

ipsogen[®] BCR-ABL1 mbcR Kit El Kitabı



Versiyon 1

IVD

Kantitatif in vitro diagnostik

Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], LightCycler[®] ve SmartCycler[®]
aletleriyle kullanılmak üzere



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALMANYA

R2

MAT

1072506TR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN herhangi bir biyolojik örneğin içeriğinin izolasyonu ve saptanmasını mümkün kılan yenilikçi örnek ve tahlil teknolojilerinin önde gelen lideridir. Gelişmiş, çok kaliteli ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca başarıyı garanti eder.

QIAGEN şunlarda standartları oluşturur:

- DNA, RNA ve proteinlerin saflaştırılması
- Nükleik asit ve protein tahlilleri
- microRNA araştırmaları ve RNAi
- Örnek ve tahlil teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz olağanüstü başarı elde etmeniz ve yeni buluşlar yapmanızı mümkün kılmaktır. Daha fazla bilgi için www.qiagen.com adresini ziyaret edin.

İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	4
İşlemin Prensibi	5
Sağlanan Materyaller	7
Kit içeriği	7
Gereken ama Sağlanmayan Materyal	8
Uyarılar ve Önlemler	9
Genel önlemler	9
Reaktif Saklama ve Muamele	10
İşlem	12
Örnek RNA hazırlama	12
Protokoller	
■ Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon	12
■ 72 tüp rotorlu RotorGene Q 5plex HRM veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM üzerinde qPCR	15
■ ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS ve LightCycler 480 Aletinde qPCR	19
■ LightCycler 1.2 ve 2.0 Aletlerinde qPCR	24
■ SmartCycler aletinde qPCR	28
Sonuçların Değerlendirilmesi	31
Veri analizi prensibi	31
Sonuçlar	32
Sorun Giderme kılavuzu	34
Kalite Kontrol	37
Sınırlamalar	38
Performans Özellikleri	38
Klinik olmayan çalışmalar	38
Klinik araştırmalar	41
Referanslar	44
Semboller	45
İrtibat Bilgisi	45
Sipariş Bilgisi	46

Kullanım Amacı

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kitinin daha önce bir BCR-ABL mbc füzyon geni (FG) olayı tanısı konmuş Ph pozitif akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarında kemik iliği veya periferik kan örneklerinde BCR-ABL p190 transkriptlerinin kantifikasyonu için kullanılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların hastalık relapsını izlemek üzere minimal rezidüel hastalık (MRD) takibi ve tedavi yapılmakta olan hastalarda tedavi etkinliğini izlemek için kullanılması amaçlanmıştır.

Özet ve Açıklama

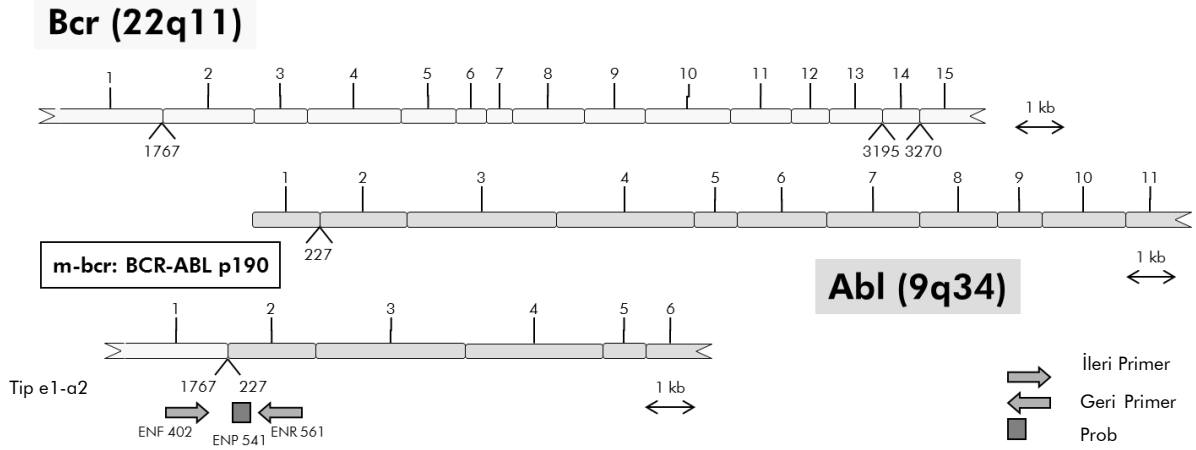
Philadelphia (Ph) kromozomu ALL'li yetişkinlerde en sık görülen karyotipik aberasyondur. Genel olarak ALL'li yetişkin hastaların %20–30'unda görülür ve insidans 50 yaşın üzerindeki hastalarda %50'nin üzerine çıkar.

Bu translokasyonda kromozom 9'da ABL proto-onkogeninin 3' segmenti kromozom 22'de BCR geninin 5' segmentiyle jukstapozisyon gösterir. BCR-ABL FG Ph kromozomunun ürünüdür ve yapısal olarak aktif bir tirozin kinaz proteindir.

ABL geninde kırılmalar tipik olarak birinci intronda görülür. BCR geninde kırılmalar genel olarak şu 3 bölgeden birinde görülür: ekson 12–16 bölgesinde yer alan ve majör kırılma kümesi bölgesi (Mbc) adı verilen bir 5,8 kb bölge, birinci intronun minör kırılma bölgesi (mbc) denilen bir 55 kb dizisi ve mikro kırılma kümesi bölgesi (μ -bc).

mbc içinde olan kırıklar ekson 1'i (e1) ABL geninin ikinci eksonu (a2) ile birleştirilerek 190 kDa (p190) bir kimerik protein kodlayan daha küçük bir füzyon transkriptiyle (e1a2) sonuçlanır (Şekil 1). p190 BCR-ABL proteini sadece Ph+ ALL'de görülürken p210 BCR-ABL proteini Ph+ ALL hastalarının %20–40'ında ve Ph+ kronik myelojenöz lösemi (KML) hastalarının hemen hemen tümünde ortakdır.

Tüm BCR-ABL füzyon proteinleri şekilleri artmış ve deregüle tirozin kinaz aktivitesi gösterir ve p190 formunun p210'a göre daha fazla transforme edici potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu kimerik protein normal sitokine bağımlı sinyal transdüksiyon yollarında deregülasyon oluşturup apoptoz inhibisyonuna yol açarak apoptoz veya büyüme faktöründen bağımsız büyümeye yol açar.



Şekil 1. qPCR primerleri ve prob seti: ENF402–ENP541–ENR561 kapsamındaki BCR-ABL mbc FG transkriptinin şeması. Primerler ve prob altındaki rakam normal gen transkriptindeki nükleotid konumuna karşılık gelir.

Ph+ ALL hastalarının tedavisi o hastalarda sağ kalıma önemli ölçüde arttıran tirozin kinaz inhibitörleriyle tedaviye başlanmasıyla optimize edilmiştir (bir derleme için bakınız referans 1). Bu hastalarda MRD izlenmesi gereklidir. MRD düzeyini izlemek için mevcut yöntemde gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) kullanılırken, BCR-ABL transkript sayıları bir kontrol geninin transkript sayılarıyla ilişkilidir. *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kiti bu tekniği temel alır.

