

Příručka pro sadu *ipsogen*[®] BCR-ABL1 Mbcr



Verze 1

IVD

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], LightCycler[®] a SmartCycler[®]



REF

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden,
NĚMECKO

R2

MAT

1072507CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

Zamýšlené použití	4
Souhrn a vysvětlení	4
Sledování nemoci	4
Princip metody	6
Dodávané materiály	9
Obsah sady	9
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	10
Varování a bezpečnostní opatření	11
Všeobecná bezpečnostní opatření	11
Uchovávání a nakládání s reagensy	12
Postup	14
Příprava vzorku RNA	14
Protokoly	
■ Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC	14
■ qPCR na přístrojích RotorGene Q MDx 5plex HRM nebo RotorGene Q 5plex HRM se 72zkušebním rotorem	17
■ qPCR na ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a přístroj LightCycler 480	21
■ qPCR na přístrojích LightCycler 1.2, a 2.0	25
■ qPCR na přístroji SmartCycler	29
Interpretace výsledků	32
Princip datové analýzy	32
Výsledky	33
Řešení problémů	35
Řízení jakosti	38
Omezení	39
Výkonnostní charakteristiky	39
Neklinické studie	39
Klinické studie	42
Literatura	45
Symboly	46
Kontaktní informace	47
Informace o způsobu objednávání	48

Zamýšlené použití

Sada *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr je určena pro kvantifikaci transkriptů BCR-ABL p210 b2a2 nebo b3a2 ve vzorcích kostní dřeně nebo periferní krve u pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií (ALL) nebo chronickou myeloidní leukémií (CML), u nichž byla předtím diagnostikována příhoda fúze genu (FG) BCR-aBL Mbcr. Test je určen k hodnocení úrovně molekulární odezvy; výsledky lze používat k minimálnímu sledování reziduálního onemocnění.

Souhrn a vysvětlení

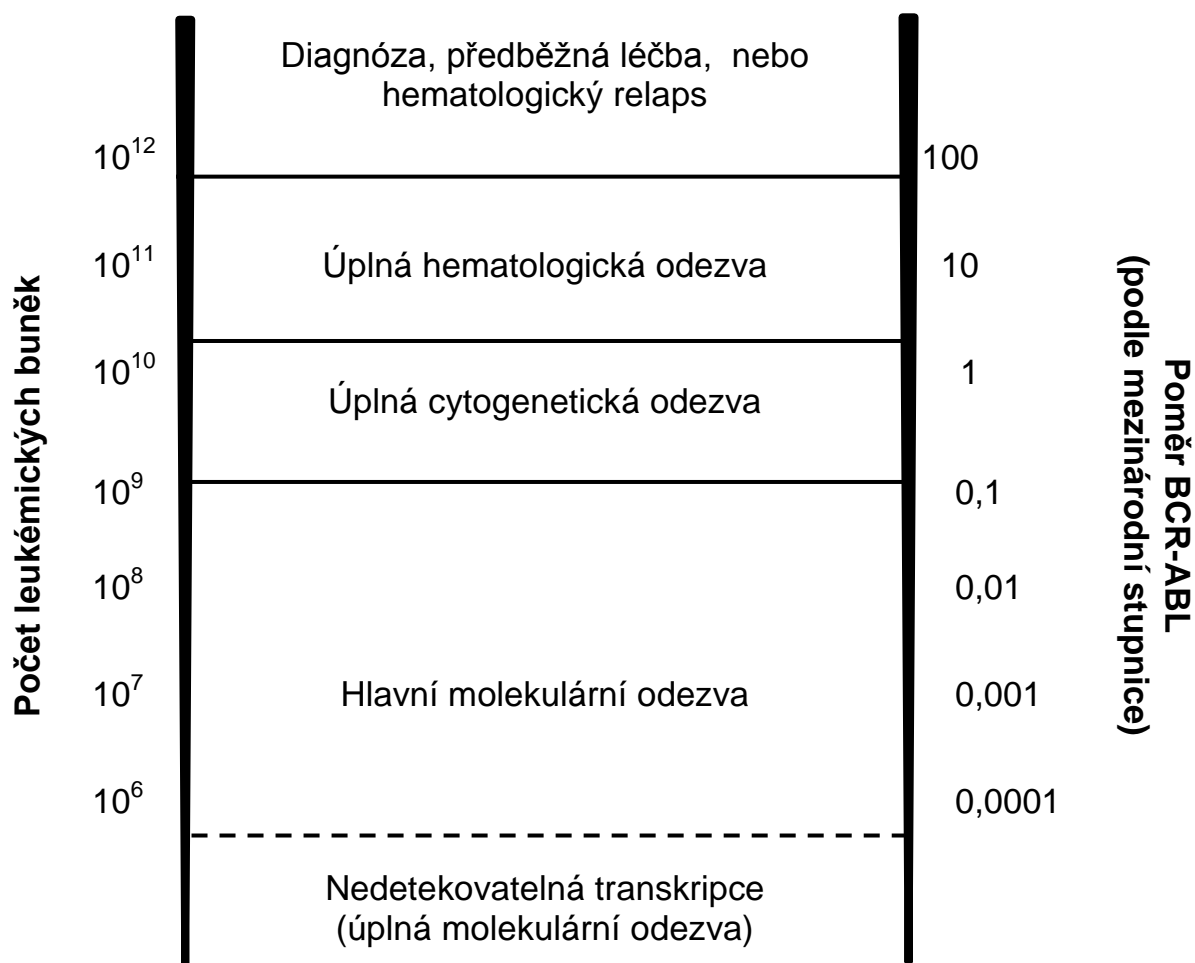
CML patří do skupiny myeloproliferativních neoplasmů a vyznačuje se ve >90 % případů přítomností filadelfského chromosomu (chromosom Ph CHRS).

Tento chromosom je produktem reciproční translokace mezi dlouhými rameny chromosomů 9 a 22, t(9;22), gen BCR (breakpoint cluster region) je umístěn na chromosomu 22 a onkogen c-ABL přichází z chromosomu 9. Odpovídající fúzní gen, BCR-ABL, je transkribován do 8,5 kb mRNA s dvěma junkčními variantami b2a2 (40 % případů) a b3a2 (55 % případů). Kóduje chimérický protein, p210, se zvýšenou aktivitou tyrozinkinázy. Transkripce b2a3 a b3a3 představují méně než 5 % případů. Chromosom Ph lze rovněž detekovat u 35 % VŠECH dospělých pacientů.

Roční výskyt CML je přibližně 1–2 na 100 000 a MCL představuje 20 % dospělých leukémií. Klinicky je charakterizován přebytkem myeloidních buněk, které se diferencují a fungují normálně. Pacienti s CML budou diagnostikováni v 90–95 % případů chronické nebo stabilní fáze onemocnění. Z historického pohledu v průměru 4 až 6 let pacienti vstoupí do akcelerované fáze, která vyvolá blastickou krizi a akutní leukémii, která je vždy smrtelná. Nástup imatinibu a v nedávné minulosti druhé generace inhibitorů tyrozinkinázy (TKI) dramaticky změnil přirozený průběh nemoci: většina pacientů nyní zůstává v remisi a zaslouží si dlouhodobou kontrolu a sledování nemoci.

Sledování nemoci

K dnešnímu dni je cílem terapie CML dosáhnout 100% přežití a negativity chromosomu Ph. Sledování nemoci je proto zásadním nástrojem k hodnocení odezvy a detekci časného relapsu u každého individuálního pacienta. Při terapii TKI pacienti obvykle progredují od hematologické k cytogenetické a pak molekulární remisi s odpovídajícím snížením počtu leukémických buněk a transkriptů BCR-ABL, jak je to podrobně uvedeno na následujícím obrázku 1.



Obrázek 1. Převzato z literatury 1.

Standardní metoda pro odhad tumorového zatížení u pacientů s CML je konvenční cytogenetická analýza (G-banding) na metafázích kostní dřeně (BM). Cytogenetická odezva se hodnotí na nejméně 20 metafázích kostní dřeně. Úroveň cytogenetické odezvy se odhaduje jako procentuální podíl metafází pozitivních na chromozom Ph (viz tabulka 1, odkaz 2). Ovšem toto hodnocení závisí na laboratorních výsledcích a má nízkou senzitivitu, 5 % při analýze 20 metafází.

Součástí technik sledování nemoci v případě léčby CML je nyní kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR), kvantifikující BCR-ABL M_{bcr} mRNA na vzorcích periferní krve (PB). Není tak invazivní jako konvenční cytogenetika metafáze kostní dřeně a je mnohem citlivější.

Nedávno byla aktualizována doporučení pro sledování onemocnění CML, která zahrnovala nový klinický důkaz z klinických hodnocení a dále cíle a nástroje pro dokonalejší sledování onemocnění. Nejnovější doporučení ohledně definice odezvy a sledování pacientů užívajících imatinib přichází od expertů ELN (2).

Z technického hlediska mezinárodní experti vynaložili úsilí na harmonizaci testování a hlášení BCR-ABL M_{bcr} (3–5). Navíc byl nedávno validován referenční panel pod dohledem WHO, aby byla možná jednoduchá standardizace kvantifikace BCR-ABL (6).

