

Príručka k *ipsogen*[®] BCR-ABL1 mbcr Kit



Verzia 1

IVD

Kvantitatívna in vitro diagnostika

Určená na použitie s nástrojmi Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®],
LightCycler[®] a SmartCycler[®]



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R2

MAT

1072506SK



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

QIAGEN stanovuje normy v:

- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a testov

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com.

Obsah

Účel použitia	4
Súhrn a vysvetlenie	4
Princíp postupu	5
Dodávané materiály	7
Obsah súpravy	7
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú	8
Varovania a preventívne opatrenia	9
Všeobecné bezpečnostné opatrenia	9
Skladovanie a manipulácia s reagensiami	10
Postup	11
Príprava vzorky RNA	11
Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC	11
Protokol: qPCR na prístrojoch Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor-Gene Q 5plex HRM so 72-skúmavkovým rotorom	14
Protokol: qPCR na prístroji ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a prístroji LightCycler 480	18
Protokol: qPCR na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0	23
Protokol: qPCR na prístroji SmartCycler	27
Interpretácia výsledkov	30
Princíp analýzy údajov	30
Výsledky	31
Sprievodca riešením problémov	33
Kontrola kvality	36
Obmedzenia	37
Charakteristiky účinnosti	37
Neklinické štúdie	37
Klinické štúdie	40
Referenčná literatúra	42
Symboly	44
Kontaktné informácie	44
Informácie o objednávaní	45

Účel použitia

Súprava *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit je určená na kvantifikáciu transkriptov BCR-ABL p190 vo vzorkách kostnej drene alebo periférnej krvi pacientov s Ph-pozitívnou akútnou lymfoblastickou leukémiou (acute lymphoblastic leukemia, ALL), ktorým bola diagnostikovaná udalosť fúzie génov (fusion gene, FG) BCR-ABL mbc. Získané výsledky sú určené na sledovanie účinnosti liečby u pacientov podstupujúcich terapiu a sledovanie následkov minimálneho reziduálneho ochorenia (minimal residual disease, MRD) na sledovanie relapsu ochorenia.

Súhrn a vysvetlenie

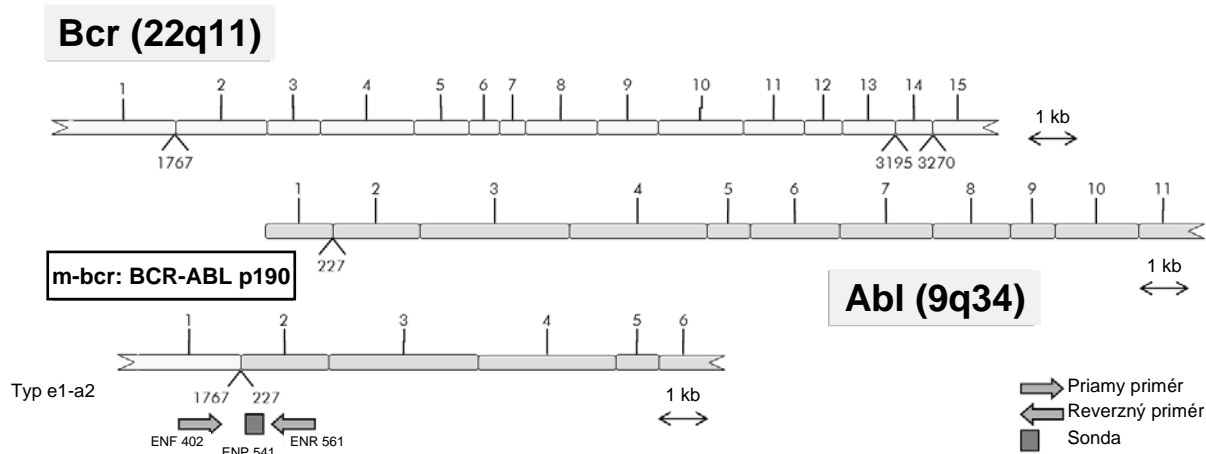
Chromozóm Philadelphia (Ph) je najčastejšou karyotypovou aberáciou u dospelých s ALL. Vyskytuje sa u 20 – 30 % dospelých pacientov z celkového množstva s ALL, pričom incidencia stúpa na viac ako 50 % u pacientov vo veku 50 rokov alebo starších.

V tejto translokácii je 3' segment ABL protoonkogénu na chromozóme 9 vedľa seba s 5' segmentom génu BCR na chromozóme 22. BCR-ABL FG je produkt chromozómu Ph a je konštitutívne aktívnym proteínom tyrozínkinázy.

K zlomeniu génu ABL zvyčajne dochádza v prvom intróne. Zlomenia v géne BCR sa všeobecne vyskytujú v jednej z nasledujúcich 3 oblastí: 5,8 kb oblasť pokrývajúca exóny 12 – 16, nazývaná hlavné zlomové miesto génu (major breakpoint cluster region, Mbc), 55 kb sekvencia prvého intrónu, ktorá sa nazýva malé zlomové miesto génu (minor breakpoint cluster region, mbc) a mikro zlomové miesto génu (micro breakpoint cluster region, μ -bc).

Zlomové hodnoty vyskytujúce sa v mbc spájajú exón 1 (e1) s druhým exónom génu ABL (a2), čo vedie k menšiemu fúznemu transkriptu e1a2, ktorý kóduje chimérický proteín 190 kDa (p190) (Obrázok 1). Proteín p190 BCR-ABL sa pozoruje iba u Ph+ ALL, zatiaľ čo p210 BCR-ABL proteín je bežný u 20 – 40 % pacientov s Ph+ ALL a takmer u všetkých pacientov s Ph+ chronickou myeloidnou leukémiou (chronic myelogenous leukemia, CML).

Všetky formy fúzných proteínov BCR-ABL vykazujú zvýšenú a deregulovanú aktivitu tyrozínkinázy a ukázalo sa, že forma p190 má väčší transformačný potenciál ako p210. Okrem toho sa zdá, že tento chimérický proteín dereguluje normálne dráhy signálnej transdukcie závislé od cytokínov, čo vedie k inhibícii rastu nezávislého od apoptózy alebo rastového faktora.



Obrázok 1. Schematický diagram transkriptu FG BCR-ABL mbcr pokrytého primérmí qPCR a súpravou sond: ENF402–ENP541–ENR561. Číslo pod primérmí a sondami odkazuje na ich nukleotidovú polohu v normálnej transkripcii génov.

Liečba pacientov s Ph⁺ ALL bola optimalizovaná zavedením inhibítorov tyrozínkinázy, čím sa významne zlepšilo prežitie týchto pacientov (prehľad je uvedený v referencii 1). U týchto pacientov je potrebné sledovanie MRD. Súčasná metodika na meranie hladiny MRD zahŕňa použitie kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) v reálnom čase, pričom počty transkriptov BCR-ABL súvisia s počtami transkriptov kontrolného génu. Na tejto technike je založená súprava *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit.