İşlemin Prensipleri

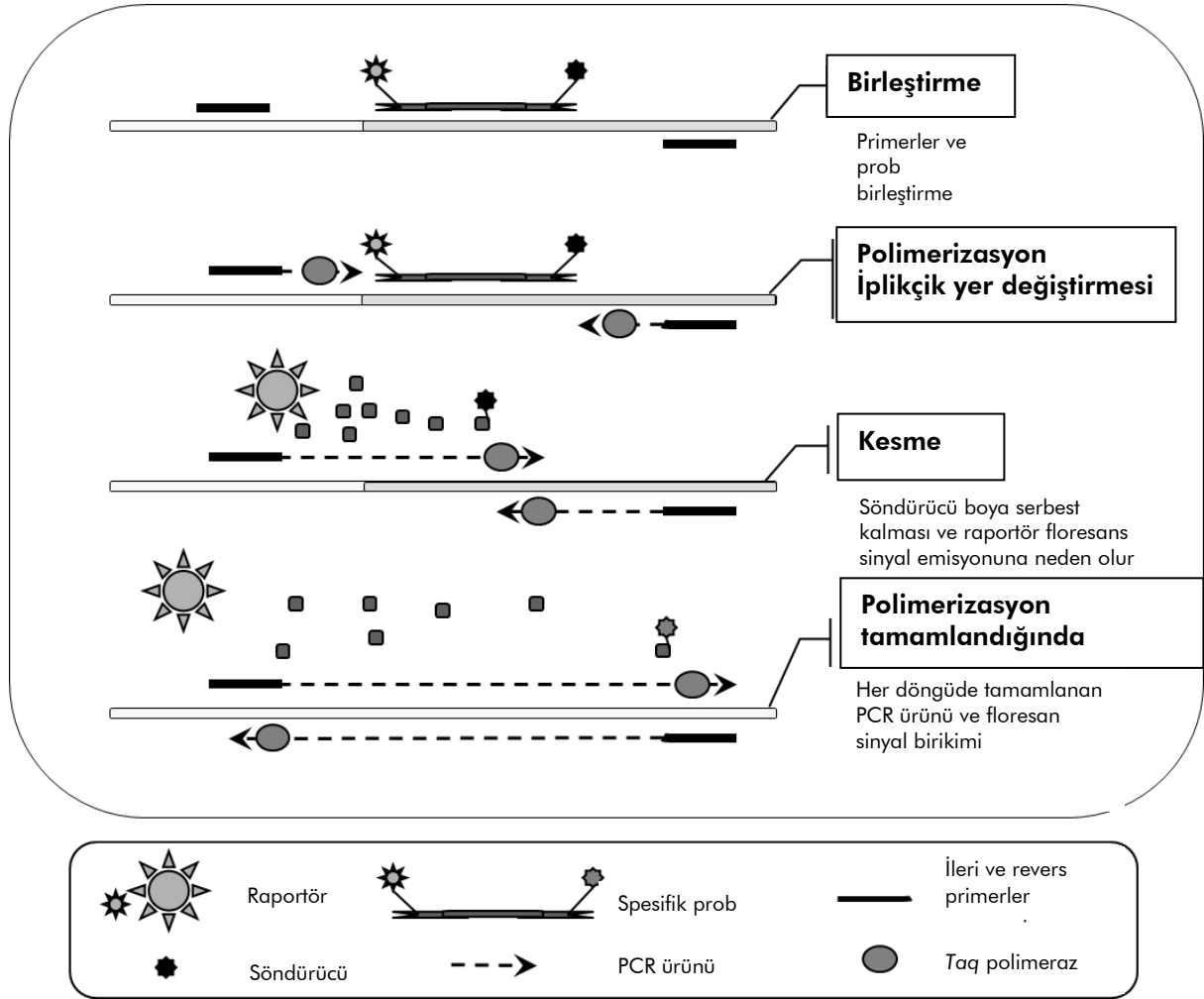
qPCR, PCR amplifikasyon sürecinin eksponensiyal fazı sırasında PCR ürünlerinin doğru kantifikasyonunu mümkün kılar. Kantitatif PCR verileri post-PCR işleme olmadan PCR cycling sırasında ve/veya sonrasında floresans sinyallerin gerçek zamanlı saptanmasıyla hızla elde edilebilir ve böylece PCR ürünü kontaminasyonu riski önemli ölçüde azalır. Şu anda 3 ana tipte qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Yeşil I Boya kullanılarak qPCR analizi, hidroliz problemleri kullanılarak qPCR analizi ve hibridizasyon problemleri kullanılarak qPCR analizi.

Bu test qPCR çift boya oligonükleotid hidroliz prensibini kullanır. PCR sırasında, ileri ve revers primerler belirli bir sekansa hibridize olur. Aynı karışımda bir çift boya oligonükleotid bulunur. Bir 5' raportör boya ve bir akış aşağı 3' söndürücü boyayla etiketlenmiş bir oligonükleotidden oluşan bu prob PCR ürünü içinde bir hedef sekansa hibridize olur. Hidroliz problemleriyle qPCR analizi *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraz 5'→3' eksonükleaz aktivitesini kullanır. Prob sağlam olduğunda raportör boyanın söndürücü boyaya yakınlığı raportör floresansın temel olarak Förster tipi enerji transferiyle baskılanmasıyla sonuçlanır.

PCR sırasında, ilgilenilen hedef mevcutsa, prob spesifik olarak ileri ve revers primer bölgeleri arasında yapışır. DNA polimerazın 5'→3' eksonükleaz aktivitesi ancak prob hedefe hibridize olursa probu raportör ile söndürücü arasında

keser. Prob fragmanları sonra hedeften ayrılır ve iplikçiğin polimerizasyonu devam eder. Probu 3' ucu PCR sırasında probun uzamasını önlemek üzere bloke edilir (Şekil 2). Bu işlem her döngüde oluşur ve ürünün eksponensiyel birikimini olumsuz etkilemez.

Bu floresans sinyali artışı ancak hedef sekans probu tamamlayıcı ise ve böylece PCR sırasında amplifiye oluyorsa saptanır. Bu gereklilikler nedeniyle nonspesifik amplifikasyon saptanmaz. Böylece, floreatadaki artış PCR sırasında hedef amplifikasyonla doğrudan orantılıdır.



Şekil 2. Reaksiyon prensibi. Total RNA revers transkripsiyona uğrar ve oluşan cDNA PCR ile bir çift spesifik primer ve spesifik internal çift boya probu (FAM™–TAMRA™) kullanılarak amplifiye edilir. Prob PCR'da her yapışma adımında amplikona bağlanır. Taq DNA polimeraz bağlı primerden amplikona uzandığında probun 5' ucunu yerinden oynatır ve burası Taq DNA polimerazın 5'→3' eksonükleaz aktivitesi ile degrade olur. Kesme kalan prob amplikondan eriyip ayrılınca kadar devam eder. Bu işlem florofor ve söndürücüyü solüsyona serbest bırakır, bunları uzaysal olarak ayırır ve FAM'dan floresans artmasına ve TAMRA'dan floresans azalmasına neden olur.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Katalog no.		670023
Reaksiyon sayısı		24
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ³ copies/5 µl) (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyon) (10 ³ kopya/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ⁴ copies/5 µl) (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyon) (10 ⁴ kopya/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ⁵ copies/5 µl) (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyon) (10 ⁵ kopya/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ¹ copies/5 µl) (BCR-ABL mbc Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10 ¹ kopya/5 µl)	F1-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ² copies/5 µl) (BCR-ABL mbc Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10 ² kopya/5 µl)	F2-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ³ copies/5 µl) (BCR-ABL mbc Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10 ³ kopya/5 µl)	F3-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁵ copies/5 µl) (BCR-ABL mbc Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10 ⁵ kopya/5 µl)	F4-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁶ copies/5 µl) (BCR-ABL mbc Füzyon Geni Standart Dilüsyon) (10 ⁶ kopya/5 µl)	F5-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
Primers and Probe Mix ABL* (Primerler ve Prob Karışımı ABL)	PPC-ABL 25x	90 µl

* ABL kontrol geni için spesifik revers ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM-TAMRA probunun karışımı.

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Katalog no.		670023
Reaksiyon sayısı		24
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene [†] (Primerler ve Prob Karışımı BCR-ABL mbc Füzyon Geni)	PPF-mbc 25x	110 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 mbc Kit El Kitabı</i> (İngilizce)		1

[†] BCR-ABL mbc füzyon geni için spesifik revers ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM-TAMRA probunun karışımı.

Not: Standart dilüsyonları ve primerler ile prob karışımlarını kullanımdan önce kısa bir süre santrifüje edin.

Gereken ama Sağlanmayan Materyal

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Reaktifler

- Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su
- Revers transkripsiyon için reaktifler: Onaylanmış reaktif Superscript[®] II (veya Superscript) Revers Transkriptazdır ve 5x birinci iplikçik tamponu, 100 mM DTT içerir (Life Technologies, kat. no. 18064-022)
- RNaz inhibitörü: Onaylanmış reaktif RNaseOUT[™]1'dir (Life Technologies, kat. no. 10777-019)
- dNTPs Seti, PCR sınıfı
- Rastgele heksamer
- MgCl₂
- Tampon ve Taq DNA polimeraz: Onaylanmış reaktifler TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. no. 4304437) ve LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. no. 04535286001) şeklindedir.

Sarf Malzemesi

- Hidrofobik filtreli nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril PCR pipet uçları

- 0,5 ml veya 0,2 ml RNaz- ve DNaz içermeyen PCR tüpleri
- Buz

Ekipman

- PCR için ayrılmış mikrolitre pipet* (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- 0,2 ml/0,5 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüj* (10.000 rpm değerine ulaşabilen)
- Gerçek zamanlı PCR cihazı:* Rotor-Gene Q 5plex HRM ve diğer Rotor-Gene cihazı; LightCycler 1.2, 2.0 veya 480; ABI PRISM 7000, 7700 veya 7900HT SDS; veya SmartCycler; ve ilgili spesifik materyal
- Termal cycler* veya su banyosu* (revers transkripsiyon adımı)

Tamamlayıcı reaktifler

- *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit (kat. no. 670091), RNA ekstraksiyonu ve revers transkripsiyonun kalitatif doğrulanması için BCR-ABL mbcR füzyon geninin negatif, yüksek ve düşük pozitif ekspresyonuyla hücre hatlarından oluşur

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro diagnostik kullanım için

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrim içi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve kullanıcılar burada her QIAGEN kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilir.