Tabulka 1. Mezinárodní doporučení pro léčbu pacientů s CML (upraveno podle odkazu 2)

	Hematologická odezva	Cytogenetická odezva	Molekulární odezva (poměr BCR-ABL a kontrolního genu podle mezinárodní stupnice)
Definice	Úplný: Počet krevních destiček <450 x 10 ⁹ /liter Počet bílých krvinek <10 x 10 ⁹ /liter Diferenciál bez nezralých granulocytů a s méně než 5 % bazofilů Nehmatatelná slezina	Úplný: Ph+ 0 % Částečný: Ph+ 1–35 % Menší: Ph+ 36–65 % Minimální: Ph+ 66-95 % Žádný: Ph+ >95 %	"Úplný" označuje nekvantifikovatelný a nedetekovatelný transkript Velký: ≤0,1
Sledování	Kontrolujte každé 2 týdny, dokud nebude dosažena a potvrzena úplná odezva, pak 3 měsíčně, pokud nebude vyžadováno jinak	Kontrolujte nejméně jednou za 6 měsíců, dokud nebude dosažena a potvrzena úplná odezva, pak nejméně jednou za 12 měsíců	Kontrolujte každé 3 měsíce Analýza mutací v případě neúspěchu, suboptimální odezvy nebo zvýšení hladiny transkriptu

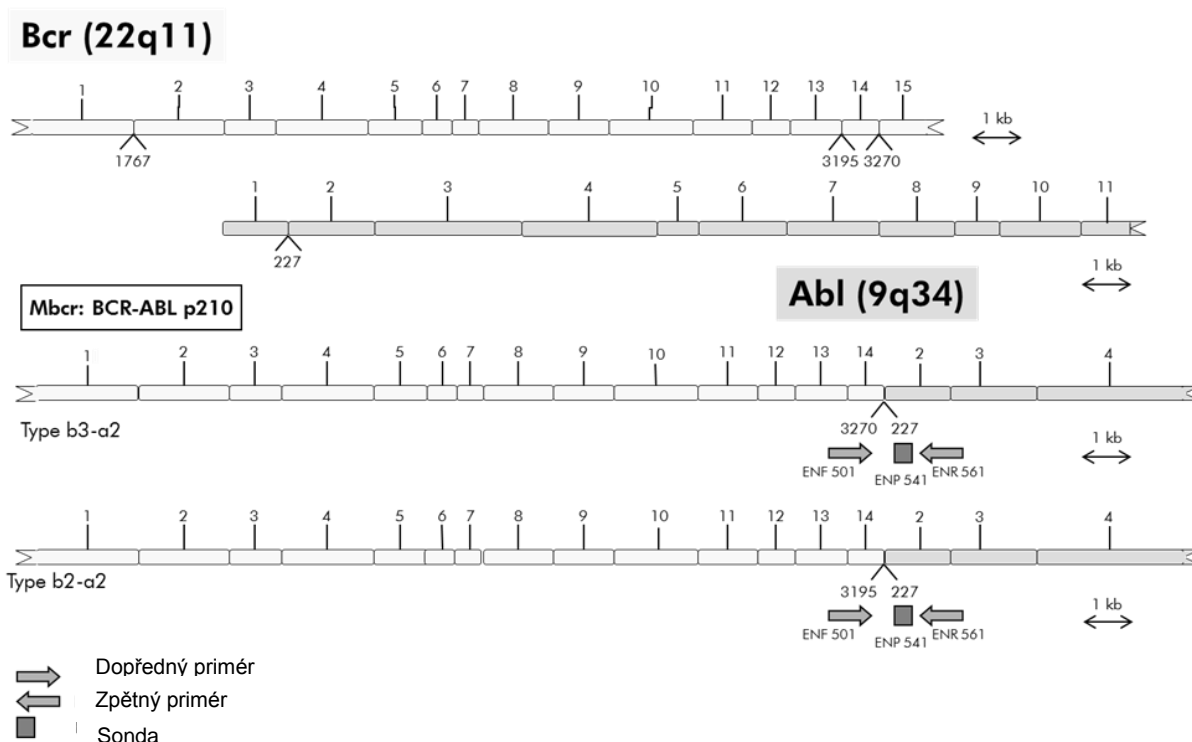
Úplná hematologická odezva, cytogenetická odezva a molekulární odezva by se měla potvrdit při dvou následných příležitostech. Cytogenetická odezva se hodnotí pomocí morfologické cytogenetiky na nejméně 20 metafázích kostní dřeně. Hybridizace fluorescence in situ (FISH) buněk periferní krve by se měla používat pouze v případě, kdy nelze získat buňky kostní dřeně. Molekulární odezva se hodnotí na buňkách periferní krve.

Princip metody

aPCR umožňuje přesnou kvantifikaci produktů PCR během exponenciální fáze procesu amplifikace PCR. Kvantitativní údaje PCR lze získat rychle bez zpracování po PCR detekcí fluorescenčních signálů v reálném čase během a/nebo po cyklování PCR, čímž se drasticky snižuje riziko kontaminace

výrobku PCR. V současnosti jsou k dispozici 3 hlavní typy technik qPCR: analýza qPCR pomocí barviva SYBR® Green I, analýza qPCR používající hydrolyzační sondy a analýza qPCR pomocí hybridizačních sond.

Tato analýza využívá princip hydrolýzy oligonukleotidu dvojitého barviva qPCR. Během PCR dopředné a zpětné priméry hybridizují do specifické sekvence (Obrázek 2). Ve stejné směsi je obsažen oligonukleotid dvojitého barviva. Tato sonda, která se skládá z oligonukleotidu označeného barvivem 5' oznamovatele a za daným místem barvivem 3' zhášecí látky, hybridizuje do cílové sekvence v rámci výrobku PCR. Analýza qPCR se hydrolyzačními sondami využívá aktivitu exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Když je sonda nedotčená, blízkost paliva oznamovatele u barviva zhášecí látky způsobuje potlačení fluorescence oznamovatele primárně převodem energie Försterova typu.

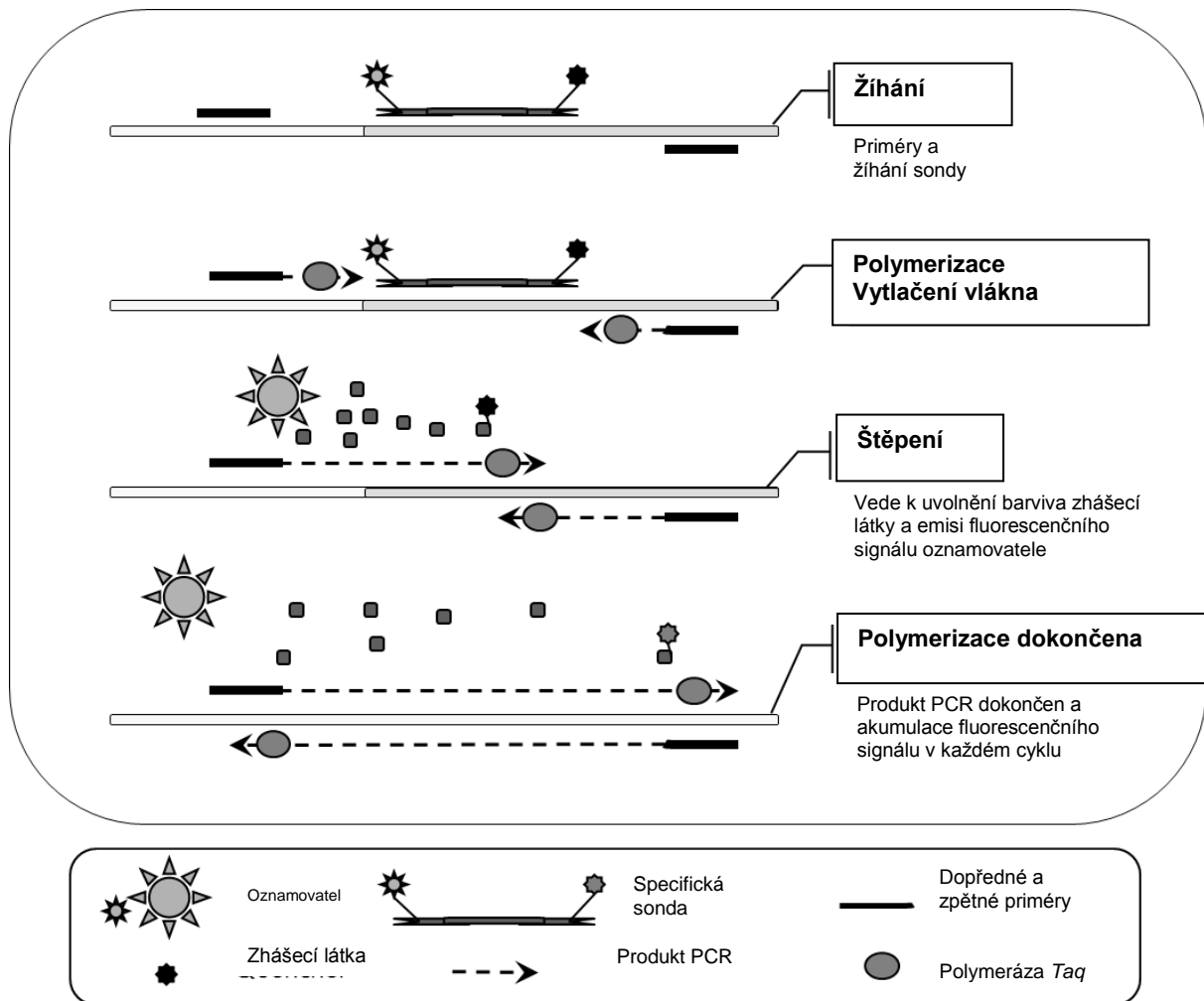


Obrázek 2. Schématický diagram transkriptu FG Mbcr BCR-ABL pokrytý priméry qPCR a sestavou sond: ENF501–ENP541–ENR561. Číslo pod priméry a sondou odkazuje na jejich nukleotidovou polohu v normálním genovém transkriptu.