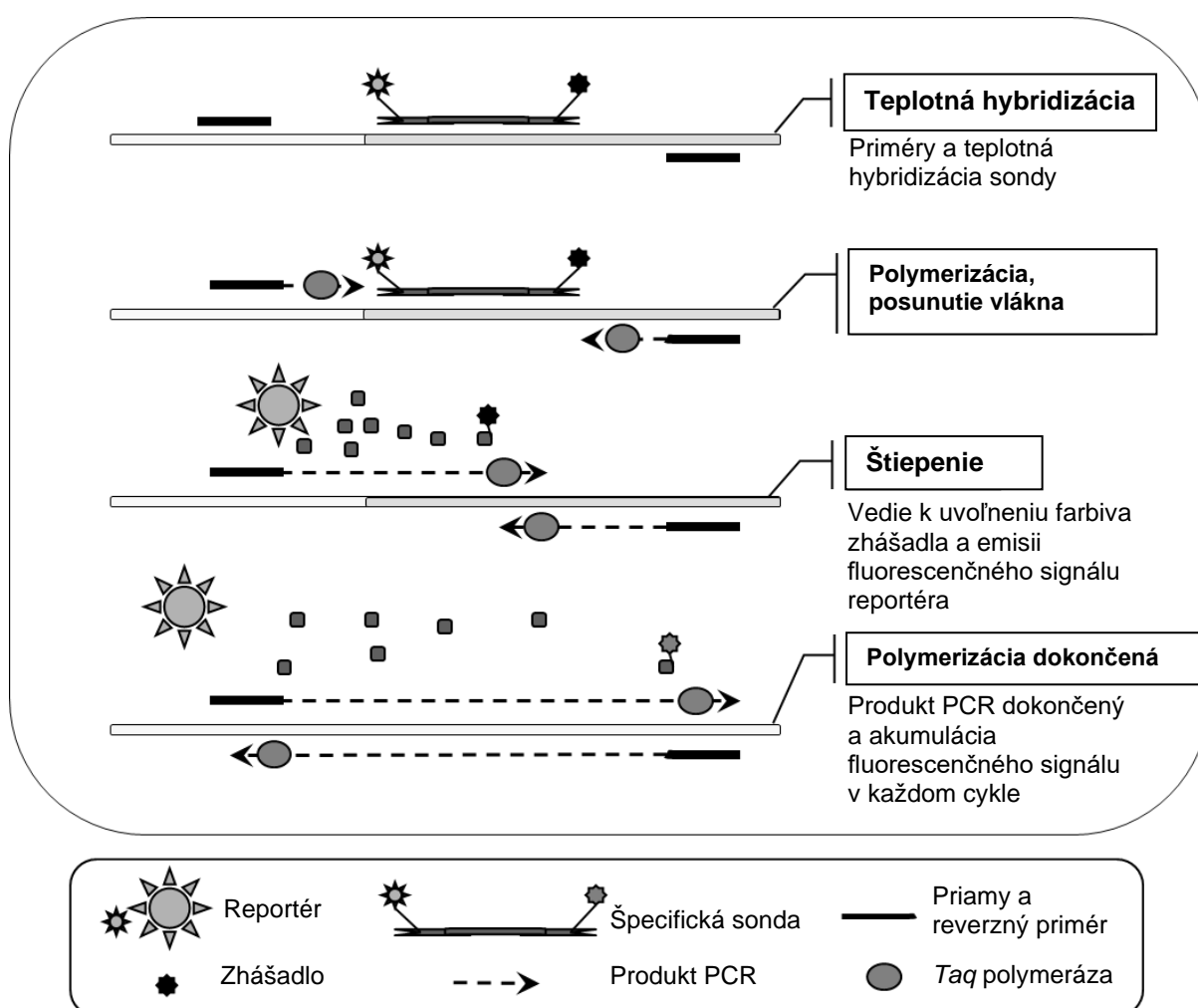
Princíp postupu

qPCR umožňuje presnú kvantifikáciu produktov PCR počas exponenciálnej fázy procesu amplifikácie PCR. Údaje kvantitatívnej PCR je možné rýchlo získať bez spracovania po PCR, a to detekciou fluorescenčných signálov v reálnom čase počas cyklovania PCR a/alebo po ňom, čím sa významne znižuje riziko kontaminácie produktu PCR. V súčasnosti sú k dispozícii 3 hlavné typy techník qPCR: analýza qPCR pomocou zeleného farbiva SYBR[®] Green I Dye, analýza qPCR pomocou hydrolyzačných sond a analýza qPCR pomocou hybridizačných sond.

Tento test využíva princíp hydrolýzy oligonukleotidu dvojitého farbiva qPCR. Počas PCR priame a reverzné priméry hybridizujú do špecifickej sekvencie. V rovnakej zmesi je obsiahnutý oligonukleotid dvojitého farbiva. Táto sonda, ktorá sa skladá z oligonukleotidu označeného farbivom 5' reportéra a za daným miestom farbivom 3' zhášadla, hybridizuje do cieľovej sekvencie v rámci produktu PCR. Analýza qPCR s hydrolyzačnými sondami využíva aktivitu exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Keď je sonda nedotknutá, blízkosť farbiva reportéra pri farbive zhášadla spôsobuje potlačenie fluorescencie reportéra primárne prevodom energie Försterovho typu.

Ak je počas PCR prítomný cieľ záujmu, sonda špecificky hybridizuje medzi miestami priamych a reverzných primérov. Aktivita exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA štiepi sondu medzi reportéra a zhášadlo iba v prípade, keď sonda hybridizuje na cieľ. Fragmenty sondy sú potom z cieľa vytlačené a polymerizácia vlákna pokračuje. Koniec sondy 3' je blokovaný, aby sa zabránilo extenzii sondy počas PCR (Obrázok 2). Tento proces nastane v každom cykle a nebude narušený exponenciálnou akumuláciou produktu.

Zvýšenie fluorescenčného signálu je detegované iba v prípade, že cieľová sekvencia bude komplementárna so sondou, a tým bude počas PCR amplifikovaná. Preto je zvýšenie fluorescence priamo úmerné cieľovej amplifikácii počas PCR.



Obrázok 2. Princíp reakcie. Celková RNA sa reverzne transkribuje a generovaná cDNA sa amplifikuje pomocou PCR s využitím páru špecifických primérov a špecifickej internej sondy s dvojitým farbivom (FAMTM–TAMRATM). Sonda sa viaže na amplikón počas každého korku hybridizácie PCR. Keď sa Taq DNA rozšíri z primérovej väzby k amplikónu, vytlačí 5' koniec sondy, ktorý sa potom degraduje aktivitou exonukleázy 5'→3' polymerázy Taq DNA. Štiepenie pokračuje, pokiaľ zostávajúca sonda amplikón neroztaví. Tento proces uvoľňuje do roztoku fluórofor a zhášadlo, priestorovo ich oddeľuje a vedie k zvýšeniu fluorescence spôsobenej FAM a poklesom fluorescence pochádzajúcej z TAMRA.

Dodávané materiály

Obsah súpravy

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Katalógové číslo		670023
Počet reakcií		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie kontrolného génu ABL) (10^3 kópií/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie kontrolného génu ABL) (10^4 kópií/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie kontrolného génu ABL) (10^5 kópií/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu BCR-ABL mbc) (10^1 kópií/5 μ l)	F1-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu BCR-ABL mbc) (10^2 kópií/5 μ l)	F2-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu BCR-ABL mbc) (10^3 kópií/5 μ l)	F3-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu BCR-ABL mbc) (10^5 kópií/5 μ l)	F4-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Štandardné riedenie fúzneho génu BCR-ABL mbc) (10^6 kópií/5 μ l)	F5-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL (ABL zmes primérov a sond)*	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene (Zmes primérov a sond fúzneho génu BCR-ABL mbc)†	PPF-mbc 25x	110 μ l
<i>Príručka k ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit</i> (angličtina)		1

* Zmes špecifických reverzných a priamych primérov pre kontrolný gén ABL plus špecifická sonda FAM–TAMRA.

† Zmes špecifických reverzných a priamych primérov pre fúzny gén BCR-ABL mbc plus špecifická sonda FAM–TAMRA.

Poznámka: Pred použitím krátko odstredíte štandardné riedenia a zmesi primérov a sond.

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Reagencie

- Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy
- Reagencie pre reverznú transkripciu: Validovanou reagenciou je Superscript® II (alebo Superscript) Reverse Transcriptase, obsahuje 5x pufer prvého vlákna, 100 mM DTT (Life Technologies, č. kat. 18064-022)
- Inhibítor RNázy: Validovanou reagenciou je RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. č. 10777-019)
- Súbor dNTP, stupeň PCR
- Náhodný hexamér
- MgCl₂
- Polymeráza pufru a Taq DNA: Validované reagencie sú TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. č. 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. č. 04535286001)

Spotrebný materiál

- Sterilné špičky PCR pipiet bez obsahu nukleáz odolné voči aerosólom s hydrofóbnymi filtrami
- 0,5 ml alebo 0,2 ml PCR skúmavky neobsahujúce RNázu a DNázu
- Ľad

Zariadenie

- Mikrolitrová pipeta* určená na PCR (1 – 10 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl)
- Stolná odstredivka* s rotorom pre reakčné skúmavky s objemom 0,2 ml/0,5 ml (schopná dosiahnuť 10 000 ot/min)
- Prístroj na real-time PCR:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo iný prístroj Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0, alebo 480; ABI PRISM 7000, 7700 alebo 7900HT SDS; alebo prístroj SmartCycler a súvisiaci špecifický materiál
- Tepelný cyklovač* alebo vodný kúpeľ* (krok reverznej transkripcie)

* Overte, či boli prístroje skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

Doplnkové reagensie

- Súprava *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit (kat. č. 670091) obsahujúca bunkové línie s negatívnou, vysokou a nízkou pozitívnou expresiou fúzneho génu BCR-ABL mbc na kvalitatívne overenie extrakcie RNA reverznej transkripcie

Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in vitro

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazíť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

Všeobecné bezpečnostné opatrenia

Testy qPCR vyžadujú správne laboratórne postupy vrátane údržby zariadení, ktoré sú určené pre molekulárnu biológiu a sú v súlade s platnými predpismi a príslušnými normami.