Örnek ve tahlil atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize göre atın.

* Aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edilip kalibre edildiğinden emin olun.

Genel önlemler

qPCR testleri geçerli düzenlemeler ve ilgili standartlarla uyumlu ve moleküler biyolojiye özel ekipman bakımı dahil iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Bu kitin in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. Bu kitte sağlanan reaktifler ve talimat optimum performans için doğrulanmıştır. Reaktiflerin daha fazla seyreltilmesi veya inkübasyon süreleri ve sıcaklıklarının değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilerle sonuçlanabilir. PPC ve PPF reaktifleri ışığa maruz kalırlarsa değişebilir. Tüm reaktifler özellikle bu test için formüle edilmiştir. Testin optimum performansı için yerine başka bir şey kullanılmamalıdır.

qPCR kullanılarak transkript düzeylerinin belirlenmesi hem mRNA revers transkripsiyonu hem de oluşan cDNA'nın PCR ile amplifikasyonunu gerektirir. Bu nedenle tüm test işlemi RNaz/DNaz içermeyen koşullarda yapılmalıdır.

Aşağıdakileri önlemek için çok dikkatli olun:

- Şablon mRNA ve oluşan cDNA'nın degradasyonuna yol açabilecek RNaz/DNaz kontaminasyonu
- Yalancı pozitif sinyalle sonuçlanan mRNA veya PCR bulaşma kontaminasyonu

Bu nedenle şunları öneririz:

- Testi yaparken nükleaz içermeyen laboratuvar gereçleri (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve eldiven takın.
- Örnekler ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek üzere tüm pipetleme adımları için taze aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- Ön PCR ana karışımını belirlenmiş materyalle (pipetler, uçlar, vs.) DNA matrikslerinin (cDNA, DNA, plasmid) giremeyeceği belirlenmiş bir bölgede hazırlayın. Şablonu belirli materyalle (pipetler, uçlar, vs.) ayrı bir bölgede (tercihen ayrı bir odada) ekleyin.
- Standart dilüsyonları (C1–3 ve F1–5) ayrı bir odada kullanın.

Reaktif Saklama ve Muamele

Kitler kuru buzda gönderilir ve alındığında -30°C ila -15°C 'de saklanmalıdır.

- Primerler ve prob karışımlarının (PPC ve PPF tüpleri) ışığa maruz kalmasını minimuma indirin.
- Açmadan önce tüpleri yavaşça karıştırın ve santrifüje edin.
- Tüm kit bileşenlerini orijinal kaplarda saklayın.

Bu saklama koşulları hem açılmış hem açılmamış bileşenler için geçerlidir. Etiketlerde belirtilenlerden farklı koşullar altında saklanan bileşenler uygun performans göstermeyebilir ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.

Her reaktif için son kullanma tarihleri ayrı bileşen etiketlerinde belirtilmiştir. Doğru saklama koşulları altında ürün performansını etikette yazılı son kullanma tarihine kadar korur.

Bu ürünün stabil olmamasını belirtecek bariz bir işaret yoktur. Ancak, bilinmeyen örneklerle aynı anda pozitif ve negatif kontroller çalışmalıdır.

İşlem

Örnek RNA hazırlama

Hasta örneklerinden (kan veya kemik iliği) RNA hazırlama onaylanmış bir işlemle yapılmış olmalıdır. Testin kalitesi büyük ölçüde giriş RNA kalitesine bağlıdır. Bu nedenle saflaştırılmış RNA'yı agaroz* jel elektroforezi ile vasıflandırmanızı veya analiz öncesinde Agilent® Bioanalyzer® kullanmanızı öneririz.

Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon

Başlamadan önce yapılacaklar

- Her biri için 10 mM dNTP hazırlayın. Alikotlar halinde –20°C de saklayın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. 1 µg RNA'yı (1–4 µl) 70°C'de 10 dakika inkübe edin ve hemen buz üzerinde 5 dakika soğutun.
3. Kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Sonra buz üzerinde tutun.
4. Aşağıdaki RT karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın (Tablo 1).

* Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın.

Tablo 1. RT karışımı hazırlama

Bileşen	Örnek başına hacim (μl)	Son konsantrasyon
Birinci İplikçik Tamponu (Superscript II Revers Transkriptaz ile sağlanır), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (her birinden 10 mM, önceden hazırlanacak ve alikotlar halinde – 20°C'de saklanacak)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, Superscript II Revers Transkriptaz ile sağlanır)	2,0	10 mM
RNaz inhibitörü (40 U/ μ l)	0,5	1 U/ μ l
Rastgele heksamer (100 μ M)	5,0	25 μ M
Superscript II veya Superscript Revers Transkriptaz (200 U/ μ l)	0,5	5 U/ μ l
Isıtılmış RNA örneği (adım 5'te eklenecek)	1,0–4,0	50 ng/ μ l
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su (adım 5'te eklenecek)	0,0–3,0	–
Son hacim	20,0	–

5. Her PCR tüpüne RT karışımından 16 μ l pipetleyin. Sonra 1–4 μ l (1 μ g) RNA (adım 3'ten) ekleyin ve hacmi nükleaz içermeyen PCR sınıfı suyla 20 μ l'ye ayarlayın (bakınız Tablo 2).

Tablo 2. Revers transkripsiyon reaksiyonunun hazırlanması

Bileşen	Hacim (μl)
RT karışımı	16
Isıtılmış örnek RNA (1 μ g)	1–4
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	0–3
Son hacim	20

6. İyice karıştırın ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).
7. 10 dakika boyunca 20°C'de inkübe edin.
8. Termal cykler üzerinde 45 dakika 42°C'de inkübe edin sonra hemen 99°C'de 3 dakika inkübe edin.
9. Buz üzerinde (reaksiyonu durdurmak için) 5 dakika inkübe edin.
10. Kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Sonra buz üzerinde tutun.
11. Son cDNA'yı son hacim 50 µl olacak şekilde 30 µl nükleaz içermeyen PCR sınıfı suyla seyreltin.
12. PCR'ı qPCR aletinize göre aşağıdaki protokollerle yapın.

Protokol: 72 tüp rotorlu RotorGene Q 5plex HRM veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM üzerinde qPCR

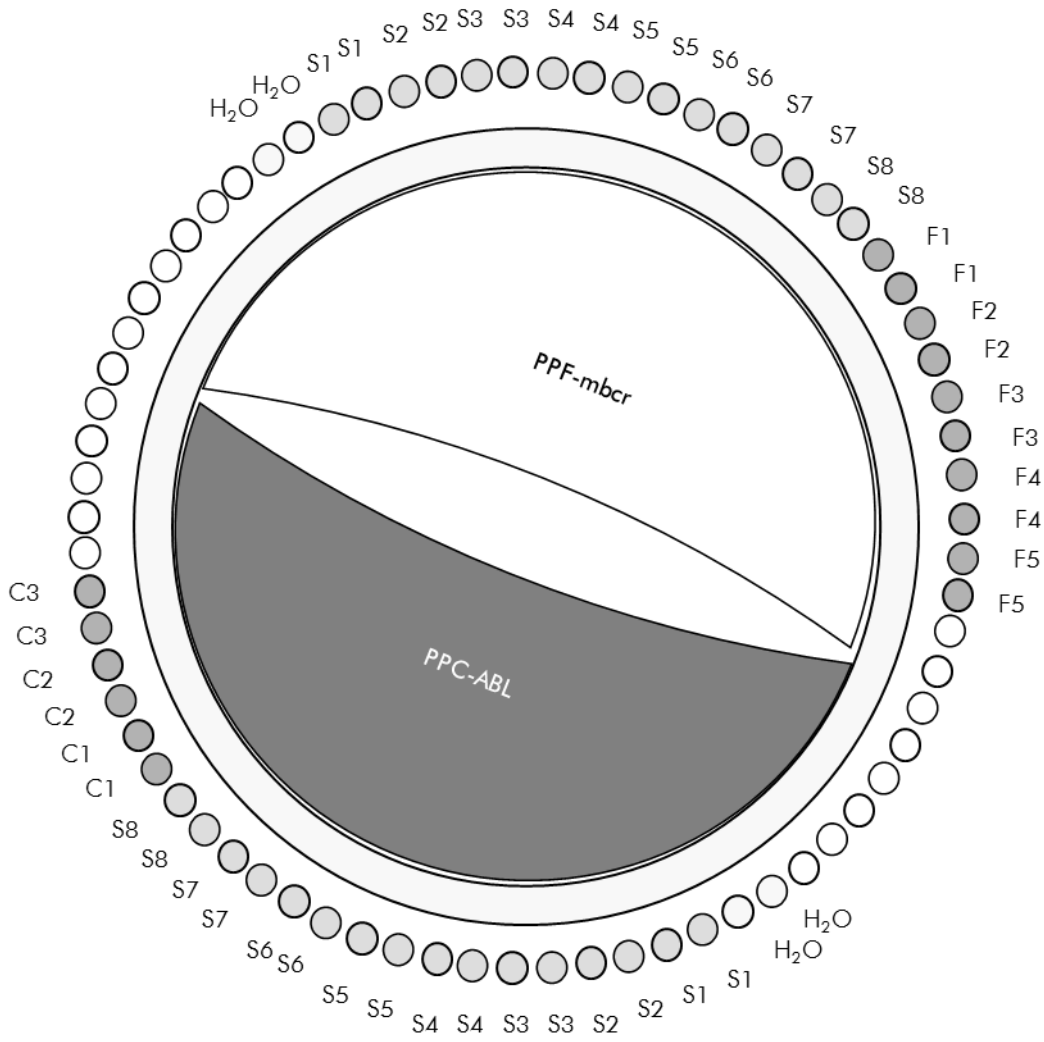
Bu aleti kullanarak Tablo 3'te gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 3. 72