Pokud je během PCR přítomen zájmový cíl, sonda specificky žihá mezi dopřednými a zpětnými místy priméru. Aktivita exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA štěpí sondu mezi oznamovatele a zhášecí látku pouze v případě, když sonda hybridizuje na cíl. Fragmenty sondy jsou poté z cíle vytlačeny a polymerizace vlákna pokračuje. Konec sondy 3' je blokován, aby se zabránilo extenzi sondy během PCR (obrázek 3). Tento proces nastane v každém cyklu a nebude narušen exponenciální akumulací produktu.

Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno pouze v případě, že bude cílová sekvence komplementární se sondou, a tím bude během PCR amplifikována. Kvůli těmto požadavkům se nedetekuje nespecifickou

amplifikaci. Tak je zvýšení fluorescence přímo úměrné cílové amplifikaci během PCR.



Obrázek 3. Princip reakce. Celková RNA se reverzně transkribuje a vytvořená cDNA je amplifikována pomocí PCR při využití páru specifických primérů a specifické vnitřní sondy s dvojitým barvivem (FAM™–TAMRA™). Sonda se váže na amplicon během každého korku žihání PCR. Když se *Taq* rozšíří z primérové vazby k ampliconu, vytlačí 5' konec sondy, který je poté degradován aktivitou 5'→3' exonukleázy polymerázy *Taq* DNA. Štěpení pokračuje, dokud zbývající sonda amplicon neroztaví. Tento proces uvolňuje do roztoku fluorofor a zhášecí látku, prostorově je odděluje a vede ke zvýšení fluorescence způsobené FAM a poklesem fluorescence pocházející z TAMRA.

Dodávané materiály

Obsah sady

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit		(24)
Katalogové č.		670123
Počet reakcí		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu ABL) (103 kopií/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu ABL (104 kopií/5 µl))	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu ABL (105 kopií/5 µl))	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardní ředění genu fúze BCR-ABL Mbc (101 kopií/5 µl))	F1-BCR- ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardní ředění genu fúze BCR-ABL Mbc (102 kopií/5 µl))	F2-BCR- ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardní ředění genu fúze BCR-ABL Mbc (103 kopií/5 µl))	F3-BCR- ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardní ředění genu fúze BCR-ABL Mbc (105 kopií/5 µl))	F4-BCR- ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Standardní ředění genu fúze BCR-ABL Mbc (106 kopií/5 µl))	F5-BCR- ABL Mbc	50 µl

Primers and Probe Mix ABL* (Priméry a směs sond ABL)	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene (Priméry a směs sond genu fúze BCR-ABL Mbc [†])	PPF- Mbc 25x	110 µl
Příručka pro sadu ipsogen BCR-ABL Mbc (angličtina)		1

* Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro kontrolní gen ABL (CG) plus specifická sonda FAM–TAMRA.

† Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro gen fúze BCR-ABL Mbc (FG) plus specifická sonda FAM–TAMRA.

Poznámka: Standardní ředění a priméry a směsi sond před použitím krátce odstředujte.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Reagencie

- Voda pro PCR bez nukleázy
- Reagencie pro reverzní transkripci: Validovanou reagencí je reverzní transkriptáza Superscript[®] II (nebo Superscript), obsahuje 5x pufr prvního vlákna, 100 mM DDT (Life Technologies, katalogové číslo 18064-022)
- Inhibitor RNázy: Validovanou reagencii je RNaseOUT[™] (Life Technologies, katalogové číslo 10777-019)
- Sestava dNTP, úroveň pro PCR
- Náhodný hexanukleotidový primer
- MgCl₂
- Pufr a polymeráza DNA Taq: Validovanými reagenciami jsou TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, katalogové číslo 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, katalogové číslo 04535286001)

Spotřební díly

- Sterilní pipetovací špičky PCR odolné proti aerosolu neobsahující nukleázu s hydrofobními filtry

- 0,5ml nebo 0,2 ml zkumavky PCR neobsahující RNázu a DNázu
- Led

Vybavení

- Mikrolitrová pipeta* vyčleněná pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga* s rotorem pro 0,2 ml/0,5 ml reakční zkumavky a mikroděsky (schopná dosáhnout 10.000 ot/min)
- Přístroje PCR pracující v reálném čase:* Systém Rotor-Gene Q MDx5plex HRM nebo jiný přístroj Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0 nebo 480; ABI PRISM 7000, 7700 nebo 7900HT SDS nebo přístroj SmartCycler a s tím spojený specifický materiál
- Tepelný cyklovač* nebo vodní lázeň* (reverzní transkripční krok)

Doplňkové reagensie

- Sada kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc (katalogové číslo 670191) skládající se z buněčných linií s negativní, vysokou a nízkou pozitivní expresí genu fúze BCR-ABL Mbc pro kvalitativní validaci extrakce RNA a reverzní transkripci

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

* Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

Všeobecná bezpečnostní opatření

Použití testů qPCR vyžaduje správnou laboratorní praxi včetně údržby zařízení, která jsou vyčleněna pro molekulární biologii, a je ve shodě s platnými předpisy a příslušnými standardy.

Tato sada je určena pro diagnostické použití *in vitro*. Reagencie a pokyny dodávané s touto sadou byly validovány pro optimální chování. Další ředění reagensů nebo pozměnění inkubačních časů a teplot může vést k chybným nebo rozporným údajům. Reagencie PPC a PPF se mohou změnit, pokud budou vystaveny působení světla. Všechny reagencie byly specificky vytvořeny pro použití s tímto testem. Pro optimální chování testu by se neměly provádět žádné náhrady.

Stanovení úrovně transkripce pomocí qPCR vyžaduje jak reverzní transkripci mRNA, tak amplifikaci vytvořené cDNA pomocí PCR. Proto se musí celý postup rozborů provést za podmínky ne přítomnosti RNázy/DNázy.

Postupujte s maximální opatrností, aby nedošlo k následujícímu:

- Kontaminace RNázou/DNázou, která by mohla způsobit degradaci templátové mRNA a vytvořené cDNA
- Přenosová kontaminace mRNA nebo PCR s následným falešně pozitivním signálem

Proto doporučujeme následující.

- Použijte laboratorní vybavení zbavené nukleázy (např. pipety, pipetovací špičky, reakční lahvičky) a při provádění analýzy mějte nasazené rukavice.
- Použijte čerstvé pipetovací špičky odolné vůči aerosolu pro všechny pipetovací kroky, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci vzorků a reagensů.
- Připravte hlavní směs před PCR s vyčleněnými materiály (pipety, špičky atd.) ve vyhrazeném místě, kam nebyly zavlečeny žádné matrice DNA (cDNA, DNA, plazmid). Dejte templát do samostatné zóny (nejlépe do samostatné místnosti) se specifickým materiálem (pipety, špičky atd.).
- Se standardními roztoky (C1–3 a F1–5) pracujte v oddělené místnosti.

Uchovávání a nakládání s reagensy

Sady se dodávají na suchém ledu a po doručení se musí uskladnit při teplotách od -30°C do -15°C.

- Minimalizujte expozici primérů a směsí sond (zkumavky PPC a PPF) působení světla.
- Před otevřením zkumavky jemně smíchejte a centrifugujte.
- Uložte všechny součásti sady do původních obalů.

Tyto podmínky uchovávání platí jak pro otevřené, tak neotevřené komponenty. Komponenty uchovávané za jiných podmínek, než jsou uvedeny a štítcích, nemusí řádně fungovat a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky rozborů.

Data použitelnosti pro každou reagensii jsou vyznačena na štítcích individuálních komponent. Za správných podmínek uchovávání si produkt uchová vlastnosti až do data použitelnosti vytištěného na štítku.

Neexistují žádné zřejmé příznaky, které by upozorňovaly na nestabilitu tohoto produktu. Pozitivní a negativní kontroly by se u neznámých vzorků měly provádět současně.

Postup

Příprava vzorku RNA

Příprava RNA ze vzorků pacienta (kost nebo kostní dřeň) se musí provést validovaným postupem. Kvalita rozboru do velké míře závisí na kvalitě vstupní RNA. Proto doporučujeme kvalifikovat před analýzou čištěnou RNA elektroforézou agarózového* gelu nebo pomocí Agilent® Bioanalyzer®.

Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Připravte dNTP, každý 10 mM. Uchovávejte v alikvotních množstvích při –20°C.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Inkubujte 1 µg RNA (1–4 µl) po 10 minut při 70°C a okamžitě chladte na ledu přibližně 5 minut.
3. Krátce odstřed'ujte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
4. Připravte následující směs RT podle počtu zpracovávaných vzorků (tabulka 2).

* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle.

