

Sierpień 2016

Instrukcja Zestawu *therascreen*[®] IDH1/2 RGQ PCR



20

Wersja 1

Do detekcji mutacji 12 *IDH1* oraz *IDH2* w glejaku

IVD

Do użytku diagnostycznego in vitro

Do użytku z aparatem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

873011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R4 **MAT**

1075247PL

Spis Treści

Przeznaczenie zestawu	4
Streszczenie i Wyjaśnienia	4
Zasada Procedury	6
Materiały Dostarczone	8
Zawartość zestawu	8
Materiały Wymagane, ale Niedostarczone	10
Ostrzeżenia i Uwagi	12
Informacje bezpieczeństwa	12
Uwagi ogólne	12
Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami	13
Warunki transportu	13
Przechowywanie	14
Stabilność	14
Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami	14
Procedura	16
Preparatyka DNA	16
Protokół: Detekcja mutacji <i>IDH1/2</i>	20
Interpretacja Wyników	25
Kontrole z wodą	25
Kontrola jakości z użyciem wartości C_T dla kontroli	25
Walidacja wejściowej ilości i jakości próbek	28
Wyniki dla próbek	28

Rozwiązywanie problemów	34
Kontrola Jakości	38
Ograniczenia	38
Charakterystyka Wydajności	40
Limit dla próby ślepej (LOB)	40
Limit detekcji (LOD)	40
Efekt wejściowej ilości DNA	42
Powtarzalność i odtwarzalność	42
Porównanie metod	45
Literatura	48
Symbole	50
Informacje Dotyczące Zamawiania	52

Przeznaczenie zestawu

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest testem diagnostycznym in vitro opartym na technologii PCR i służącym do ilościowego oznaczania 7 mutacji w genie *IDH1* oraz 5 mutacji w genie *IDH2*, a także bezpośredniej identyfikacji 3 głównych mutacji w DNA ekstrahowanym ze skrawków ludzkiej tkanki mózgu zatopionej w bloczkach parafinowych (FFPE – ang. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded).

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest przeznaczony do pomocy przy klasyfikacji glejaków.

Streszczenie i Wyjaśnienia

Mutacje w genach *IDH1* i *IDH2* dehydrogenazy izocytrynianowej (isocitrate dehydrogenase; IDH) są często obserwowane u osób dorosłych w glejakach stopnia II oraz III według klasyfikacji WHO (World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia) oraz w glejakach wtórnych (secondary glioblastomas; GBM) stopnia IV WHO. Poza wartością prognostyczną mutacji w IDH1/2, ich obecność jest również związana z pozytywną prognozą dla pacjentów z glejakiem (1–13).

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR służy detekcji 12 specyficznych mutacji *IDH1/2*: 6 w kodonie 132 genu *IDH1*, 5 w homologicznym kodonie 172 genu *IDH2* oraz 1 w kodonie 100 genu *IDH1* (Tabela 1). Zestaw pozwala także na bezpośrednią detekcję głównych mutacji *IDH1* i *IDH2* prowadzących do substytucji aminokwasowych *IDH1* R132H, *IDH1* R132C oraz *IDH2* R172K.

Tabela 1. Mutacje IDH1 oraz IDH2 wykryte z użyciem Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

Gen	Mutacja	Zmiana zasady	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

* Identyfikatory 'COSMIC ID' zostały zaczerpnięte z Catalog of Somatic Mutations in Cancer (katalog mutacji somatycznych w nowotworach; www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Zasada Procedury

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR zapewnia wystarczającą ilość odczynników do wykonania 9 osobnych reakcji amplifikacji wykrywających 12 mutacji (Tabela 1):

- 3 reakcje całkowitej amplifikacji kodonów 132 i 100 genu *IDH1* oraz kodonu 172 genu *IDH2*
- 3 reakcje amplifikacji dla mutacji w kodonach 132 i 100 genu *IDH1* oraz w kodonie 172 genu *IDH2*
- 3 reakcje amplifikacji specyficzne dla mutacji *IDH1* R132H, *IDH1* R132C oraz *IDH2* R172K

Całkowite mieszaniny reakcyjne

Całkowite mieszaniny starterów oraz sond (PPM-Total) oparte są na wykorzystaniu starterów i sond do amplifikacji zarówno zmutowanych, jak i dzikich sekwencji docelowych (Rysunek 1).

Mieszaniny reakcyjne do detekcji mutacji

Mieszaniny starterów i sond do detekcji mutacji służą do amplifikacji zarówno zmutowanych, jak i dzikich sekwencji docelowych. Dodatkowo zawierają oligonukleotyd zablokowany grupą fosforanową na końcu 3', co zapobiega wydłużaniu produktu (PCR clamping), co jest specyficzne dla dzikiej sekwencji docelowej.

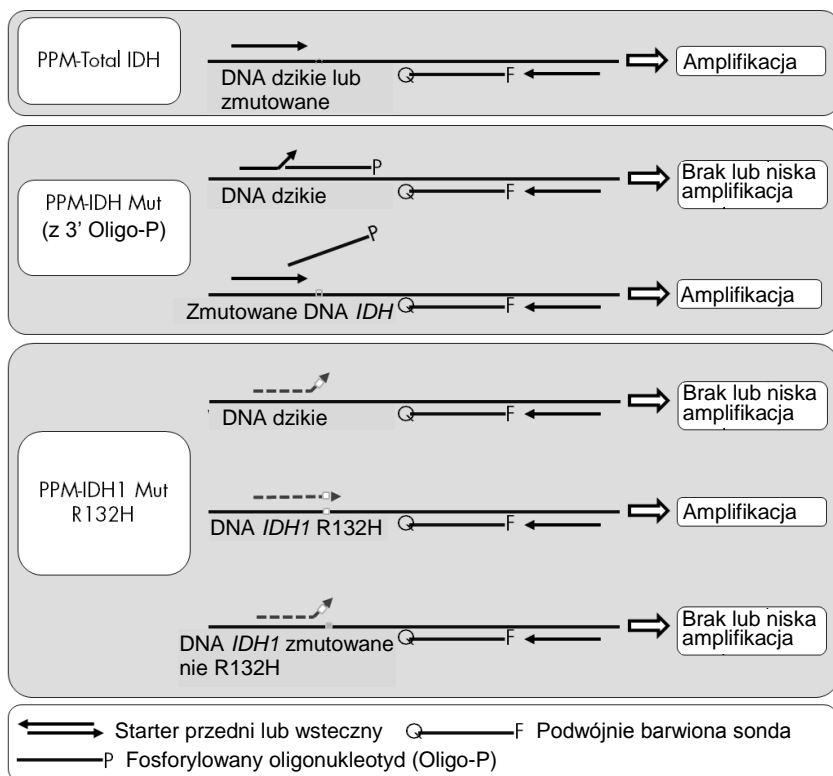
Gdy matryca dla PCR zawiera dziką sekwencję, 3'-fosforowany oligonukleotyd będzie dominował nad starterem PCR poprzez większe powinowactwo do sekwencji dzikiej. Wydłużanie produktu przez polimerazę DNA w takiej sytuacji nie zachodzi, nawet na niskim poziomie, a co za tym idzie nie obserwuje się amplifikacji.

Gdy obecna jest sekwencja zmutowana, przyłączanie startera PCR będzie dominowało nad przyłączeniem się 3'-fosforowanego oligonukleotydu i nastąpi amplifikacja (Rysunek 1).

Mieszanki reakcyjne do identyfikacji mutacji

Amplifikacja specyficzna dla alleli jest możliwa dzięki zastosowaniu technologii ARMS (Amplification Refractory Mutation System) wykorzystującej zdolność polimerazy DNA do sprawnego rozróżniania dopasowania lub braku dopasowania starterów na końcu 3'.

Gdy starter PCR jest w pełni dopasowany, to amplifikacja postępuje z pełną wydajnością. Gdy zasada 3' nie jest dopasowana, to obserwuje się tylko słabą amplifikację na poziomie tła (Rysunek 1).



