remiantis kontrolėmis, pavyzdys**

<b>Reikšmė</b>	<b>Vanduo (NTC)</b>	<b>IDH1/IDH2 WT kontrolė</b>	<b>IDH1/IDH2 Teigiama kontrolė</b>
$C_T$ Viso IDH1/R132	Neaptikta	25.45	23.95
$C_T$ IDH1/R132 Mut	Neaptikta	34.32	25.76
$\Delta C_T$ IDH1/R132 Mut	Neaptikta	8.87	1.81
$C_T$ Viso IDH2/R172	Neaptikta	25.42	24.93
$C_T$ IDH2/R172 Mut	Neaptikta	34.36	26.36
$\Delta C_T$ IDH2/R172 Mut	Neaptikta	8.94	1.43
$C_T$ Viso IDH1/R100	Neaptikta	26.30	24.69
$C_T$ IDH1/R100 Mut	Neaptikta	33.04	26.39
$\Delta C_T$ IDH1/R100 Mut	Neaptikta	6.74	1.70
$C_T$ IDH1 Mut R132H	Neaptikta	35.20	26.48
$\Delta C_T$ IDH1 Mut R132H	Neaptikta	9.75	2.53
$C_T$ IDH1 Mut R132C	Neaptikta	37.16	27.07
$\Delta C_T$ IDH1 Mut R132C	Neaptikta	11.71	3.12
$C_T$ IDH2 Mut R172K	Neaptikta	40.00	27.97
$\Delta C_T$ IDH2 Mut R172K	Neaptikta	14.58	3.04

## Mėginio įvesties patvirtinimas

Mėginio įvestis turi būti patvirtinta prieš interpretaciją.

$C_T$  reikšmė gauta mėginiui su kiekvienu PPM-viso ( $C_{T \text{ VISO IDH1/R132}}$ ,  $C_{T \text{ VISO IDH2/R172}}$  ir  $C_{T \text{ VISO IDH1/R100}}$ ) turi būti žemesnė nei 32.00.  $C_{T \text{ VISO}}$  reikšmės  $\geq 32.00$  gaunamos esant nedidelei DNR kokybei. Mėginys turi būti tiriamas iš naujo. Jei DNR kiekio nepavyksta gauti pakankamai, išskirkite daugiau vėžio audinio, jei įmanoma (žiūrėkite "Triukčių šalinimas", puslapyje 34).

## Mėginio rezultatai

### *IDH1/2* mutacijos nustatymas

Kiekvienam mėginiui paskaičiuokite  $\Delta C_T$  reikšmes gautas kiekvienam mutacijos nustatymo tyrimui (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) kaip nurodyta žemiau.

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

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

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

Jei 0  $C_T$  reikšmė gaunama mėginiui, naudokite  $C_T$  reikšmę lygią 40, kad apskaičiuotumėte  $\Delta C_T$  reikšmę.

Mėginiai priskiriami mutacijai teigiamais jei  $\Delta C_T$  reikšmė yra mažesnė arba lygi  $\Delta C_T$  nukrypimo reikšmei pagal mutacijos nustatymo tyrimus, kaip nurodyta 8 lentelėje.

## 8 lentelė. Ribinės vertės kiekvienam mutacijos nustatymo tyrimui

Mutacijos tyrimas	Riba ( $\Delta C_T$ )
IDH1/R132 Mut	5.34
IDH2/R172 Mut	6.42
IDH1/R100 Mut	4.65

### *IDH1/2* mutacijos identifikavimas

Kiekvienam mėginiui skaičiuokite  $\Delta C_T$  vertes, gautas mutacijos identifikavimo tyrimui (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K) kaip nurodyta žemiau.

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

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

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

Jei 0  $C_T$  reikšmė gaunama mėginiui, naudokite  $C_T$  reikšmę lygią 40, kad apskaičiuotumėte  $\Delta C_T$  reikšmę.

Mėginio mutacija yra identifikuojama jei  $\Delta C_T$  reikšmė yra mažesnė arba lygi  $\Delta C_T$  ribinei reikšmei atitinkamam mutacijos nustatymo tyrimui, kaip nurodyta žemiau 9 lentelėje. Pavyzdžiai kaip interpretuoti  $\Delta C_T$  parodyta 10 ir 11 lentelėse.