Táto súprava je určená na diagnostické použitie in vitro. Reagensie a pokyny dodávané v tejto súprave boli validované pre optimálny výkon. Ďalšie riadenie reagensí alebo zmena inkubačných časov a teplôt môže viesť k chybným alebo nezhodným údajom. Ak sú reagensie PPC a PPF vystavené svetlu, môžu sa zmeniť. Všetky reagensie sú pripravené na špecifické použitie s týmto testom. Pre optimálny výkon testu by sa nemali robiť žiadne substitúcie.

Určovanie úrovne transkriptov pomocou qPCR si vyžaduje reverznú transkripciu mRNA a amplifikáciu cDNA vytvorenej pomocou PCR. Preto musí byť celý postup testu vykonaný v podmienkach bez RNázy/DNázy.

Buďte mimoriadne opatrní, aby ste zabránili:

- kontaminácii RNázy/DNázy, ktorá by mohla spôsobiť degradáciu templátovej mRNA a vytvorenej cDNA
- kontaminácii prenosom mRNA alebo PCR, ktorá by mohla viesť k falošne pozitívnemu signálu

Preto odporúčame nasledujúce.

- Pri vykonávaní testu používajte laboratórne vybavenie neobsahujúce nukleázy (napr. pipety, hroty pipiet, reakčné fl'aštičky) a noste rukavice.
- Na všetky pipetovacie kroky používajte čerstvé pipetové hroty odolné voči aerosólom, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii vzoriek a reagensí.

- Pripravte predbežnú zmes PCR master s príslušným materiálom (pipety, hroty atď.) v príslušnej oblasti, kde nie sú zavedené žiadne matrice DNA (cDNA, DNA, plazmid). Šablónu pridajte do samostatnej zóny (najlepšie v samostatnej miestnosti) so špecifickým materiálom (pipety, hroty, atď.).
- So štandardnými riedeniami (C1–3 a F1–5) manipulujte v samostatnej miestnosti.

Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Súpravy sa dodávajú na suchom ľade a po prijatí sa musia skladovať pri teplote -30°C až -15°C .

- Minimalizujte vystavenie zmesí primérov a sondy (skúmavky PPC a PPF) svetlu.
- Pred otvorením skúmavky jemne premiešajte a odstredíte.
- Všetky komponenty súpravy skladujte v pôvodných obaloch.

Tieto podmienky skladovania platia pre otvorené aj neotvorené komponenty. Komponenty skladované za iných podmienok, ako je uvedené na štítkoch, nemusia správne fungovať a môžu nepriaznivo ovplyvniť výsledky testu.

Dátum expirácie pre každú reagenciu je uvedený na štítkoch jednotlivých komponentov. Za správnych skladovacích podmienok si produkt zachová svoju výkonnosť až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku.

Neexistujú žiadne zjavné znaky naznačujúce nestabilitu tohto produktu. Pozitívne a negatívne kontroly by sa však mali vykonávať súčasne s neznámymi skúšobnými vzorkami.

Postup

Príprava vzorky RNA

Príprava RNA zo vzoriek od pacientov (krv alebo kostná dreň) musí byť vykonaná overeným postupom. Kvalita testu veľmi závisí od kvality vstupnej RNA. Preto odporúčame vymedziť RNA elektroforeticky purifikovanú agarózový* gélom alebo použitím Agilent® Bioanalyzer® pred analýzou.

Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC

Postup, ktorý sa má vykonať pred začatím

- Pripravte dNTP, 10 mM každý. Skladujte pri teplote –20 °C v alikvótach.

Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Inkubujte 1 µg RNA (1 – 4 µl) 10 minút pri teplote 70 °C a okamžite ich ochladte na ľade v priebehu 5 minút.
3. Krátko odstred'ujte (približne 10 sekúnd pri otáčkach 10 000 ot./min., aby sa zozbierala kvapalina v spodnej časti skúmavky). Potom držte na ľade.
4. Pripravte nasledujúcu zmes RT podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované (Tabuľka 1).

* Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare.

Tabuľka 1. Príprava zmesi RT

Komponent	Objem na vzorku (µl)	Konečná koncentrácia
Pufer prvého vlákna (dodávaný s produktom Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM každý, musia byť vopred pripravené a skladované pri teplote -20 °C v alikvótach)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, dodávané s produktom Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
Inhibítor RNázy (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Náhodný hexamér (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II alebo Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Zahrievaná vzorka RNA (pridá sa v kroku 5)	1,0 – 4,0	50 ng/µl
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy (pridá sa v kroku 5)	0,0 – 3,0	–
Konečný objem	20,0	–

5. Napipetujte 16 µl zmesi RT do každej skúmavky PCR. Potom pridajte 1 – 4 µl (1 µg) RNA (z kroku 3) a nastavte objem na 20 µl s vodou PCR stupňa bez obsahu nukleázy (pozri Tabuľku 2).

Tabuľka 2. Príprava reakcie reverznej transkripcie

Komponent	Objem (µl)
Zmes RT	16
Zahrievaná vzorka RNA (1 µg)	1 – 4
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	0 – 3
Konečný objem	20

6. Dobre premiešajte a krátko odstred'ujte (približne 10 sekúnd pri 10 000 ot./min., aby sa zozbierala kvapalina v spodnej časti skúmavky).
7. Inkubujte pri teplote 20 °C po dobu 10 minút.
8. Inkubujte pri teplote 42 °C na tepelnom cyklovači 45 minút, potom okamžite 3 minúty pri teplote 99 °C.
9. 5 minút ochladzujte na ľade (aby sa zastavila reakcia).
10. Krátko odstred'ujte (približne 10 sekúnd 10 000 ot./min., aby sa zozbierala kvapalina v spodnej časti skúmavky). Potom držte na ľade.
11. Konečnú cDNA rozried'te 30 µl vody PCR stupňa bez obsahu nukleázy, aby bol konečný objem 50 µl.
12. Vykonajte PCR podľa nasledujúcich protokolov v súlade s vaším prístrojom na qPCR.

Protokol: qPCR na prístrojoch Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor-Gene Q 5plex HRM so 72-skúmavkovým rotorom

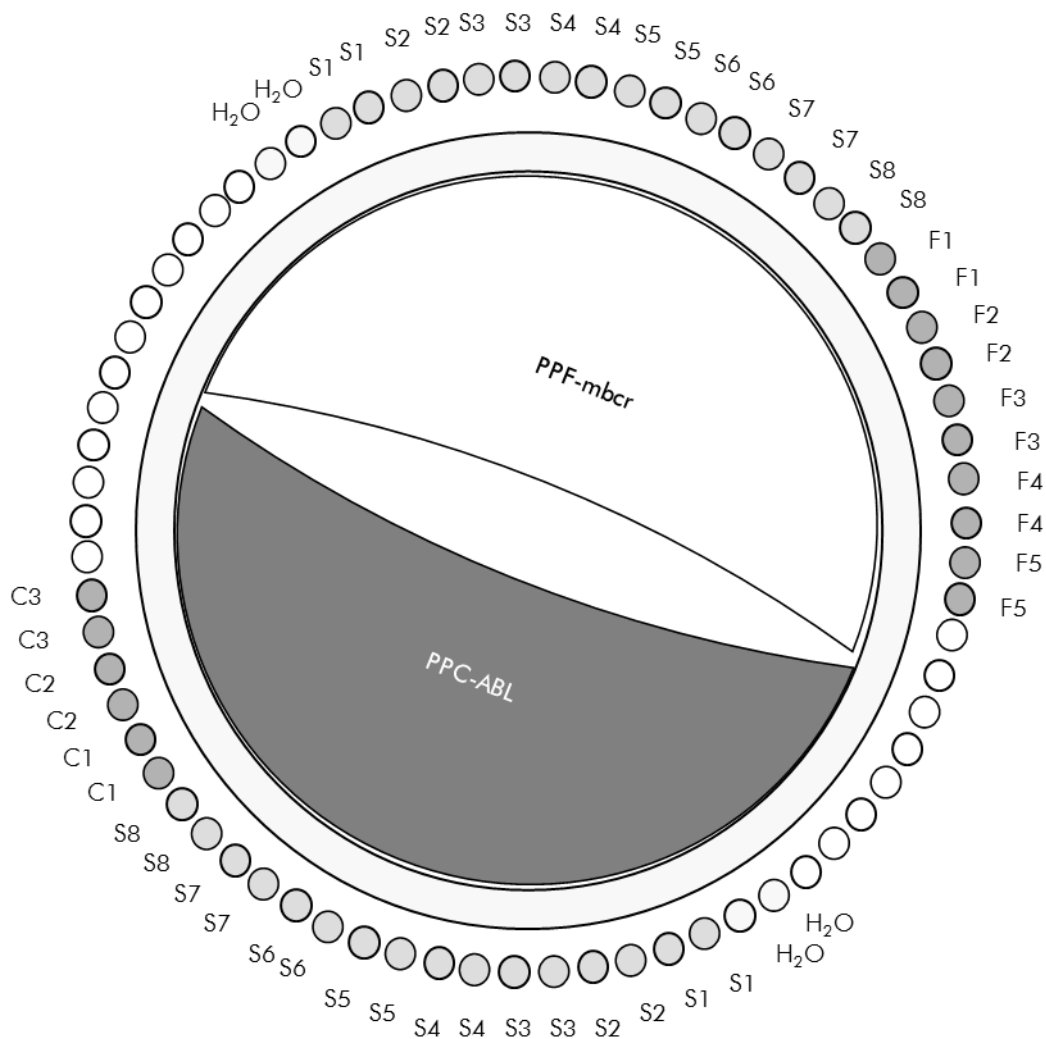
Pri použití tohto prístroja sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 3.