Rysunek 1. Wyniki otrzymane z mieszankami starterów i sond Zestawu *therascreen IDH1/2* RGQ PCR. Zasada detekcji dla *IDH1* R132H dotyczy również *IDH1* R132C i *IDH2* R172K.

Materiały Dostarczone

Zawartość zestawu

Zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR		(20)
Numer katalogowy		873011
Ilość reakcji		20
Mieszanina starterów i sond do detekcji całkowitego <i>IDH1/R132</i> (dzikiego i zmutowanego)	PPM-Total <i>IDH1/R132</i> 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond do detekcji całkowitego <i>IDH2/R172</i> (dzikiego i zmutowanego)	PPM-Total <i>IDH2/R172</i> 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond do detekcji całkowitego <i>IDH1/R100</i> (dzikiego i zmutowanego)	PPM-Total <i>IDH1/R100</i> 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond (zawiera Oligo-P) do detekcji zmutowanego <i>IDH1/R132</i>	PPM- <i>IDH1/R132</i> Mut 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond (zawiera Oligo-P) do detekcji zmutowanego <i>IDH2/R172</i>	PPM- <i>IDH2/R172</i> Mut 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond (zawiera Oligo-P) do detekcji zmutowanego <i>IDH1/R100</i>	PPM- <i>IDH1/R100</i> Mut 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond do identyfikacji <i>IDH1</i> Mut R132H	PPM- <i>IDH1</i> Mut R132H 25x	40 µl

Kontynuacja tabeli na następnej stronie

Zawartość zestawu (kontynuacja)

Zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR		(20)
Numer katalogowy		873011
Ilość reakcji		20
Mieszanina starterów i sond do identyfikacji <i>IDH1</i> Mut R132C	PPM-IDH1 Mut R132C 25x	40 µl
Mieszanina starterów i sond do identyfikacji <i>IDH2</i> Mut R172K	PPM-IDH2 Mut R172K 25x	40 µl
DNA genomowe <i>IDH1/IDH2</i> typu dzikiego	IDH1/IDH2 WT Control	270 µl
Zmutowana kontrola pozytywna <i>IDH1/IDH2</i>	IDH1/IDH2 Positive Control	270 µl
Mieszanina polimerazy DNA <i>Taq</i> , nukleotydów (dNTPs), $MgCl_2$ oraz buforu do qPCR	qPCR Master Mix 2x	5 x 900 µl
Woda wolna od nukleaz	Nuclease-Free Water	5 x 525 µl
<i>Instrukcja Zestawu therascreen IDH1/2 RGQ PCR</i> (anglojęzyczna)		1

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheets; SDS), dostępnymi u producentów lub dostawców produktów.

Ważne: Upewnij się, że urządzenia zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producentów.

Odczynniki (ręczna ekstrakcja DNA)

- Zestaw do ekstrakcji DNA: QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (nr kat. 56404)
- RNase A (17.500 U) (nr kat. 19101)
- Xylene lub Histolemon™ (Carlo Erba, nr kat. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100%)
- Bufor TE (1x), pH 8,0

Odczynniki (automatyczna ekstrakcja DNA)

- Zestaw do ekstrakcji DNA: QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (nr kat. 937236)
- Bufor ATL (nr kat. 19076 lub 939016)
- RNase A (nr kat. 19101)
- Xylene lub Histolemon (Carlo Erba, nr kat. 454911, www.carloerbareagents.com)
- Etanol (96–100%)
- Bufor TE (1x), pH 8,0

Materiały zużywalne

- Skalpele
- Sterylne końcówki do pipet (do PCR, z filtrami hydrofobowymi)

- Probówki wolne od nukleaz 2,0 ml lub 1,5 ml
- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml do aparatu Rotor-Gene Q (nr kat. 981103 lub 981106)
- Lód

Dodatkowe materiały zużywalne do automatycznej ekstrakcji DNA

- Sample Prep Cartridges, 8-well (nr kat. 997002)
- 8-Rod Covers (nr kat. 997004)
- Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (nr kat. 990332) oraz Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (nr kat. 997024)
- Elution Microtubes CL (nr kat. 19588)
- Micro tubes 2,0 ml Type H (Sarstedt®, nr kat. 72.693, www.sarstedt.com)

Sprzęt

- Statyw na slajdy (szkiełka) i 2 kompatybilne naczynia na xylene/Histolemon i etanol
- Pipety nastawne do PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wirówka stołowa z rotorem na probówki 0,5 ml/1,5 ml oraz mikro płytki (zdolna do osiągnięcia 13.000–14.000 rpm)
- Worteks
- Aparat do qPCR: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM wraz z dedykowanymi akcesoriami
- Oprogramowanie Rotor-Gene Q MDx (software) wersja 2.1.0 lub wyższa
- Biofotometr
- Termomikser, inkubator orbitalny lub łaźnia wodna zdolne do utrzymywania temperatury 56°C i 90°C

Wyposażenie dodatkowe do automatycznej ekstrakcji

- Aparat QIASymphony SP
- Oprogramowanie QIASymphony SP (software) wersja 4.0 lub wyższa

Ostrzeżenia i Uwagi

Do użytku diagnostycznego in vitro

Informacje bezpieczeństwa

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheets; SDS) dostępnymi online w formacie PDF pod adresem **www.qiagen.com/safety**, gdzie możesz znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty SDS dla każdego zestawu QIAGEN oraz dla poszczególnych komponentów zestawów.

Celem uzyskania informacji dotyczących bezpieczeństwa użytkowania zestawu do oczyszczania oraz aparatury, należy zapoznać się z odpowiednimi instrukcjami użytkowania zestawu oraz aparatury.

Uwagi ogólne

- Test jest przeznaczony do użytku z uzyskanymi operacyjnie próbkami tkanek w formie bloczków parafinowych (FFPE).
- Wszystkie chemikalia i materiały biologiczne są potencjalnie niebezpieczne. Próbki i materiały są potencjalnie zakaźne i muszą być traktowane jako materiał biologicznie niebezpieczny.
- Pozbywaj się odpadów próbek i zestawów zgodnie z lokalnymi przepisami.
- Odczynniki Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR są optymalnie rozcieńczone. Nie rozcieńczaj bardziej odczynników, gdyż może to spowodować spadek wydajności. Nie stosuj objętości reakcji (mieszanina reakcyjna plus próbka) mniejszych niż 25 µl.
- Wszystkie odczynniki dostarczone w Zestawie *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR są przeznaczone wyłącznie do użytku wraz z innymi odczynnikami tego samego zestawu.

Nie zamieniaj odczynników pomiędzy Zestawami *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR, gdyż może to spowodować spadek wydajności.

- Dodatkowe ostrzeżenia, uwagi i procedury można znaleźć w instrukcji użytkownika Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (instrument user manual).
- Zmiany inkubacji i temperatur mogą skutkować błędnymi lub niespójnymi wynikami.
- Nie używaj odczynników przeterminowanych lub nieprawidłowo przechowywanych.
- Mieszaniny starterów i sond mogą ulec uszkodzeniu pod wpływem światła.
- Pracuj ostrożnie, tak aby zapobiegać kontaminacji mieszanin materiałami syntetycznymi zawartymi w odczynniku z kontrolą pozytywną.
- Pracuj ostrożnie, tak aby zapobiegać kontaminacji DNazą, co mogłoby spowodować degradację matrycowego DNA.
- Do dodawania matrycy i pipetowania reakcji używaj tylko dedykowanych pipet.
- Przygotowuj i dodawaj mieszaniny reakcyjne w obszarze odseparowanym od tego, w którym dodawane są matryce.
- Nie otwieraj aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM przed zakończeniem jego pracy.
- Nie otwieraj próbek Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM po zakończeniu reakcji.
- Pracuj ostrożnie, tak aby zapobiegać błędem w pipetowaniu, dodawaniu próbek itp.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami

Warunki transportu

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest dostarczany na suchym lodzie. Jeśli jakkolwiek komponent Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR nie jest zamrożony w chwili dostarczenia, jeśli w trakcie transportu zostało otwarte zewnętrzne opakowanie lub dostawa nie zawiera listu przewozowego, instrukcji lub odczynników, to należy skontaktować się z

Serwisem Technicznym firmy QIAGEN lub dystrybutorem (patrz okładka lub www.qiagen.com).