**9 lentelė. Ribinės vertės kiekvienam mutacijos identifikavimo tyrimui**

<b>Mutacijos tyrimas</b>	<b>Riba (<math>\Delta C_T</math>)</b>
IDH1 Mut R132H	6.87
IDH1 Mut R132C	7.14
IDH2 Mut R172K	8.49

**10 lentelė. Pavyzdys - IDH1/2 mutacijos nustatymas**

<b>Reikšmė</b>	<b>Mėginys 1</b>	<b>Mėginys 2</b>
$C_T$ Viso IDH1/R132	26.39	26.32
$C_T$ IDH1/R132 Mut	33.86	28.29
$\Delta C_T$ IDH1/R132 Mut	7.47	1.97
$C_T$ Viso IDH2/R172	26.79	25.79
$C_T$ IDH2/R172 Mut	35.13	35.21
$\Delta C_T$ IDH2/R172 Mut	8.34	9.42
$C_T$ Viso IDH1/R100	27.20	27.37
$C_T$ IDH1/R100 Mut	33.83	33.76
$\Delta C_T$ IDH1/R100 Mut	6.63	6.39
<b>Mutacijos nustatymas</b>	<b>Mutacija nenustatyta</b>	<b>R132 mutacija nustatyta</b>

## 11 lentelė. Pavyzdys - *IDH1/2* mutacijos identifikavimas

Reikšmė	Mėginys 1	Mėginys 2
$C_T$ Viso <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
$C_T$ <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i>	33.82	28.27
$\Delta C_T$ <i>IDH1</i> Mut <i>R132H</i>	7.43	1.95
$C_T$ Viso <i>IDH1/R132</i>	26.39	26.32
$C_T$ <i>IDH1</i> Mut <i>R132C</i>	37.94	40.00
$\Delta C_T$ <i>IDH1</i> Mut <i>R132C</i>	11.55	13.68
$C_T$ Viso <i>IDH2/R172</i>	26.79	25.79
$C_T$ <i>IDH2</i> Mut <i>R172K</i>	40.00	40.00
$\Delta C_T$ <i>IDH2</i> Mut <i>R172K</i>	13.21	14.21
Mutacijos identifikavimas	Mutacija nustatyta	Mutacija nustatyta <i>R132H</i>

## IDH1/2 mutacijų interpretavimas

Procedūra, kad būtų galima priskirti *IDH1/2* mutacijos tipą mėginiams, kurie yra teigiami dėl *IDH1/2* mutacijos, parodyta 12 lentelėje. Interpretacijos pavyzdys pademonstruotas 13 lentelėje.

### 12 lentelė. Interpretavimo gidas

		Mutacijos identifikavimas			
		<i>IDH1</i> Mut R132H nustatyta	<i>IDH1</i> Mut R132C nustatyta	<i>IDH2</i> Mut R172K nustatyta	Mutacija nenustatyta
<b>Mutacijos nustatymas</b>	<b>R132 mutacija nustatyta</b>	R132H mutacija nustatyta	R132C mutacija nustatyta	–	R132 mutacija, bet ne R132H ir ne R132C
	<b>R172 mutacija nustatyta</b>	–	–	R172K mutacija nustatyta	R172 mutacija bet ne R172K
	<b>R100 mutacija nustatyta</b>	–	–	–	R100
	<b>Mutacija nenustatyta</b>	Žemas mutacijos R132H kiekis nustatytas (tarp 1% ir 2%)*	Žemas mutacijos R132C kiekis nustatytas (tarp 1% ir 4%)*	Žemas mutacijos R172K kiekis nustatytas (apie 1%)*	Mutacija nenustatyta

\* Šie atvejai gali pasitaikyti retai ir visi mėginiai ir techniniai priimtumo kriterijai turi būti patikrinti, ypač vėžio ląstelių kiekis. Jei visi kriterijai atitinka normas, mėginys turi būti tiriamas iš naujo.



### 13 lentelė. Pavyzdys - *IDH1/2* mutacijos ataskaita ir interpretavimas

	Mėginys 1	Mėginys 2
<b>Mutacijos nustatymas</b>	Mutacija nenustatyta	R132 mutacija nustatyta
<b>Mutacijos identifikavimas</b>	Mutacija nenustatyta	Mutacija nustatyta R132H
<b>Rezultatų interpretavimas</b>	Mutacija nenustatyta ir neidentifikuota	R132H mutacija

**Pastaba:** Jei mėginys turi 2 ar daugiau  $\Delta C_T$  reikšmes mažesnes ar lygias  $\Delta C_T$  ribinei reikšmei, tada mutacijos statusas skiriamas mutacijai su didesniu skirtumu tarp ribinės ir gautos  $\Delta C_T$ . Žiūrėkite pavyzdį 14 lentelėje.

