

ipsogen[®] WT1 Profile*Quant*[®] Kit (ELN*) El Kitabı



Versiyon 1

IVD

Kantitatif in vitro tanı amaçlı

Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System ve LightCycler[®] cihazlarıyla kullanılmak üzere



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R2

MAT

1072503TR

ELN LeukemiaNet[®]
European



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN her biyolojik örneğin içeriğinin saptanması ve izolasyonunu mümkün kılacak şekilde yenilikçi örnek ve tahlil teknolojilerinin önde gelen sağlayıcısıdır. Gelişmiş ve yüksek kalitede ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca kadar başarıyı garanti eder.

QIAGEN şunlarda standartları belirler:

- DNA, RNA ve protein saflaştırma
- Nükleik asit ve protein tahlilleri
- mikroRNA araştırmaları ve RNAi
- Örnek ve tahlil teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz olağanüstü başarılar elde etmenizi ve yeni buluşlar yapmanızı sağlamaktır. Daha fazla bilgi için www.qiagen.com adresini ziyaret ediniz.

İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	4
Prosedür Prensipleri	5
Sağlanan Materyaller	8
Kit içeriği	8
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller	9
Uyarılar ve Önlemler	10
Genel önlemler	10
Reaktif Saklama ve Kullanma	11
Prosedür	12
Örnek RNA'sı hazırlama	12
Protokol: Önerilen standardize EAC ters transkripsiyonu	12
Protokol: 72 tüplük rotorlu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazlarında qPCR	15
Protokol: ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ve LightCycler 480 cihazında qPCR	19
Protokol: LightCycler 1.2 cihazında qPCR	24
Sonuçların Yorumlanması	28
Veri analiz prensibi	28
Sonuçlar	29
Sorun giderme kılavuzu	30
Kalite Kontrol	34
Sınırlamalar	34
Performans Özellikleri	34
Klinik olmayan çalışmalar	34
Klinik çalışmalar	36
Referanslar	39
Semboller	40
İletişim Bilgileri	41
Sipariş Bilgileri	42

Kullanım Amacı

ipsogen WT1 ProfileQuant Kit, akut miyeloid lösemi (Acute Myeloid Leukemia, AML) hastalarından izole edilen total RNA'da bulunan Wilm tümörü (Wilm's Tumor, WT) gen transkriptlerinin kantifikasyonuna yöneliktir. Elde edilen sonuçların, erken tedavi yanıtının izlenmesinde ve minimal rezidüel hastalıkta (Minimal Residual Disease, MRD) yardımcı olması amaçlanmıştır.

Özet ve Açıklama

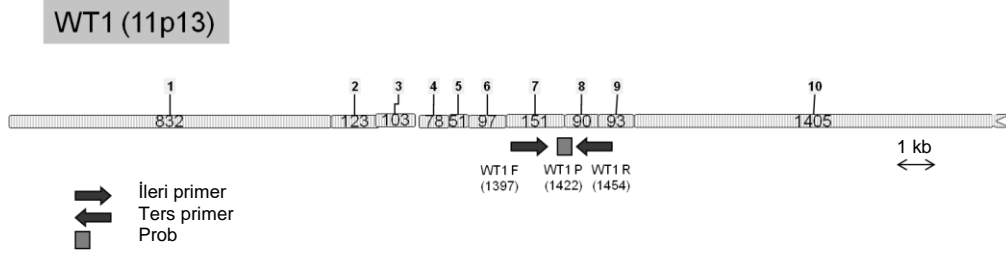
Akut miyeloid lösemiye (AML) yönelik mevcut tedavi protokolleri, tedavi katmanlandırmasına katkıda bulunan prognostik faktörlere dayalıdır (1, 2). Şu ana kadar tanımlanan temel prognostik faktörler arasında, yaş ve lökosit (White Blood Cell, WBC) sayımı gibi ön tedavi karakteristiklerinin yanı sıra, hasta karyotipi ve FLT3 ile NPM1 gibi spesifik genomik mutasyonların varlığı yer almaktadır (3, 4). İndüksiyon kemoterapisine verilen morfolojik yanıt, özellikle allojenik nakil olmak üzere konsolidasyon tedavisine ilişkin kararları yönlendirmede kullanılan mevcut risk katmanlandırma planlarına dahil edilen, ileri bir öngörücü faktör sağlar (5). Bu parametreler geniş ölçüde farklı nüksetme riskindeki hasta gruplarını ayırt etse de, nakilden faydalanma olasılığı en yüksek (veya en düşük) hastaları daha güvenilir bir şekilde belirlemek için risk katmanlandırmasını daha ayrıntılı hale getirmek zorunludur. Bir takım çalışmalarda, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) ile MRD izlemesinin, lösemiye özgü hedefler olan PML-RARA, CBFB-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) gibi füzyon geni (FG) transkriptlerini veya NPM1 gibi spesifik genlerdeki mutasyonları saptama potansiyelinin altı çizilmiştir. Bu yöntem, nüksetme riski en yüksek olan hastaların belirlenmesini sağlar ve dolayısıyla, erken tedavi müdahalesine uygun adayları belirler (6).

AML hastalarının yaklaşık yarısında, uygun bir lösemiye özgü hedef bulunmamaktadır ve MRD izlemesinin hastaların çok daha büyük bir kısmında uygulanmasını sağlayacak alternatif yaklaşımlar geliştirme konusuna oldukça ilgi gösterilmektedir. Stratejilerden birinde, lösemi ile ilişkili anormal fenotipleri tanımlamak ve izlemek için akış sitometrisi kullanılmaktadır. Bu strateji her ne kadar geniş bir uygulama alanına sahip olsa da teknik açıdan zahmetlidir (6). Diğer bir yaklaşımda ise, AML blastlarında normal kan ve iliğe göre oldukça fazla eksprese edilen transkriptleri saptamak için qPCR kullanımını söz konusu olup bu stratejide en çok *WT1* genine odaklanılmaktadır (6).

WT1 geni 11p13 kromozomunda bulunur, bir çinko parmak transkripsiyon faktörünü kodlar ve orijinal olarak, Wilm tümörünün patojenezindeki rolü sayesinde tanımlanmıştır (7). *WT1* geninin, AML dahil olmak üzere çeşitli hematopoetik tümörlerde oldukça fazla eksprese olduğu görülmüştür (7, 8). *WT1*'in aşırı ekspresyonuna yol açan mekanizmalar yeterince anlaşılmamış olsa da, bu olgudan lösemik hematopoezin varlığına, persistansına veya yeniden ortaya çıkmasına işaret eden bir belirteç olarak faydalanılabilir.

Prosedür Prensibi

qPCR tekniği, PCR amplifikasyon işleminin eksponansiyel fazı sırasında PCR ürünlerinin doğru kantifikasyonunu mümkün kılar. qPCR verileri, PCR sonrası işleme yapılmaksızın, PCR döngüsü esnasında ve/veya sonrasında floresan sinyallerinin gerçek zamanlı saptanmasıyla hızlıca elde edilebilir ve bu sayede PCR ürün kontaminasyonu riski önemli ölçüde azalır. Mevcut durumda, 3 ana tipte qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Green I Dye kullanılarak qPCR analizi, hidroliz problemleri kullanılarak qPCR analizi ve hibridizasyon problemleri kullanılarak qPCR analizi.