Przechowywanie

Natychmiast po dostarczeniu Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR powinien zostać umieszczony w temperaturze od -15 do -30°C w zamrażarce utrzymującej stałą temperaturę i musi być chroniony przed światłem.

Stabilność

Jeśli Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest przechowywany w warunkach podanych na oryginalnym opakowaniu, to zachowuje stabilność aż do daty ważności podanej na etykiecie.

Po otwarciu odczynniki mogą być przechowywane w oryginalnych opakowaniach w -15 do -30°C aż do daty ważności podanej na etykiecie. Należy unikać powtarzanego zamrażania i rozmrażania. Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania-rozmrażania.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR służy do użytku z DNA wyekstrahowanym z usuniętej chirurgicznie tkanki nowotworowej pacjentów z nowotworem mózgu zatopionej w bloczkach parafinowych (FFPE). Wszystkie próbki tkanek powinny być traktowane jako potencjalnie niebezpieczne.

- Próbki tkanek muszą być utrwalone w 4–10% w neutralnie buforowanej formalinie (neutral buffered formalin; NBF).
- Kolejne skrawki (sąsiadujące) o grubości 10 µm muszą zostać wycięte z bloczka parafinowego i umieszczone na szklanych slajdach.

-
- Osoba wykwalifikowana (np. patolog) powinna ocenić zawartość tkanki nowotworowej oraz obszaru sąsiadującego w preparacie wybarwionym hematoksyliną i eozyną (H&E). Do ekstrakcji DNA używaj kolejnych (sąsiadujących) skrawków.
 - Tylko skrawki z zawartością tkanki nowotworowej $\geq 40\%$ nadają się do testu.
 - W przypadku skrawków z powierzchnią tkanki $< 50 \text{ mm}^2$ zaleca się użycie odpowiedniej ilości skrawków, tak aby zwiększyć powierzchnię tkanki do co najmniej 50 mm^2 (100 mm^2 w przypadku izolacji automatycznej na aparacie QIASymphony SP).
 - Oznakowanie, przechowywanie i obchodzenie się z próbkami nowotworowymi, bloczkami i slajdami FFPE oraz próbkami gotowymi do ekstrakcji powinno odbywać się w sposób kontrolowany i zgodny z lokalnymi przepisami.
 - Przechowuj bloczki i slajdy FFPE w temperaturze pokojowej. Slajdy mogą być przechowywane w takiej temperaturze do momentu ekstrakcji DNA i testu przy pomocy Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR przez okres do 4 tygodni.
 - Po ekstrakcji DNA genomowego, może być ono przechowywane do 1 tygodnia w $2-8^\circ\text{C}$ lub do 8 tygodni w -15 do -25°C .

Procedura

Preparatyka DNA

Celem oczyszczenia genomowego DNA z próbek FFPE zawierających materiał nowotworowy mózgu użyj zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (nr kat. 56404) lub QIASymphony DSP DNA Mini Kit (nr kat. 937236).

Uwaga: Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR został zwalidowany tylko w połączeniu z zestawami QIAamp DNA FFPE Tissue Kit lub QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Nie używaj innych produktów do ekstrakcji DNA.

Używanie zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit



Przeczytaj uważnie informacje dotyczące poniższych modyfikacji, które należy uwzględnić podczas stosowania protokołu QIAamp.

- Preparatyka próbek przed deparafinizacją i ekstrakcją DNA wymaga zapoznania się z rozdziałem 'Starting material' (materiał wyjściowy) w instrukcji *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* oraz 'Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami', strona 14 w niniejszej instrukcji.
- Zestaw QIAamp DNA FFPE Tissue Kit może być używany tylko łącznie.
- Krok z użyciem RNazy (RNase) opisany w instrukcji *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook* musi zostać wykonany.
- Nie używaj QIAGEN Deparaffinization Solution (roztwór deparafinizujący). Do deparafinizacji używaj tylko metody ksylenu/etanol opisanej poniżej w 'Procedura deparafinizacji ślajdów z użyciem zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'. Ksylen może być zastąpiony przez Histolemon (substytut ksylenu).
- Trawienie z Proteinazą K musi odbywać się przez 1 godzinę.

- Próbkki muszą zostać eluowane dwukrotnie z użyciem 30 µl (2 x 30 µl) buforu elucyjnego (Buffer ATE) z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Procedura deparafinizacji slajdów z użyciem zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

1. Umieść slajdy w dedykowanym statywie.
2. Statyw ze slajdami umieść na 2 minuty w naczyniu zawierającym ksylen lub Histolemon. Wstrząśnij całość 2-3 ruchami do przodu i do tyłu.
3. Statyw ze slajdami umieść na 2 minuty w drugim naczyniu zawierającym etanol (96–100%). Wstrząśnij całość 2-3 ruchami do przodu i do tyłu.
4. Wysusz slajdy w 15–37°C. To może potrwać kilka minut.
5. Dla każdej próbki przygotuj i oznacz próbówki 1,5 ml i dodaj 180 µl buforu 'Buffer ATL' (z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) do każdej z próbówek.
6. Nanieś kilka kropel buforu 'Buffer ATL' na skrawki tkanki na slajdach, tak aby pokryć powierzchnię tkanki.
7. Zdrap rejon zawierający tkankę przy użyciu sterylnego skalpela i umieść w odpowiednio oznaczonej próbówce.
8. Do każdej próbówki dodaj 20 µl proteinazy K (z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) i wymieszaj przez worteksowanie.
9. Inkubuj w 56°C przez 1 godzinę.

Kontynuuj przechodząc do etapu inkubacji w 90°C protokołu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (krok 12 instrukcji *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*, June 2012, strona 13).

Używanie zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit



Przeczytaj uważnie informacje dotyczące poniższych modyfikacji, które należy uwzględnić podczas stosowania protokołu QIASymphony SP Protocol Sheet: Tissue_LC_200_V7_DSP.

- Preparatyka próbek przed deparafinizacją i ekstrakcją DNA wymaga zapoznania się z rozdziałem 'Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami', strona 14.
- Krok z użyciem RNazy (RNase) opisany w instrukcji QIASymphony SP Protocol Sheet musi zostać wykonany.
- Nie używaj 'QIAGEN Deparaffinization Solution' (roztwór deparafinizacyjny). Do deparafinizacji używaj tylko metody ksylenu/etanol opisanej poniżej w 'Procedura deparafinizacji slajdów z użyciem zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit'. Ksylen może być zastąpiony przez Histolemon (substytut ksylenu).
- Trawienie z Proteinazą K musi się odbywać przez 1 godzinę.
- Na ekranie dotykowym urządzenia należy wybrać objętość elucji (elution volume) 50 μ l.

Procedura deparafinizacji slajdów z użyciem zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Przeprowadź deparafinizację zgodnie z poniższymi krokami, które różnią się względem protokołu QIASymphony SP Protocol Sheet: Tissue_LC_200_V7_DSP.

1. Umieść slajdy w dedykowanym statywie.
2. Statyw ze slajdami umieść na 2 minuty w naczyniu zawierającym ksylen lub Histolemon. Wstrząśnij całość 2-3 ruchami do przodu i do tyłu.
3. Statyw ze slajdami umieść na 2 minuty w drugim naczyniu zawierającym etanol (96–100%). Wstrząśnij całość 2-3 ruchami do przodu i do tyłu.
4. Wysusz slajdy w 15–37°C. To może potrwać kilka minut.
5. Dla każdej próbki przygotuj i oznacz próbówki 1,5 ml i dodaj 220 μ l buforu 'Buffer ATL' do każdej z próbek.
6. Nanieś kilka kropel buforu 'Buffer ATL' na skrawki tkanki na slajdach, tak aby pokryć powierzchnię tkanki.
7. Zdrap rejon zawierający tkankę przy użyciu sterylne go skalpela i umieść w odpowiednio oznaczonej próbówce.