### 14 lentelė. Pavyzdys daugybinio teigiamo rezultato interpretavimo atveju

	Mėginys 3	Mėginys 4
$\Delta C_T$ <i>IDH1/R132</i> Mut	1.24	5.24
$\Delta C_T$ ribinė <i>IDH1/R132</i> Mut	5.34	5.34
$(\Delta C_T \text{ ribinė} - \Delta C_T)$ <i>IDH1/R132</i> Mut	4.10	0.10
$\Delta C_T$ <i>IDH2/R172</i> Mut	5.32	5.95
$\Delta C_T$ ribinė <i>IDH2/R172</i> Mut	6.42	6.42
$(\Delta C_T \text{ ribinė} - \Delta C_T)$ <i>IDH2/R172</i> Mut	1.10	0.47
<b>Rezultatų interpretavimas</b>	R132 mutacija	R172 mutacija

## Trikčių šalinimas

Šis trikčių šalinimo gidas gali būti naudingas sprendžiant bet kurias problemas, kurios gali iškilti. Daugiau informacijos rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

### Komentarai ir pasiūlymai

---

#### Užsikimšusi kolonėlė atliekant DNR išskyrimą

Nepilnas lizavimas

Pakartokite centrifugavimą.

Likęs lizatas gali būti perkeltas į naują kolonėlę.

Pakartokite išskyrimą naudodami mažiau FFPE audinio.

#### Nepakankamas DNR kiekis išskyrimo nuoplovose

Nepakankamas FFPE audinio plotas

Pakartokite išskyrimą su daugiau parinkto FFPE audinio.

#### IDH1/2 WT kontrolė neaptikta

a) Pipetavimo klaida ar praleisti reagentai; mėgintuvėlio ar šulinėlio sumaišymas

Patikrinkite pipetavimo schemą ir reakcijos nustatymą.

Pakartokite PGR procedūrą.

b) Netinkamas rinkinio sudedamųjų dalių laikymas

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys turi būti laikomas –15°C iki –30°C temperatūroje ir reikia laikyti pradmenis ir zondų mišinius apsaugotus nuo šviesos. Žiūrėkite “Reagentų laikymas ir apdorojimas”, puslapyje 13.

Neviršykite 5 užšaldymo – atšildymo ciklų.

## Komentariai ir pasiūlymai

- |  |   |
|--|---|
| c) <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinio galiojimo laikas pasibaigė | Patikrinkite laikymo sąlygas ir galiojimo laiką (žiūrėkite rinkinio etiketėje) visų reagentų ir jei reikia naudokite naują <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinį. |
|--|---|

### **IDH1/2 teigiama kontrolė neaptikta**

- |   |   |
|---|---|
| a) Pipetavimo klaida ar praleisti reagentai; mėgintuvėlio ar šulinėlio sumaišymas | Patikrinkite pipetavimo schemą ir reakcijos nustatymą.<br>Pakartokite PGR procedūrą.  |
| b) Netinkamas rinkinio sudedamųjų dalių laikymas                                  | <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinys turi būti laikomas –15°C iki –30°C temperatūroje ir reikia laikyti pradmenis ir zondų mišinius apsaugotus nuo šviesos. Žiūrėkite “Reagentų laikymas ir apdorojimas”, puslapyje 13.<br>Neviršykite 5 užšaldymo – atšildymo ciklų. |
| c) <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinio galiojimo laikas pasibaigė          | Patikrinkite laikymo sąlygas ir galiojimo laiką (žiūrėkite rinkinio etiketėje) visų reagentų ir jei reikia naudokite naują <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinį.   |

### **Signalas neaprinkamas, įskaitant kontrolės signalus**

- |   |  |
|---|--|
| a) Nėra reakcijos mėgintuvėlio 1 pozicijoje Rotor-Gene Q MDx instrumente          | Visada įsitikinkite, kad įdedate mėginį į 1 poziciją rotoruje. Kitaip instrumentas nebus kalibruotas ir atsiras neteisingi fluorescencijos duomenys. |
| b) Pipetavimo klaida ar praleisti reagentai; mėgintuvėlio ar šulinėlio sumaišymas | Patikrinkite pipetavimo schemą ir reakcijos nustatymą.<br>Pakartokite PGR procedūrą.   |

## Komentarai ir pasiūlymai

---

- c) Netinkamas rinkinio sudedamųjų dalių laikymas *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys turi būti laikomas  $-15^{\circ}\text{C}$  iki  $-30^{\circ}\text{C}$  temperatūroje ir reikia laikyti pradmenis ir zondų mišinius apsaugotus nuo šviesos. Žiūrėkite “Reagentų laikymas ir apdorojimas”, puslapyje 13.  
Neviršykite 5 užšaldymo – atšildymo ciklų.
- d) *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinio galiojimo laikas pasibaigė Patikrinkite laikymo sąlygas ir galiojimo laiką (žiūrėkite rinkinio etiketėje) visų reagentų ir jei reikia naudokite naują *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinį.
- e) Neteisingai parinktas nustatymo kanalas Nustatykite nustatymo kanalą į Ciklinimas Žalias arba 530 nm/640 nm.
- f) Nėra duomenų programoje Patikrinkite šiluminio ciklo programą. Žiūrėkite 5 lentelę, puslapyje 24.  
Pasirinkite duomenų rinkimo režimą **Single** kiekvieno atitinkamo segmento pabaigoje PGR programoje.