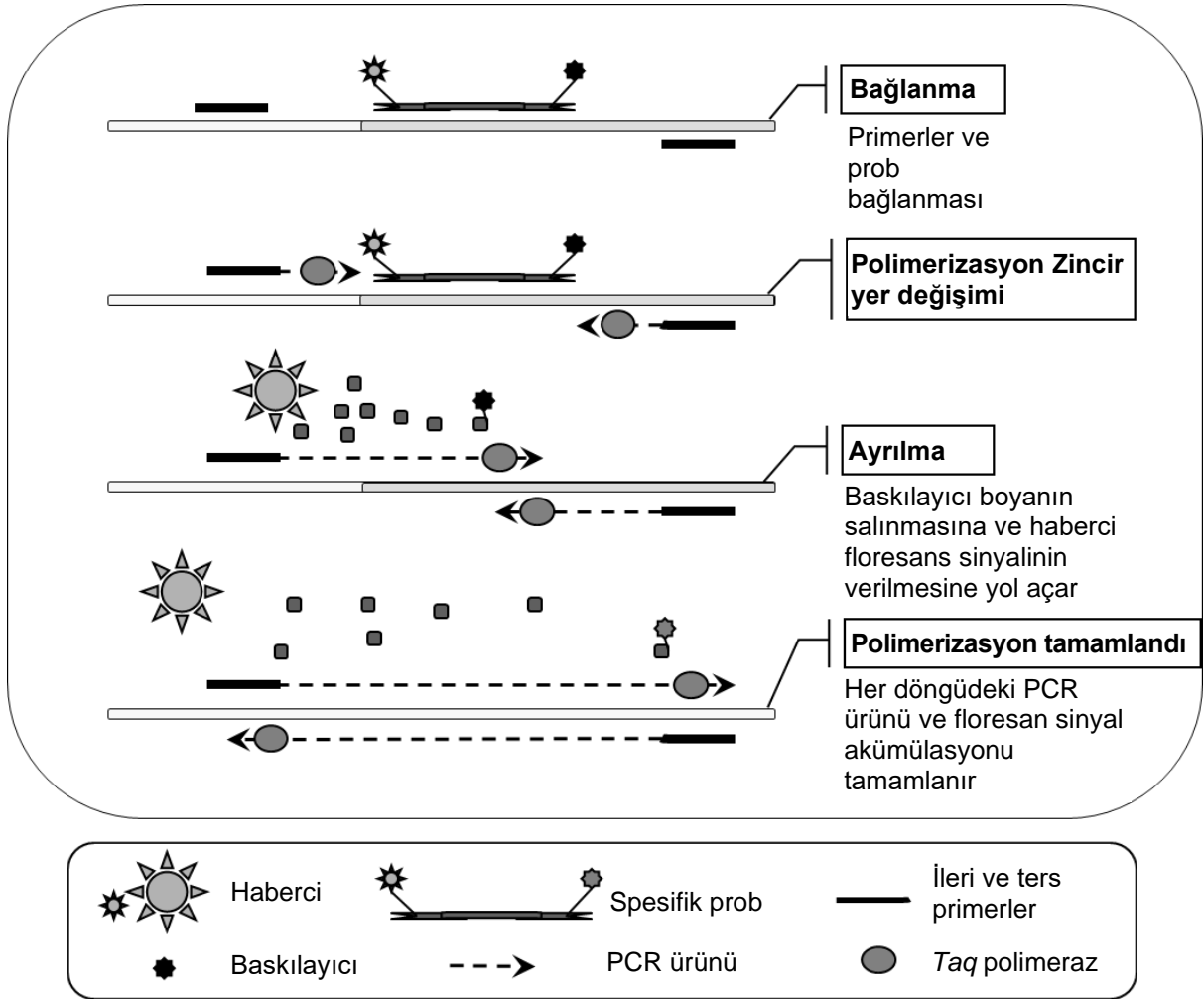


Şekil 1. ELN qPCR primerleri ve prob setinin kapsadığı WT1 transkriptinin şeması: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R. Primerler ve prob altındaki sayı, normal gen transkriptindeki nükleotid pozisyonuna karşılık gelir. Ekson 5, alternatif olarak birleştirilebilir.

Bu tahlil, qPCR çift boyalı oligonükleotid hidroliz prensibini kullanmaktadır. PCR esnasında, ileri ve ters primerler belirli bir sırada hibridize olur. Bu karışıma çift boyalı oligonükleotid dahil edilir. 5' haberci boya ve aşağı yönde 3' baskılayıcı boya ile etiketlenen oligonükleotidden oluşan bu prob, PCR ürünü içindeki bir hedef sekansa hibridize olur. Hidroliz probu qPCR analizi, *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerazının 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinden faydalanır. Prob intakt durumdayken, haberci boyanın baskılayıcı boyaya olan yakınlığı, haberci boyanın birincil olarak Förster tipi enerji transferi tarafından baskılanmasına yol açar.

PCR esnasında, ilgilenilen hedef mevcutsa, prob, ileri ve ters primer alanlarını spesifik olarak bağlar. Yalnızca probun hedefe hibridize olması durumunda, DNA polimerazının 5'→3' ekzonükleaz etkinliği, haberci boya ile baskılayıcı boya arasındaki probu ayırır. Ardından prob parçaları hedeften ayrılır ve zincirin polimerizasyonu devam eder. Probun 3' ucu PCR sırasında probun uzamasını önlemek üzere bloke edilir (Şekil 2). Bu süreç her döngüde gerçekleşir ve ürünün eksponansiyel akümüülasyonuna engel olmaz.

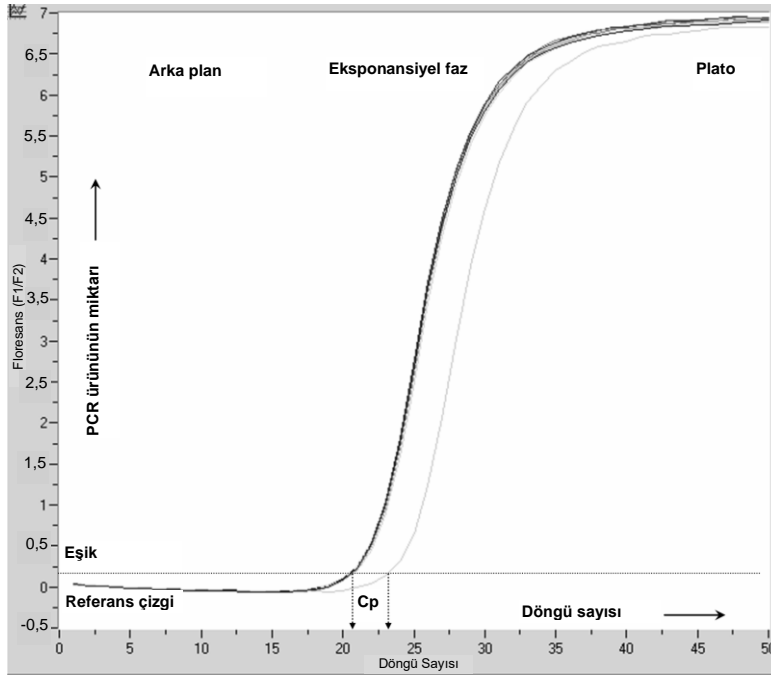
Floresan sinyaldeki artış, yalnızca hedef sıralamanın probu tamamlayıcı nitelikte olması ve bu sayede PCR esnasında amplifiye edilmesi durumunda algılanır. Bu gereklilikler nedeniyle spesifik olmayan amplifikasyon saptanmaz. Yani, floresan artışı, PCR esnasındaki hedef amplifikasyonu ile doğru orantılıdır.



Şekil 2. Reaksiyon prensibi. Total RNA ters transkripsiyona uğrar ve oluşan cDNA, PCR ile bir çift spesifik primer ve spesifik internal çift boya probu (FAM™–TAMRA™) kullanılarak amplifiye edilir. Prob, PCR işleminin her bağlama adımında amplicona bağlanır. Taq, amplicona bağlı primerden uzayarak çıktığında, probun 5' ucunu yerinden çıkarır ve ardından bu uç, Taq DNA polimerazının 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi ile parçalanır. Probun kalanı ampliconu eriterek bitirinceye kadar ayrılma devam eder. Bu işlem florofor ve baskılayıcının solüsyona salımını sağlar, bunları uzamsal olarak ayırır ve FAM'dan floresans artmasına ve TAMRA'dan floresans azalmasına neden olur.