8. Do każdej probówki dodaj 20 µl proteiny K (z zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) i wymieszaj przez worteksowanie.

Kontynuuj przechodząc do etapu inkubacji w 56°C protokołu QIASymphony SP Protocol Sheet: Tissue_LC_200_V7_DSP protocol (krok 12 instrukcji 'Deparaffinization using xylene', April 2012). Inkubuj w 56°C przez 1 godzinę.

DNA genomowe

DNA genomowe przechowuj w 2–8°C do 1 tygodnia po ekstrakcji lub w –15 do –25°C do 8 tygodni po ekstrakcji.

Ilość DNA powinna zostać oceniona przez pomiar gęstości optycznej (OD) próbki przy długości fali 260 nm.

Rozcieńcz DNA do stężenia 5 ng/µl w buforze TE (1x), pH 8,0.

Reakcja PCR jest zoptymalizowana dla próbek zawierających 25 ng oczyszczonego DNA genomowego.

Protokół: Detekcja mutacji *IDH1/2*

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Celem optymalnego wykorzystania Zestawu *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR próbki muszą być pogrupowane po 4. Użycie mniejszych partii spowoduje zmniejszenie ilości możliwych do przeanalizowania próbek w ramach Zestawu *therascreen* *IDH1/2* RGQ PCR.
- Zalecamy testowanie wszystkich próbek na raz w jednej analizie PCR zgodnie z Tabelą 2 i z zastosowaniem układów dla statywu oraz rotora zgodnie z Tabelą 3 i Rysunkiem 2.

Tabela 2. Ilość reakcji dla aparatów Rotor-Gene Q MDx z rotorem 72-probówkowym

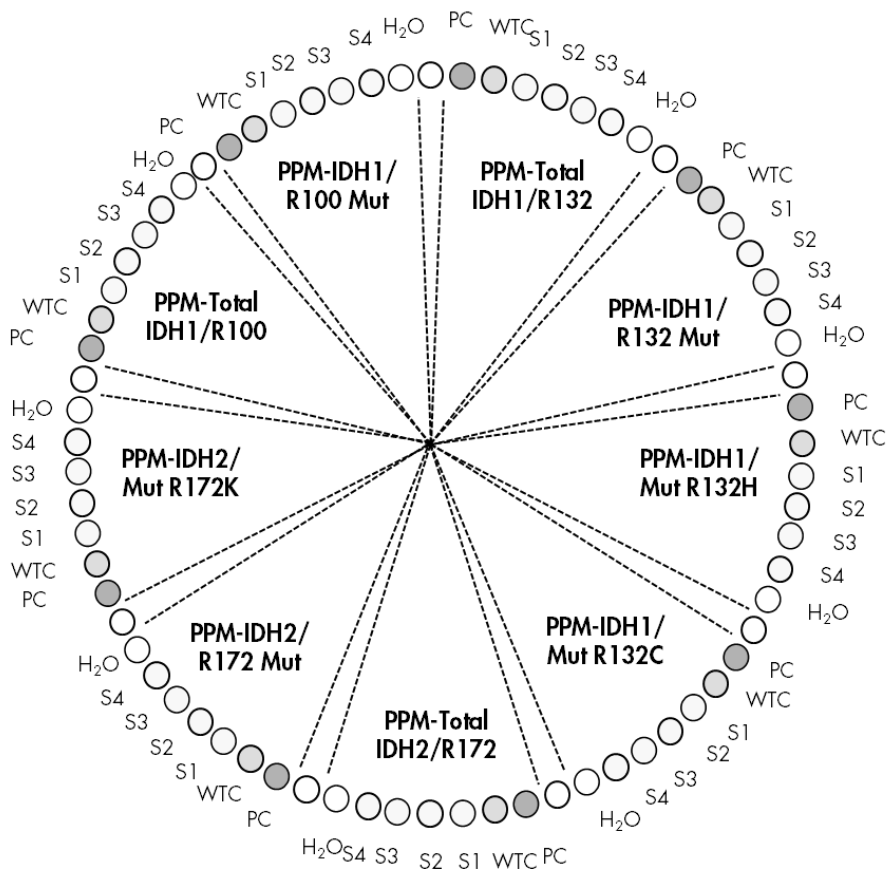
Próbki	Reakcje
n próbek DNA	n x 1 reakcja
2 kontrole DNA	2 reakcje: Kontrole pozytywne i typu dzikiego (WT), każda testowana jednokrotnie dla jednej analizy PCR
Kontrola z wodą	1 reakcja

Tabela 3. Sugerowany układ próbek w statywie dla Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

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

* PC: Kontrola pozytywna.

† WTC: Kontrola typu dzikiego.



Rysunek 2. Sugerowany układ próbek w rotorze dla Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.

Uwaga: W pozycji 1 rotora zawsze należy umieszczać próbkę. W przeciwnym razie aparat nie dokona kalibracji i odczytane zostaną niewłaściwe dane fluorescencji.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie wymagane odczynniki i umieść na lodzie.
2. Przygotuj następujące mieszaniny PCR zgodnie z ilością analizowanych próbek.

Wszystkie stężenia dotyczą końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej.

Tabela 4 przedstawia schemat pipetowania do przygotowania jednej mieszaniny odczynnikowej skalkulowanej do uzyskania końcowej objętości reakcji 25 µl. Dla każdej mieszaniny PPM może zostać sporządzony odpowiedni dla planowanej ilości reakcji pre-miks. Celem kompensacji błędów w pipetowaniu uwzględnione są dodatkowe objętości.

Tabela 4. Przygotowanie mieszanin PCR

Komponent	1 reakcja (µl)	Pre-miks: 7 + 1 reakcje (µl)	Stężenie końcowe
qPCR Master Mix, 2x	12,5	100	1x
PPM,* 25x	1	8	1x
Nuclease-Free Water (woda wolna od nukleaz)	6,5	52	–
Próbka lub kontrola† (do dodania w kroku 4)	5	5 każda	–
Objętość końcowa	25	25 każda	–

* Przygotuj 9 pre-miksów, jeden z każdą mieszaniną PPM zawartą w zestawie.

† Kontrola pozytywna, kontrola negatywna lub kontrola z wodą.

3. Dodaj po 20 µl pre-miksu do każdej z próbek Rotor-Gene (Tabela 3).
4. Do odpowiedniej próbki dodaj 5 µl materiału do oceny ilościowej (25 ng DNA genomowego próbki lub kontrola). Objętość końcowa wynosi 25 µl; Tabela 3).
5. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
6. Probówki umieść w rotorze dostarczonym wraz z aparatem (Rysunek 2).
Nieużywane miejsca w rotorze powinny zostać uzupełnione pustymi probówkami.
7. Umieść wypełniony rotor w aparacie Rotor-Gene Q MDx.

8. Zaprogramuj aparat Rotor-Gene Q MDx zgodnie z wytycznymi w Tabeli 5.

Tabela 5. Profil temperaturowy

Hold (Inkubacja)	Temperatura: 95°C Time (czas): 10 min
Cycling (cykle)	40 times (cykli) 95°C przez 15 sekund 60°C przez 60 sekund z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM w pojedynczym kanale zielonym (channel Green: Single)

9. W oknie **New Run Wizard** wybierz **Gain Optimisation** – otworzy się nowe okno **Auto-Gain Optimisation Setup**. Ustaw zakres (range) dla kanału zielonego (Green) od **2FI** dla **Min Reading** do **10FI** dla **Max Reading**.

10. Zaznacz kratkę **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** i zamknij (Close) okno **Auto-Gain Optimisation Setup**.