## Fluorescencijos intensyvumas kinta

Pipetavimo klaida ar praleisti reagentai; mėgintuvėlio ar šulinėlio sumaišymas

Patikrinkite pipetavimo schemą ir reakcijos nustatymą.  
Pakartokite PGR procedūrą.

## Fluorescencijos intensyvumas per žemas

- a) Netinkamas rinkinio sudedamųjų dalių laikymas *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys turi būti laikomas  $-15^{\circ}\text{C}$  iki  $-30^{\circ}\text{C}$  temperatūroje ir reikia laikyti pradmenis ir zondų mišinius apsaugotus nuo šviesos. Žiūrėkite “Reagentų laikymas ir apdorojimas”, puslapyje 13.

## Komentari ir pasiūlymai

---

- b) *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinio galiojimo laikas pasibaigė
- Neviršykite 5 užšaldymo – atšildymo ciklų.  
Patikrinkite laikymo sąlygas ir galiojimo laiką (žiūrėkite rinkinio etiketėje) visų reagentų ir jei reikia naudokite naują *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinį.
- c) Labai mažai taikinio DNR
- Visada patikrinkite DNR koncentraciją prieš tyrimą.  
Žiūrėkite “DNR išskyrimas ir paruošimas”, puslapyje 16.

## Neigiama kontrolė (H<sub>2</sub>O) duoda teigiamą rezultatą

Kryžminis užteršimas, reagentų užteršimas, instrumento klaida, šulinėlių ar kapiliarų inversija, pradmenų degradacija.

Pakeiskite visus kritiškai svarbius reagentus arba naudokite naują *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinį.

Visada dirbkite su mėginiais, rinkinio sudedamosiomis dalimis ir eksplotacinėmis medžiagomis tinkamai, siekdami išvengti perkėlimo užteršimo.

Laikykite pradmenis ir zondų mišinius apsaugotus nuo šviesos.

Patikrinkite ar nėra klaidingai teigiamų rezultatų fluorescencijos kreivėse.

Patikrinkite reakcijos nustatymą. Žiūrėkite “Protokolas: IDH1/2 mutacijų nustatymas”, puslapis 20.

## Kokybės kontrolė

Remiantis QIAGEN ISO-sertifikuota Kokybės Valdymo Sistema, kiekvienos partijos *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniai yra išbandomi iš anksto žinomomis specifikacijomis, kad būtų užtikrinta pastovi produkto kokybė. Analizės sertifikatus galite rasti puslapyje [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

---

# Apribojimai

Rinkinys skirtas profesionaliam naudojimui.

Produktas gali būti naudojamas tik personalo, instruktuo ir apmokyto dirbti molekulinės biologijos srityje ir susipažinusio su šia technika.

Rinkinys turi būti naudojamas remiantis instrukcijomis, duotomis šiame vadove, kartu su patvirtintu instrumentu, nurodytu "Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos", puslapyje 10.

Turi būti atkreiptas dėmesys į galiojimo datas, nurodytas ant dėžės ir visų sudedamųjų medžiagų etikečių. Nenaudokite pasibaigusio galiojimo sudedamųjų dalių.

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra skirtas tirti tik buferinius formalinu fiksuotų į parafiną įterptųjų smegenų audinius.

*therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinys yra patvirtintas tik naudojimui su QIAamp DNA FFPE Tissue Kit arba su QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Tik Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (skirtas PGR) ir QIASymphony SP (mėginio paruošimui) yra patvirtinti.

Bet koks neteisėtas naudojimas ir/ar pakeitimas sudedamųjų dalių pašalins QIAGEN atsakomybę.

Naudotojo atsakomybė patvirtinti sistemos veikimą, bet kokioms procedūroms naudojamoms laboratorijoje, kurios nėra padengtos QIAGEN veikimo studijos.

---

Tyrimas sukurtas nustatyti 7 mutacijas kodonuose 132 ir 100 *IDH1* gene ir 5 mutacijas kodone 172 *IDH2* gene. Mėginiai, kurių tyrimo rezultatas "mutacija nenustatyta", gali turėti *IDH1* ar *IDH2* mutacijas, nenustatomas šiuo tyrimu.