Tabuľka 3. Počet reakcií pre prístroje Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

Vzorky	Reakcie
S primérmí ABL a zmesou sond (PPC-ABL)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	2 x 3 reakcie (3 zriedenia, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie
S primérmí BCR-ABL mbcr a zmesou sond (PPF-mbcr)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard mbcr	2 x 5 reakcií (5 zriedení, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie

Spracovanie vzoriek prístrojmi Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 8 vzoriek cDNA s cieľom optimalizovať používanie štandardov a primérov a zmesí sond.



Obrázok 3. Navrhované nastavenie rotora pre každý experiment s *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. F1–5: Štandardy BCR-ABL mbcr; C1–3: ABL štandardy; S: vzorka cDNA; H₂O: kontrola vody.

Poznámka: Vzorku, ktorá sa má testovať, vždy umiestnite do polohy 1 rotora. Inak počas kalibračného kroku prístroj nevykoná kalibráciu a získajú sa nesprávne údaje o fluorescencii.

Vypĺňte všetky ostatné polohy prázdnyimi skúmavkami.

qPCR na prístroje Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 4 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi priméra a sond (PPC-ABL alebo PPF-mbcr). Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Tabuľka 4. Príprava zmesi qPCR

Komponent	1 reakcia (µl)	ABL: 24+1 reakcií (µl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 reakcií (µl)	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Priméry a zmes sond, 25x	1	25	29	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na skúmavku.
4. Pridajte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného z reverznej transkripcie (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 11) do príslušnej skúmavky (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Skúmavku umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
7. Naprogramujte prístroj Rotor-Gene Q a program tepelného cyklovača, ako je uvedené v Tabuľke 5.

Tabuľka 5. Teplotný profil

Mode of analysis (Režim analýzy)	Kvantifikácia
Hold (Výdrž)	Teplota: 50 stup. Čas: 2 min.
Hold 2 (Výdrž 2)	Teplota: 95 stup. Čas: 10 min.
Cycling (Cyklovanie)	50-krát 95 stup. na 15 sek. 60 stup. na 1 min. so získaním fluorescencie FAM v kanáli Green: Jednotlivý

8. V prípade prístrojov Rotor-Gene Q zvolte na analýzu možnosť „Slope Correct“ (Sklon správny). Odporúčame nastaviť prah na hodnotu 0,03. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 5.

Protokol: qPCR na prístrojoch ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a prístroji LightCycler 480

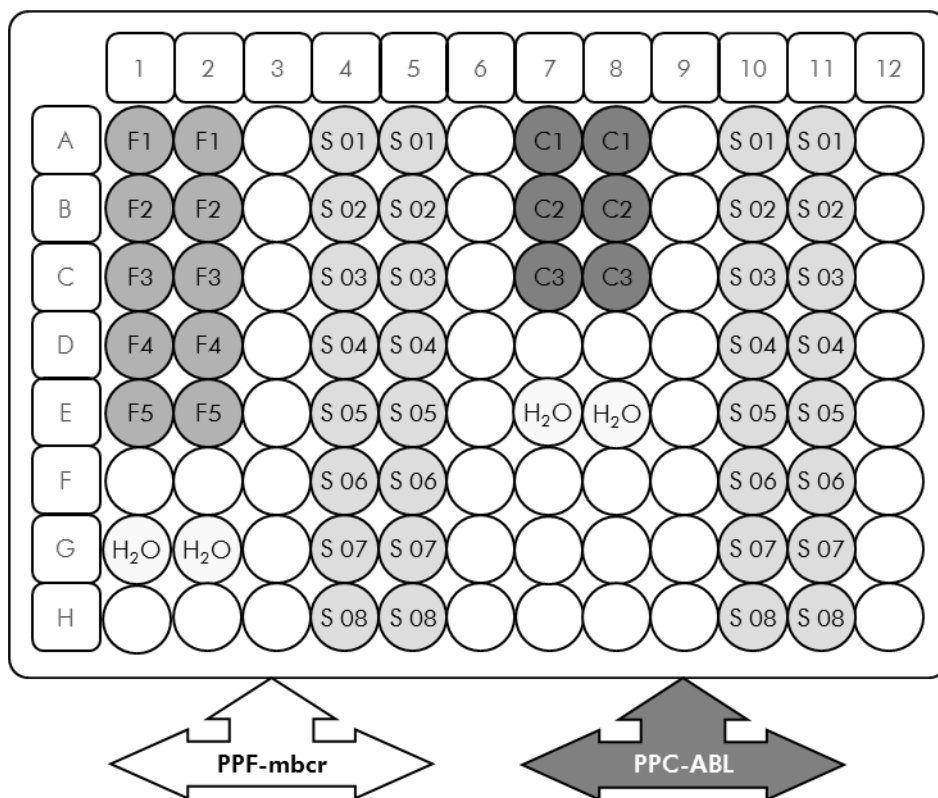
Pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 6.

Tabuľka 6. Počet reakcií pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami

Vzorky	Reakcie
S primérmí ABL a zmesou sond (PPC-ABL)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	2 x 3 reakcie (3 zriedenia, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie
S primérmí BCR-ABL mbcr a zmesou sond (PPF-mbcr)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard mbcr	2 x 5 reakcií (5 zriedení, každé testované dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie

Spracovanie vzoriek na prístrojoch ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS a na prístroji LightCycler 480

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 8 vzoriek cDNA s cieľom optimalizovať používanie štandardov a primérov a zmesí sond. Schéma doštičiek na obrázku 4 znázorňuje príklad takéhoto experimentu.



Obrázok 4. Navrhované nastavenie doštičiek pre jeden experiment. S: vzorka cDNA; F1–5: Štandardy BCR-ABL mbcr; C1–3: Štandardy ABL; H₂O: kontrola vody.

qPCR na prístroji ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS a prístroji LightCycler 480

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované. Pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 7 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi priméra a sond (PPC-ABL alebo PPF-mbcr). Zahnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Tabuľka 7. Príprava zmesi qPCR

Komponent	1 reakcia (μl)	ABL: 24+1 reakcií (μl)	BCR-ABL mbc: 28+1 reakcií (μl)	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Priméry a zmes sond, 25x	1	25	29	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 μ l predbežnej zmesi qPCR na jednu jamku.
4. Pridajte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v reverznej transkripcii (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 11) v príslušnej jamke (celkový objem 25 μ l).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Zatvorte doštičku a krátko odstred'ujte (300 x g, približne 10 sekúnd).
7. Doštičku umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu. Naprogramujte tepelný cyklovač a program tepelného cyklovača, ako je uvedené v Tabuľke 8 pre prístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS alebo v Tabuľke 9 pre nástroj LightCycler 480.

Tabuľka 8. Teplotný profil pre ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS

Mode of analysis (Režim analýzy)	Štandardná krivka – absolútna kvantifikácia
Hold (Výdrž)	Teplota: 50 °C Čas: 2 min.
Hold 2 (Výdrž 2)	Teplota: 95 °C Čas: 10 min.
Cycling (Cyklovanie)	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 60 °C 1 minútu so získaním fluorescencie FAM; zhášadlo: TAMRA

Tabuľka 9. Teplotný profil pre prístroj LightCycler 480

Mode of analysis (Režim analýzy)	Absolútna kvantifikácia („Abs Quant“)
Detection formats (Formáty detekcie)	V okne Formáty detekcie vyberte možnosť „Simple Probe“ (Jednoduchá sonda)
Hold (Výdrž)	Teplota: 50 °C Čas: 2 min.
Hold 2 (Výdrž 2)	Teplota: 95 °C Čas: 10 min.
Cycling (Cyklovanie)	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 60 °C 1 minútu so získaním fluorescencie FAM, čo zodpovedá (483–533 nm) pri LC verzii 01 a (465–510 nm) pri LC verzii 02

8. V prípade nástrojov ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS postupujte podľa kroku 8a. V prípade prístroja LightCycler 480 postupujte podľa kroku 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS: Odporúčame nastaviť prah na hodnotu 0,1, ako je opísané v protokole EAC v kroku analýzy o ABI PRISM SDS a základné hodnoty nastaviť medzi cyklami 3 a 15. Spustíte program cyklovania podľa údajov v Tabuľke 8.