11. Przejdź do ostatniego okna **New Run Wizard** i rozpocznij program (Start).

12. Po zakończeniu programu (pracy aparatu) wykonaj poniższe czynności.

- Na dole okna z wykresem wybierz **Options > Crop Start Cycles > Remove data before cycle 10** (usuń dane przed cyklem 10) - usuwane są dane z artefaktami.
- Wybierz **Analysis > Cycling A. Green from 10**, oznaczone na raporcie jako 'left threshold = 10.00'.
- Na górze okna z wykresem wybierz **Dynamic Tube** jako metodę normalizacji oraz **Slope Correct** jako metodę korekty przebiegu sygnału tła.
- Ustaw **Outlier Removal** dla **NTC threshold** na **0%**.
- Ustaw **Outlier Removal** dla **Reaction Efficiency Threshold** jako wyłączone (kratka obok 'enabled' nie może być zaznaczona).
- Ustaw wartość dla progu odcięcia (threshold) na **0,03**.
- Ustaw wykres na skalę liniową (linear scale).
- Wybierz **Digital Filter > Light** (opcja menu kontekstowego wywoływanego kliknięciem wykresu prawym przyciskiem myszy).

Interpretacja Wyników

Kontrole z wodą

Kontrole z wodą (no template controls; NTC) powinny dawać wartości C_T równe zero dla wszystkich mieszanin starterów i sond.

W przypadku uzyskania pozytywnej wartości C_T dla NTC, oznacza to kontaminację krzyżową. Celem znalezienia rozwiązania patrz 'Rozwiązywanie problemów', strona 34.

Kontrola jakości z użyciem wartości C_T dla kontroli

Kontrola typu dzikiego *IDH1/2* (wild-type control; WTC) oraz pozytywna kontrola zmutowanego *IDH1/2* (Mut-PC) pozwalają na zakwalifikowanie eksperymentu.

Dla każdej z kontroli oblicz wartości ΔC_T jak poniżej.

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

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

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

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

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

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

Jeśli dla próbki uzyskana zostaje wartość $C_T = 0$, to do obliczenia wartości ΔC_T użyj wartości $C_T = 40$.

Kontrole są sklasyfikowane jako pozytywne dla mutacji jeśli wartości ΔC_T są równe lub mniejsze względem odpowiednich wartości odcięcia (cutoff) ΔC_T , zgodnie z Tabelą 6.

Tabela 6. Wartości odcięcia dla reakcji każdej z mutacji

Reakcja dla mutacji	Wartość odcięcia (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

- Kontrola typu dzikiego *IDH1/2* musi być wykryta jako negatywna dla mutacji dla każdej reakcji mutacji (Tabela 7).
- Zmutowana kontrola pozytywna *IDH1/2* musi być wykryta jako pozytywna dla mutacji dla każdej reakcji mutacji (Tabela 7).

Jeśli któryś z powyższych warunków nie jest spełniony, wówczas wyniki całego eksperymentu muszą zostać odrzucone.

Tabela 7. Przykład walidacji analizy na podstawie kontroli

Wartość	Woda (NTC)	IDH1/IDH2 Kontr. dzika (WTC)	IDH1/IDH2 Kontr. pozytywna
C _T Total IDH1/R132	Nie wykryto	25,45	23,95
C _T IDH1/R132 Mut	Nie wykryto	34,32	25,76
ΔC _T IDH1/R132 Mut	Nie wykryto	8,87	1,81
C _T Total IDH2/R172	Nie wykryto	25,42	24,93
C _T IDH2/R172 Mut	Nie wykryto	34,36	26,36
ΔC _T IDH2/R172 Mut	Nie wykryto	8,94	1,43
C _T Total IDH1/R100	Nie wykryto	26,30	24,69
C _T IDH1/R100 Mut	Nie wykryto	33,04	26,39
ΔC _T IDH1/R100 Mut	Nie wykryto	6,74	1,70
C _T IDH1 Mut R132H	Nie wykryto	35,20	26,48
ΔC _T IDH1 Mut R132H	Nie wykryto	9,75	2,53
C _T IDH1 Mut R132C	Nie wykryto	37,16	27,07
ΔC _T IDH1 Mut R132C	Nie wykryto	11,71	3,12
C _T IDH2 Mut R172K	Nie wykryto	40,00	27,97
ΔC _T IDH2 Mut R172K	Nie wykryto	14,58	3,04

Walidacja wejściowej ilości i jakości próbek

Przed rozpoczęciem interpretacji wyników musi zostać dokonana walidacja wejściowej ilości i jakości próbek.

Wartość C_T uzyskana dla próbki z każdą mieszaniną PPM-Total ($C_{T \text{ Total IDH1/R132}}$, $C_{T \text{ Total IDH2/R172}}$ oraz $C_{T \text{ Total IDH1/R100}}$) musi być niższa niż 32,00. Wartości $C_{T \text{ Total}} \geq 32,00$ są wynikiem użycia DNA niskiej jakości. Taka próbka musi zostać przetestowana ponownie. Jeśli ilość DNA jest wciąż niewystarczająca, to do ekstrakcji DNA należy użyć więcej tkanki nowotworowej (patrz 'Rozwiązywanie problemów', strona 34).

Wyniki dla próbek

Detekcja mutacji *IDH1/2*

Dla każdej próbki oblicz wartość ΔC_T uzyskaną z każdej reakcji detekcji mutacji (PPM-IDH1/R132 Mut, PPM-IDH2/R172 Mut, PPM-IDH1/R100 Mut) jak poniżej.

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

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

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

Jeśli dla próbki uzyskana zostaje wartość $C_T = 0$, to do obliczenia wartości ΔC_T użyj wartości $C_T = 40$.

Próbki są sklasyfikowane jako pozytywne dla mutacji jeśli wartości ΔC_T są równe lub mniejsze względem odpowiednich wartości odcięcia ΔC_T , zgodnie z Tabelą 8.

Tabela 8. Wartości odcięcia dla reakcji detekcji każdej z mutacji

Reakcja dla mutacji	Wartość odcięcia (ΔC_T)
IDH1/R132 Mut	5,34
IDH2/R172 Mut	6,42
IDH1/R100 Mut	4,65

Identyfikacja mutacji *IDH1/2*

Dla każdej próbki oblicz wartość ΔC_T uzyskaną z każdej reakcji identyfikacji mutacji (PPM-IDH1 Mut R132H, PPM-IDH1 Mut R132C, PPM-IDH2 Mut R172K) jak poniżej.

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

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

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

Jeśli dla próbki uzyskana zostaje wartość $C_T = 0$, do obliczenia wartości ΔC_T użyj wartości $C_T = 40$.

Mutacja dla próbki jest zidentyfikowana, gdy wartość ΔC_T jest równa lub mniejsza względem wartości odcięcia ΔC_T dla odpowiedniej reakcji identyfikacji mutacji, zgodnie z Tabelą 9. Przykłady interpretacji ΔC_T są pokazane w Tabeli 10 i Tabeli 11.

Tabela 9. Wartości odcięcia dla reakcji identyfikacji każdej z mutacji

Reakcja dla mutacji	Wartość odcięcia (ΔC_T)
IDH1 Mut R132H	6,87
IDH1 Mut R132C	7,14
IDH2 Mut R172K	8,49

Tabela 10. Przykład detekcji mutacji *IDH1/2*

Wartość	Próbka 1	Próbka 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
Detekcja mutacji	Nie wykryto mutacji	Wykryto mutację R132

Tabela 11. Przykład identyfikacji mutacji *IDH1/2*

Wartość	Próbka 1	Próbka 2
C _T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1 Mut R132H	33,82	28,27
ΔC _T IDH1 Mut R132H	7,43	1,95
C _T Total IDH1/R132	26,39	26,32
C _T IDH1 Mut R132C	37,94	40,00
ΔC _T IDH1 Mut R132C	11,55	13,68
C _T Total IDH2/R172	26,79	25,79
C _T IDH2 Mut R172K	40,00	40,00
ΔC _T IDH2 Mut R172K	13,21	14,21
Detekcja mutacji	Nie wykryto mutacji	Wykryto mutację R132H

Interpretacja mutacji *IDH1/2*

Tabela 12 przedstawia procedurę użytą do przypisywania typu mutacji *IDH1/2* do próbek pozytywnych dla mutacji *IDH1/2*. Przykład interpretacji pokazano w Tabeli 13.