Mutacijų nustatymas priklauso nuo mėginio vientisumo, naviko turinio ir DNR kiekio mėginyje.

Visi diagnostiniai rezultatai, gauti tyrimo metu, turi būti vertinami atsižvelgiant į visus tiesiogiai susijusius klinikinius ar laboratorinius tyrimus.

# Veikimo charakteristikos

## Tuščios vietos riba (LOB)

Tuščios vietos riba (LOB) buvo nustatyta (remiantis CLSI/NCCLS EP17-A gairėmis; 14) neigiamiems mėginiams (FFPE nepakitusių smegenų, 8 mėginiai, 64 matavimai/partijai, 2 partijos).

LOB rezultatai pavaizduoti 15 lentelėje.

### 15 lentelė. Tuščios vietos riba (LOB)

Tyrimas	LOB	Galutinė LOB
R132 Mut	Patvirtinta partija 1: 6.57 Patvirtinta partija 2: 6.32	6.32
R132H Mut	Patvirtinta partija 1: 7.91 Patvirtinta partija 2: 8.22	7.91
R132C Mut	Patvirtinta partija 1: 8.04 Patvirtinta partija 2: 8.20	8.04
R172 Mut	Patvirtinta partija 1: 7.74 Patvirtinta partija 2: 7.59	7.59
R172K Mut	Patvirtinta partija 1: 9.93 Patvirtinta partija 2: 10.58	9.93
R100 Mut	Patvirtinta partija 1: 6.52 Patvirtinta partija 2: 5.19	5.17

## Aptikimo riba (LOD)

Aptikimo riba (LOD arba analitinis jautrumas) buvo nustatyta remiantis "tikslumo profilio metodu" aprašytu CLSI/NCCLS EP17-A gairėse (14). Penki mažo teigiamumo mėginiai (plazmidinė DNR įvesta į gliomos laukinio tipo DNR) buvo naudoti vienai mutacijai (nuo 30 iki 110 matavimų vienai mutacijai ir mutacijos kiekiui).



Aptikimo ribos rezultatai pavaizduoti 16 lentelėje.

**16 lentelė. Aptikimo riba (LOD)**

Tyrimas	Mutacija	LOD	Tyrimo riba	Jautrumas (%)
R132H Mut	R132H	6.87	6.87	0.78
R132C Mut	R132C	7.14	7.14	1.19
R172K Mut	R172K	8.49	8.49	0.61
R132 Mut	R132H	5.50	5.34	2.32
	R132C	5.34		4.35
	R132L	5.42		2.30
	R132G	5.61		2.23
	R132S	5.42		2.75
	R132V	5.56		2.24
R172 Mut	R172K	6.42	6.42	1.06
	R172G	6.58		3.00
	R172M	6.66		3.31
	R172S	6.42		14.93
	R172W	6.68		2.36
R100 Mut	R100Q	4.65	4.65	3.45

Mutacija nustatoma jei  $\Delta C_T$  yra mažiau ar lygu LOD.

## DNR kiekio efektas

DNR buvo išskirta iš 4 skirtingų gliomos auglių mėginių: 2 laukinio tipo *IDH1/2* ir 2 su *IDH1* R132H (395G>A) mutacijomis.

Trys skirtingi DNR kiekiai (įskaitant rekomenduojamą protokole) buvo tiriami, siekiant įvertinti DNR kiekio poveikį kokybiniams rezultatams. Rezultatai parodė, kad DNR kiekis neturi įtakos kokybiniams rezultatams. Tačiau, daugiau techninių klaidų ( $C_T$  viso QC klaida) buvo pastebėta, kai naudota DNR kiekis mažesnis nei rekomenduojamas (<25 ng DNR). Todėl 25 ng DNR 5  $\mu$ l tūryje yra rekomenduojamas kiekis atliekant šį tyrimą.

## Atsikartojamumas ir atkuriamumas

Tikslumo tyrimas buvo atliktas naudojant 4 skirtingus mėginius (plazmidinė DNR įvesta į gliomos laukinio tipo DNR, kad atitiktų laukinio tipo (WT), mutavusius ir ribinius mėginius) tiriant 40 kartų po du kartus ( $n = 80$  matavimų).

Standartiniai nuokrypiai (SD) ir variacijos koeficientai (CV) pavaizduoti 17 lentelėje.