8b. Prístroj LightCycler 480: Odporúčame režim analýzy Fit point s pozadím nastaveným na hodnotu 2.0 a prahovou hodnotou 2.0. Program teplotného cyklovania spustite podľa Tabuľky 9.

Protokol: qPCR na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0

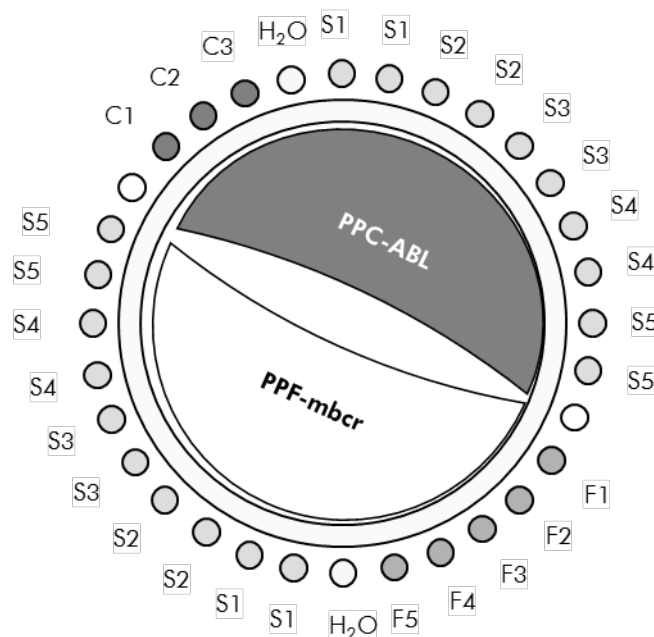
Odporúčame merať vzorky dvakrát pomocou kapilárnych prístrojov a kontrolovať ich len raz, ako je uvedené v Tabuľke 10.

Tabuľka 10. Počet reakcií pre prístroje LightCycler 1.2 a 2.0

Vzorky	Reakcie
S primérmí ABL a zmesou sond (PPC-ABL)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	1 x 3 reakcie (3 štandardné zriedenia, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia
S primérmí BCR-ABL mbcr a zmesou sond (PPF-mbcr)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard mbcr	1 x 5 reakcií (5 štandardných zriedení, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia

Spracovanie vzoriek na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 5 vzoriek cDNA na optimalizovanie používania štandardov a primérov a zmesí sond. Kapilárna schéma na obrázku 5 znázorňuje príklad experimentu.



Obrázok 5. Navrhované nastavenie rotora pre každý experiment s *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. F1–5: Štandardy BCR-ABL mbcr; C1–3: Štandardy ABL; S: neznáma vzorka DNA určená na analýzu; H₂O: kontrola vody.

qPCR na prístrojoch LightCycler 1.2 a 2.0

Poznámka: Pre osobitné technologické požiadavky sa musia experimenty na nástroji LightCycler vykonávať s použitím špecifických reagensí. Odporúčame použiť LightCycler TaqMan Master a pri príprave Master Mix 5x postupujte podľa odporúčaní výrobcu.

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 11 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 20 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primérov a sond (PPC-ABL alebo PPF-mbcr). Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Tabuľka 11. Príprava zmesi qPCR

Komponent	1 reakcia (μl)	ABL: 14+1 reakcií (μl)	BCR-ABL mbc: 16+1 reakcií (μl)	Konečná koncentrácia
Čerstvo pripravená hlavná zmes LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60	68,0	1x
Priméry a zmes sond, 25x	0,8	12	13,6	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	10,2	153	173,4	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	5,0 každá	–
Celkový objem	20,0	20 každá	20,0 každá	–

3. **Dispenzujte 15 μ l predbežnej zmesi qPCR na kapiláru.**
4. **Pridajte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného z reverznej transkripcie (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 11) do príslušnej skúmavky (celkový objem 20 μ l).**
5. **Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.**
6. **Vložte kapiláry do adaptérov dodaných s prístrojom a krátko odstredte (700 x g, približne 10 sekúnd).**
7. **Vložte kapiláry do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.**
8. **Naprogramujte prístroj LightCycler 1.2 alebo 2.0 a program tepelného cyklovača podľa Tabuľky 12.**

Tabuľka 12. Teplotný profil

Mode of analysis (Režim analýzy)	Kvantifikácia
Hold (Výdrž)	Teplota: 95 °C Čas: 10 min. Sklon: 20
Cycling (Cyklovanie)	50-krát 95 °C na 10 sekúnd; sklon: 20 60 °C 1 minútu; sklon: 20; so získaním fluorescencie FAM: Jednotlivý
Hold 2 (Výdrž 2)	45°C 1 minútu; sklon: 20

9. V prípade LightCycler 1.2 pokračujte krokom 9a. V prípade LightCycler 2.0 pokračujte krokom 9b.
- 9a. LightCycler 1.2: Odporúča sa F1/F2 a režim „2nd derivative analysis“ (analýza založená na 2. derivácii). Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 12.
- 9b. LightCycler 2.0: Odporúčame použiť Automatizovanú (F''max) analýzu na nástroji LightCycler 2.0 s verziou softvéru 4.0 na získanie reprodukovateľných výsledkov. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 12.

Protokol: qPCR na prístroji SmartCycler

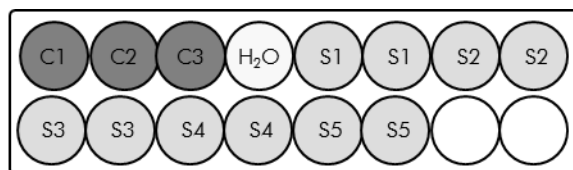
Odporúčame merať vzorky pomocou tohto prístroja dvakrát a kontrolovať ich len raz, ako je uvedené v Tabuľke 13.

Tabuľka 13. Počet reakcií pre prístroj SmartCycler

Vzorky	Reakcie
S primérmí ABL a zmesou sond (PPC-ABL)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
ABL štandard	1 x 3 reakcie (3 štandardné zriedenia, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia
S primérmí BCR-ABL mbcr a zmesou sond (PPF-mbcr)	
n vzoriek cDNA	n x 2 reakcie
Štandard mbcr	1 x 5 reakcií (5 štandardných zriedení, každé testované raz)
Kontrola vody	1 reakcia

Spracovanie vzoriek na prístroji SmartCycler

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať najmenej 5 vzoriek cDNA na optimalizovanie používania štandardov a primérov a zmesí sond. Dvojbloková schéma na obrázku 6 znázorňuje príklad.



Všetky testy v tomto prvom bloku sú vykonané s PPC-ABL



Všetky testy v tomto druhom bloku sú vykonané s PPF-mbcr.

Obrázok 6. Navrhované nastavenie doštičiek pre jeden experiment. S: vzorka cDNA; F1–5: Štandardy BCR-ABL mbcr; C1–3: Štandardy ABL; H₂O: kontrola vody.

qPCR na prístroji SmartCycler

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 14 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi priméra a sond (PPC-ABL alebo PPF-mbcr). Zahnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Tabuľka 14. Príprava zmesi qPCR

Komponent	1 reakcia (µl)	ABL: 14+1 reakcií (µl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reakcií (µl)	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Priméry a zmes sond, 25x	1	15	17	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	97,5	110,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na jednu jamku.
4. Pridajte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného z reverznej transkripcie (pozri „Protokol: Odporúčaná štandardizovaná reverzná transkripcia EAC“, strana 11) do príslušnej skúmavky (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Vložte vzorky do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
7. Naprogramujte prístroj SmartCycler a program tepelného cyklovača ako je uvedené v Tabuľke 15.