Şekil 3'te, döngü sayısına karşı floresansın çizildiği grafikte, PCR ürününün akümülyasyonu gösterilmektedir. Bu amplifikasyon eğrisi sırasıyla, erken bir arka plan fazından (cihazın saptama seviyesinin altında), eksponansiyel bir fazdan (veya logaritmik faz) ve bir plato fazından oluşur. En doğru kantitatif tayin, yalnızca eksponansiyel faz sırasında yapılabilir. Cihazın, amplifikasyonun ürettiği floresansın arka plan sinyalinin üzerinde olduğunu ayırt edebildiği ilk döngü eşik döngüsü (Threshold Cycle, C_T) veya çapraz geçiş noktası (Crossing Point, C_P) olarak adlandırılır. Floresans yoğunluğu, eksponansiyel fazdaki PCR ürününün miktarıyla doğru orantılı olduğundan, eşik logaritmik lineer fazın içinde seçerek, ilk başlangıç moleküllerinin gerçek miktarını hesaplamak mümkündür.

Plato fazı sırasında, PCR ürünü miktarında kayda değer bir artış gerçekleşmez. Bunun asıl nedeni, PCR bileşenlerinin tükenmesi ve son ürünlerin yüksek konsantrasyonu nedeniyle PCR ürünü ipliklerinin yeniden bağlanması, böylece daha fazla primer bağlanmasının engellenmesidir.



Şekil 3. Döngü ve amplifikasyonun ardışık fazları sırasında floresans edinimi.

Kantitatif verilerin analizine yönelik en doğrudan ve kesin yaklaşım, bilinen konsantrasyonda kontrol şablonunun bir dilüsyon serisinden hazırlanan bir standart eğri kullanmaktır. Bu yöntem, "standart eğri ile" veya "mutlak" kantifikasyon olarak bilinir. Standart dilüsyon serisinin amplifikasyonunun ardından, ilk şablon kopya sayısının log değerinin, her bir dilüsyon için üretilen C_p değerine karşı grafiği çizilerek standart eğri oluşturulur. Bu noktalar grafiğe döküldüğünde standart eğri ortaya çıkar. Bu standart eğrinin denklemi kullanılarak, kantifikasyonu yapılacak örneklerin ilk kopya sayısı belirlenebilir.

WT1 ProfileQuant Kit (ELN), WT1 ve ABL için belirli plazmidler ile primer ve prob karışımları içerir. Bu bileşenler, European Leukemia Net konsorsiyumundan bir grup uzman liderliğinde yürütülen ortak bir çalışma bağlamında, bir arada onaylanmıştır. Van Dijk ve meslektaşları tarafından önceden yayınlanan tahlil, performans bakımından sürekli olarak diğer tahlillerin önüne geçmiştir ve konfigürasyonu sayesinde AML'de mutasyonlara yatkınlığı daha azdır (9). Sonuç olarak bu tahlil, ELN WT1 tahlili olarak seçilmiştir. *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit bu tekniği temel alır. Bu kitte, bir endojen kontrol (ABL transkripti), örnekten ve WT1 transkriptinden amplifiye edilir. Kontrolün ve WT1 cDNA'sının standart seri dilüsyonları sağlanır ve oluşturulan standart eğriler, her bir örnekteki WT1 transkriptlerinin ve ABL'nin kopya sayısının doğru hesaplanmasını sağlar.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

ipsogen WT1 ProfileQuant Kit		(24)
Katalog no.		676923
Reaksiyon sayısı		24
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyonu) (10 ³ kopya/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyonu) (10 ⁴ kopya/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL Kontrol Geni Standart Dilüsyonu) (10 ⁵ kopya/5 µl)	C3-ABL	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 Profil Geni Standart Dilüsyonu) (10 ¹ kopya/5 µl)	P1-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 Profil Geni Standart Dilüsyonu) (10 ² kopya/5 µl)	P2-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 Profil Geni Standart Dilüsyonu) (10 ³ kopya/5 µl)	P3-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 Profil Geni Standart Dilüsyonu) (10 ⁵ kopya/5 µl)	P4-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 Profil Geni Standart Dilüsyonu) (10 ⁶ kopya/5 µl)	P5-WT1	50 µl
Primerler ve Prob Karışımı ABL*	PPC-ABL 25x	90 µl
Primerler ve Prob Karışımı PPP-WT1 (ELN) [†]	PPP-WT1 (ELN) 25x	110 µl
ipsogen <i>WT1 ProfileQuant Kit El Kitabı (İngilizce)</i>		1

* ABL kontrol geni (control gene, CG) için spesifik ters ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM-TAMRA probunun karışımı.

[†] WT1 (ekson 1-2) geni için spesifik ters ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM-TAMRA probunun karışımı.

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

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden edinebileceğiniz uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun.

Reaktifler

- Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su
- Ters transkripsiyon reaktifleri: Onaylanmış reaktif Superscript® II (veya Superscript) Reverse Transcriptase'dir, 5x birinci iplik tamponu, 100 mM DTT içerir (Life Technologies, kat. no. 18064-022)
- RNaz inhibitörü: Onaylanmış reaktif RNaseOUT™'dir (Life Technologies, kat. no. 10777-019)
- dNTPs Seti, PCR sınıfı
- Rastgele heksamer
- MgCl₂
- Tampon ve Taq DNA polimeraz: Onaylanmış reaktifler TaqMan® Universal PCR Master Mix (Ana Karışım PCR 2x) (Life Technologies, kat. no. 4304437) ve LightCycler TaqMan Master'dır (Ana Karışım PCR 5x) (Roche, kat. no. 04535286001)

Sarf Malzemeleri

- Nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril hidrofobik filtreli PCR pipeti uçları
- 0,5 ml veya 0,2 ml RNaz ve DNaz içermeyen PCR tüpleri
- Buz

Ekipman

- PCR için özel mikrolitre pipet* (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- 0,2 ml/0,5 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu ve maksimum 13.000-14.000 rpm hıza sahip masaüstü santrifüj*
- Real-time PCR cihazı:* Rotor-Gene Q 5plex HRM® veya diğer Rotor-Gene cihazı; LightCycler 1.2 veya 480; veya ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ve ilgili spesifik materyal
- Isıl döngüleyici* veya su banyosu* (ters transkripsiyon adımı)

Not: Isıl döngüleyici veya su banyosunun üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

Uyarılar ve Önlemler

In vitro tanı amaçlı kullanım içindir

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

Örnek ve tahlil atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize uygun olarak atın.

Genel önlemler

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

Bu kitin in vitro tanı amaçlı kullanım için olması amaçlanmıştır. Bu kit içinde sağlanan reaktifler ve talimatlar optimum performans için onaylanmıştır. Reaktiflerin daha fazla seyreltilmesi ya da inkübasyon sürelerinin ve sıcaklıklarının değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir. PPC-ABL ve PPP-WT1 reaktifleri ışığa maruz bırakılırsa değişime uğrayabilir. Tüm reaktifler özellikle bu test için formüle edilmiştir. Testin en iyi performansı için hiçbir değişim yapılmamalıdır.

qPCR kullanılarak transkript seviyelerinin belirlenmesi hem mRNA ters transkripsiyonu hem de oluşan cDNA'nın PCR ile amplifikasyonunu gerektirir. Bu nedenle, tahlil prosedürünün tamamı RNaz/DNaz içermeyen koşullarda gerçekleştirilmelidir.

Aşağıdakilerin önlenmesine çok dikkat edin:

- Kalıp mRNA'nın veya üretilmiş cDNA'nın degradasyonuna neden olabilecek RNaz/DNaz kontaminasyonu
- Yalancı pozitif sinyalle sonuçlanan mRNA veya PCR taşınma kontaminasyonu

Bu nedenle aşağıdakileri öneririz.