**17 lentelė. Tikslumo rezultatai**

Tyrimas	Mėginys	Vidutinis $\Delta C_T$	$SD_R^*$	$SD_{Tyrimo}^\dagger$	$SD_{Viso}^\ddagger$	$CV_{Viso}(\%)^\ddagger$	Teisingo rezultato kiekis
R132C Mut	WT	11.58	1.08	0.00	1.11	10	100% (78/78)
	5%	5.19	0.26	0.23	0.46	9	100% (76/76)
	10%	4.37	0.27	0.14	0.48	11	100% (78/78)
	30%	2.62	0.20	0.21	0.46	18	100% (78/78)
R132H Mut	WT	10.87	1.48	0.00	1.48	14	100% (78/78)
	5%	4.46	0.27	0.05	0.31	7	100% (78/78)
	10%	3.57	0.28	0.14	0.31	9	100% (76/76)
	30%	1.86	0.21	0.20	0.30	16	100% (72/72)
R172K Mut	WT	12.20	0.31	0.17	0.39	3	100% (66/66)
	5%	6.19	0.50	0.00	0.63	10	100% (76/76)
	10%	5.23	0.32	0.20	0.48	9	100% (76/76)
	30%	3.68	0.18	0.11	0.36	10	100% (76/76)

\* R: Atsikartojamumas.

† Tyrimo: Atsikartojamumas viename tyrime

‡ Viso: Visas tikslumas (įskaitant tarp instrumentų, tarp operatorių, tarp partijų).

Lentelės tęsinys kitame lape

**17 lentelė. Tikslumo rezultatai (tęsinys)**

Tyrimas	Mėginys	Vidutinis $\Delta C_T$	$SD_R^*$	$SD_{Tyrimo}^\dagger$	$SD_{Viso}^\ddagger$	$CV_{Viso}(\%)^\ddagger$	Teisingo rezultato kiekis
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	100% (152%152)
	R132C 30%	2.00	0.26	0.28	0.59	29	

\* R: Atsikartojamumas.

† Tyrimo: Atsikartojamumas viename tyrime

‡ Viso: Visas tikslumas (įskaitant tarp instrumentų, tarp operatorių, tarp partijų).

Lentelės tęsinys kitame lape

## 17 lentelė. Tikslumo rezultatai (tęsinys)

Tyrimas	Mėginys	Vidutinis					Teisingo rezultato kiekis
		$\Delta C_T$	$SD_R^*$	$SD_{\text{Tyrimo}}^\dagger$	$SD_{\text{Viso}}^\ddagger$	$CV_{\text{Viso}}(\%)^\ddagger$	
R172 Mut	WT	9.47	0.91	0.87	1.45	15	100% (66/66)
	5%	4.45	0.35	0.12	0.56	13	100% (76/76)
	10%	3.55	0.29	0.02	0.53	15	100% (76/76)
	30%	2.05	0.18	0.15	0.47	23	100% (76/76)

\* R: Atsikartojamumas.

† Tyrimo: Atsikartojamumas viename tyrime

‡ Viso: Visas tikslumas (įskaitant tarp instrumentų, tarp operatorių, tarp partijų).

## Metodų palyginimas

Palyginimas su imunohistocheminiu (IHC) metodu *IDH1/R132H* nustatymui.

Buvo atliktas tyrimas, siekiant parodyti atitikimą tarp duomenų gautų atlikus tyrimą su *therascreen IDH1/2 RGQ PGR* rinkiniu ir IHC (Prieš-žmogaus *IDH1R132H* antikūnio klonas H09, DIANOVA).

Iš viso buvo parinkta 103 klinikinės gliomos mėginių. Seniausias blokas buvo 10 metų.

Visi mėginiai išlaikė kokybės kontrolę abiem rinkiniam *therascreen IDH1/2 RGQ PGR* rinkiniui ir IHC.

Rezultatai parodo teigiamą procentinį sutarimą (PPA) lygų 100%, neigiamą procentinį sutarimą (NPA) lygų 98%, vidutinį sutarimą (OA) lygų 99% (18 lentelė).

### 18 lentelė. Sutarimo analizė tarp *therascreen* RGQ PGR rinkinio ir IHC

Sutarimo matavimas	Dažnumas (%)	95% Pasikliautinis intervalas
PPA	45/45 (100%)	[92;100]
NPA	57/58 (98%)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

#### Palyginimas su dvikrypte DNR sekoskaita

Buvo atliktas tyrimas, siekiant parodyti atitikimą tarp duomenų gautų atlikus tyrimą su *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniu ir dvikrypte DNR sekoskaita.

Iš viso buvo parinkta 103 klinikinės gliomos mėginių. Seniausias blokas buvo 10 metų.

Visi mėginiai išlaikė kokybės kontrolę *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkiniui ir 101 mėginys demonstravo rezultatus atliekant dvikryptę DNR sekoskaitą.