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	2 x 3 reaksiyon (3 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon
BCR-ABL mbcr primerleri ve prob karışımıyla (PPF-mbcr)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
mbcr standardı	2 x 5 reaksiyon (5 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz.



Şekil 3. ipsogen BCR-ABL1 mbcR Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. F1–5: BCR-ABL mbcR standartları; **C1–3:** ABL standartları; **S:** cDNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

Not: Daima test edilecek bir örneği rotorda pozisyon 1'e koyduğunuzdan emin olun. Aksi halde kalibrasyon adımı sırasında alet kalibrasyon yapmaz ve hatalı floresans verileri alınır.

Tüm diğer pozisyonları boş tüplerle doldurun.

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 4 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon

sayısına göre aynı primer ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-mbcr). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 4. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	ABL: 24+1 reaksiyon (μl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 reaksiyon (μl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	25	29	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	162,5	188,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

- 3. Tüp başına 20 μ l qPCR ana karışımı verin.**
- 4. Karşılık gelen tüpe revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 μ l ekleyin (toplam hacim 25 μ l).**
- 5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.**
- 6. Tüpleri üretici önerilerine göre termal cyclus'a koyun.**
- 7. Rotor-Gene Q aletini Tablo 5'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.**

Tablo 5. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 50 derece Süre: 2 dk
Tutma 2	Sıcaklık: 95 derece Süre: 10 dk
Cycling	50 kez 15 sn için 95 derece 1 dk için 60 derece ve Yeşil kanalında FAM floresans alınması: Tek

- 8. Rotor-Gene Q aletleri için analizde "Slope Correct" (Eğim Düzelt) seçin. Eşiği 0,03 olarak ayarlamanızı öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 5'te belirtildiği şekilde başlatın.**

Protokol: ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS ve LightCycler 480 Aletinde qPCR

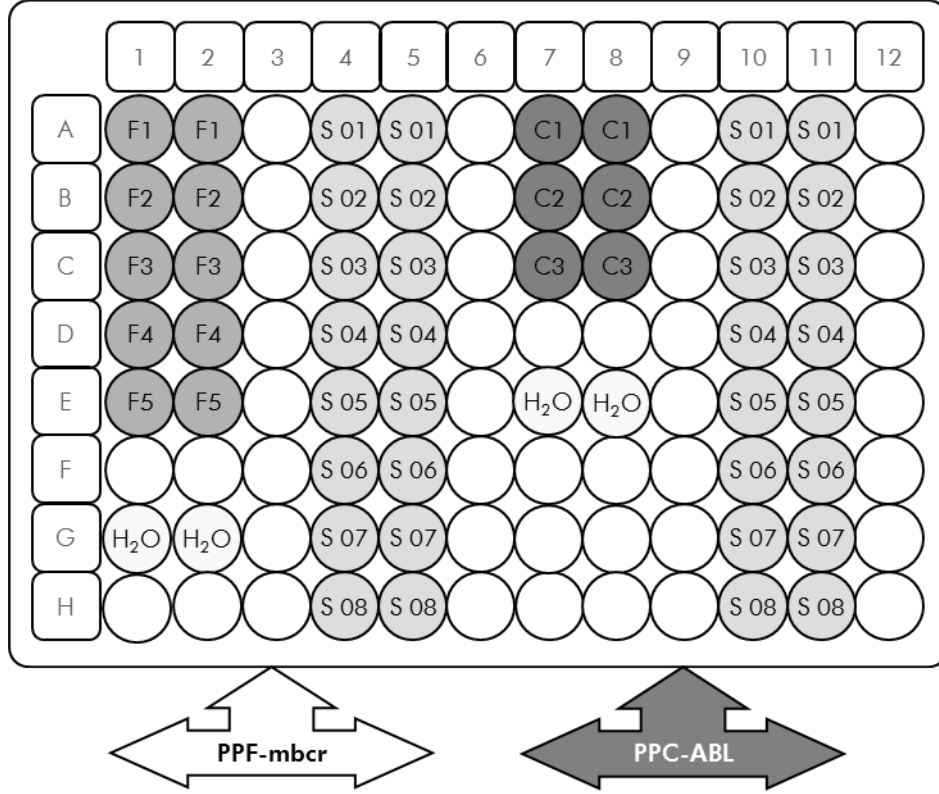
96 kuyulu plakalı qPCR aletini kullanarak Tablo 6'da gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 6. 96 kuyulu plakalı qPCR ekipmanında reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	2 x 3 reaksiyon (3 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon
BCR-ABL mbcr primerleri ve prob karışımıyla (PPF-mbcr)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
mbcr standardı	2 x 5 reaksiyon (5 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon

ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900 SDS ve LightCycler 480 Aletinde Örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 4'teki plaka şeması böyle bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 4. Bir deney için önerilen plaka kurulumu. S: cDNA örneği; F1–5: BCR-ABL mbcR standartları; C1–3: ABL standartları; H₂O: su kontrol.

ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900 SDS ve LightCycler 480 Aletinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın. 96 kuyulu plakalı qPCR aletini kullanarak tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 7 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primer ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-mbcR). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 7. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 24+1 reaksiyon (µl)	BCR-ABL mbc: 28+1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	25	29	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	162,5	188,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

- 3. Kuyucuk başına 20 µl qPCR ana karışımı verin.**
- 4. Karşılık gelen kuyucuğa revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).**
- 5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.**
- 6. Plakayı kapatın ve kısa süre santrifüje edin (300 x g, yaklaşık 10 saniye).**
- 7. Plakayı üretici önerilerine göre termal cycler'a koyun. Termal cycler'ı Tablo 8'de ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS veya Tablo 9'da LightCycler 480 Aleti için belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.**

Tablo 8. ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS için sıcaklık profili

Analiz modu	Standart Eğri — Mutlak Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C FAM floresansı almayla 1 dakika için 60°C; söndürücü: TAMRA

Tablo 9. LightCycler 480 Aleti için Sıcaklık profili

Analiz modu	Mutlak Kantifikasyon ("Abs Quant")
Format saptama	Detection formats (Saptama formatları) penceresinde "Simple Probe" (Basit Prob) seçin
Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C LC versiyon 01 için 483–533 nm, LC versiyon 02 için 465–510 nm'ye karşılık gelen FAM floresansı almayla 1 dakikada 60°C

**8. ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS için adım 8a izleyin.
LightCycler 480 Aleti için adım 8b'yi izleyin.**

8a. ABI PRISM 7000, 7700 ve 7900HT SDS: ABI PRISM SDS üzerinde analiz adımında EAC protokolünde tanımlandığı gibi 0,1 olarak ayarlanmış bir eşik ve döngü 3 ile 15 arasında ayarlanmış bir başlangıç öneriyoruz. Cycling programını Tablo 8'de belirtildiği şekilde başlatın.

8b. LightCycler 480 Aleti: Zemin 2,0 ve eşik 2,0 olarak bir Uyum noktası analiz modu öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 9'da belirtildiği şekilde başlatın.