- Tahlili gerçekleştirirken nükleaz içermeyen laboratuvar gereçleri (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve eldiven takın.
- Örneklerin ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek adına tüm pipetleme adımları için yeni aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- Ön PCR ana karışımını özel materyalle (pipetler, uçlar vb.), DNA matrikslerinin (cDNA, DNA, plazmid) giremeyeceği özel bir alanda hazırlayın. Şablonu ayrı bir bölgede (tercihen farklı bir odada) spesifik materyaller (pipetler, uçlar vb.) kullanarak ekleyin.
- Standart dilüsyonları (C1–3 ve P1–5) ayrı bir odada kullanın.

Reaktif Saklama ve Kullanma

Kitler kuru buzda gönderilir ve teslim alındıktan sonra -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklanmalıdır.

- Primerler ve prob karışımlarının (PPC ve PPP tüpleri) ışığa maruz kalmasını en aza indirin.
- Açmadan önce tüpleri yavaşça karıştırın ve santrifüje edin.
- Tüm kit bileşenlerini orijinal kaplarında saklayın.

Bu saklama koşulları hem açılmış hem açılmamış bileşenler için geçerlidir. Etiket üzerinde belirtilenlerin dışındaki koşullarda saklanan bileşenler düzgün çalışmayabilir ve tahlil sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.

Her bir reaktif için son kullanma tarihleri kendi bileşen etiketleri üzerinde belirtilmiştir. Doğru saklama koşulları altında ürün, performansını etikette yazılı son kullanma tarihine kadar korur.

Bu ürünün instabilitesini belirten hiçbir belirgin işaret yoktur. Ancak, pozitif ve negatif kontroller bilinmeyen numunelerle aynı anda çalışılmalıdır.

Prosedür

Örnek RNA'sı hazırlama

Hasta örneklerinden (kan veya kemik iliği) RNA hazırlığı, onaylanmış bir prosedür kullanılarak yapılmış olmalıdır. Tahlilin kalitesi büyük ölçüde giriş RNA'sının kalitesine bağlıdır. Bu nedenle saflaştırılmış RNA'yı agaroz* jel elektroforezi ile veya analiz öncesinde Agilent® Bioanalyzer® kullanarak nitelemenizi öneririz.

Protokol: Önerilen standardize EAC ters transkripsiyonu

Başlamadan önce yapılacaklar

- dNTP'leri hazırlayın (her birinden 10 mM). Alikotlar halinde –20°C'de saklayın.
- Rastgele heksamer hazırlayın (50 mM). Alikotlar halinde –20°C'de saklayın.
- MgCl₂ hazırlayın (50 mM). Alikotlar halinde –20°C'de saklayın.

Prosedür

1. Tüm gerekli bileşenleri çözdürün ve buza yerleştirin.
2. 1 µg RNA'yı (1–4 µl) 70°C'de 10 dakika inkübe edin ve hemen buz üzerinde 5 dakika soğutun.
3. Sıvıyı tüpün alt kısmında toplamak için kısa süre santrifüje edin (yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Ardından buz üzerinde tutun.
4. Aşağıdaki RT karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın (Tablo 1).

* Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın.

Tablo 1. RT karışımının hazırlanması

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

5. Her PCR tüpüne RT karışımından 16 µl pipetleyin. Ardından 1-4 µl (1 µg) RNA (adım 3'ten) ekleyin ve hacmi nükleaz içermeyen PCR sınıfı suyla 20 µl'ye ayarlayın (bkz. Tablo 2).

Tablo 2. Ters transkripsiyon reaksiyonunun hazırlanması

Bileşen	Hacim (µl)
RT karışımı	16,0
Isıtılmış örnek RNA'sı (1 µg)	1,0-4,0
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	0,0-3,0
Son hacim	20,0

6. İyice karıştırın ve sıvıyı tüpün alt kısmında toplamak için kısa süre santrifüje edin (yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).
7. 10 dakika boyunca 20°C'de inkübe edin.
8. Isıl döngüleyici üzerinde 45 dakika 42°C'de inkübe edin, ardından hemen 99°C'de 3 dakika inkübe edin.
9. Buz üzerinde (reaksiyonu durdurmak için) 5 dakika soğutun.
10. Sıvıyı tüpün alt kısmında toplamak için kısa süre santrifüje edin (yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Ardından buz üzerinde tutun.
11. Son cDNA'yı son hacim 50 µl olacak şekilde 30 µl nükleaz içermeyen PCR sınıfı suyla seyreltin.
12. PCR'yi qPCR cihazınıza göre aşağıdaki protokoller doğrultusunda gerçekleştirin.

Not: Bu ters transkripsiyon protokolü, "Kansere Karşı Avrupa" (Europe Against Cancer, EAC) çalışmalarından türetilmiştir (10, 11).

Protokol: 72 tüplük rotorlu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazlarında qPCR

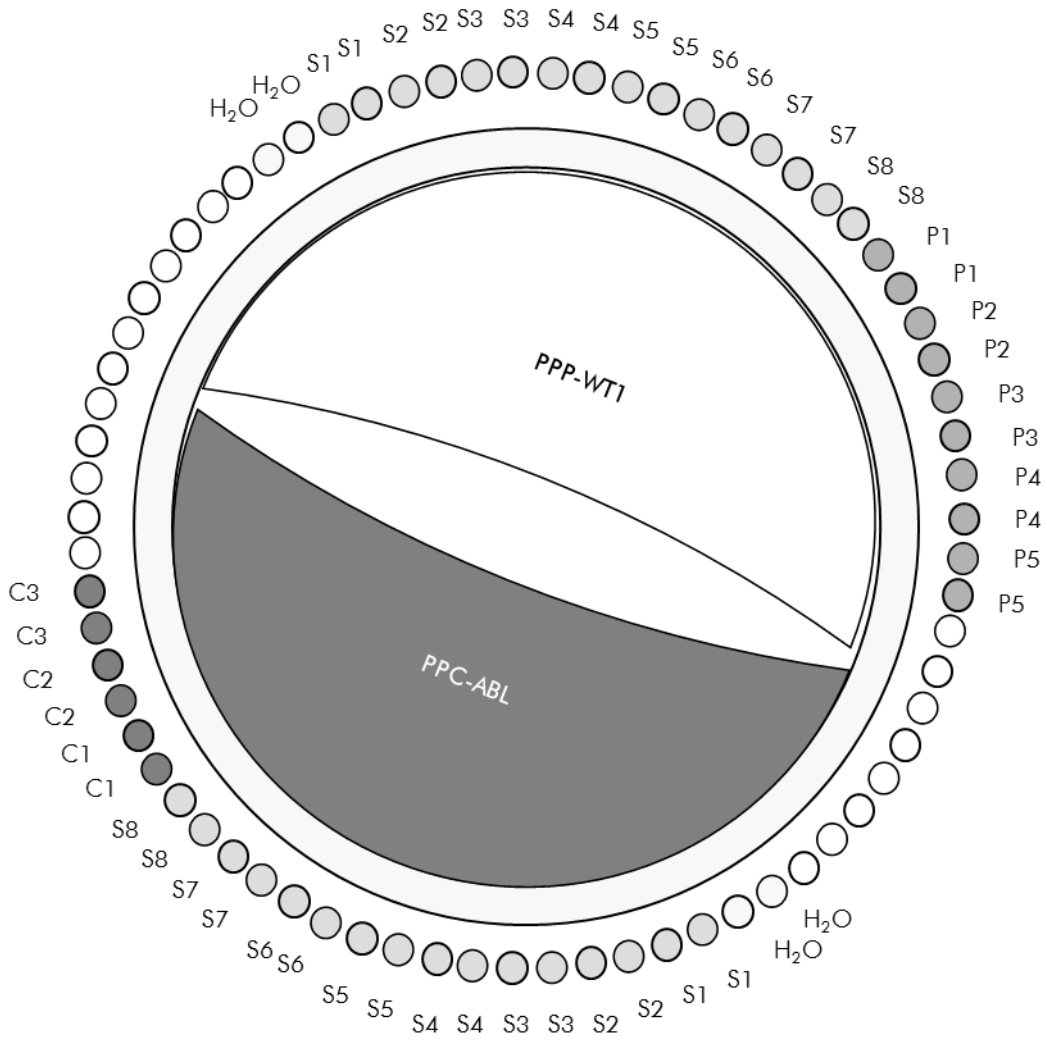
Bu cihazı kullanarak Tablo 3'te gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 3. 72 tüplük rotorlu Rotor-Gene Q cihazlarında reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerler ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örneği	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	2 x 3 reaksiyon (3 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrolü	2 reaksiyon
WT1 primerler ve prob karışımıyla (PPP-WT1)	
n cDNA örneği	n x 2 reaksiyon
WT1 standardı	2 x 5 reaksiyon (5 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrolü	2 reaksiyon