Rezultatai parodo teigiamą procentinį sutarimą (PPA) lygų 100%, neigiamą procentinį sutarimą (NPA) lygų 92%, vidutinį sutarimą (OA) lygų 96% (19 ir 20 lentelės).

19 lentelė. *therascreen* IDH1/2 RGQ PGR rinkinio palyginimas su dvikrypte DNR sekoskaita

		Sanger dvikryptė DNR sekoskaita				
		R132*	R132C	R132H	R172 <sup>†</sup>	WT
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PGR rinkinys	R132*	6	0	0	0	0
	R132C	0	2	0	0	0
	R132H	0	0	42	0	3
	R172 <sup>†</sup>	0	0	0	0	1
	WT	0	0	0	0	47

\* R132 reiškia, kad mėginyje buvo nustatyta R132 mutacija, bet ne R132H ir ne R132C.

† R172 reiškia, kad mėginyje buvo nustatyta R172 mutacija, bet ne R172K.

20 lentelė. Sutarimo analizė su dvikrypte DNR sekoskaita

Sutarimo matavimas	Dažnumas (%)	95% Pasikliautinis intervalas
PPA	50/50 (100%)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

---

# Nuorodos

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



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

# Simboliai

Ši lentelė aprašo simbolius, kurie gali būti nurodyti ant pakuotės ar šiame dokumente.



<N>

Reagentų pakanka <N> tyrimų



Galiojimo data



In vitro diagnostinis medicininis produktas



Katalogo numeris



Partijos numeris



Medžiagos numeris (t.y. sudedamosios dalies ženklimas)



Sudedamosios dalys (t.y. sąrašas to kas yra įtraukta)



Sudėtyje yra (turinys)



Numeris (t.y. buteliukai, buteliai)

Rn

R žymi naudojimo vadovo peržiūrėjimą, n žymi peržiūrėjimo numerį



Pasaulinis prekybinis produkto numeris



Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Perskaitykite naudojimo instrukcijas



Dėmesio

## Užsakymų informacija

Produktas	Sudedamosios dalys	Kat. Nr..
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR kit (20)	20 reakcijų: 9 pradmenų ir zondų mišiniai, WT kontrolė, Teigiama kontrolė, Pagrindinis mišinys, Benukleazis vanduo	873011
<b>Rotor-Gene Q MDx ir priedai</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Tikro laiko PGR cikleris ir didelės rezoliucijos lydymo analizatorius su 5 kanalais (žalias, geltonas, oranžinis, raudonas, tamsiai raudonas) plius HRM kanalas, nešiojamas kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1-metų garantija dalims ir darbui, instaliacija ir apmokymas	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Tikro laiko PGR cikleris su 5 kanalais (žalias, geltonas, oranžinis, raudonas, tamsiai raudonas), nešiojamas kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1-metų garantija dalims ir darbui, instaliacija ir apmokymas neįskaičiuota	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete į 72 x 0.1 ml mėgintuvėlius	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir kepurėlės skirtos 1000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir kepurėlės skirtos 1000 reakcijų	981106
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — genominės DNR išskyrimui iš parafino įterptųjų audinių</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Skirta 50 DNR paruošimų: 50 QIAamp MinElute® kolonėlių, Proteinase K, Buferiai, Surinkimo mėgintuvėliai (2 ml)	56404

Produktas	Sudedamosios dalys	Kat. Nr..
<b>QIASymphony DSP DNA Mini Kit — automatiniam DNR išskyrimui iš 1–96 mėginių</b>		
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Skirta 192 paruošimų po 200 µl: įtraukti 2 reagentų stoveliai ir enzimų stovai bei priedai	937236
<b>QIASymphony SP ir priedai</b>		
QIASymphony SP System	QIASymphony mėginių paruošimo modulis: įskaitant instaliaciją ir mokymus, 1 metų garantija dalims ir darbui	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony mėginių paruošimo modulis: įskaitant 1-metų garantija dalims ir darbui	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-šulinėlių mėginių paruošimo kasetės, skirtos naudoti su QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-Rod užvalkalai, skirti naudoti su QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Vienkartiniai antgaliai su filtru, stoveliuose; (8 x 128). Skirti naudoti su QIACube ir QIASymphony SP/AS instrumentais	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Vienkartiniai antgaliai su filtru, stoveliuose; (8 x 128). Skirti naudoti su QIASymphony SP/AS instrumentu	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Nesterilūs polipropileno mėgintuvėliai (0.85 ml didžiausias tūris, mažiau nei 0.7 ml saugojimo tūris, 0.4 ml išplovimo tūris); 2304 stoveliuose po 96; įskaitant kepurėlių juosteles	19588
<b>Reagentai</b>		
RNase A (17,500 U)	2.5 ml (100 mg/ml; 7000 vienetų/ml, tirpalas)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml audinio lizės buferis skirtas 1000 paruošimų	19076

---

Naujausią licencijavimo informaciją ir su produktais susijusius atsakomybės apribojimus rasite atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove ar vartotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovus ir vartotojo vadovus rasite **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** arba galite užsisakyti iš QIAGEN techninės pagalbos ar savo vietinio platintojo.