Tabela 12. Przewodnik interpretacyjny

		Identyfikacja mutacji			
		<i>IDH1</i> Mut R132H wykryta	<i>IDH1</i> Mut R132C wykryta	<i>IDH2</i> Mut R172K wykryta	Nie wykryto mutacji
Wykrywanie mutacji	R132 mutacja wykryta	R132H mutacja wykryta	R132C mutacja wykryta	–	Mutacja R132, ale ani R132H ani R132C
	R172 mutacja wykryta	–	–	R172K mutacja wykryta	Mutacja R172, ale nie R172K
	R100 mutacja wykryta	–	–	–	R100
	Nie wykryto mutacji	Wykryto niską zawartość mutacji R132H (1 do 2%)*	Wykryto niską zawartość mutacji R132C (1 do 4%)*	Wykryto niską zawartość mutacji R172K (około 1%)*	Nie wykryto mutacji

* Takie przypadki mogą się zdarzać rzadko, a wszystkie kryteria akceptacji technicznej powinny zostać sprawdzone, przede wszystkim zawartość komórek nowotworowych. Jeśli wszystkie kryteria są spełnione, wówczas analiza próbki powinna zostać powtórzona.

Tabela 13. Przykład raportowania i interpretacji mutacji *IDH1/2*

	Próbka 1	Próbka 2
Detekcja mutacji	Nie wykryto mutacji	R132 mutacja wykryta
Identyfikacja mutacji	Nie wykryto mutacji	Mutacja wykryta dla R132H
Interpretacja wyniku	Nie wykryto ani nie zidentyfikowano mutacji	Mutacja R132H

Uwaga: Jeśli próbka ma 2 lub więcej wartości ΔC_T mniejszych lub równych wartości odcięcia ΔC_T , wówczas status mutantu jest przypisywany mutacji o największej różnicy pomiędzy wartością odcięcia a wartością otrzymaną dla ΔC_T . Patrz przykład w Tabeli 14.

Tabela 14. Przykład interpretacji w przypadku wielu wyników pozytywnych

	Próbka 3	Próbka 4
ΔC_T IDH1/R132 Mut	1,24	5,24
ΔC_T odcięcia IDH1/R132 Mut	5,34	5,34
(ΔC_T odcięcia – ΔC_T) IDH1/R132 Mut	4,10	0,10
ΔC_T IDH2/R172 Mut	5,32	5,95
ΔC_T odcięcia IDH2/R172 Mut	6,42	6,42
(ΔC_T odcięcia – ΔC_T) IDH2/R172 Mut	1,10	0,47
Interpretacja wyniku	Mutacja dla R132	Mutacja dla R172

Rozwiązywanie problemów

Niniejszy poradnik rozwiązywania problemów może być pomocny w przypadku pojawienia się trudności i kwestii niejasnych. Więcej informacji: www.qiagen.com.

Komentarze i sugestie

Zatkana kolumna podczas ekstrakcji DNA

Niekompletna liza	Powtórz wirowanie. Pozostały lizat może zostać przeniesiony do nowej kolumny. Powtórz ekstrakcję z mniejszą ilością skrawków tkanki FFPE.
-------------------	---

Niewystarczająca ilość DNA w eluacie po ekstrakcji

Niewystarczająca ilość tkanki FFPE	Powtórz ekstrakcję z większą ilością skrawków tkanki FFPE.
------------------------------------	--

Kontrola IDH1/2 WT nie została wykryta

- | | |
|---|--|
| a) Błąd pipetowania lub pominięte odczynniki; zamiana probówek lub studzienek | Sprawdź prawidłowość pipetowania i przygotowania reakcji.

Powtórz PCR. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie komponentów zestawu | Przechowuj Zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR w -15°C do -30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPM) przed światłem. Patrz 'Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikiem', strona 13.

Nie przekraczaj maksymalnej liczby 5 cykli rozmrażania-zamrażania. |

Komentarze i sugestie

- c) Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR uległ przeterminowaniu
- Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (na etykiecie). Jeśli to konieczne użyj nowego Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.

Kontrola pozytywna *IDH1/2* nie została wykryta

- a) Błąd pipetowania lub pominięte odczynniki; zamiana probówek lub studzienek
- Sprawdź prawidłowość pipetowania i przygotowania reakcji.
Powtórz PCR.
- b) Nieprawidłowe przechowywanie komponentów zestawu
- Przechowuj Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR w -15°C do -30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPM) przed światłem. Patrz 'Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikiem', strona 13.
Nie przekraczaj maksymalnej liczby 5 cykli rozmrażania-zamrażania.
- c) Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR uległ przeterminowaniu
- Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (na etykiecie). Jeśli to konieczne, użyj nowego Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.

Brak sygnału, również dla kontroli

- a) Brak probówki z reakcją w pozycji 1 rotora aparatu Rotor-Gene Q MDx
- W pozycji 1 rotora zawsze należy umieszczać próbkę. W przeciwnym razie aparat nie dokona kalibracji i odczytane zostaną niewłaściwe dane fluorescencji.
- b) Błąd pipetowania lub pominięte odczynniki; zamiana probówek lub studzienek
- Sprawdź prawidłowość pipetowania i przygotowania reakcji.
Powtórz PCR.

Komentarze i sugestie

- c) Nieprawidłowe przechowywanie komponentów zestawu Przechowuj Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR w -15°C do -30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPM) przed światłem. Patrz 'Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami', strona 13.
Nie przekraczaj maksymalnej liczby 5 cykli rozmrażania-zamrażania.
- d) Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR uległ przeterminowaniu Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (na etykiecie). Jeśli to konieczne, użyj nowego Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.
- e) Wybór nieprawidłowego kanału detekcji Ustaw kanał detekcji na Cycling Green (zielony) lub 530 nm/640 nm.
- f) Brak programu dla odczytu danych (data acquisition) Sprawdź program reakcji. Patrz Tabela 5, strona 24.
Wybierz program dla odczytu danych (data acquisition) **Single** na końcu każdego etapu hybrydyzacji programu PCR.

Zmienna intensywność fluorescencji

- Błąd pipetowania lub pominięte odczynniki; zamiana probówek lub studzienek Sprawdź prawidłowość pipetowania i przygotowania reakcji.
Powtórz PCR.

Zbyt mała intensywność fluorescencji

- a) Nieprawidłowe przechowywanie komponentów zestawu Przechowuj Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR w -15°C do -30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPM) przed światłem. Patrz 'Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami', strona 13.

Komentarze i sugestie

- Nie przekraczaj maksymalnej liczby 5 cykli rozmrażania-zamrażania.
- b) Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR uległ przeterminowaniu Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (na etykiecie). Jeśli to konieczne, użyj nowego Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.
- c) Bardzo mała ilość DNA matrycowego Zawsze przed rozpoczęciem sprawdzaj stężenie DNA. Patrz 'Preparatyka DNA', strona 16.

Kontrola negatywna (H₂O) daje wynik pozytywny

Kontaminacja krzyżowa, kontaminacja odczynników, błąd aparatu, zamiana probówek lub studzienek lub degradacja sond

Wymień wszystkie kluczowe odczynniki lub użyj nowego Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR.

Celem zapobiegania kontaminacji zawsze obchodź się z próbkami, komponentami zestawu i materiałami zużywalnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.

Chroń mieszaniny starterów i sond (PPM) przed światłem.

Sprawdź krzywe fluorescencji na obecność wyników fałszywie pozytywnych.

Sprawdź ustawienia reakcji. Patrz 'Protokół: Detekcja mutacji *IDH1/2*', strona 20.

Kontrola Jakości

Zgodnie z certyfikatem ISO Systemu Zarządzania Jakością firmy QIAGEN, każda partia Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest testowana pod kątem zgodności względem wcześniej określonych specyfikacji, aby zapewnić jednolitą jakość produktu. Certyfikaty analizy są dostępne na żądanie pod adresem www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Niniejszy zestaw jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

Niniejszy produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez personel specjalnie przeszkolony w zakresie technik biologii molekularnej i zaznajomiony z tą technologią.

Niniejszy zestaw powinien być użytkowany zgodnie z wytycznymi zawartymi w tej instrukcji w połączeniu ze zwalidowanym aparatem wymienionym w 'Materiały Wymagane, ale Niedostarczone', strona 10.