Tabulka 2. Příprava směsi RT

Komponenta	Objem na vzorek (μl)	Konečná koncentrace
Pufr prvního vlákna (dodávaný s reverzní transkriptázou Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ , 50 mM	2,0	5 mM
dNTP (10 mM každý, nutno připravit dříve a uchovávat při –20°C v alikvotních množstvích)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, dodávaný s reverzní transkriptázou Superscript II)	2,0	10 mM
Inhibitor RNase (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Náhodný hexanukleotidový primer (100 μM)	5,0	25 μM
Reverzní transkriptáza Superscript II nebo Superscript (200 U/μl)	0,5	5 U/μl
Ohřátý vzorek RNA, (bude přidán v kroku 5)	1,0-4,0	50 ng/μl
Voda vhodná pro PCR bez nukleázy (bude přidána v kroku 5)	0,0-3,0	–
Konečný objem	20,0	–

- 5. Do každé zkumavky PCR pipetujte 16 μl směsi RT. Pak přidejte 1–4 μl (1 μg) RNA (z kroku 3) a upravte objem na 20 μl vodou vhodnou pro PCR bez nukleázy (viz tabulka 3).**

Tabulka 3. Příprava reakce reverzní transkriptázy

Komponenta	Objem (μl)
Směs RT	16
Ohříváný vzorek RNA (1 μg)	1-4
Voda pro PCR bez nukleázy	0-3
Konečný objem	20

6. Dobře promíchejte a krátce odstřed'ujte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky.
7. Inkubujte při 20°C 10 minut.
8. Inkubujte při 42°C na tepelném cyklovači po 45 minut, pak neprodleně při 99°C po 3 minuty.
9. Chlad'te na ledu (pro zastavení reakce) po 5 minut.
10. Krátce odstřed'ujte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
11. Nařed'te konečnou cDNA pomocí 30 µl vody vhodné pro PCR zbavené nukleázy, aby byl konečný objem 50 µl.
12. Proveďte PCR podle následujících protokolů podle svého přístroje qPCR.

Protokol: qPCR na přístrojích RotorGene Q MDx 5plex HRM nebo RotorGene Q 5plex HRM se 72zkumavkovým rotorem

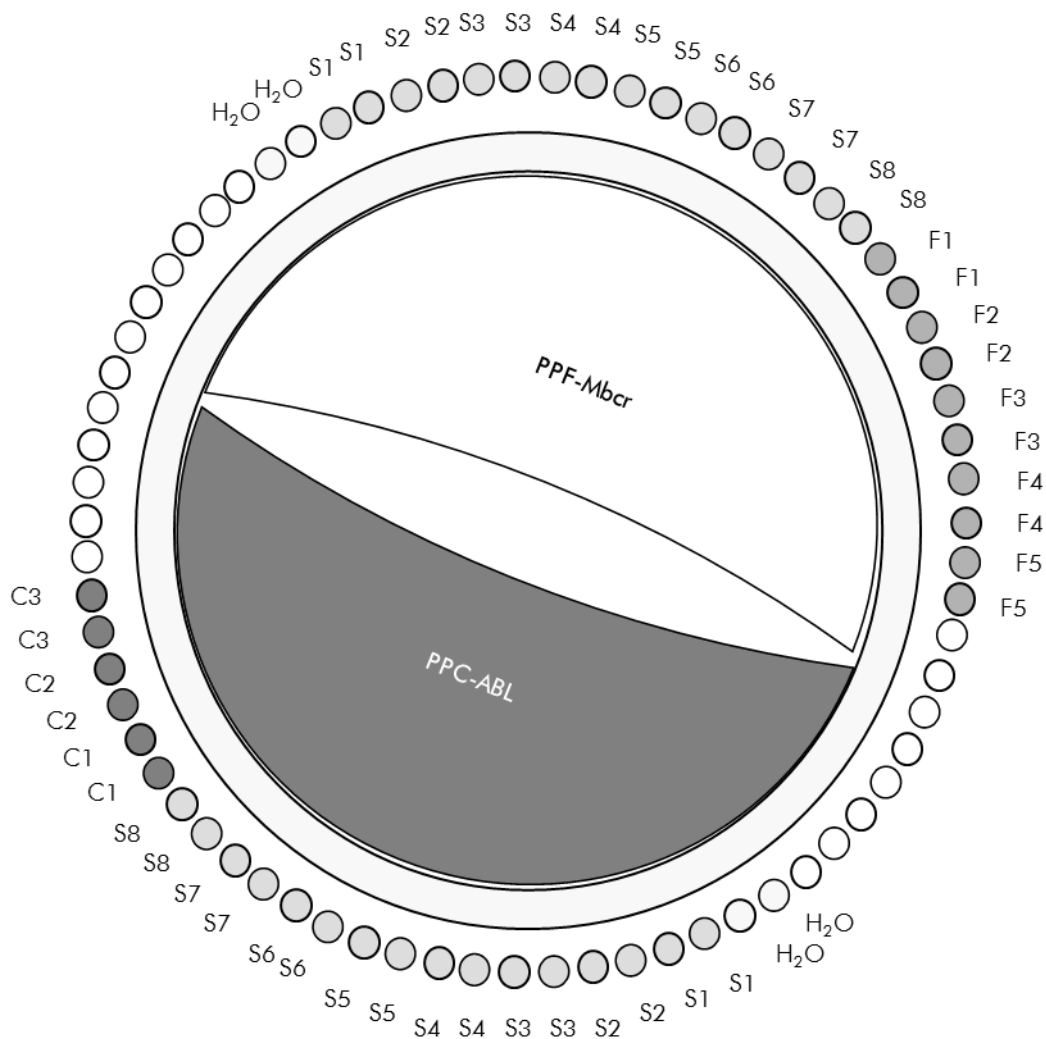
Při použití tohoto přístroje doporučujeme provádět všechna měření dvojmo, jak je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4. Počet reakcí pro přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	2 x 3 reakce (3 ředění každý jednotlivě testován dvojmo)
Kontrola vody	2 reakce
S priméry BCR-ABL Mbcr a směsí sond (PPF-Mbcr)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard Mbcr	2 x 5 reakce (5 ředění každý jednotlivě testován dvojmo)
Kontrola vody	2 reakce

Zpracování vzorku na přístrojích Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem

Doporučujeme testování nejméně 8 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Jedna sada *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr obsahuje dostatek reagensů k provedení 8vzorkového experimentu 3krát při použití 72zkumavkového rotoru.



Obrázek 4. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR. F1–5: Standardy BCR-ABL MbcR; C1–C3: Standardy ABL; S: vzorek cDNA; H₂O: kontrola vody.

Poznámka: Dbejte vždy na to, abyste testovaný vzorek umístili na rotoru do polohy 1. Jinak během kalibračního kroku přístroj kalibraci neprovede a budou pořízena nesprávná fluorescenční data.

Všechny ostatní pozice zaplňte prázdnými zkumavkami.

Přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

- 1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.**
- 2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 5 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-Mbcr). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 5. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 24+1 reakce (μl)	BCR-ABL Mbcr: 28+1 reakce (μl)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1	25	29	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

3. Dávkuje 20 μ l premixu qPCR na zkumavku.
4. Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC”, strana 14) v odpovídající zkumavce (celkový objem 25 μ l).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Zkumavky vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.
7. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Držet	Teplota: 50 stupňů Čas: 2 minut
Držet 2	Teplota: 95 stupňů Čas: 10 minut
Cyklování	50krát 95 stupňů po 15 sekund 62 stupňů po 1 minut se snímáním fluorescence FAM v kanálu Zelená: Jednotlivý

- 8. U přístrojů Rotor-Gene Q vyberte pro analýzu "Správný sklon". Doporučujeme nastavit prahovou hodnotu na 0,03. Spusťte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 6.**

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

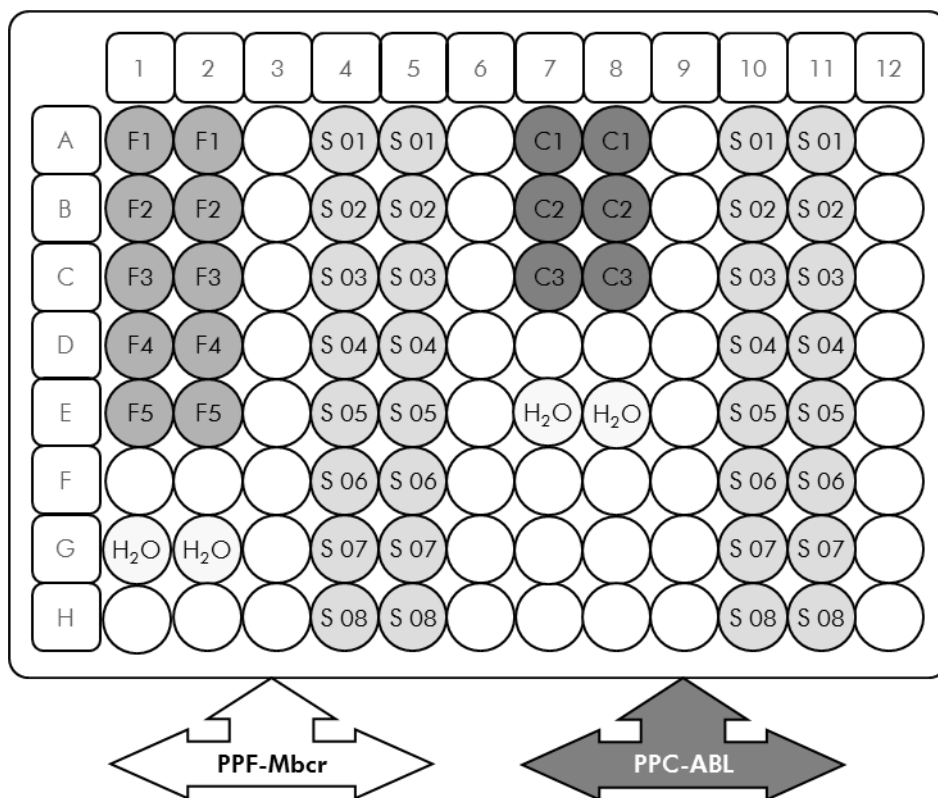
Při použití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách doporučujeme provádět všechna měření dvojnásobně, jak je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7. Počet reakcí při využití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	2 x 3 reakce (3 ředění každý jednotlivě testován dvojnásobně)
Kontrola vody	2 reakce
S priméry BCR-ABL Mbc r a směsí sond (PPF-Mbc r)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard Mbc r	2 x 5 reakce (5 ředění každý jednotlivě testován dvojnásobně)
Kontrola vody	2 reakce