72 tüplük rotorlu Rotor-Gene Q cihazlarında örnek işleme

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



Şekil 4. *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit ile her bir deney için önerilen rotor ayarları. P1–5: WT1 standartları; C1–3: ABL standartları; S: cDNA örneği; H₂O: su kontrolü.

Not: Her zaman test edilecek örneği rotorun 1. pozisyonuna yerleştirmeye özen gösterin. Aksi halde kalibrasyon adımı sırasında cihaz kalibrasyon yapmaz ve hatalı floresans verileri alınır.

Tüm diğer pozisyonları boş tüplerle doldurun.

72 tüplük rotorlu Rotor-Gene Q cihazlarında qPCR

Not: Tüm adımları buzda gerçekleştirin.

Prosedür

1. Tüm gerekli bileşenleri çözdürün ve buza yerleştirin.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.
Tüm konsantrasyonlar reaksiyonun son hacmi içindir.

Tablo 4, 25 µl nihai reaksiyon hacmi elde etmek üzere hesaplanmış bir reaktif karışımı hazırlamaya yönelik pipetleme planını açıklamaktadır. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPP-WT1). Pipetleme hatasını telafi etmek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 4. qPCR karışımının hazırlanması

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 24 + 1 reaksiyon (µl)	WT1: 28 +1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	162,5	188,5	-
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her biri 5	Her biri 5	-
Toplam hacim	25,0	Her biri 25	Her biri 25	-

3. Tüp başına 20 µl qPCR ön karışımı dağıtın.
4. Karşılık gelen tüpe ters transkripsiyonda elde edilen (bkz. "Protokol: Önerilen standardize EAC ters transkripsiyonu", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).
5. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.
6. Tüpleri üretici önerilerine göre ısıl döngüleyiciye yerleştirin.
7. Rotor-Gene Q cihazını Tablo 5'te belirtildiği şekilde ısıl döngü programıyla programlayın.

Tablo 5. Sıcaklık profili

Mode of analysis (Analiz modu)	Quantitation (Kantitasyon)
Hold (Tutma)	Temperature (Sıcaklık): 50 derece Time (Süre): 2 dk
Hold 2 (Tutma 2)	Temperature (Sıcaklık): 95 derece Time (Süre): 10 dk
Cycling (Döngü)	50 kez 15 sn için 95 derece 1 dk için 60 derece, Yeşil kanalında FAM floresans edinimiyle: Single (Tek)

8. Rotor-Gene Q cihazları için analizde "Slope Correct" (Eğim Düzelt) ögesini seçin. Eşiği 0,03 olarak ayarlamanızı öneririz. Isıl döngü programını Tablo 5'te belirtildiği şekilde başlatın.

Protokol: ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ve LightCycler 480 cihazında qPCR

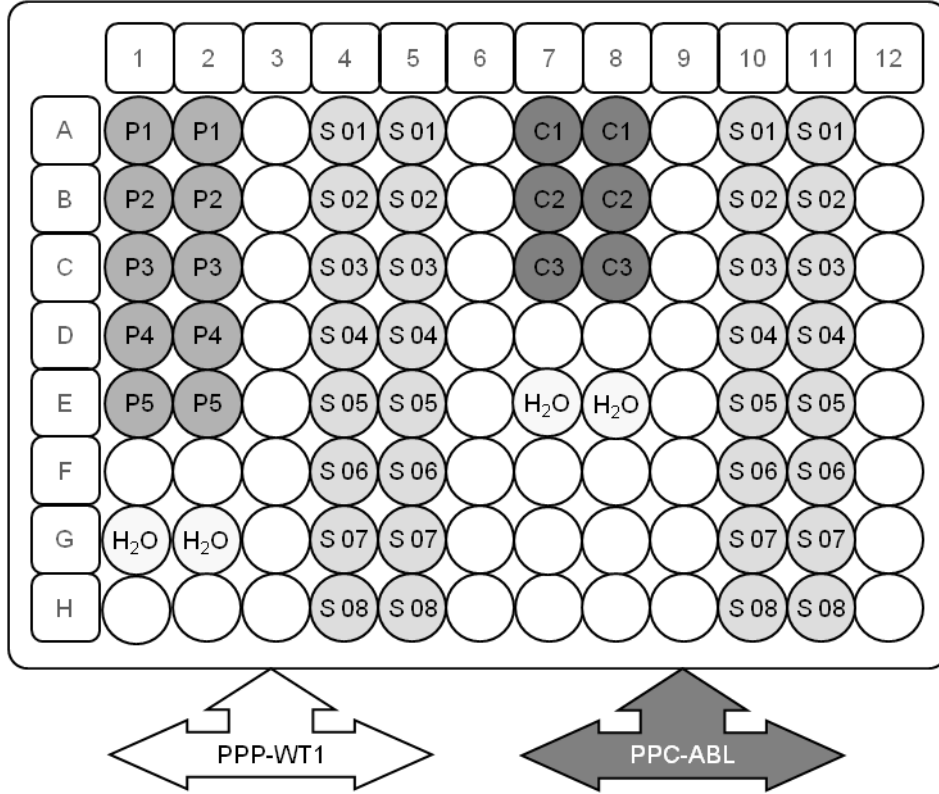
96 kuyulu plakalı qPCR ekipmanı kullanarak Tablo 6'da gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 6. 96 kuyulu plakalı qPCR ekipmanında reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerler ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örneği	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	2 x 3 reaksiyon (3 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrolü	2 reaksiyon
WT1 primerler ve prob karışımıyla (PPP-WT1)	
n cDNA örneği	n x 2 reaksiyon
WT1 standardı	2 x 5 reaksiyon (5 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrolü	2 reaksiyon

ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ve LightCycler 480 cihazlarında örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 5'teki plaka şeması böyle bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 5. Bir deney için önerilen plaka kurulumu. S: cDNA örneği; **P1–5:** WT1 standartları; **C1–3:** ABL standartları; **H₂O:** su kontrolü.

ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ve LightCycler 480 cihazlarında qPCR

Not: Tüm adımları buzda gerçekleştirin.

Prosedür

- Tüm gerekli bileşenleri çözdürün ve buza yerleştirin.**
- Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.**

Tüm konsantrasyonlar reaksiyonun son hacmi içindir.