Tabuľka 15. Teplotný profil

Hold (Výdrž)	Teplota: 50 °C Čas: 2 min.
Hold 2 (Výdrž 2)	Teplota: 95 °C Čas: 10 min.
Cycling (Cyklovanie)	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 60 °C 1 minútu so získaním: Jednotlivý

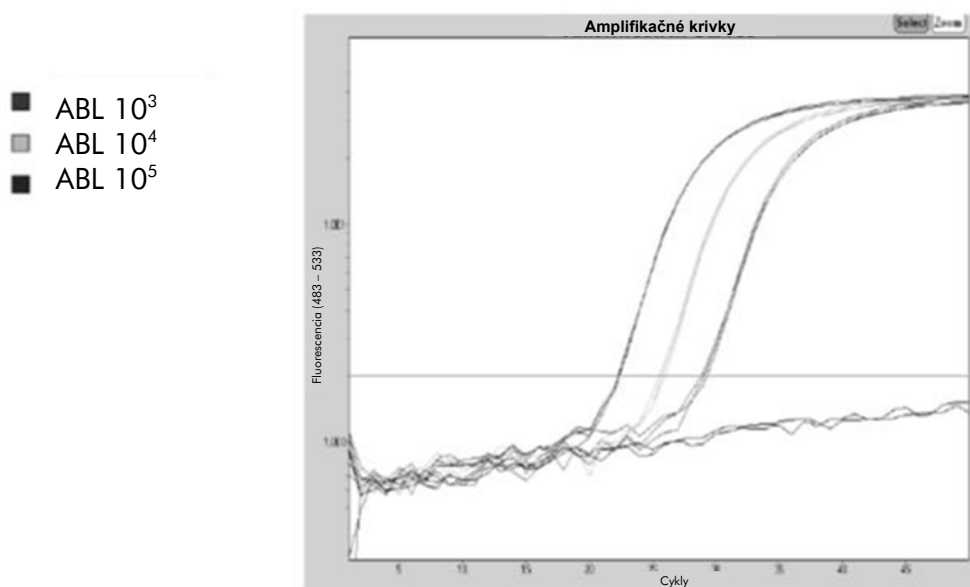
8. Odporúčame prah nastavený na hodnotu 30. Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 15.

Interpretácia výsledkov

Princíp analýzy údajov

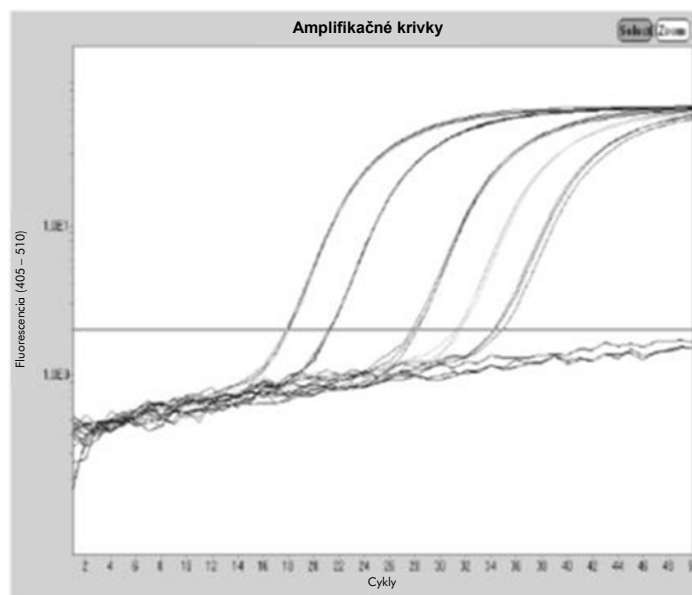
Pri použití technológie TaqMan sa počet cyklov PCR potrebných na detekciu signálu nad prahovou hodnotou nazýva prahový cyklus (C_T) a je priamo úmerný množstvu prítomnej cieľovej látky na začiatku reakcie.

Pomocou štandardov so známym počtom molekúl môžeme vytvoriť štandardnú krivku a určiť presné množstvo prítomnej cieľovej látky v testovanej vzorky. Štandardné krivky *ipsogen* sú založené na plazmidoch a používajú 3 plazmidové štandardné riedenia pre kontrolný gén CG a 5 štandardných riedení pre fúzny gén FG, aby boli zabezpečené presné štandardné krivky. Na Obrázkoch 7 a 8 je znázornený príklad amplifikačných kriviek TaqMan získaných pomocou súpravy *ipsogen* BCR-ABL mbcR Kit.



Obrázok 7. Detekcia štandardov ABL (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 a 10^5 kópií/5 μ l.

- m-bcr 10¹
- m-bcr 10²
- m-bcr 10³
- m-bcr 10⁵
- m-bcr 10⁶



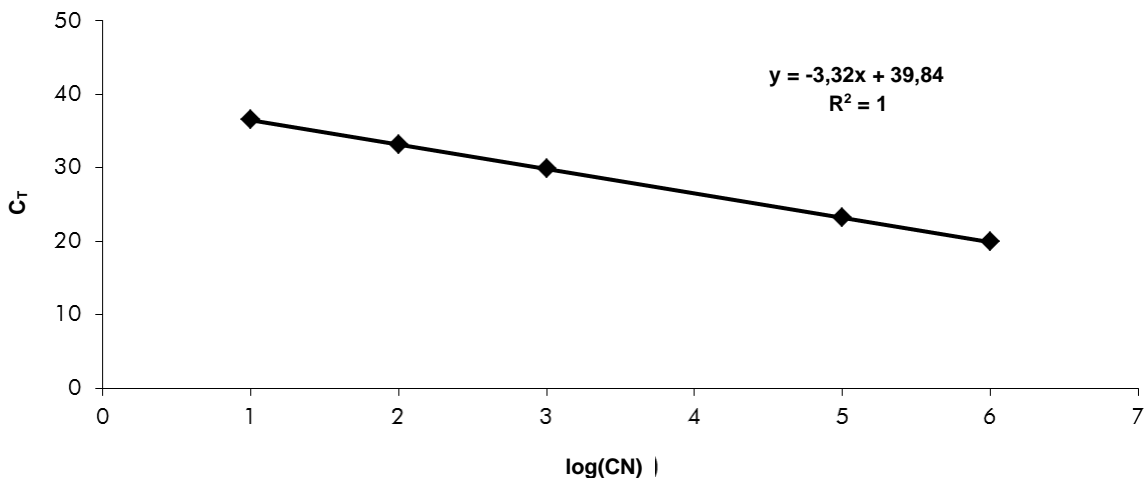
Obrázok 8. Detekcia štandardov BCR-ABL mbc (F1 – F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵, 10⁶ kópií/5 µl.

Výsledky

Štandardná krivka a kritériá kvality

Nespracované údaje možno vložiť do súboru Excel[®] na analýzu.

Pre každý gén (ABL a BCR-ABL) sa nespracované hodnoty C_T získané z rozriedenia plazmidových štandardov vyznačujú podľa logaritmu počtu kópií (3, 4 a 5 pre C1, C2 a C3; 1, 2, 3, 5 a 6 pre F1, F2, F3, F4 a F5). Obrázok 9 znázorňuje príklad teoretickej krivky vypočítanej z 5 štandardných zriedení.



Obrázok 9. Teoretická krivka vypočítaná z 5 štandardných zriedení. Krivka lineárnej regresie ($y = ax + b$) sa vypočíta pre každý gén (ABL a BCR-ABL), pri ktorom je a sklon priamky a b je priesečník s osou y , ktorá je súradnicou bodu y , v ktorom priamka pretína os y . Jej rovnica a koeficient stanovenia (R^2) sa vytlačia na grafe.

Keďže štandardy predstavujú desaťnásobné zriedenia, teoretický sklon krivky je -3.3 . Sklon od $-3,0$ do $-3,9$ je akceptovateľný, pokiaľ je $R^2 > 0,95$ (2). Pre presné výsledky je však žiadúca hodnota $R^2 > 0,98$ (3).

Normalizovaný počet kópií (Normalized copy number, NCN)

Na transformovanie nespracovaných hodnôt C_T (získaných pomocou PPC-ABL) pre neznáme vzorky na počet kópií ABL (ABL_{CN}) je potrebné použiť rovnicu štandardnej krivky ABL.

Na transformovanie nespracovaných hodnôt C_T (získaných pomocou PPF-mbcr) pre neznáme vzorky na počet kópií BCR-ABL ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$) je potrebné použiť rovnicu štandardnej krivky BCR-ABL.

Pomer týchto hodnôt vyjadrujúci počet kópií CN predstavuje normalizovaný počet kópií (Normalized Copy Number, NCN):

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

Hodnota MRD

Hodnota minimálneho zvyškového ochorenia (Minimal Residual Disease, MRD) predstavuje pomer medzi normalizovanou expresiou fúzneho génu z hľadiska kontrolného génu pri následnej kontrole $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ a v diagnostických vzorkách $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

Citlivosť

Citlivosť (SENS_v) sa vypočíta podľa relatívnej expresie fúzneho génu FG pri diagnóze (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} a expresie kontrolného génu CG (CG_{CN,FUP}) vo vzorke následnej kontroly.

$$\text{Citlivosť (SENS}_v\text{)} = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

Kontrola kvality z hodnôt ABL

Slabá kvalita RNA alebo problémy počas krokov qPCR vedú k nízkemu počtu ABL_{CN}. Odporúčame odmietnuť výsledky zo vzoriek s hodnotou ABL_{CN} < 1318 (nižšia hodnota 95 % CI zo vzoriek pacientov v štúdií EAC, referencia 4).