Zpracování na ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS a přístroji LightCycler 480

Doporučujeme testování nejméně 8 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Schéma rotoru na obrázku 5 ukazuje příklad takového experimentu.



Obrázek 5. Navrhované nastavení desky pro jeden experiment. S: vzorek cDNA; **F1–5:** Standardy BCR-ABL Mbcr; **C1–C3:** Vzorek ABL; **H₂O:** kontrola vody.

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

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. **Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.**
2. **Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků. Pokud použijete zařízení qPCR s 96 jamkami na desce, doporučujeme provádět všechna měření dvojmo.**

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 8 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-Mbcr). Zahrnuty jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 8. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (µl)	ABL: 24+1 reakce (µl)	BCR-ABL Mbc: 28+1 reakce (µl)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1	25	29	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

3. **Dávkujte 20 µl premixu qPCR na jamku.**
4. **Přidejte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC”, strana 14) v odpovídající jamce (celkový objem 25 µl).**
5. **Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.**
6. **Uzavřete desku a krátce odstřed'ujte (300 x g, přibližně 10 sekund).**
7. **Desku vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce. Naprogramujte tepelný cyklovač pomocí programu tepelného cyklování, jak je to uvedeno v tabulce 9 pro přístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS nebo v tabulce 10 pro přístroj LightCycler 480.**

Tabulka 9. Teplotní profil pro ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS

Režim analýzy	Standardní křivka — absolutní kvantifikace
Držet	Teplota: 50°C Čas: 2 minuty
Držet 2	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty
Cyklování	50krát 95°C po 15 sekund 60°C po 1 minutu se snímkováním fluorescence FAM; zhášecí látka: TAMRA

Tabulka 10. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480

Režim analýzy	Absolutní kvantifikace ("Abs Quant")
Detekční formáty	Vyberte "Samostatná sonda" v okně Detekční formáty
Držet	Teplota: 50°C Čas: 2 minuty
Držet 2	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty
Cyklování	50krát 95°C po 15 sekund 60°C po 1 minutu se snímáním fluorescence FAM odpovídající (483–533 nm) pro LC verzi 01 a (465–510 nm) pro LC verzi 02

8. U přístrojů ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS postupujte podle kroku 8a. U přístroje LightCycler 480 postupujte podle kroku 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS Doporučujeme nastavit práh na 0,1, jak je popsán v protokolu EAC v kroku analýzy na ABI PRISM SDS a ve výchozím nastavení mezi cykly 3 a 15. Spusťte program cyklování, jak je uvedeno v tabulce 9.
- 8b. Přístroj LightCycler 480: Doporučujeme režim analýzy Bod vhodnosti s pozadím na 2,0 a prahovou hodnotou 2,0. Spusťte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 10.

Protokol: qPCR na přístrojích LightCycler 1.2, a 2.0

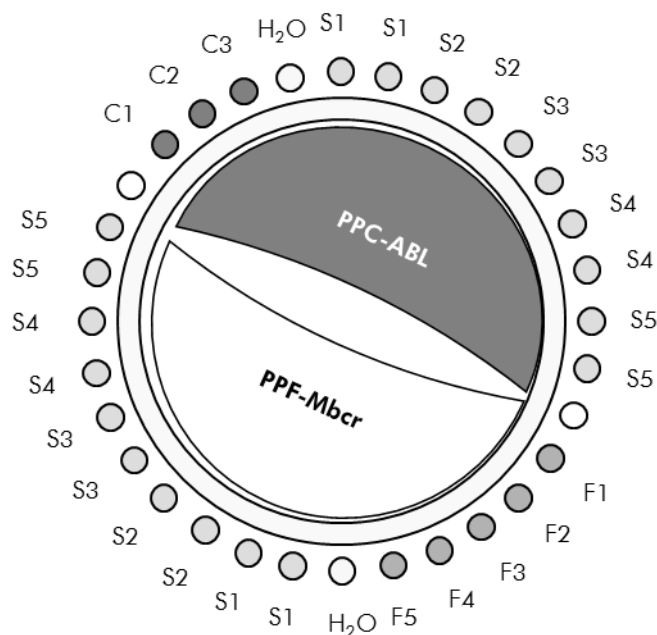
Při použití kapilárních přístrojů doporučujeme měřit vzorky dvojmo a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v tabulce 11.

Tabulka 11. Počet reakcí pro přístroje LightCycler 1.2 a 2.0

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	1 x 3 reakce (3 standardní ředění, každé jednotlivě testováno dvojmo)
Kontrola vody	1 reakce
S priméry BCR-ABL Mbcr a směsí sond (PPF-Mbcr)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard Mbcr	1 x 5 reakce (5 standardní ředění, každé jednotlivě testováno dvojmo)
Kontrola vody	1 reakce

Zpracování vzorku na přístrojích LightCycler 1.2 a 2.0

Doporučujeme testování nejméně 5 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Kapilární schéma na obrázku 6 ukazuje příklad experimentu.



Obrázek 6. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr. F1–5: Standardy BCR-ABL Mbcr; C1–C3: Standardy ABL; S: neznámý vzorek DNA, který se má analyzovat; H₂O: kontrola vody.

qPCR na přístrojích LightCycler 1.2, a 2.0

Poznámka: Kvůli konkrétním technologickým požadavkům se musí experimenty s přístrojem LightCycler provádět při použití specifických reagensů. Doporučujeme používat LightCycler TaqMan Master a dodržovat pokyny výrobce pro přípravu Master Mix 5x.

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. **Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.**
2. **Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 12 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 20 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-Mbcr). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 12. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 14+1 reakce (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reakce (μl)	Konečná koncentrace
Čerstvě připravená Master Mix LightCycler TaqMan, 5x	4,0	60	68,0	1x
Priméry a směs sond, 25x	0,8	12	13,6	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	10,2	153	173,4	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	5,0 každý	–
Celkový objem	20,0	20 každý	20,0 každý	–

- Dávkujte 15 μl premixu qPCR na kapiláru.**
- Přidejte 5 μl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC”, strana 14) v odpovídající zkumavce (celkový objem 20 μl).**
- Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.**
- Umístěte kapiláry do adaptérů dodávaných s přístrojem, krátce odstřed'ujte (700 x g, přibližně 10 sekund).**
- Kapiláry vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.**
- Naprogramujte přístroje LightCycler 1.2 nebo 2.0 pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 13.**

Tabulka 13. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Držet	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty Nárůst: 20
Cyklování	50krát 95°C po 10 sekund; nárůst: 20 60°C po 1 minutu; nárůst: 20; se snímáním fluorescence FAM: Jednotlivý
Držet 2	45°C po 1 minutu; nárůst: 20

- 9. U přístroje LightCycler 1.2 postupujte podle kroku 9a. U přístroje LightCycler 2.0 postupujte podle kroku 9b.**
- 9a. LightCycler 1,2: Doporučuje se F1/F2 a režim “analýzy založené na 2. derivaci”. Spust’te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 13.**
- 9b. LightCycler 2,0: Doporučujeme použití Automatické analýzy (F”max) na softwaru LightCycler 2.0, verze 4.0 pro získání reprodukovatelných výsledků. Spust’te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 13.**

Protokol: qPCR na přístroji SmartCycler

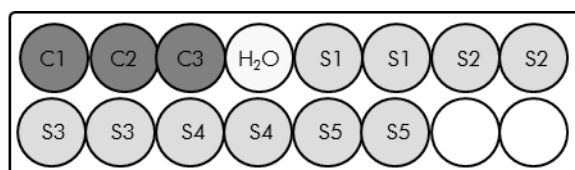
Při použití tohoto přístroje doporučujeme měřit vzorky dvojmo a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v tabulce 14.

Tabulka 14. Počet reakcí pro přístroj SmartCycler

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	1 x 3 reakce (3 standardní ředění, každé jednotlivě testováno dvojmo)
Kontrola vody	1 reakce
S priméry BCR-ABL Mbc a směsí sond (PPF-Mbc)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard Mbc	1 x 5 reakce (5 standardní ředění, každé jednotlivě testováno dvojmo)
Kontrola vody	1 reakce

Zpracování vzorku na přístroji SmartCycler

Doporučujeme testování nejméně 5 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Dvoublokové schéma na obrázku 7 ukazuje příklad.