Tablo 7, 25 µl nihai reaksiyon hacmi elde etmek üzere hesaplanmış bir reaktif karışımı hazırlamaya yönelik pipetleme planını açıklamaktadır. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPP-WT1). Pipetleme hatasını telafi etmek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 7. qPCR karışımının hazırlanması

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 24 + 1 reaksiyon (µl)	WT1: 28 + 1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	162,5	188,5	-
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her biri 5	Her biri 5	-
Toplam hacim	25,0	Her biri 25	Her biri 25	-

- 3. Kuyu başına 20 µl qPCR ön karışımı dağıtın.**
- 4. Karşılık gelen kuyuya ters transkripsiyonda elde edilen (bkz. "Protokol: Önerilen standardize EAC ters transkripsiyonu", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).**
- 5. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.**
- 6. Plakayı kapatın ve kısa süre santrifüje edin (300 x g, yaklaşık 10 saniye).**
- 7. Plakayı üreticinin önerilerine göre ısıl döngüleyiciye yerleştirin. Isıl döngüleyiciyi Tablo 8'de ABI PRISM 7900HT SDS veya Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ya da Tablo 9'da LightCycler 480 cihazı için belirtildiği şekilde ısıl döngü programıyla programlayın.**

Tablo 8. ABI PRISM 7900HT SDS veya Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System için sıcaklık profili

Mode of analysis (Analiz modu)	Standard Curve — Absolute Quantitation (Standart Eğri — Mutlak Kantifikasyon)
Hold (Tutma)	Temperature (Sıcaklık): 50°C Time (Süre): 2 dakika
Hold 2 (Tutma 2)	Temperature (Sıcaklık): 95°C Time (Süre): 10 dakika
Cycling (Döngü)	50 kez 15 saniye için 95°C 1 dakika için 60°C, FAM floresansı edinimiyle; baskılayıcı: TAMRA

Tablo 9. LightCycler 480 cihazı için sıcaklık profili

Mode of analysis (Analiz modu)	Mutlak Kantifikasyon ("Abs Quant" (Mut Kant))
Detection formats (Saptama formatları)	Detection formats (Saptama formatları) penceresinde "Simple Probe" (Basit Prob) ögesini seçin
Hold (Tutma)	Temperature (Sıcaklık): 50°C Time (Süre): 2 dakika
Hold 2 (Tutma 2)	Temperature (Sıcaklık): 95°C Time (Süre): 10 dakika
Cycling (Döngü)	50 kez 15 saniye için 95°C 1 dakika için 60°C, LC versiyon 01 için 483–533 nm, LC versiyon 02 için 465–510 nm'ye karşılık gelen FAM floresansı edinimiyle

- 8. ABI PRISM 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System için adım 8a'yı izleyin. LightCycler 480 cihazı için adım 8b'yi izleyin.**
- 8a. ABI PRISM 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Analiz adımında EAC protokolünde tanımlandığı gibi 0,1 olarak ayarlanmış bir eşik ve döngü 3 ile 15 arasında ayarlanmış bir referans çizgi öneririz. Döngü programını Tablo 8'de belirtildiği şekilde başlatın.**
- 8b. LightCycler 480: Arka plan 2,0 ve eşik 2,0 olarak bir Uyum noktası analiz modu kullanılmasını öneririz. Isıl döngü programını Tablo 9'da belirtildiği şekilde başlatın.**

Protokol: LightCycler 1.2 cihazında qPCR

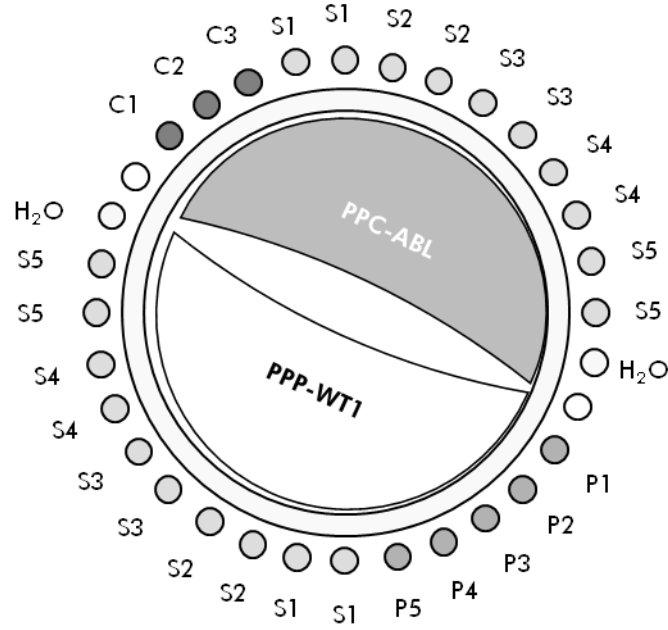
Kapiller cihazlar kullanarak, Tablo 10'da gösterildiği gibi, örneklerin ikili olarak ve kontrollerin bir kez ölçülmesini öneririz.

Tablo 10. LightCycler 1.2 cihazı için reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerler ve prob karışımıyla (PPC-ABL)	
n cDNA örneği	n x 2 reaksiyon
ABL standardı	1 x 3 reaksiyon (3 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrolü	1 reaksiyon
WT1 primerler ve prob karışımıyla (PPP-WT1)	
n cDNA örneği	n x 2 reaksiyon
WT1 standardı	1 x 5 reaksiyon (5 standart dilüsyon, her biri bir kez test edilir)
Su kontrolü	1 reaksiyon

LightCycler 1.2 cihazında örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde 5 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 6'daki kapiller şeması bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 6. ipsogen WT1 ProfileQuant Kit ile her bir deney için önerilen rotor ayarları. P1–5: WT1 standartları; C1–3: ABL standartları; S: analiz edilecek bilinmeyen DNA örneği; H₂O: su kontrolü.

LightCycler 1.2 cihazında qPCR

Not: Özel teknolojik gereksinimler nedeniyle, LightCycler deneyleri spesifik reaktifler kullanılarak gerçekleştirilmelidir. LightCycler TaqMan Master kullanılmasını ve Ana Karışım 5x hazırlamak için üretici talimatlarının izlenmesini öneririz.

Not: Tüm adımları buzda gerçekleştirin.

Prosedür

- 1. Tüm gerekli bileşenleri çözdürün ve buza yerleştirin.**
- 2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.**

Tüm konsantrasyonlar reaksiyonun son hacmi içindir.

Tablo 11, 20 µl nihai reaksiyon hacmi elde etmek üzere hesaplanmış bir reaktif karışımı hazırlamaya yönelik pipetleme planını açıklamaktadır.

Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPP-WT1). Pipetleme hatasını telafi etmek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 11. qPCR karışımının hazırlanması

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 14 + 1 reaksiyon (µl)	WT1: 16 + 1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
Yeni hazırlanan LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	10,2	153,0	173,4	-
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her biri 5	Her biri 5	-
Toplam hacim	20,0	Her biri 20	Her biri 20	-

- 3. Kapiller başına 15 µl qPCR ön karışımı dağıtın.**
- 4. Karşılık gelen tüpe ters transkripsiyonda elde edilen (bkz. "Protokol: Önerilen standardize EAC ters transkripsiyonu", sayfa 12) RT ürününden (cDNA, 100 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin (toplam hacim 20 µl).**
- 5. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.**
- 6. Kapillerleri aparat ile sağlanan adaptörlere yerleştirin ve kısa süre santrifüje edin (700 x g, yaklaşık 10 saniye).**
- 7. Kapillerleri üreticinin önerilerine göre ısıl döngüleyiciye yükleyin.**
- 8. LightCycler 1.2 cihazını Tablo 12'de belirtildiği şekilde ısıl döngü programıyla programlayın.**

Tablo 12. Sıcaklık profili

Mode of analysis (Analiz modu)	Quantification (Kantifikasyon)
Hold (Tutma)	Temperature (Sıcaklık): 95°C Time (Süre): 10 dakika Ramp (Artış): 20
Cycling (Döngü)	50 kez 10 saniye için 95°C; Ramp (Artış): 20 1 dakika için 60°C; Ramp (Artış): 20; FAM floresansı edinimiyle: Single (Tek)
Hold 2 (Tutma 2)	1 dakika için 45°C; Ramp (Artış): 20

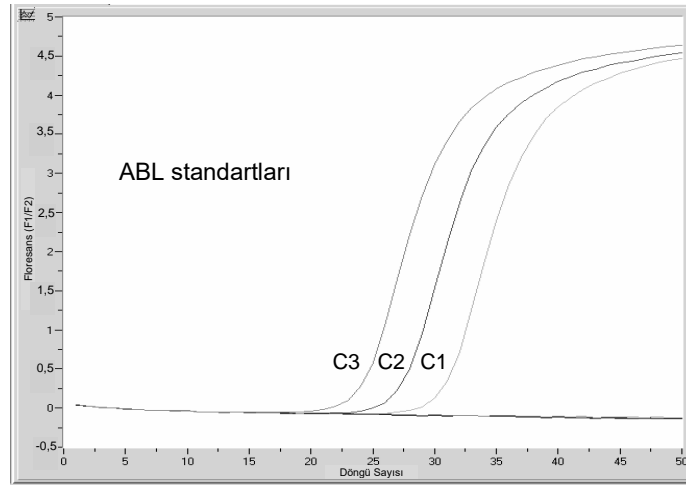
9. LightCycler 1.2 cihazı için F1/F2 ve "2nd derivative analysis" (2. derivatif analizi) modu önerilir. Isıl döngü programını Tablo 12'de belirtildiği şekilde başlatın.