Protokol: LightCycler 1.2 ve 2.0 Aletlerinde qPCR

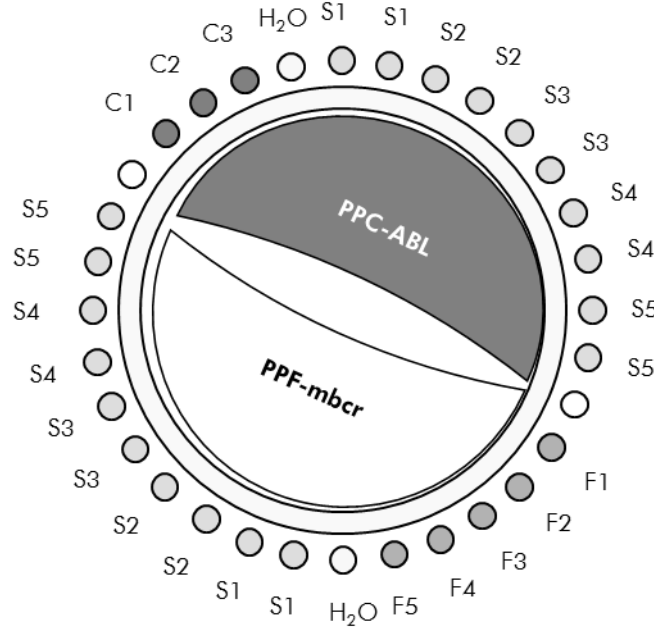
Kapiller aletler kullanarak Tablo 10'da gösterildiği gibi örnekleri ikili ve kontrolleri bir kez ölçmeyi öneriyoruz.

Tablo 10. LightCycler 1.2 ve 2.0 Aletlerinde reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	1 x 3 reaksiyon (3 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon
BCR-ABL mbcr primerleri ve prob karışımıyla (PPF-mbcr)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
mbcr standardı	1 x 5 reaksiyon (5 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon

LightCycler 1.2 ve 2.0 Aletleri örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 5 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 5'teki kapiller şeması bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 5. ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. F1–5: BCR-ABL mbcr standartları; **C1–3:** ABL standartları; **S:** analiz edilecek bilinmeyen DNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

LightCycler 1.2 ve 2.0 Aletlerinde qPCR

Not: Belirli teknolojik gereklilikler nedeniyle LightCycler deneylerinin belirli reaktifler kullanılarak yapılması gerekir. LightCycler TaqMan Master kullanılması ve Master Mix 5x hazırlamak için üreticinin talimatının izlenmesini öneriyoruz.

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

- 1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.**
- 2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.**

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 11 20 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-mbcr). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 11. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	ABL: 14+1 reaksiyon (μl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reaksiyon (μl)	Son konsantrasyon
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x yeni hazırlanır	4,0	60	68,0	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	0,8	12	13,6	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	10,2	153	173,4	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	Her birinden 5,0	–
Toplam hacim	20,0	Her birinden 20	Her birinden 20,0	–

- 3. Kapiller başına 15 μ l qPCR ana karışımı verin.**
- 4. Karşılık gelen tüpe revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 μ l ekleyin (toplam hacim 20 μ l).**
- 5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.**
- 6. Kapillerleri aparat ile sağlanan adaptörlere yerleştirin ve kısa süre santrifüje edin (700 x g, yaklaşık 10 saniye).**
- 7. Kapillerleri üreticinin önerilerine göre termal cycler'a yükleyin.**
- 8. LightCycler 1.2 veya 2.0 Aletini Tablo 12'de belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.**

Tablo 12. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika Rampa: 20
Cycling	50 kez 10 saniye için 95°C; rampa: 20 1 dakika için 60°C; rampa: 20; FAM floresansı almayla: Tek
Tutma 2	1 dakika için 45°C; rampa: 20

9. LightCycler 1.2 için adım 9a'yı izleyin. LightCycler 2.0 için adım 9b'yi izleyin.
- 9a. LightCycler 1.2: F1/F2 ve "2nd derivative analysis" (2 derivatif analizi) modu önerilir. Termal cycling programını Tablo 12'de belirtildiği şekilde başlatın.
- 9b. LightCycler 2.0: Tekrar üretilebilir sonuçlar elde etmek üzere LightCycler 2.0 Yazılım versiyon 4.0 üzerinde Otomatik (F''maks) analizi kullanmanızı öneririz. Termal cycling programını Tablo 12'de belirtildiği şekilde başlatın.

Protokol: SmartCycler aletinde qPCR

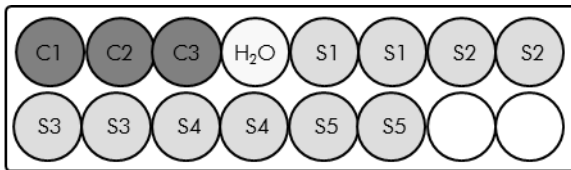
Bu aleti kullanarak Tablo 13'de gösterildiği gibi örnekleri ikili ve kontrolleri bir kez ölçmeyi öneriyoruz.

Tablo 13. SmartCycler aleti için reaksiyon sayısı

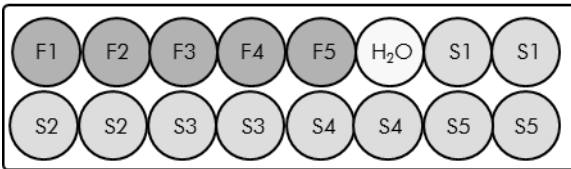
Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	1 x 3 reaksiyon (3 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon
BCR-ABL mbc primerleri ve prob karışımıyla (PPF-mbc)	
n cDNA örnekleri	n x 2 reaksiyon
mbcr standardı	1 x 5 reaksiyon (5 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrol	1 reaksiyon

SmartCycler aletinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 5 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 6'daki iki bloklü şema bir örnek vermektedir.



Bu birinci bloktaki tüm testler PPC-ABL ile yapılır



Bu ikinci bloktaki tüm testler PPF-mbc ile yapılır.

Şekil 6. Bir deney için önerilen plaka kurulumu. S: cDNA örneği; F1–5: BCR-ABL mbc standartları; C1–3: ABL standartları; H₂O: su kontrol.

SmartCycler aletinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 14 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primer ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-mbcr). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 14. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 14+1 reaksiyon (µl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	15	17	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	97,5	110,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

3. Kuyucuk başına 20 µl qPCR ana karışımı verin.

4. Karşılık gelen tüpe revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: Önerilen standardize EAC revers transkripsiyon", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).
5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Örnekleri üreticinin önerilerine göre termal cycler'a yükleyin.
7. SmartCycler aletini Tablo 15'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Tablo 15. Sıcaklık profili

Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C 1 dakika için 60°C alınmasıyla: Tek

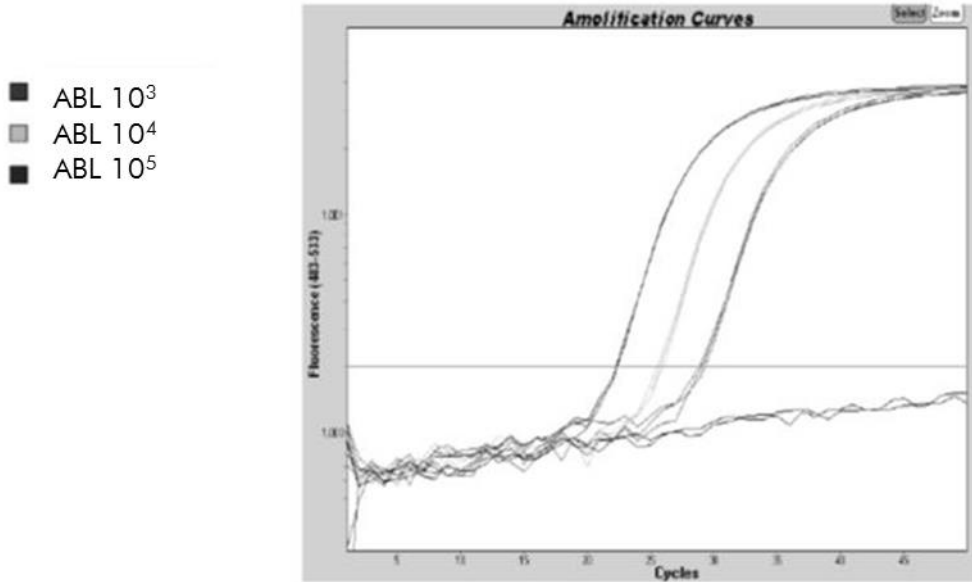
8. Eşiği 30 olarak ayarlamanızı öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 15'te belirtildiği şekilde başlatın.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Veri analizi prensibi