Všechny rozборы na prvním bloku se provádí pomocí PPC-ABL.



Všechny rozборы na druhém bloku se provádí pomocí PPF-Mbc.

Obrázek 7. Navrhované nastavení desky pro jeden experiment. S: vzorek cDNA; **F1–5:** Standardy BCR-ABL Mbc; **C1–C3:** Vzorek ABL; **H₂O:** kontrola vody.

qPCR na přístroji SmartCycler

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. **Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.**
2. **Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 15 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-Mbcr). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 15. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 14+1 reakce (μl)	BCR-ABL Mbcr: 16+1 reakce (μl)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1	15	17	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	97,5	110,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

3. **Dávkujte 20 μ l premixu qPCR na jamku.**
4. **Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC”, strana 14) v odpovídající jamce (celkový objem 25 μ l).**
5. **Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.**
6. **Vzorky vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.**

7. Naprogramujte přístroj SmartCycler pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16. Teplotní profil

Držet	Teplota: 50°C Čas: 2 minuty
Držet 2	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty
Cyklování	50krát 95°C po 15 sekund 60°C po 1 minutu s přírůstkem: Jednotlivý

8. Doporučujeme nastavení prahové hodnoty na 30. Spust'te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 16.

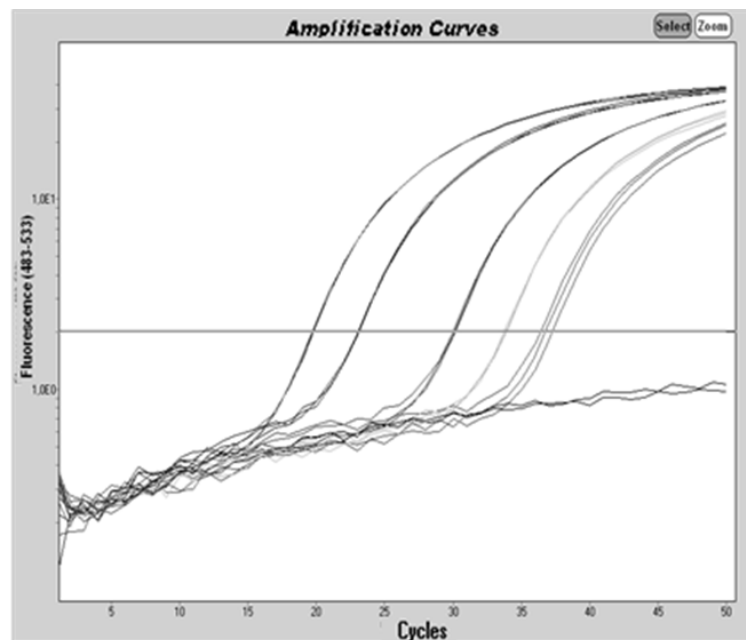
Interpretace výsledků

Princip datové analýzy

Při použití technologie TaqMan se počet cyklů PCR nezbytný pro detekci signálu na prahovou hodnotou nazývá prahový cyklus (CT) a je přímo úměrný množství přítomné cílové látky na počátku reakce.

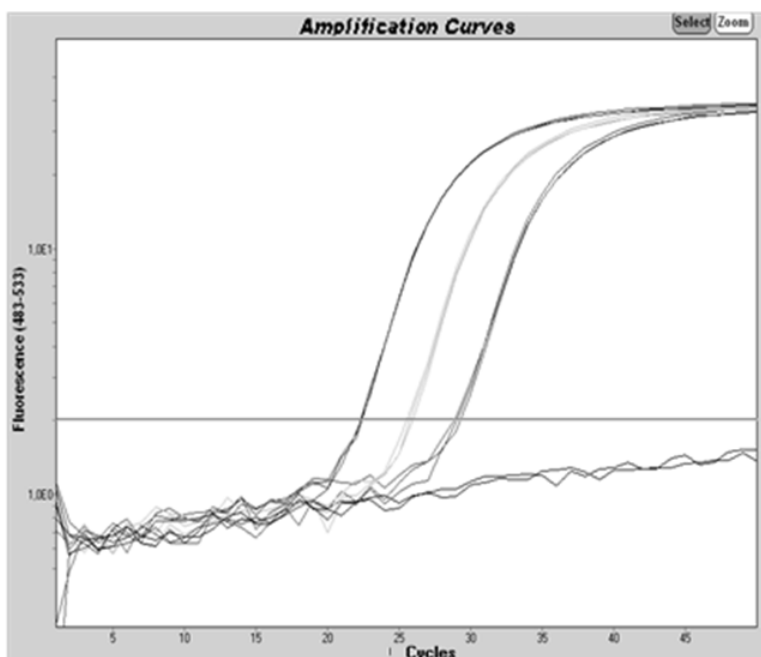
Pomocí standardů se známým počtem molekul můžete vytvořit standardní křivku a stanovit přesné množství cílové látky přítomné v testovacím vzorku. Standardní křivky *ipsogenu* jsou založeny na plazmidech a používáme 3 plazmidová standardní ředění pro kontrolní gen ABL (CG) a 5 standardních ředění pro FG, aby byly zajištěny přesné standardní křivky. Obrázky 8 a 9 ukazují příklad amplifikačních křivek TaqMan získaných pomocí sady *ipsogen* BCR-ABL Mbcr.

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



Obrázek 8. Detekce standardů BCR-ABL Mbcr (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopií/5 μ l.

- ABL 10³
- ABL 10⁴
- ABL 10⁵



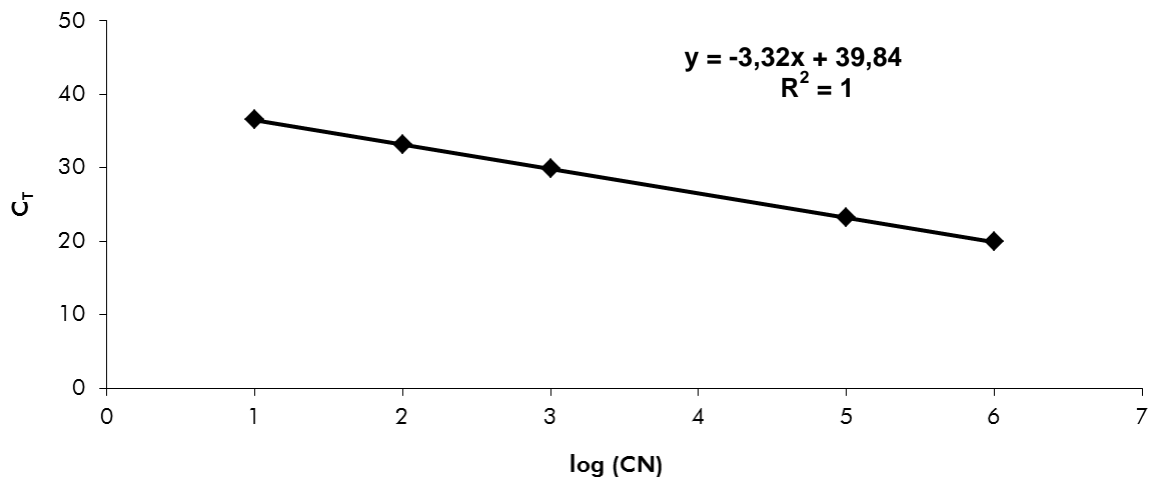
Obrázek 9. Detekce standardů ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴, a 10⁵ kopií/5 μ l.

Výsledky

Standardní křivka a kritéria kvality

Surová data lze pro účely analýzy vložit do souboru Excel[®].

Pro každý gen (ABL a BCR-ABL) se surové hodnoty C_T získané z naředění plazmidových standardů vynáší podle logaritmu počtu kopií (3, 4, a 5 pro C1, C2 a C3; 1, 2, 3, 5 a 6 pro F1, F2, F3, F4 a F5). Obrázek 10 ukazuje příklad teoretické standardní křivky vypočítané ze 5 standardních ředění.



Obrázek 10. Teoretická křivka vypočítaná z 5 standardních ředění. Vypočítá se přímka lineární regrese ($y = ax + b$) pro každý gen (ABL a BCR-ABL), kde a je sklon přímky a b je průsečík s osou y , což je souřadnice y bodu, kdy přímka protíná osu y . Její rovnice a koeficient stanovení (R^2) se vytiskne do grafu.

Jako standardy slouží 10násobná ředění, teoretický sklon křivky je -3,3. Sklon od -3,0 do -3,9 je přijatelný, pokud je $R^2 > 0,95$ (7). Ovšem hodnota $R^2 > 0,98$ je žádoucí pro přesné výsledky (3).

Normalizovaný počet kopií (NCN)

Standardní rovnice křivky ABL by se měla použít pro transformaci surových hodnot C_T (získaných pomocí PPC-ABL) pro neznámé vzorky do počtu kopií ABL (ABL_{CN}).

Standardní rovnice křivky BCR-ABL by se měla použít pro transformaci surových hodnot C_T (získaných pomocí PPF-Mbcr) pro neznámé vzorky do počtu kopií BCR-ABL ($BCR-ABL_{Mbcrcn}$).