Reprodukovateľnosť medzi replikátmi

Variácia hodnôt C_T medzi replikátmi by mala byť < 2, čo zodpovedá štvornásobnej zmene hodnôt počtu kópií.

Variácia hodnôt C_T medzi replikátmi je vo všeobecnosti < 1,5, ak je stredná hodnota C_T replikátov < 36 (2).

Poznámka: Každý používateľ by si mal merať svoju vlastnú reprodukovateľnosť vo svojom laboratóriu.

Kontroly vody

Negatívne kontroly musia mať nulový počet kópií.

Pozitívna kontrola vody vyplýva z krížovej kontaminácie. Riešenie nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“ uvedenej ďalej.

Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete v časti „Kontaktné informácie“ na strane 44).

Komentáre a návrhy

Negatívny výsledok pre kontrolný gén (ABL) a BCR-ABL mbcv vo všetkých vzorkách – štandard je v poriadku

- a) Slabá kvalita RNA Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
Súbežne spustíte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (vysoko pozitívna kontrola v *ipsogen* BCR-ABL1 mbcv Controls Kit, kat. č. 670091).
- b) Zlyhanie kroku reverznej transkripcie Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
Súbežne spustíte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcv Controls Kit, kat. č. 670091).

Negatívny výsledok pre kontrolný gén (ABL) vo vzorkách – štandard je v poriadku

- a) Slabá kvalita RNA Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
Súbežne spustíte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcv Controls Kit, kat. č. 670091).
- b) Zlyhanie kroku reverznej transkripcie Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
Súbežne spustíte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcv Controls Kit, kat. č. 670091).

Štandardný signál negatívny

- a) Chyba pipetovania Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.
Zopakujte cyklus PCR.
- b) Nesprávne skladovanie komponentov súpravy Súpravu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcv Kit skladujte pri teplote od –15 do –30 °C a priméry a zmesi sond (PPC a PPF) uchovávajúte chránené pred svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“, strana 10.
Vyhnite sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.
Alikvotné reagensie na skladovanie.

Komentáre a návrhy

Negatívne kontroly sú pozitívne

- Križová kontaminácia Vymeňte všetky kritické reagensy.
Experiment opakujte s novými alikvótmami všetkých reagensov.
So vzorkami, komponentmi súpravy a spotrebným materiálom vždy zaobchádzajte v súlade so všeobecne uznávanými postupmi, aby ste zabránili kontaminácii pri prenose.

Žiadny signál, ani pri štandardných kontrolách

- a) Chyba pipetovania alebo vynechanie reagensov Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie.
Zopakujte cyklus PCR.
- b) Inhibičné účinky materiálu vzorky spôsobené nedostatočnou purifikáciou Zopakujte prípravu RNA.
- c) LightCycler: Bol zvolený nesprávny detekčný kanál Nastavte nastavenie kanálov na F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Nie je naprogramovaná žiadna akvizícia údajov Skontrolujte programy cyklov.
Vyberte režim akvizície „single“ (samostatná) na konci každého segmentu hybridizácie primérov programu PCR.

Chýbajúci alebo slabý signál vo vzorkách, ale štandardné kontroly sú v poriadku

- a) Nízka kvalita RNA alebo nízka koncentrácia Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Control Kit, kat. č. 670091).
- b) Zlyhanie kroku reverznej transkripcie Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentráciu RNA.
Súbežne spustte pozitívnu kontrolu bunkovej línie RNA (*ipsogen* BCR-ABL1 mbc Control Kit, kat. č. 670091).

Komentáre a návrhy

Intenzita fluorescence je príliš nízka

- a) Nesprávne skladovanie komponentov súpravy Súpravu *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Kit skladujte pri teplote od -15 do -30 °C a priméry a zmesi sond (PPC a PPF) uchovávajte chránené pred svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“, strana 10.
Vyhnite sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.
Alikvotné reagensie na skladovanie.
- b) Veľmi malé počiatkové množstvo cieľovej RNA Zvýšte množstvo vzoriek RNA.
Poznámka: V závislosti od zvolenej metódy prípravy RNA sa môžu vyskytnúť inhibičné účinky.

LightCycler: Intenzita fluorescence sa líši

- a) Chyba pipetovania Variabilitu spôsobenú tzv. „chybou pipetovania“ je možné znížiť analýzou údajov v režime F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.
- b) Nedostatočné odstredenie kapilár Pripravená zmes PCR môže byť ešte vždy v hornej nádobe kapiláry, alebo môže byť v kapilárnom hrote zachytená vzduchová bublina.
Kapiláry naplnené reakčnou zmesou vždy odstredte, ako je to opísané v osobitnom návode na obsluhu nástroja.
- c) Vonkajší povrch kapilárneho hrotu je znečistený Pri manipulácii s kapilármi vždy noste rukavice.

LightCycler: Chyba štandardnej krivky

- Chyba pipetovania Variabilitu spôsobenú tzv. „chybou pipetovania“ je možné znížiť analýzou údajov v režime F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.

Kontrola kvality

Kontrola kvality celej súpravy bola vykonaná na prístroji LightCycler 480. Táto súprava je vyrobená v súlade s normou ISO 13485:2003. Osvedčenia o analýze sú k dispozícii na požiadanie na stránke www.qiagen.com/support/.

Obmedzenia

Pred použitím tohto zariadenia musia byť používatelia zaškolení a oboznámení s touto technológiou.

Všetky získané diagnostické výsledky sa musia interpretovať v spojení s inými klinickými alebo laboratórnymi nálezmi. Používateľ je zodpovedný za overenie výkonu systému pre všetky postupy používané v jeho laboratóriu, na ktoré sa nevzťahujú štúdie výkonnosti QIAGEN.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Poznámka: Táto súprava bola navrhnutá v súlade so štúdiami (4), programu „Európa proti rakovine“ (Europe Against Cancer, EAC) a je v súlade s aktualizovanými medzinárodnými odporúčaniami (3, 5). Mala by používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s validovanými reagensiami a prístrojmi (pozrite si časť „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 8). Používanie tohto produktu spôsobom, ktorý nie je v súlade s príručkou, a/alebo modifikácia komponentov ruší zodpovednosť spoločnosti QIAGEN.

Charakteristiky účinnosti

Neklinické štúdie

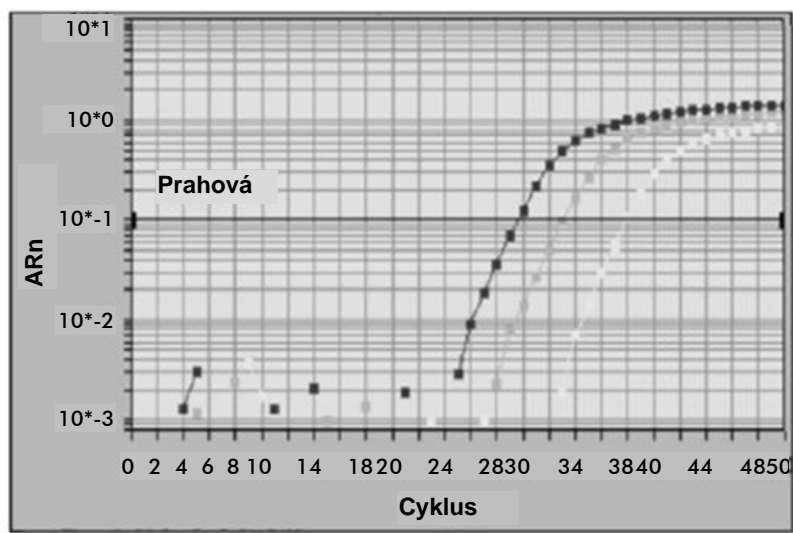
Materiály a metódy

Hodnotenie účinnosti bolo vykonané na prístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinácii s reagensiami uvedenými v časti „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 8. Štúdie rovnocennosti potvrdili jej použitie na nasledujúcich prístrojoch: ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, Rotor-Gene 3000 a na prístroji SmartCycler (6).

Vykonal sa neklinické štúdie s cieľom stanoviť analytickú výkonnosť súpravy *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. Tieto neklinické laboratórne štúdie boli vykonané na celej RNA z bunkovej línie TOM1 zriedenej v stálom konečnom množstve celkovej RNA bunkovej línie MV4-11.

Na určenie opakovateľnosti testu bolo analyzovaných 5 rôznych koncentrácií celkovej RNA línie TOM1 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg a 0,5 pg) zriedenej v celkovej RNA línie MV4-11 v stálom konečnom celkovom množstve 1000 ng v 5 replikátoch na cyklus a v 4 rôznych cykloch (Obrázok 10).

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



Obrázok 10. Amplifikácia vytvára krivku zriedení 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) a 5×10^{-5} (0,05 ng) celkovej RNA línie TOM1 v celkovej RNA negatívnej na líniu MV4-11.