Należy zwracać uwagę na daty przydatności do użytku wydrukowane na opakowaniu oraz na etykietach wszystkich komponentów. Nie używaj komponentów przeterminowanych

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest zwalidowany tylko do użytku z preparatami tkanek mózgu FFPE.

Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR jest zwalidowany tylko do użytku z zestawem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit lub zestawem QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Zwalidowane zostały tylko aparaty Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (do PCR) oraz QIASymphony SP (do przygotowania próbek).

Jakiegokolwiek użytkowanie tego produktu niezgodne z wytycznymi (off-label) oraz/lub modyfikacje jego komponentów spowodują zwolnienie firmy QIAGEN z odpowiedzialności.

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację wydajności systemu względem jakichkolwiek procedur przeprowadzanych w swoim laboratorium, które nie zostały uwzględnione w testach wydajności firmy QIAGEN.

Niniejszy test jest zaprojektowany do wykrywania 7 mutacji w kodonach 132 i 100 genu *IDH1* oraz 5 mutacji w kodonie 172 genu *IDH2*. Próbki z wynikami raportowanymi jako 'no mutation detected' (brak wykrytej mutacji) mogą zawierać mutacje *IDH1* lub *IDH2* nie wykryte przy pomocy tego testu.

Detekcja mutacji zależy od integralności próbki, zawartości tkanki nowotworowej i amplifikowalnego DNA obecnego w próbce.

Jakiegokolwiek wyniki diagnostyczne wygenerowane przy pomocy niniejszego produktu muszą być interpretowane w kontekście wszystkich powiązanych danych klinicznych oraz laboratoryjnych.

Charakterystyka Wydajności

Limit dla próby ślepej (LOB)

Limit dla próby ślepej (limit of blank; LOB) został określony (zgodnie z wytycznymi CLSI/NCCLS EP17-A guideline; 14) dla próbek negatywnych (normalna tkanka mózgu FFPE, 8 próbek, 64 pomiary/partię, 2 partie).

Wyniki LOB przedstawione są w Tabeli 15.

Tabela 15. Limit dla próby ślepej (LOB)

Analiza	LOB	Końcowe LOB
R132 Mut	Walidacja partia 1: 6,57	6,32
	Walidacja partia 2: 6,32	
R132H Mut	Walidacja partia 1: 7,91	7,91
	Walidacja partia 2: 8,22	
R132C Mut	Walidacja partia 1: 8,04	8,04
	Walidacja partia 2: 8,20	
R172 Mut	Walidacja partia 1: 7,74	7,59
	Walidacja partia 2: 7,59	
R172K Mut	Walidacja partia 1: 9,93	9,93
	Walidacja partia 2: 10,58	
R100 Mut	Walidacja partia 1: 6,52	5,17
	Walidacja partia 2: 5,19	

Limit detekcji (LOD)

Limit detekcji (limit of detection; LOD; także czułość analityczna) został ustalony na podstawie 'precision profile approach (ustalanie profilu precyzji) zgodnie z wytycznymi CLSI/NCCLS EP17-A guideline (14). Na każdą mutację zostało użytych pięć próbek nisko

pozytywnych (DNA plazmidowe dodane do DNA typu dzikiego glejaka) - 30 do 110 pomiarów na każdy rodzaj mutacji oraz procentowość mutacji.

Wyniki LOD przedstawione są w Tabeli 16.

Tabela 16. Limit detekcji (LOD)

Analiza	Mutacje	LOD	Wartość odcięcia dla analizy	Czułość (%)
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

Mutacja jest wykryta jeśli ΔC_T jest mniejsze lub równe LOD.

Efekt wejściowej ilości DNA

DNA zostało wyekstrahowane z 4 różnych próbek nowotworowych glejaka: 2 z typem dzikim *IDH1/2* oraz 2 z mutacją *IDH1* R132H (395G>A).

Trzy różne ilości DNA (w tym jedna zgodnie z zaleceniem protokołu) zostały przetestowane celem oceny wpływu wejściowej ilości DNA (DNA input) na wyniki jakościowe. Wyniki pokazały, że wejściowa ilość DNA nie miała wpływu na wyniki jakościowe. Niemniej jednak zaobserwowano więcej problemów natury technicznej ($C_{T \text{ Total}}$ QC niepowodzenia) przy użyciu ilości DNA niższych niż zalecana (<25 ng DNA). W efekcie, do testu rekomendowane jest 25 ng DNA w objętości 5 μ l.

Powtarzalność i odtwarzalność

Badania nad precyzją zostały wykonane na 4 różnych próbkach (DNA plazmidowe dodane do DNA typu dzikiego glejaka reprezentatywne dla typu dzikiego (WT), mutant i próbki odcięcia (cutoff sample) testowane 40-krotnie w duplikatach (n = 80 pomiarów).

Odchylenia standardowe (standard deviations; SD) oraz współczynniki zmienności (coefficients of variation; CV) są przedstawione w Tabeli 17.

Tabela 17. Wyniki badań nad precyzją

Analiza	Próbka	Średnia ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV_{Total} (%) [‡]	Częstość prawidłowych wyników
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: Powtarzalność.

† Run: Odtwarzalność pomiędzy eksperymentami.

‡ Total: Precyzja całkowita (w tym pomiędzy aparatami, pomiędzy operatorami i pomiędzy partiami).

Kontynuacja tabeli na następnej stronie

Tabela 17. Wyniki badań nad precyzją (kontynuacja)

Analiza	Próbka	Średnia ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV_{Total} (%) [‡]	Częstość prawidłowych wyników
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: Powtarzalność.

† Run: Odtwarzalność pomiędzy eksperymentami.

‡ Total: Precyzja całkowita (w tym pomiędzy aparatami, pomiędzy operatorami i pomiędzy partiami).

Kontynuacja tabeli na następnej stronie

Tabela 17. Wyniki badań nad precyzją (kontynuacja)

Analiza	Próbka	Średnia ΔC_T	SD_R^*	SD_{Run}^\dagger	SD_{Total}^\ddagger	CV _{Total} (%) [‡]	Częstość prawidłowych wyników
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: Powtarzalność.

† Run: Odtwarzalność pomiędzy eksperymentami.

‡ Total: Precyzja całkowita (w tym pomiędzy aparatami, pomiędzy operatorami i pomiędzy partiami).

Porównanie metod

Porównanie do immunohistochemii (IHC) dla detekcji *IDH1/R132H*.

Wykonano badanie, którego celem było zademonstrowanie zgodności statusu mutacji wynikającego z analizy Zestawem *therascreen IDH1/2 RGQ PCR* z badaniem IHC (Anti-human *IDH1R132H* antibody clone H09, DIANOVA).

Wyselekcjonowana została grupa 103 klinicznych próbek glejaków, gdzie najstarszy preparat FFPE miał 10 lat.

Wszystkie próbki przeszły pomyślnie kontrolę jakości zarówno w przypadku Zestawu *therascreen IDH1/2 RGQ PCR* jak i IHC.

Wyniki wykazały pozytywną zgodność procentową (positive percentage agreement; PPA) równą 100%, negatywną zgodność procentową (negative percentage agreement; NPA) równą 98% oraz zgodność ogólną (overall agreement; OA) równą 99% (Tabela 18).

Tabela 18. Analiza zgodności pomiędzy Zestawem *therascreen* RGQ PCR a IHC

Pomiar zgodności	Częstotliwość (%)	Interwał pewności* 95%
PPA	45/45 (100%)	[92;100]
NPA	57/58 (98%)	[91;100]
OA	102/103 (99%)	[96;100]

* ang. confidence interval

Porównanie do sekwencjonowania dwukierunkowego

Wykonano badanie, którego celem było zademonstrowanie zgodności statusu mutacji wynikającego z analizy Zestawem *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR z sekwencjonowaniem dwukierunkowym.

Wyselekcjonowana została grupa 103 klinicznych próbek glejaków, gdzie najstarszy preparat FFPE miał 10 lat.