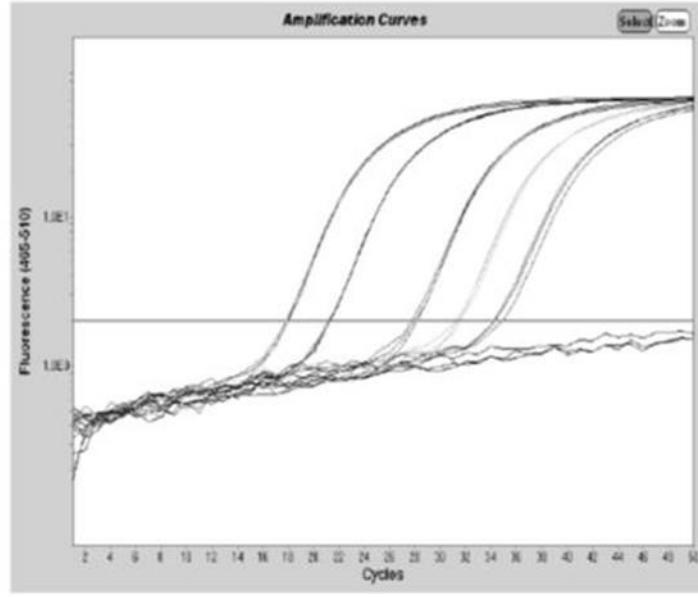
TaqMan teknolojisi kullanılarak, eşik üzerinde bir sinyal saptamak için gerekli PCR döngüsü sayısına eşik döngüsü (C_T) denir ve reaksiyon başında bulunan hedef miktarıyla doğrudan orantılıdır.

Bilinen sayıda molekülle standartlar kullanarak standart bir eğri oluşturulabilir ve test örneğinde bulunan kesin hedef miktarı belirlenebilir. *ipsogen* standart eğrileri plasmid tabanlıdır; doğru standart eğrileri sağlamak üzere CG için 3 plasmid standart dilüsyonu ve FG için 5 standart dilüsyon öneririz. Şekil 7 ve 8 *ipsogen* BCR-ABL mbc Kit ile elde edilen TaqMan amplifikasyon eğrilerine örnek gösterir.



Şekil 7. ABL standartlarının saptanması (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ ve 10⁵ kopya/5 µl.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6



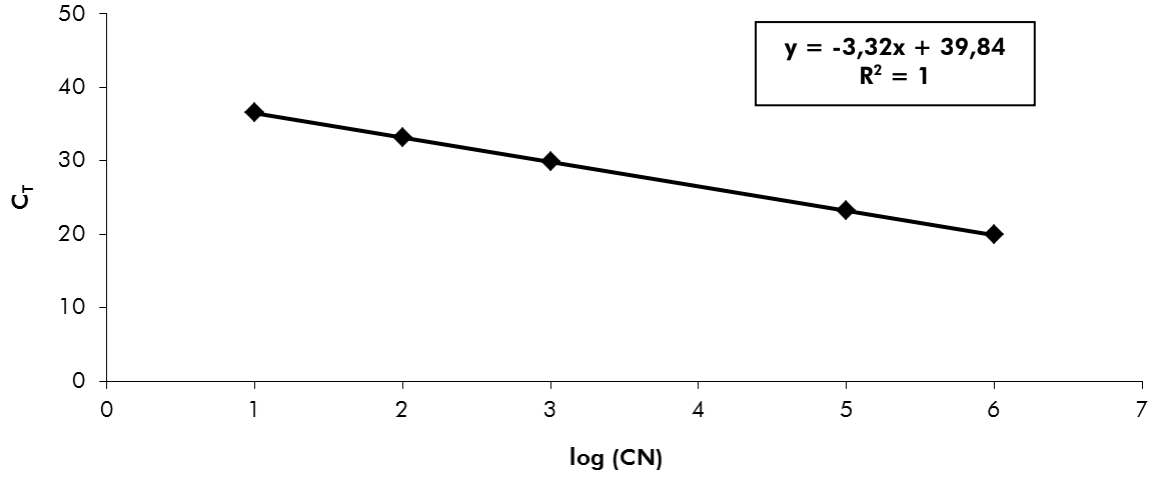
Şekil 8. BCR-ABL mbcrlarının standartlarının saptanması (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopya/5 μ l.

Sonuçlar

Standart eğri ve kalite kriterleri

Ham veriler analiz için bir Excel® dosyasına yapıştırılabilir.

Her gen için (ABL ve BCR-ABL), plasmid standart dilüsyonlarından elde edilen ham C_T değerleri log kopya numarasına göre plotlanır (C_1 , C_2 ve C_3 için 3, 4 ve 5; F1, F2, F3, F4 ve F5 için 1, 2, 3, 5 ve 6). Şekil 9 5 standart dilüsyonda hesaplanmış teorik eğri örneği gösterir.



Şekil 9. 5 standart dilüsyondan hesaplanmış teorik eğri. Her gen için (ABL ve BCR-ABL) bir lineer regresyon eğrisi ($y = ax + b$) hesaplanır ve burada a çizginin eğimi ve b y-kesişimidir ve burası çizginin y eksenini geçtiği noktada y koordinatıdır. Belirlemenin katsayısı (R^2) ve denklem grafikte yazdırılır.

Standartlar on kat dilüsyon olduğundan eğrinin teorik eğimi $-3,3$ 'tür. $-3,0$ ile $-3,9$ arasında bir eğim $R^2 > 0,95$ olduğu sürece kabul edilebilir (2). Ancak hassas sonuçlar için $R^2 > 0,98$ istenir (3).

Normalize kopya numarası (NCN)

ABL standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_T verilerini (PPC-ABL ile elde edilen) ABL kopya numaralarına (ABL_{CN}) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

BCR-ABL standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_T verilerini (PPF-mbcr ile elde edilen) BCR-ABL kopya numaralarına ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

Bu CN değerlerinin oranı normalize kopya numarasını (NCN) verir:

$$NCN = \frac{BCR-ABL_{mbcr_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

MRD değeri

Minimal rezidüel hastalık (MRD) değeri takip $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ ve diagnostik örnekler $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ FG için CG normalize ekspresyonunun oranıdır.

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

Hassasiyet

Hassasiyet (SENS_v) tanıda relatif FG ekspresyonu (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} ve takip örneğinde CG ekspresyonuna ($CG_{CN,FUP}$) göre hesaplanır.

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

ABL değerlerinde kalite kontrol

Kötü RNA kalitesi veya qPCR adımları sırasında problemler düşük ABL_{CN}'ye neden olur. ABL_{CN} < 1318 olan örneklerden sonuçları atmanızı öneriyoruz (referans 4, EAC çalışmasında hasta örneklerinden %95 GA için alt değer).

Replikatlar arasında tekrar üretilebilirlik

Replikatlar arasında C_T değerleri değişkenliği kopya sayısı değerlerinde dört kat değişikliğe karşılık gelecek şekilde < 2 olmalıdır.

Replikatlar arasında C_T değerleri değişikliği replikatların ortalama C_T değeri < 36 (2) ise genelde < 1,5'tir.

Not: Her kullanıcı laboratuvarında kendi tekrar üretilebilirliğini ölçmelidir.

Su kontrol

Negatif kontroller sıfır CN vermelidir.

Pozitif su kontrol çapraz kontaminasyon nedeniyle oluşur. Bir çözüm bulmak için aşağıda "Sorun Giderme kılavuzu" kısmına bakınız.

Sorun Giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu oluşabilecek herhangi bir problemi çözmekte faydalı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizde Sık Sorulan Sorular sayfasına bakınız: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgiler ve protokol veya tahlil ve örnek teknolojileri ile ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplamaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgisi için bakınız "İrtibat Bilgisi", sayfa 45).

Açıklama ve öneriler

Tüm örneklerde BCR-ABL mbc ve kontrol geninde (ABL) negatif sonuç — standart iyi

- a) Kötü RNA kalitesi Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kiti, kat. no. 670091, içinde yüksek pozitif kontrol).
- b) Revers transkripsiyon adımının başarısızlığı Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, kat. no. 670091).

Kontrol geninde (ABL) negatif sonuç — standart iyi

- a) Kötü RNA kalitesi Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, kat. no. 670091).
- b) Revers transkripsiyon adımının başarısızlığı Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, kat. no. 670091).

Standart sinyal negatif

- a) Pipetleme hatası Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Kit bileşenlerinin uygun olmayan saklanması *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kitini –15 ila –30°C'de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını (PPC ve PPF) ışıktan koruyun. Bakınız "Reaktif Saklama ve Muamele", sayfa 10.
Tekrarlanan dondurma ve çözmelerden kaçının. Reaktifleri saklama için alikotlayın.