Poměr těchto hodnot CN dává normalizovaný počet kopií (NCN):

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

Hodnota MRD

Hodnota minimálního reziduálního onemocnění (MRD) je poměr mezi normalizovanou expresí CG FG v kontrolních $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ a diagnostických vzorcích $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

Citlivost

Citlivost (SENS_v) se vypočítá podle relativní exprese FG při diagnóze (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} a expresi CG (CG_{CN,FUP}) v kontrolním vzorku.

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

Kontrola kvality u hodnot ABL

Špatná kvalita RNA nebo problémy během kroků qPCR má za následek nízký počet ABL_{CN}. Doporučujeme odmítnout výsledky ze vzorků dávající ABL_{CN} <4246,2 (nižší hodnota 95% CI ze vzorků CML pacienta ve studii EAC, odkaz 8).

Reprodukovatelnost mezi replikáty

Variace hodnot C_T mezi replikáty by měla být <2, což odpovídá čtyřnásobné změně hodnot počtu kopií.

Variace hodnot C_T mezi replikáty je obecně <1,5, pokud bude hodnota C_T replikátů <36 (7).

Poznámka: Každý uživatel by měl měřit vlastní reprodukovatelnost ve své laboratoři.

Kontroly vody

Negativní kontroly by měly dávat nulovou CN.

Pozitivní kontrola vody je výsledkem zkřížená kontaminace. Viz “Řešení problémů” níže, kde naleznete řešení.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně informací a protokolu v tomto manuálu nebo přípravy vzorků a jejich technologií rozborů (možnosti navázání kontaktu viz “Kontaktní informace”, strana 47).

Komentáře a návrhy

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) a BCR-ABL Mbc_r ve všech vzorcích — standard je v pořádku

- a) Nízká kvalita RNA Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sadě kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc_r, katalogové číslo 670191) souběžně.
- b) Selhání kroku zpětné transkripce Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sadě kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc_r, katalogové číslo 670191) souběžně.

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) ve vzorcích — standard je v pořádku

- a) Nízká kvalita RNA Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sadě kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc_r, katalogové číslo 670191) souběžně.
- b) Selhání kroku zpětné transkripce Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sadě kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc_r, katalogové číslo 670191) souběžně.

Standardní signál negativní

- a) Chyba pipetování Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Opakujte chod PCR.
- b) Nevhodné uchovávání komponent sady Uchovávejte sadu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc_r při teplotě od –15 do –30°C a chraňte priméry a směsi sond (PPC a PPF) před světlem. Viz “Uchovávání a nakládání s reagensy”, strana 12.
Chraňte před opakovaným zmražením nebo roztavením.
Alikvotní reagensie pro uchovávání

Komentáře a návrhy

Negativní kontroly jsou pozitivní

- Křížové kontaminace Vyměňte všechny kritické reagensy.
Zopakujte experiment s novými alikvotními množstvími všech reagensů.
Vždy nakládejte se vzorky, komponenty sady a spotřební materiály ve shodě s běžně přijatou praxí, aby se zabránilo kontaminaci přenosem.

Nulový signál i u standardních kontrol

- a) Chyba pipetování nebo vynechané reagensy. Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Opakujte chod PCR.
- b) Inhibiční účinky materiálu vzorku způsobené nedostatečným čištěním Zopakujte přípravu RNA
- c) LightCycler: Vybrán nesprávný detekční kanál Zadejte nastavení kanálu na F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Snímání dat nebylo naprogramováno Zkontrolujte programy cyklu.
Zkontrolujte režim snímání "jednotlivý" na konci každého segmentu snímání programu PCR.

Nepřítomný nebo nízký signál u vzorků, ale standardní kontroly jsou v pořádku.

- a) Nízká kvalita RNA nebo nízká koncentrace Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sada kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc, katalogové číslo 670191) souběžně.
- b) Selhání kroku zpětné transkripce Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sada kontrol *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc, katalogové číslo 670191) souběžně.

Komentáře a návrhy

Intenzita fluorescence je příliš nízká

- a) Nevhodné uchovávání komponent sady Uchovávejte sadu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr při teplotě od -15 do -30°C a chraňte priméry a směsi sond (PPC a PPF) před světlem. Viz "Uchovávání a nakládání s reagensy", strana 12.
- Chraňte před opakovaným zmražením nebo roztavením.
- Alikvotní reagensie pro uchovávání
- b) Velmi nízké výchozí množství cílové RNA Zvětšete množství RNA vzorku
- Poznámka:** V závislosti na zvolené metodě přípravy RNA se mohou vyskytnout inhibiční účinky.

LightCycler: Intenzita fluorescence se mění

- a) Chyba pipetování Proměnlivost způsobená tzv. "chybou pipetování" lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.
- b) Nedostatečná centrifugace kapilár Připravená směs PCR může být stále přítomna v horní části kapiláry nebo může dojít k zachycení vzduchové bubliny v hrotu kapiláry.
- Vždy centrifugujte kapiláry na plněné reakční směsi, jak je to popsáno v konkrétní provozní příručce přístroje.
- c) Vnější povrch hrotu kapiláry je znečištěn Při manipulaci s kapilárami vždy noste rukavice.

LightCycler: Chyba standardní křivky

- Chyba pipetování Proměnlivost způsobená tzv. "chybou pipetování" lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.

Řízení jakosti

Na přístroji LightCycler 480 proveďte řízení jakosti úplné sady. Tato sada se vyrábí podle normy ISO 13485:2003. Certifikáty o analýze jsou k dispozici na požádání na adrese www.qiagen.com/support/.

Omezení

Uživatelé musí být školeni a obeznámeni s touto technologií před použitím tohoto zařízení.

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů. Uživatel odpovídá za validaci chování systému v souvislosti s jakýmkoliv postupy použitými v jeho laboratoři, které nejsou zahrnuty do studií chování QIAGEN.

Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagenty s prošlou trvanlivostí.

Poznámka: Sada byla navržena podle studií "Europe Against Cancer" (EAC - Evropa proti rakovině) (8) a je ve shodě s aktualizovanými mezinárodními doporučeními (3, 5). Měla by se použít podle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými reagenty a přístroji (viz "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky", strana 10). Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo schválené indikace a/nebo úprava komponent zneplatní závazky QIAGEN.

Výkonnostní charakteristiky

Neklinické studie

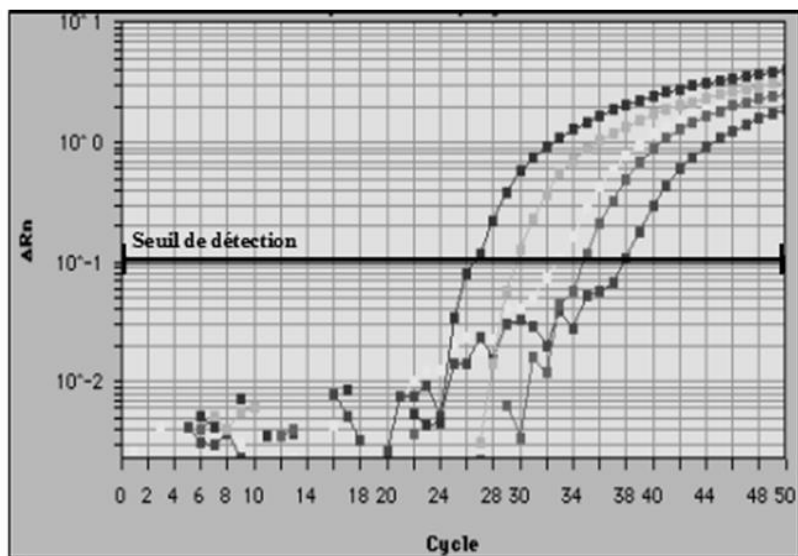
Materiály a metody

Hodnocení výkonů bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinaci s reagenty uvedenými na seznamu v "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky", strana 10. Studie ekvivalence validovaly její použití pro následující přístroje: ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, přístroj Rotor

Ke zjištění analytické výkonnosti sady *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr byly provedeny neklinické studie. Tyto neklinické laboratorní studie byly provedena na celkové RNA z buněčné linie K562 naředěné konstantním konečným množstvím celkové RNA buněčné linie MV4-11.

Pro stanovení opakovatelnosti analýzy bylo analyzováno 5 různých koncentrací celkové RNA K562 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg a 0,5 pg) naředěné v celkové RNA MV4-11 v konstantním konečném celkovém množství 200 ng v 5 replikátech na běh a ve 4 různých bězích (obrázek 11).

- K562 $2,5 \times 10^{-2}$
- ▣ K562 $2,5 \times 10^{-3}$
- K562 $2,5 \times 10^{-4}$
- K562 $2,5 \times 10^{-5}$
- K562 $2,5 \times 10^{-6}$



Obrázek 11. Vynesení amplifikací ředění $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng) a $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng), $2,5 \times 10^{-5}$ (0,005 ng) a $2,5 \times 10^{-6}$ (0,0005 ng) celkové RNA K562 v negativní celkové RNA MV4-11.

Analytické údaje

Tabulky 17-20 ukazují analýzy jednotlivých rozborů s průměrným prahovým cyklem, (C_T), směrodatnou odchylkou (SD), počtem vzorků (n), variačním koeficientem (CV), průměrným počtem kopií (CN) a průměrným normalizovaným počtem kopií (NCN).