Wszystkie 103 próbki przeszły pomyślnie kontrolę jakości w przypadku Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR oraz 101 próbek dało wyniki sekwencjonowania dwukierunkowego.

Wyniki wykazały pozytywną zgodność procentową (positive percentage agreement; PPA) równą 100%, negatywną zgodność procentową (negative percentage agreement; NPA) równą 92% oraz zgodność ogólną (overall agreement; OA) równą 96% (Tabele 19 i 20).

Tabela 19. Zestaw *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR vs sekwencjonowanie dwukierunkowe

		Sekwencjonowanie dwukierunkowe Sangera				
		R132*	R132C	R132H	R172†	WT§
Zestaw <i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR	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 oznacza, że w próbce znaleziono mutację dla R132, ale ani R132H ani R132C.

† R172 oznacza, że w próbce znaleziono mutację dla R172, ale nie R172K.

§ Typ dziki (wild-type)

Tabela 20. Analiza zgodności z sekwencjonowaniem dwukierunkowym

Pomiar zgodności	Częstotliwość (%)	Interwał pewności* 95%
PPA	50/50 (100%)	[93;100]
NPA	47/51 (92%)	[81;97]
OA	97/101 (96%)	[90;98]

* ang. confidence interval

Literatura

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

Następujące symbole mogą się pojawić na etykietach lub w tym dokumencie.



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające na <N> reakcji



Użyj do

IVD

Do diagnostycznego użytku medycznego in vitro

REF

Numer katalogowy

LOT

Numer partii (lot)

MAT

Numer materiału (np. oznakowanie komponentów)

COMP

Komponenty (np. lista zawartości)

CONT

Zawiera (zawartość)

NUM

Ilość (np. probówek, butelek)

Rn

'R' oznacza korektę Instrukcji, natomiast 'n' oznacza numer korekty



Globalny Numer Jednostki Handlowej
(Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe



Producent



Zapoznaj się z instrukcją użytkowania



Ostrożnie!

Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> IDH1/2 RGQ PCR Kit (20)	Na 20 reakcji: 9 Primer and Probe Mixes (9 mieszanin starterów i sond), WT Control (kontrola typu dzikiego), Positive Control (kontrola pozytywna), Master Mix (mieszanina PCR), Nuclease-Free Water (woda wolna od nukleaz)	873011
Rotor-Gene Q MDx i akcesoria		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym z analizatorem HRM (High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, karmazynowy) i dodatkowy kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji na części i serwis, instalacja i szkolenie są zawarte	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym z analizatorem HRM (High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, karmazynowy) i dodatkowy kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji na części i serwis, instalacja i szkolenie nie są zawarte	9002032
Loading Block 72 x 0,1ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowania reakcji przy pomocy pipety jednokanałowej w formacie dla probówek 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1ml (250)	250 pasków 4-probówkowych wraz z zatyczkami na 1000 reakcji	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1ml (2500)	10 x 250 pasków 4-probówkowych wraz z zatyczkami na 10.000 reakcji	981106

Produkt	Zawartość	Nr kat.
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — do oczyszczania DNA genomowego z tkanek FFPE		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Zestaw na 50 izolacji DNA: 50 QIAamp MinElute® Columns (kolumny), Proteinase K (proteinaza K), Buffers (bufory), Collection Tubes (2 ml; próbki na eluat)	56404
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit — do automatycznego oczyszczania DNA z 1–96 próbek		
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Na 192 preparatyk, 200 µl każda: zawiera 2 kartridże odczynnikowe i statywy na enzymy oraz akcesoria	937236
QIAasymphony SP i akcesoria		
QIAasymphony SP System	QIAasymphony moduł do preparatyki próbek: zawiera instalację i szkolenie, 1 rok gwarancji na części i robociznę	9001751
QIAasymphony SP	QIAasymphony moduł do preparatyki próbek: zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-dółkowe kartridże do preparatyki próbek do użytku z QIAasymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Oslony na 8 prętów magnetycznych do użytku z QIAasymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Jednorazowe końcówki do pipet w pudełkach; (8 x 128). Do użytku z aparatami QIAcube oraz QIAasymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Jednorazowe końcówki do pipet w pudełkach; (8 x 128). Do użytku z aparatami QIAasymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Niesterylne próbki polipropylenowe (maksymalna objętość 0,85 ml, objętość do przechowywania mniej niż 0,7 ml, objętość elucji 0,4 ml); 2304 w pudełkach po 96; zatyczki w zestawie	19588

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Odczynniki		
RNase A (17.500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 jednostek/ml, roztwór)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer (bufor lizujący do tkanek) na 1000 preparatyk	19076

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z podręcznika odpowiedniego zestawu lub z instrukcji obsługi QIAGEN. Podręczniki zestawów QIAGEN i instrukcje obsługi są dostępne na stronie www.qiagen.com. Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Strona celowo pozostawiona pustą

Niniejszy produkt jest przeznaczony do diagnostycznego użytku in vitro. Produkty QIAGEN nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane do odsprzedaży ani używane celem produkcji artykułów komercyjnych bez pisemnej zgody QIAGEN.

Informacje zawarte w tym dokumencie mogą zostać zmienione bez uprzedzenia. QIAGEN nie ponosi odpowiedzialności za żadne błędy mogące pojawić się w tym dokumencie. Ten dokument powinien zawierać kompletne i prawdziwe informacje w momencie jego publikacji. W żadnym wypadku QIAGEN nie będzie odpowiedzialny za przypadkowe, zamierzone, wielokrotne lub będące konsekwencją szkody powstałe w skutek korzystania z tego dokumentu.

Produkty QIAGEN są gwarantowane w zakresie spełniania przez nie określonych dla nich parametrów. Jedynym zobowiązaniem QIAGEN oraz jedyną możliwością zgłaszania reklamacji przez klienta, w przypadku gdy produkt nie działa zgodnie z gwarancją, jest wyłącznie wymiana produktów bez opłaty.

Zakup niniejszego produktu pozwala kupującemu na wykonywanie usług diagnostycznych w zakresie ludzkiej diagnostyki in vitro. Nie udziela się ogólnego patentu ani żadnego typu licencji poza specyficznym prawem użytkownika wynikającym z zakupu niniejszego produktu.

Mutacje *IDH1/2* i ich wykorzystywanie jest chronione prawami patentowymi, w tym europejskimi wnioskami patentowymi EP2326735 oraz EP2546365, wnioskami patentowymi USA US2011229479 oraz US2012202207 oraz ich odpowiednikami w innych krajach.

Zakup niniejszego produktu nie przenosi żadnych praw do jego wykorzystywania w badaniach klinicznych leków celowanych dla *IDH1/2*. Dla takich zastosowań QIAGEN przygotowuje specjalne programy licencyjne. Więcej informacji można uzyskać kontaktując się z naszym wydziałem prawnym pod adresem indhlicenses@qiagen.com.

Znaki handlowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIASymphony® MinElute®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™ (Life Technologies Corporation); Histolemon™ (Carlo Erba); Sarstedt® (Sarstedt AG).

Ograniczona Umowa Licencyjna dla Zestawu *therascreen* IDH1/2 RGQ PCR

Używanie tego produktu oznacza zgodę nabywcy bądź użytkownika tego produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być używany wyłącznie zgodnie z wytycznymi zawartymi w instrukcji tego produktu i tylko wraz z komponentami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników nie zawartych w tym zestawie z wyjątkiem tego, co opisano w instrukcji zestawu *BCR-ABL1 mbc Kit Handbook* i w dodatkowych protokołach dostępnych pod adresem www.qiagen.com. Niektóre z tych dodatkowych protokołów zostały udostępnione przez użytkowników QIAGEN dla innych użytkowników QIAGEN. Protokoły te nie zostały dogłębnie przetestowane ani zoptymalizowane przez QIAGEN. QIAGEN nie gwarantuje ich działania, ani ewentualnego naruszania praw stron trzecich.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepojęmowanie ani niepozwalanie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.qiagen.com.

HB-1566-004 1075247PL 154034217 08/2016

© 2013–2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