Sonuçların Yorumlanması

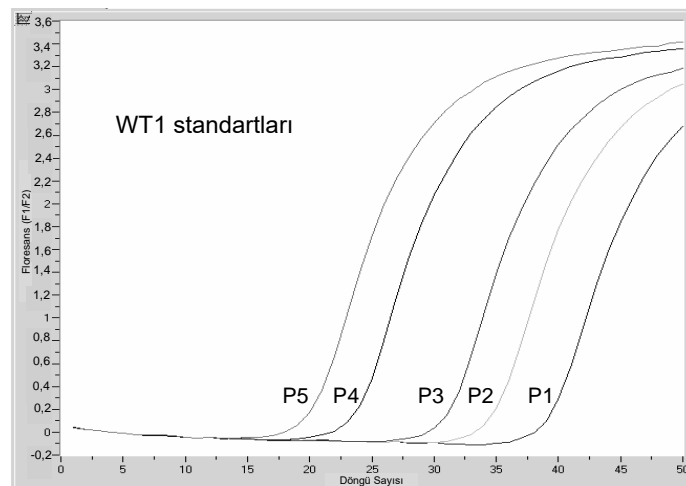
Veri analiz prensibi

TaqMan teknolojisi kullanıldığında, eşğin üzerindeki bir sinyali tespit etmek için gerekli PCR döngüsü sayısına eşik döngüsü (Threshold Cycle, C_T) adı verilir ve bu sayı, reaksiyonun başlangıcında mevcut olan hedef miktarı ile doğru orantılıdır.

Standartlarla beraber bilinen bir sayıda molekül kullanarak standart eğriyi bulabilir ve test örneğinde bulunan hedef miktarını tam olarak belirleyebilirsiniz. *ipsogen* standart eğrileri plazmide dayalıdır ve standart eğrilerin doğruluğunu sağlamak üzere ABL kontrol geni (control gene, CG) için 3 plazmid standart dilüsyonu ve WT1 geni için 5 standart dilüsyon kullanır. Şekil 7 ve 8'de, *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit ile elde edilen TaqMan amplifikasyon eğrilerine bir örnek verilmektedir.



Şekil 7. ABL standartlarının saptanması (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 ve 10^5 kopya/5 μ l.



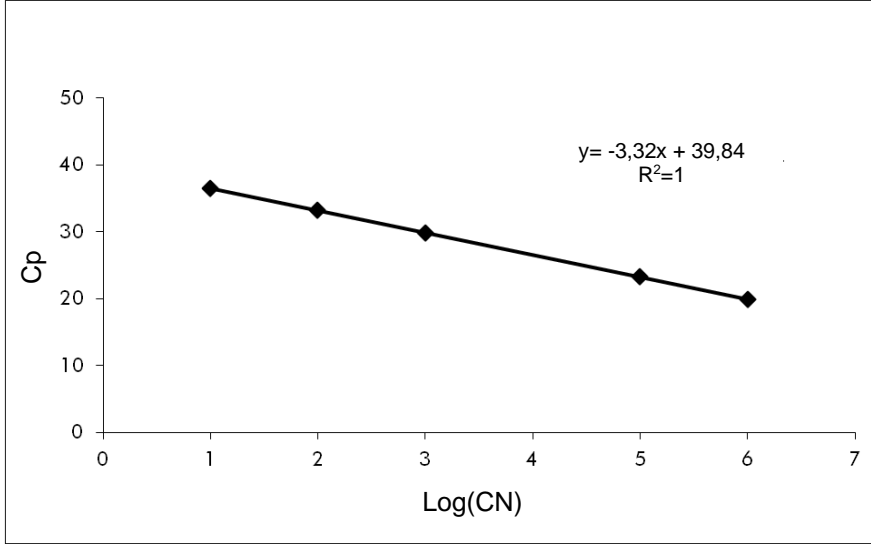
Şekil 8. WT1 standartlarının saptanması (P1–P5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopya/5 μ l.

Sonuçlar

Standart eğri ve kalite kriterleri

Ham veriler analiz için bir Excel® dosyasına yapıştırılabilir.

Her gen için (ABL ve WT1), plazmid standart dilüsyonlarında elde edilen ham C_P / C_T değerleri log kopya sayısına göre grafiğe dökülür (C1, C2 ve C3 için 3, 4 ve 5; P1, P2, P3, P4 ve P5 için 1, 2, 3, 5 ve 6). Şekil 9'da 5 standart dilüsyonda hesaplanmış teorik eğriye bir örnek gösterilmektedir.



Şekil 9. 5 standart dilüsyondan hesaplanmış teorik eğri. Her gen için (ABL ve WT1) bir lineer regresyon eğrisi ($y = ax + b$) hesaplanır; burada a çizginin eğimi, b ise y kesişimi olup çizginin y eksenini kestiği noktadaki y koordinatıdır. Eğrinin denklemini ve tayinin katsayısı (R^2) grafikte yazdırılır.

Standartlar 10 kat dilüsyon olduğundan eğrinin teorik eğimi $-3,32$ 'dir. $-3,0$ ile $-3,9$ arasında bir eğim $R^2 > 0,95$ olduğu sürece kabul edilebilir (12). Ancak hassas sonuçlar için $R^2 > 0,98$ 'e göre bir değer istenir (13).

Normalize kopya sayısı (Normalized Copy Number, NCN)

ABL standart eğri denklemini bilinmeyen örnekler için ham C_P değerlerini (PPC-ABL ile elde edilen) ABL kopya sayılarına (ABL_{CN}) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

$$\text{Log}_{10} \text{ örnek } ABL_{CN} = \frac{\text{Ortalama ABL } C_P - \text{ABL standart eğrisi kesişimi}}{\text{ABL standart eğrisinin eğimi}}$$

WT1 standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_P değerlerini (PPP-WT1 ile elde edilen) WT1 kopya sayılarına ($WT1_{CN}$) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

$$\text{Log}_{10} \text{ örnek } WT1_{CN} = \frac{\text{Ortalama } WT1 C_P - WT1 \text{ standart eğrisi kesişimi}}{WT1 \text{ standart eğrisinin eğimi}}$$

Bu CN değerlerinin oranı, 10.000 ABL kopyası başına normalize kopya sayısı (Normalized Copy Number, NCN) değerini verir:

$$\text{NCN} = \frac{WT1_{CN}}{ABL_{CN}} \times 10.000$$

ABL değerlerinde kalite kontrol

Kötü RNA kalitesi veya qPCR adımları sırasında problemler düşük ABL_{CN} değerine neden olur. $ABL_{CN} < 4246$ sonucu veren örneklerin sonuçlarının göz ardı edilmesini öneririz.

Replikatlar arasında yeniden üretilebilirlik

Replikatlar arasında C_P değerlerindeki varyasyon, kopya sayısı değerlerinde 4 kat değişikliğe karşılık gelecek şekilde < 2 olmalıdır.