Tabulka 17. Analýza jednotlivých rozborů — Mbcr BCR-ABL buněčných linií a ABL

Buněčná linie	Ředění	Průměrný C_T	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	32,62	0,62	20	1,91
ABL	–	23,59	0,20	95	0,83

Tabulka 18. Analýza jednotlivých rozborů — plazmidy

Gen	Plazmid	Průměrný C _T	SD	n	CV (%)
BCR- ABL Mbcr	F1 (10 ¹ kopií)	34,47	1,25	8	3,64
	F2 (10 ² kopií)	31,48	0,54	8	1,71
	F3 (10 ³ kopií)	28,17	1,11	7	3,95
	F4 (10 ⁵ kopií)	21,20	0,65	8	3,06
	F5 (10 ⁶ kopií)	18,22	0,09	6	0,49
ABL	C1 (10 ³ kopií)	28,47	0,34	8	1,18
	C2 (10 ⁴ kopií)	25,25	0,31	8	1,22
	C3 (10 ⁵ kopií)	21,92	0,70	8	3,19

Tabulka 19. Analýza jednotlivých rozborů — Mbcr buněčných linií BCR-ABL a ABL (průměrný CN)

Buněčná linie	Ředění	Průměrný CN	SD	n	CV (%)
BCR- ABL Mbcr	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	4134,27	2512,40	20	60,77
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL	–	33.831,51	13.637,7	94	40,31

Tabulka 20. Analýza jednotlivých rozborů — Mbcr buněčných linií BCR-ABL (průměrný NCN)

Buněčná linie	Ředění	Průměrný NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

* Pouze pro tyto studijní výsledky se NCN udává jako $\frac{Mbcr_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$.

Klinické studie

Hodnocení výkonů bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinaci s reagensy uvedenými na seznamu v “Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky”, strana 10. Studie ekvivalence validovaly její použití pro následující přístroje: Přístroje ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, přístroj Rotor

Skupina 26 laboratoří v 10 evropských zemích organizovaných v rámci koordinovaného postupu Evropa proti rakovině (EAC) použila plazmidy poskytnuté IPSOGEN ke zjištění standardizovaného protokolu pro analýzu qPCR hlavních genů fúze (FG) spojované s leukémií v klinickém nastavení. Transkript BCR-ABL p210 byl jedním z genů fúze (FG) zařazených do studie. Předkládáme zde souhrn této validační studie; plné výsledky byly zveřejněny (8, 10).

Mezilaboratorní reprodukovatelnost pro plazmidové standardy CG a FG

Jedenáct laboratoří provedlo experiment mezilaboratorní reprodukovatelnosti s cílem vyhodnotit variabilitu měření standardních ředění plazmidů CG a FG. Ředění byla prováděna v každém zařízení dvojmo. Tabulka 21 uvádí průměr, směrodatnou odchylku a CV (%) pro každé ředění.

Tabulka 21. Mezilaboratorní reprodukovatelnost pro plazmidové standardy CG a FG

Gen	Ředění	Průměr	C _T SD	CV (%)
Kontrolní gen ABL	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
Gen fúze BCR-ABL p210	F1	41,11	2,26	5,50
	F2	37,43	1,51	4,04
	F3	33,76	1,28	3,81
	F4	26,50	1,03	3,90
	F5	22,98	0,97	4,21

Hodnoty exprese transkriptu FG BCR-ABL Mbc

Tabulky 22 a 23 ukazují hodnoty exprese transkriptu FG BCR-ABL Mbc a ABL CG pro buněčnou linii K562, pacienti CML a ALL při diagnóze a normální pacienti.

Tabulka 22. Hodnoty exprese transkriptu FG BCR-ABL Mbc a hodnoty ABL CG — C_T

	Hodnoty C _T (95% rozsah)	
	BCR-ABL Mbc	ABL
Buněčná linie 562	20,5	20,7
Vzorky pacientů CML		
BM (n = 15)	25,1 (21,5-27,0)	25,2 (20,7-26,8)
PB (n = 14)	23,1 (21,9-25,8)	23,7 (22,6-26,7)
Vzorky pacientů ALL		
BM a PB (n = 17)	24,1 (21,5-29,9)	24,0 (21,6-26,4)
Negativní vzorky pacientů		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68-26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83-25,48)

Tabulka 23. Hodnoty exprese transkriptu FG BCR-ABL Mbcr a hodnoty ABL CG — CN a poměru

	Hodnoty CN (95% rozsah)		Hodnoty poměru (95% rozsah)*
	BCR-ABL Mbcr	ABL	CN BCR-ABL Mbcr/CN ABL
Vzorky pacientů CML			
BM (n = 15)	8710 (2089-112.202)	10 115,8 (4786,3-37.153,52)	0,86 (0,44-3,02)
PB (n = 14)	17.783 (2042-112.202)	15 237 (4246,2-25.568,3)	1,17 (0,48-4,41)
Negativní vzorky pacientů			
BM (n = 26)	–	19 201 (12.922-25.480)	–
PB (n = 74)	–	21 136 (17.834-24.437)	–

* Výsledky jsou vyjádřeny jako jednoduché poměry BCR-ABL/ABL.

Hodnoty ABL C_T se mezi normálními a leukémickými vzorky významně nelišily, a to ani mezi typy vzorků (PB nebo BM) nebo mezi leukémickými vzorky (ALL, AML, CML).

Míry výskytu falešně pozitivní a falešně negativních vzorků

Míry výskytu falešně negativních a falešně pozitivních vzorků byly vypočítány pomocí následujících kontrol.

- Pozitivní kontroly: Buňky K562, buněčná linie dobře známá pro svoji pozitivitu pro gen fúze BCR
- Negativní kontroly: Negativní vzorky RNA, kontroly bez amplifikace (NAC) získané z RNA *E. coli* namísto humánní RNA pro kontrolu kontaminace PCR a beztemplátové kontroly (NTC), které obsahovaly vodu místo lidské RNA

Amplifikace na vzorcích RNA FG byla prováděna trojmo a dvojmo pro CG.

Falešně negativní vzorek byl definován jako pozitivní RNA vzorek s méně než 50 % pozitivních jamek (0/2, 0/3 nebo 1/3).

Falešně pozitivní vzorek byl definován jako negativní vzorek s méně než 50 % pozitivních jamek (1/2, 2/3 nebo 3/3).

Tabulka 24 ukazuje počet a procentuální podíl falešně negativních a falešně pozitivních vzorků.

Tabulka 24. Falešně negativní a falešně pozitivní vzorky

Falešná negativita		Falešná pozitivita	
10^{-3}	10^{-4}	Negativní kontrola FG	NAC/NTC
0 % (0/33)	6,1% (2/33)	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)

Literatura

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu, atd.

Úplný seznam literatury naleznete v databance "QIAGEN Reference Database" na stránce www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo kontaktujte technický servis QIAGEN nebo Vašeho místního distributora.

Citovaná literatura

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
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. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
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. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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

Na obalech a štítcích se mohou objevit následující symboly:



Obsahuje reagentie pro <N> reakcí



Použijte do



Prostředky zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Teplotní rozmezí



Výrobce



Další informace viz návod k použití

Kontaktní informace

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na adrese www.qiagen.com/Support, volejte 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení QIAGEN nebo naše místní distributory (viz poslední stránka obalu nebo navštivte www.qiagen.com).

Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (24)	Pro 24 reakcí: Standardy genu kontroly ABL, standardy genu fúze BCR-ABL Mbc, priméry a směs sond ABL, priméry a směs sond genu fúze BCR-ABL Mbc	670123
Rotor-Gene Q MDx — pro analýzu PCR v reálném čase validované IVD v klinických aplikacích		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklovač PCR v reálném čase a analyzátor taveniny s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, nachový) plus kanál HRM, laptop, software, příslušenství, 1letá záruka na díly a práci, instalace a školení není zahrnuto	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR cyklér pracující v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt - HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus HRM kanál, notebook počítač, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis včetně instalace a školení	9002033
Sada kontrol <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc — pro kvalitativní validaci extrakce RNA a reverzní transkripce genu fúze BCR-ABL Mbc		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Buněčné linie s negativní, vysokou a nízkou pozitivní expresí genu fúze BCR-ABL Mbc	670191

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro. *Produkty ipsogen* se nesmí dále prodávat, upravovat pro další prodej nebo používat k výrobě komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti QIAGEN.

Informace v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího oznámení. QIAGEN nepřebírá žádnou odpovědnost za žádné chyby, které se mohou v tomto dokumentu objevit. Má se za to, že tento dokument je v době zveřejnění úplný a přesný. V žádném případě nebude QIAGEN odpovídat za náhodné, zvláštní, násobné nebo následné škody související s používáním tohoto dokumentu nebo z něho vyplývajících.

Produkty *ipsogen* mají záruku na dodržení pro ně stanovených technických parametrů. Výlučný závazek QIAGEN a výlučný opravný prostředek zákazníka se omezuje na náhradu výrobků zdarma v případě, že se výrobky nebudou chovat podle záruky.

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).

Omezená licenční smlouva

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr souhlas s následujícími podmínkami:

1. Sada *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr smí být používána výhradně v souladu s *Příručkou sady ipsogen BCR-ABL1 Mbcr* a pouze s komponentami obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění příložených komponent sady s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v *Příručce sady ipsogen BCR-ABL1 Mbcr* a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její díly jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracována ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může zakazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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