Açıklama ve öneriler

Negatif kontroller pozitifdir

- Çapraz kontaminasyon Tüm kritik reaksiyonları değiştirin.
Deneyi tüm reaktiflerin yeni alikotlarıyla tekrarlayın.
Örnekler, kit bileşenleri ve sarf malzemesini bulaşma kontaminasyonunu önlemek için daima yaygın olarak kabul edilen uygulamalara göre kullanın.

Standart kontrollerde bile sinyal yok

- a) Pipetleme hatası veya atlanmış reaktifler Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Yetersiz saflaştırma nedeniyle örnek materyalinin inhibe edici etkileri RNA hazırlanmasını tekrarlayın.
- c) LightCycler: Yanlış saptama kanalı seçilmiş Kanal Ayarını F1/F2 veya 530 nm/640 nm olarak ayarlayın.
- d) LightCycler: Veri alma programlanmamış Döngü programlarını kontrol edin.
PCR programında her birleştirme segmentinin sonunda "single" (tek) çekim modunu seçin.

Örneklerde sinyal yok veya düşük ama standart kontrolleri iyi

- a) Kötü RNA kalitesi veya düşük konsantrasyon Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, kat. no. 670091).
- b) Revers transkripsiyon adımının başarısızlığı Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrol çalıştırın (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit, kat. no. 670091).

Açıklama ve öneriler

Floresans şiddeti fazla düşük

- a) Kit bileşenlerinin uygun olmayan saklanması *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kitini -15 ila -30°C'de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını (PPC ve PPF) ışıktan koruyun. Bakınız "Reaktif Saklama ve Muamele", sayfa 10.
Tekrarlanan dondurma ve çözmelerden kaçınınız.
Reaktifleri saklama için alikotlayınız.
- b) Çok düşük başlangıç hedef RNA miktarı Örnek RNA miktarını arttırınız.
Not: Seçilen RNA hazırlama yöntemine bağlı olarak inhibe edici etkiler oluşabilir.

LightCycler: Floresans şiddeti değişkenlik gösterir

- a) Pipetleme hatası "Pipetting error" (pipetleme hatası) denilen durumun yarattığı değişkenlik verileri F1/F2 veya 530 nm/640 nm modunda analiz ederek azaltabilir.
- b) Kapillerlerde yetersiz santrifügasyon Hazırlanan PCR karışımı halen kapillerin üst kısmında olabilir veya kapiller ucunda bir hava kabarcığı sıkışmış olabilir.
Kapillerleri daima cihazın spesifik çalıştırma el kitabında tanımlanan şekilde reaksiyon karışımıyla yüklenmiş olarak santrifüje edin.
- c) Kapiller ucunun dış yüzeyi kirlidir Kapillerleri kullanırken daima eldiven takınız.

LightCycler: Standart eğri hatası

- Pipetleme hatası "Pipetting error" (pipetleme hatası) denilen durumun yarattığı değişkenlik verileri F1/F2 veya 530 nm/640 nm modunda analiz ederek azaltabilir.

Kalite Kontrol

Tüm kitin kalite kontrolü bir LightCycler 480 Aletiyle yapılmıştır. Kit ISO 13485:2003 standardına göre üretilmiştir. Analiz sertifikaları istek üzerine www.qiagen.com/support/ adresinde bulunabilir.

Sınırlamalar

Kullanıcılar bu cihazın kullanılmasından önce bu teknoloji konusunda eğitimli ve aşina olmalıdır.

Oluşan herhangi bir diagnostik sonuç diğer klinik veya laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır. Laboratuvarlarında QIAGEN performans çalışmalarının kapsamında olmadan kullanılan herhangi bir işlem için sistem performansını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm bileşenlerin kutu ve etiketlerinde basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Not: Bu kit "Europe Against Cancer" (EAC) çalışmalarına göre tasarlanmıştır (4) ve güncellenmiş uluslararası önerilerle uyumludur (3, 5). Bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış reaktifler ve aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır (bakınız "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 8). Bu ürünün etiket dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN'in yükümlülüğünü ortadan kaldırır.

Performans Özellikleri

Klinik olmayan çalışmalar

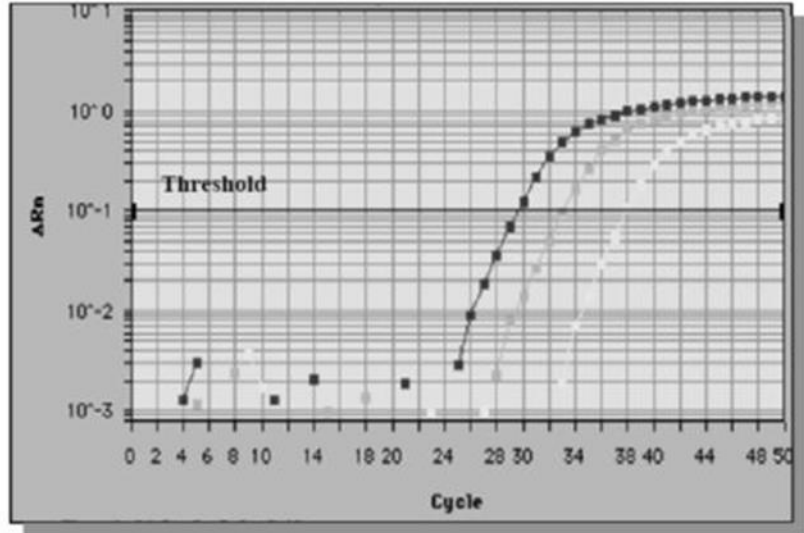
Materyaller ve yöntemler

Performans değerlendirmesi "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 8 içinde liste halinde verilen reaktiflerle kombinasyon halinde bir ABI PRISM 7700 SDS ile yapılmıştır. Eşdeğerlik çalışmaları aşağıdaki aletlerde kullanımını doğrulamıştır: ABI PRISM 7000 ve 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ve 480, Rotor-Gene 3000 ve SmartCycler (6).

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kitinin analitik performansını belirlemek üzere klinik olmayan çalışmalar yapılmıştır. Bu klinik olmayan laboratuvar çalışmaları sabit bir son MV4-11 hücre hattı total RNA miktarında seyreltilmiş olarak TOM1 hücre hattından total RNA üzerinde yapılmıştır.

Testin tekrarlanabilirliğini belirlemek üzere 1000 ng sabit son toplam miktarda MV4-11 total RNA'da seyreltilmiş TOM1 total RNA konsantrasyonu (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg ve 0,5 pg) çalışma başına 5 replikat ve 4 farklı çalışma olarak analiz edilmiştir (Şekil 10).

- TOM1 5×10^{-3}
- TOM1 5×10^{-4}
- TOM1 5×10^{-5}



Şekil 10. MV4-11 negatif total RNA'da TOM1 total RNA için 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) ve 5×10^{-5} (0,05 ng) dilüsyonlarının amplifikasyon plotları.

Analitik veriler

Tablo 16–19 ortalama eşik döngüsü (C_T), standart sapma (SD), örnek sayısı (n), varyasyon katsayısı (CV), ortalama kopya numarası (CN) ve ortalama normalize kopya numarası (NCN) ile testler arası analizleri gösterir.

Tablo 16. Testler arası analiz — hücre hatları mbcr ve ABL

Hücre hattı	Dilüsyon	Ortalama C_T	SD	n	CV (%)
mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	29,19	0,26	20	0,88
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	33,70	0,48	20	1,47
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Tablo 17. Testler arası analiz — plasmidler

Gen	Plasmid	Ortalama			
		C _T	SD	n	CV (%)
mbcr	F1 (10 ¹ kopya)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² kopya)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ kopya)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ kopya)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ kopya)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ kopya)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ kopya)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ kopya)	22,53	0,42	12	1,86

Tablo 18. Testler arası analiz — hücre hatları BCR-ABL mbcr ve ABL (ortalama CN)

Hücre hattı	Dilüsyon	Ortalama			
		CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22,038,22	9459,17	100	42,92

Tablo 19. Testler arası analiz — hücre hattı BCR-ABL mbcr (ortalama NCN)

Hücre hattı	Dilüsyon	Ortalama NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	267,46	93,22	20	34,85
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	23,54	7,36	20	31,28
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	2,60	2,80	20	107,66

* Sadece bu çalışma sonuçları için NCN

$$\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000 \text{ olarak verilir.}$$

Klinik araştırmalar

Performans değerlendirmesi "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 8 içinde liste halinde verilen reaktiflerle kombinasyon halinde bir ABI PRISM 7700 SDS ile yapılmıştır. Eşdeğerlik çalışmaları aşağıdaki aletlerde kullanımını doğrulamıştır: ABI PRISM 7000 ve 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ve 480 Aletleri, Rotor

Europe Against Cancer (EAC) tarafından bir toplu eylemde organize edilmiş şekilde 10 Avrupa ülkesinde 26 laboratuvarlık bir grup IPSOGEN tarafından sağlanan plasmidleri klinik ortamda majör lösemiyle ilişkili füzyon genlerinin qPCR analizi için standardize bir protokol elde etmek üzere kullanmıştır. BCR-ABL p190 transkripti bu çalışmaya dahil edilen füzyon genlerinden (FG) biridir. Burada bu doğrulama çalışmasının bir özetini sunuyoruz; tam sonuçlar 2003 yılında yayımlanmıştır (4, 7).