---

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias.

Šis produktas yra skirtas in vitro diagnostiniam naudojimui. QIAGEN produktai negali būti perparduodami, modifikuoti perpardavimui ar naudojami gaminti komercinius produktus be raštinio QIAGEN leidimo.

Informacija šiame dokumente gali keistis be išankstinio įspėjimo. QIAGEN neprisiima atsakomybės už bet kokias klaidas, kurios gali atsirasti šiame dokumente. Šis dokumentas yra manoma, yra išsamus ir tikslus jo paskelbimo metu. Jokių atvejų QIAGEN neatsako už atsitiktinę, specialią, kelis arba pasekminius nuostolius, susijusius su, arba kylančius iš šio dokumento naudojimo.

QIAGEN produktai garantuoja atitikimą nurodytoms specifikacijoms. Vienintelė QIAGEN pareiga ir vienintelė kliento priemonė yra tik pakeisti nemokamai produktą tuo atveju jei produktas nesugeba atlikti, kaip garantuoja.

Šio produkto įsigijimas leidžia pirkėjui jį naudoti diagnostikos paslaugas atlikti žmogaus in vitro diagnostikai. Nėra generalinio patento ar kito pažymėjimo nei šį konkrečiai naudojimo teisę po pirkimo garantuojanti leidimą.

*IDH1/2* mutacijos ir jų naudojimas yra apsaugotos pacientų teisių, įskaitant Europos patentų EP2326735 ir EP2546365, JAV patentų US2011229479 ir US2012202207 ir užsienio kolegų.

Šio produkto įsigijimas nesuteikia jokios teisės jį naudoti klinikiniam tyrimams susijusiems su *IDH1/2* veikiančiais vaistais. QIAGEN kuria specialią licenzijavimo programą tokiam naudojimui. Prašome kreiptis į mūsų teisės departamentą [ldhlicenses@qiagen.com](mailto:ldhlicenses@qiagen.com).

Prekės ženklai: QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIASymphony<sup>®</sup>, MinElute<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, *therascreen*<sup>®</sup> (QIAGEN Group); FAM<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Histolemon<sup>™</sup> (Carlo Erba); Sarstedt<sup>®</sup> (Sarstedt AG).

#### **Ribotos atsakomybės sutartis *therascreen IDH1/2 RGQ PGR* rinkiniui**

Šio produkto naudojimas reiškia, kad rinkinio pirkėjas ar vartotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. Produktas gali būti naudojamas tik pagal su produktu tiekiamais protokolais ir šį vadovą ir tik su j šį rinkinį įeinančiais komponentais. Turėdami intelektualinę nuosavybę, QIAGEN neleidžia naudoti ar įdiegti j prie šio rinkinio pridedamus komponentus kitų komponentų, kurie neįeina į šį rinkinį, kaip aprašyta su produktu tiekiamuose protokoluose, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Kai kuriuos papildomus protokolus QIAGEN vartotojai parūpina QIAGEN vartotojams. Šių protokolų QIAGEN kruopščiai neištestavo ar neoptimizavo. QIAGEN nesuteikia garantijos, kad jie nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. QIAGEN nesuteikia jokios garantijos, kad šis rinkinys ir/ar jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisės, išskyrus aiškiai apibūdintą licenciją.
3. Šis rinkinys ir jo komponentai yra licencijuoti vienkartiniam naudojimui ir jų negalima naudoti pakartotinai, atnaujinti ar perparduoti.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų aiškių ar turimų omenyje licencijų, išskyrus aiškiai apibūdintąsias.
5. Rinkinio pirkėjas ir vartotojas sutinka neatlikti tokių veiksmų, kurie skatintų ar palengvintų aukščiau aprašytus draudžiamus veiksmus, ir neleisti jų atlikti kitiems. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotos atsakomybės sutarties draudimus bet kokiame teisme ir atgauti visas tyrimo bei teismo išlaidas, įskaitant mokesčius teisininkams, priverstinį ribotos atsakomybės sutarties vykdymą ir intelektualinės nuosavybės teises, susijusias su rinkiniu ir/ar jo komponentais.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1566-004 1075247 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, visos teisės saugomos