Analytické údaje

V tabuľkách 16–19 sú uvedené vnútro laboratórne analýzy so stredným prahovým cyklom (C_T), štandardná odchýlka (Standard Deviation, SD), počet vzoriek (n), koeficient variácie (Coefficient of Variation, CV), stredný počet kópií (Copy Number, CN) a stredný normalizovaný počet kópií (Normalized Copy Number, NCN).

Tabuľka 16. Vnútro laboratórna analýza – bunkové línie mbcr a ABL

Bunková línia	Zriedenie	Stredná 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

Tabuľka 17. Vnútro laboratórna analýza – plazmidy

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

Tabuľka 18. Vnútro laboratórna analýza – bunkové línie BCR-ABL m bcr a ABL (stredný CN)

Bunková línia	Zriedenie	Stredný CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL m bcr	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

Tabuľka 19. Vnútro laboratórna analýza – bunková línia BCR-ABL m bcr (stredný NCN)

Bunková línia	Zriedenie	Stredný NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL m bcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	267,46	93,22	20	34,85
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	23,54	7,36	20	31,28
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	2,60	2,80	20	107,66

* Iba pre výsledky týchto štúdií je NCN uvedený ako $\frac{\text{BCR-ABL m bcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$.

Klinické štúdie

Hodnotenie účinnosti bolo vykonané na prístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinácii s reagensiami uvedenými v časti „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 8. Štúdie rovnocennosti potvrdili jej použitie na nasledujúcich prístrojoch: ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, Rotor-Gene 3000 a na prístroji SmartCycler (6).

Skupina 26 laboratórií v 10 európskych štátoch, ktoré sú zoskupené v programe Európa proti rakovine (Europe Against Cancer, EAC), zosúladiť svoj postup a použila plazmidy dodané spoločnosťou IPSOGEN na vytvorenie štandardizovaného protokolu analýzy qPCR hlavných fúzných génov spojených s leukémiou v klinickom prostredí. Jedným z fúzných génov (fusion genes, FG) zahrnutých do tejto štúdie bol transkript BCR-ABL p190. Predkladáme vám zhrnutie tejto overovacej štúdie, jej úplné výsledky už boli zverejnené v roku 2003 (4, 7).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť pre štandardy plazmidov CG a FG

Jedenásť laboratórií urobilo experiment medzilaboratórnej reprodukovateľnosti na zhodnotenie variability merania štandardných riedení plazmidov CG a FG. Riedenia boli v každom zariadení vykonané dvakrát. Tabuľka 20 uvádza strednú štandardnú odchýlku a CV (%) pre každé riedenie.

Tabuľka 20. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť pre štandardy plazmidov CG a FG

Gén	Zriedenie	Stredná	C _T SD	CV (%)
Kontrolný gén ABL	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
Fúzny gén BCR-ABL mbc	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

Hodnoty expresie transkriptu FG BCR-ABL mbc

V Tabuľkách 21 a 22 sú uvedené hodnoty expresie transkriptu FG BCR-ABL mbc a CG ABL pre bunkovú líniu TOM1 u pacientov s ALL pri určení diagnózy a u bežných pacientov.

Tabuľka 21. Hodnoty expresie transkriptu FG BCR-ABL mbc r a CG ABL – hodnoty C_T

	Hodnoty C _T (95 % rozsah)	
	BCR-ABL mbc r	ABL
Bunková línia TOM1	22,8	21,8
Vzorky pacientov s ALL		
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)
Vzorky negatívnych pacientov		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68 – 26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83 – 25,48)

Tabuľka 22. Hodnoty expresie transkriptu FG BCR-ABL mbc r a CG ABL – CN a NCN

	Hodnoty CN (95 % rozsah)		Hodnoty NCN (95 % rozsah)
	BCR-ABL mbc r	ABL	CN BCR-ABL mbc r/CN ABL
Vzorky pacientov s ALL			
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)
Vzorky negatívnych pacientov			
BM (n = 26)	–	19 201 (12 922 – 25 480)	–
PB (n = 74)	–	21 136 (17 834 – 24 437)	–

Hodnoty ABL C_T medzi bežnými vzorkami a leukemickými vzorkami neboli výrazne odlišné, rovnako ako ani medzi typmi vzoriek (PB alebo BM) alebo vzorkami leukémie (ALL, AML, CML).

Miera falošnej pozitivity a falošnej negativity

Miera falošnej pozitivity a falošnej negativity bola vypočítaná pomocou nasledujúcich kontrol.

- Pozitívne kontroly: Bunky TOM1, teda bunková línia dobre známa svojou pozitivitou na fúzny gén BCR-ABL p190; vzorky pacientov už vyhodnotenú ako pozitívne na p190
- Negatívne kontroly: Negatívne vzorky RNA, neboli vykonané žiadne amplifikačné kontroly (No Amplification Controls, NAC) na RNA baktérií *E. coli* namiesto ľudskej RNA s cieľom skontrolovať kontamináciu PCR a žiadne šablónové kontroly (No Template Controls, NTC), ktoré obsahovali vodu namiesto ľudskej RNA

Amplifikácia na vzorkách RNA FG bola vykonaná trikrát a dvakrát na CG.

Falošne negatívna vzorka bola definovaná ako pozitívna vzorka RNA s menej ako 50 % pozitívnych jamiek (0/2, 0/3 alebo 1/3).

Falošne pozitívna vzorka bola definovaná ako negatívna vzorka s minimálne 50 % pozitívnych jamiek (1/2, 2/3 alebo 3/3).

Tabuľka 23 zobrazuje počet a percento falošne negatívnych a falošne pozitívnych vzoriek.

Tabuľka 23. Falošne negatívne a falošne pozitívne vzorky

Falošná negativita		Falošná pozitivita	
10 ⁻³	10 ⁻⁴	Negatívna kontrola FG	NAC/NTC
0 % (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Referenčná literatúra

QIAGEN vedie rozsiahlu aktuálnu online databázu vedeckých publikácií využívajúcich produkty QIAGEN. Komplexné možnosti vyhľadávania umožnia nájsť potrebné články, a to buď jednoduchým vyhľadávaním podľa kľúčových slov, alebo zadaním aplikácie, oblasti výskumu, názvu atď.

Úplný zoznam referenčnej literatúry nájdete v on-line Referenčnej databáze QIAGEN na stránke www.qiagen.com/RefDB/search.asp, prípadne kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Citovaná referenčná literatúra

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.

Symboly

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť na balení a štítkoch:



<N>

Obsahuje reagencie postačujúce na <N> reakcií



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Teplotné obmedzenia



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie

Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese www.qiagen.com/Support alebo na telefónnom čísle 00800-22-44-6000, alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu www.qiagen.com).

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	Pre 24 reakcií: Štandardy kontrolného génu ABL, štandardy fúzneho génu BCR-ABL mbc, zmes primérov a sond ABL, zmes primérov a sond fúzneho génu BCR-ABL mbc	670023
Rotor-Gene Q MDx – pre IVD-validované analýzy real-time PCR v klinických aplikáciách		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit – na kvalitatívnu validáciu extrakcie RNA a reverznú transkripciu fúzneho génu BCR-ABL mbc		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Bunkové línie s negatívnou, vysokou a nízkou pozitívnou expresiou fúzneho génu BCR-ABL mbc	670091

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Tento produkt je určený na diagnostické použitie in vitro. Produkty *Ipsogen* sa nemôžu opätovne predávať, upravovať na ďalší predaj ani používať na výrobu komerčných výrobkov bez písomného súhlasu spoločnosti QIAGEN.

Informácie uvádzané v tomto dokumente sa môžu zmeniť bez predchádzajúceho upozornenia. Spoločnosť QIAGEN nenesie žiadnu zodpovednosť za chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť v tomto dokumente. Tento dokument sa v čase uverejnenia považuje za úplný a presný. Spoločnosť QIAGEN v žiadnom prípade nezodpovedá za náhodné, špeciálne, viacnásobné alebo následné škody, ktoré vzniknú v súvislosti s používaním tohto dokumentu alebo vyplývajúce z jeho použitia.

Na produkty *ipsogen* sa poskytuje záruka, že spĺňajú uvedené špecifikácie. Jediný záväzok spoločnosti QIAGEN a jediný prostriedok nápravy zákazníkom je obmedzený na bezplatnú výmenu produktov v prípade, že produkty nebudú fungovať v súlade so zárukou.

Ochranné známky: 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).

Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit s nasledovnými podmienkami:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit môže byť použitá výlučne v súlade s *príručkou k ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit* a iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v *príručke k ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit* a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolí vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

HB-1357-002 © 2013-2015 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

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