CG ve FG plasmid standartları için laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik

On bir laboratuvar CG ve FG plasmid standart dilüsyonlarının ölçümünde değişkenliği değerlendirmek üzere bir laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik deneyi yapmıştır. Dilüsyonlar her tesiste ikili olarak yapılmıştır. Tablo 20 her dilüsyon için ortalama, standart sapma ve CV (%) değerlerini göstermektedir.

Tablo 20. CG ve FG plasmid standartları için laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik

Gen	Dilüsyon	Ortalama	C _T SD	CV (%)
ABL kontrol geni	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
BCR-ABL mbcf füzyon geni	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

BCR-ABL mbcf FG transkriptinin ekspresyon değerleri

Tablo 21 ve 22 BCR-ABL mbcf FG transkripti ve ABL CG ekspresyon değerlerini TOM1 hücre hattı, tanıda ALL hastaları ve normal hastalar için vermektedir.

Tablo 21. BCR-ABL mbcf FG transkripti ve ABL CG ekspresyon değerleri — C_T değerleri

	C _T değerleri (%95 aralık)	
	BCR-ABL mbcf	ABL
TOM1 hücre hattı	22,8	21,8
ALL hasta örnekleri		
BM (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
PB (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Negatif hasta örnekleri		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tablo 22. BCR-ABL mbcr FG transkripti ve ABL CG ekspresyon değerleri — CN ve NCN değerleri

	CN değerleri (%95 aralık)		NCN değerleri (%95 aralık)
	BCR-ABL mbcr	ABL	CN BCR-ABL mbcr/CN ABL
ALL hasta örnekleri			
BM (n = 17)	9550 (1738–97,724)	11,912 (5012–70,795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91,201 (1905–208,930)	134,896 (4786–114,815)	0,68 (0,4–1,82)
Negatif hasta örnekleri			
BM (n = 26)	–	19,201 (12,922–25,480)	–
PB (n = 74)	–	21,136 (17,834–24,437)	–

ABL C_T değerleri normal ve lösemik örnekler arasında önemli fark göstermedi ve ayrıca örnek tipleri (PB veya BM) veya lösemi örnekleri (ALL, AML, CML) arasında önemli fark göstermedi.

Yalancı pozitif ve yalancı negatif oranları

Yalancı negatif ve yalancı pozitif oranları aşağıdaki kontroller kullanılarak hesaplandı.

- Pozitif kontroller: BCR-ABL p190 füzyon geni için pozitif olmakla bilinen bir hücre hattı olan TOM1 hücreleri; hasta örnekleri zaten p190 pozitifliği için değerlendirilmiştir
- Negatif kontroller: Negatif RNA örnekleri, PCR kontaminasyonunu kontrol etmek için insan RNA'sı yerine *E. coli* RNA'sından yapılmış amplifikasyon olmaması kontrolleri (NAC) ve insan RNA'sı yerine su içeren şablon olmaması kontrolleri (NTC)

FG'nin RNA örnekleri amplifikasyonu üçlü olarak ve CG için ikili olarak çalışıldı. Yalancı negatif örnek %50'den az pozitif kuyunun olduğu (0/2, 0/3 veya 1/3) pozitif RNA örneği olarak tanımlandı.

Bir yalancı pozitif örnek en az %50 pozitif kuyuyla (1/2, 2/3 veya 3/3) bir negatif örnek olarak tanımlandı.

Tablo 23 yalancı negatif ve yalancı pozitif örneklerin sayı ve yüzdesini göstermektedir.

Tablo 23. Yalancı negatif ve yalancı pozitif örnekler

Yalancı negatiflik		Yalancı pozitiflik	
10 ⁻³	10 ⁻⁴	FG negatif kontrol	NAC/NTC
0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Referanslar

QIAGEN, QIAGEN ürünleri kullanılan bilimsel yayınların geniş ve güncel bir çevrimiçi veri tabanını tutmaktadır. Kapsamlı arama seçenekleri gereksinim duyduğunuz makaleleri basit bir anahtar kelimesi araması veya uygulama, araştırma alanı, başlık vesaire belirterek bulmanızı mümkün kılar.

Referansların tam bir listesi için çevrimiçi QIAGEN Referans Veri Tabanını www.qiagen.com/RefDB/search.asp adresinde ziyaret edin veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzle irtibat kurun.

Atıfta bulunulan referanslar

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program **2007**, 435.
2. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia **17**, 1013.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia **20**, 1925.
4. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. Leukemia **17**, 2318.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood **108**, 28.
6. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of

fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. Leukemia **19**, 305.

7. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia **17**, 2474.

Semboller

Aşağıdaki semboller paketler ve etiketlerde belirebilir:



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son Kullanma Tarihi



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Küresel Ticaret Parça Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatına başvurun

İrtibat Bilgisi

Teknik yardım ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezimize gidin, 00800-22-44-6000 numarasından arayın veya QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden veya yerel distribütörlerden birini arayın (arka kapağa bakınız veya www.qiagen.com adresine gidiniz).

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	24 reaksiyon için: ABL Kontrol Geni Standartları, BCR-ABL mbc Füzyon Geni Standartları, Primer ve Probe Karışımı ABL, Primer ve Probe Karışımı BCR-ABL mbc Füzyon Geni	670023
Rotor-Gene Q MDx — Klinik uygulamalarda IVD ile doğrulanmış gerçek zamanlı PCR analizi için		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cycler ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cycler ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kontrol Kiti — BCR-ABL mbc füzyon geninin revers transkripsiyonu ve RNA ekstraksiyonunun kalitatif doğrulanması için		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	BCR-ABL mbc füzyon geninin negatif,yüksek ve düşük pozitif ekspresyonlu hücre hatları	670091

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakınız. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı el kitapları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu ürünün in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. *ipsogen* ürünleri önceden QIAGEN'in yazılı onayı olmadan tekrar satılamaz, tekrar satış için modifiye edilemez veya ticari ürünler üretmek için kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgi haber verilmeden değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilen herhangi bir hata için sorumluluk almaz. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. QIAGEN, hiçbir şekilde bu belgenin kullanımından doğrudan veya dolaylı olarak kaynaklanan her türlü özel, arızı veya çoklu veya sonuçsal kayıplardan sorumlu değildir.

ipsogen ürünlerinin belirtilen spesifikasyonları karşılayacağı garanti edilir. Ürünler garanti edildiği şekilde performans göstermezse QIAGEN'in tek yükümlülüğü ve müşterinin tek çözümü ürünlerin ücretsiz değiştirilmesiyle sınırlıdır.

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

Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımını *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kitini satın alan veya kullanıcının şu şartları kabul ettiğini belirler:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kiti sadece *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit El Kitabı uyarınca ve sadece bu Kite bulunan bileşenlerle kullanılabilir. QIAGEN fikri mülkiyeti altında bu Kite sağlanan bileşenleri bu Kite sağlanmayan herhangi bir bileşenle, *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kiti El Kitabı ve www.qiagen.com adresinde bulunan ek protokoller içinde tanımlanan durumlar haricinde kullanma veya birlikte işleme sokma açısından bir lisans vermez.
2. Açık olarak ifade edilmiş lisanslar dışında, QIAGEN bu Kit ve/veya kullanımının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceği konusunda herhangi bir garanti vermez.
3. Bu Kit ve bileşenleri sadece tek kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, tekrar işleminden geçirilemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN spesifik olarak açık olarak belirtilen dışında ister açık ister zımni olsun her türlü başka lisansı reddeder.
5. Kitin satın alanı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan işlemlerden herhangi birine yol açabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı ve başkasının da atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir Mahkemede yürürlüğe sokabilir ve Avukat ücretleri dışında tüm araştırma ve mahkeme masraflarını bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini veya Kit ve/veya bileşenleriyle ilgili herhangi bir fikri mülkiyet haklarını yürürlüğe sokmak için yapılan bir davada geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bakınız www.qiagen.com.

HB-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