Replikatlar arasında C_P değerlerindeki varyasyon, replikatların ortalama C_P değeri < 36 (12) ise genelde $< 1,5$ 'tir.

Not: Her kullanıcı laboratuvarında kendi tekrar üretilebilirliğini ölçmelidir.

Su kontrolleri

Negatif kontroller, hem ABL hem de WT1 için sıfır CN değeri vermelidir.

Pozitif su kontrolü, çapraz kontaminasyon nedeniyle oluşur. Bir çözüm bulmak için aşağıda "Sorun giderme kılavuzu" kısmına bakın.

Sorun giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgiler ve protokol veya örnek ve tahlil teknolojileri ile ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplamaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgisi için bkz. "İletişim Bilgileri", sayfa 41).

Yorum ve öneriler

Tüm örneklerde kontrol geni (ABL) ve WT1 için negatif sonuç — standart iyi

- a) Kötü RNA kalitesi Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrolü çalıştırın.
- b) Ters transkripsiyon adımının başarısız olması Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrolü çalıştırın.

Örneklerdeki kontrol geninde (ABL) negatif sonuç — standart iyi

- a) Kötü RNA kalitesi Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrolü çalıştırın.
- b) Ters transkripsiyon adımının başarısız olması Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrolü çalıştırın.

Standart sinyal negatif

- a) Pipetleme hatası Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması *ipsogen* WT1 Profile *Quant* Kit'i -15 ila -30°C'de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını (PPC ve PPP) ışıktan koruyun. Bkz. "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 11.
Tekrarlanan dondurma ve çözündürme işlemlerinden kaçınınız.
Saklama için reaktifleri ayrı şişelere bölün.

Yorum ve öneriler

Negatif kontroller pozitif

- Çapraz kontaminasyon Tüm kritik reaktifleri değiştirin.
Deneyi tüm reaktifler için yeni şişe kullanarak tekrarlayın.
Taşınma kontaminasyonunu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini yaygın olarak kabul edilen uygulamalar çerçevesinde kullanın.

Standart kontrollerde bile sinyal yok

- a) Pipetleme hatası veya atlanmış reaktifler Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.
PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Yetersiz saflaştırma nedeniyle örnek materyalinin inhibe edici etkileri RNA hazırlama işlemini tekrarlayın.
- c) LightCycler: Seçilen saptama kanalı yanlış Kanal ayarını F1/F2 veya 530 nm/640 nm olarak ayarlayın.
- d) LightCycler: Programlanmış veri taraması yok Döngü programlarını kontrol edin.
PCR programında her bir bağlama segmentinin sonunda "single" (tek) çekim modunu seçin.

Örneklere sinyal yok veya düşük ancak standart kontrolleri iyi

- a) Kötü RNA kalitesi veya düşük konsantrasyon Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrolü çalıştırın.
- b) Ters transkripsiyon adımının başarısız olması Başlamadan önce daima RNA kalitesi ve konsantrasyonunu kontrol edin.
Paralel olarak bir hücre hattı RNA pozitif kontrolü çalıştırın.

Yorum ve öneriler

Floresans yoğunluğu çok düşük

- a) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması *ipsogen* WT1 Profile *Quant* Kit'i –15 ila –30°C'de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını (PPC ve PPP) ışıktan koruyun. Bkz. "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 11.
- Tekrarlanan dondurma ve çözündürme işlemlerinden kaçınin.
- Saklama için reaktifleri ayrı şişelere bölün.
- b) Çok düşük başlangıç hedef RNA miktarı Örnek RNA'sı miktarını arttırın.
- Not:** Seçilen RNA hazırlama yöntemine bağlı olarak, inhibitör etkiler oluşabilir.

LightCycler: Floresan yoğunluğu değişiyor

- a) Pipetleme hatası "Pipetting error" (pipetleme hatası) denilen durumun yarattığı değişkenlik verileri F1/F2 veya 530 nm/640 nm modunda analiz ederek azaltabilir.
- b) Kapillerlerin yetersiz santrifüjlenmesi Hazırlanan PCR karışımı hala kapillerin üst kanalında olabilir veya kapiller ucunda bir hava kabarcığı sıkışmış olabilir.
- Reaksiyon karışımı yüklenmiş kapillerleri, her zaman cihazın spesifik kullanım kılavuzunda açıklandığı gibi santrifüj edin.
- c) Kapiller ucunun dış yüzeyi kirli Kapillerleri kullanırken her zaman eldiven takın.

LightCycler: Standart eğri hatası

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

Kalite Kontrol

Tüm kitin kalite kontrolü bir LightCycler 480 cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu kit, ISO 13485:2003 standardına göre üretilmiştir. Analiz sertifikaları talep üzerine www.qiagen.com/support/ adresinden alınabilir.

Sınırlamalar

Kullanıcılar bu cihazın kullanılmasından önce bu teknoloji konusunda eğitilmiş ve aşina olmalıdır. Bu kit, bu el kitabında verilen talimatlar izlenerek, onaylanmış bir cihazla birlikte kullanılmalıdır (bkz. "Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller", sayfa 9).

Elde edilen tanıya yönelik sonuçlar, diğer klinik veya laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır. QIAGEN performans çalışmaları kapsamında olmayan laboratuvarlarında kullanılan herhangi bir prosedür için sistem performansının onaylanması kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihleri geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Not: Bu kit "European LeukemiaNet" (ELN) çalışmalarına göre tasarlanmıştır (10, 11). Bu el kitabında verilen talimatlar izlenerek, onaylanmış reaktifler ve cihazlarla birlikte kullanılmalıdır. Bu ürünün endikasyon dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN'in yükümlülüğünü ortadan kaldırır.

Performans Özellikleri

Klinik olmayan çalışmalar

Materyaller ve yöntemler

Lineerlik çalışmaları, her biri, yüksek ekspresyonlu hücre hattından ve sağlıklı donörlerin WT1 geni bakımından düşük ekspresyon seviyesine sahip örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın farklı bir karışımından elde edilen 14 örnek üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her örnek üç tekrarlı olarak test edilmiştir. NCN için değerler, 2,20 - 3838,11 NCN arasında değişmiş ve bu çalışma, *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit'in bu değer aralığında lineer sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Kesinlik

Kesinlik çalışması, her biri yüksek ve düşük WT1 ekspresyonuna sahip hücre hatlarından ekstrakte edilen RNA'nın farklı bir karışımından elde edilen 4 örnek üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu tahliller her bir örnek için 16 defaya kadar tekrar edilmiştir. Analitik veriler aşağıdaki tablolarda özetlenmektedir.

Tablo 13. Kesinlik çalışmasından analitik veriler — plazmidler

	Dilüsyon	Ortalama C _T	σ	n	CV (%)
WT1 plazmidleri	P1: 10 ¹ kopya/5 μ l	36,13	0,87	15	2,42
	P2: 10 ² kopya/5 μ l	32,70	0,40	16	1,21
	P3: 10 ³ kopya/5 μ l	29,39	0,43	16	1,45
	P4: 10 ⁵ kopya/5 μ l	22,62	0,41	16	1,80
	P5: 10 ⁶ kopya/5 μ l	19,25	0,38	16	1,98
ABL plazmidleri	C1: 10 ³ kopya/5 μ l	29,59	0,35	16	1,20
	C2: 10 ⁴ kopya/5 μ l	26,11	0,40	15	1,52
	C3: 10 ⁵ kopya/5 μ l	22,77	0,28	16	1,22

Tablo 14. Kesinlik çalışmasından analitik veriler — hücre hatları

	Dilüsyon	Ortalama NCN	σ	n	CV (%)
Hücre hattı RNA dilüsyonu	%10	10.472	5598,76	16	53
	%1,5	1880	747,01	16	40
	%0,05	86	37,79	16	44
	%0,0025	3	1,90	16	57

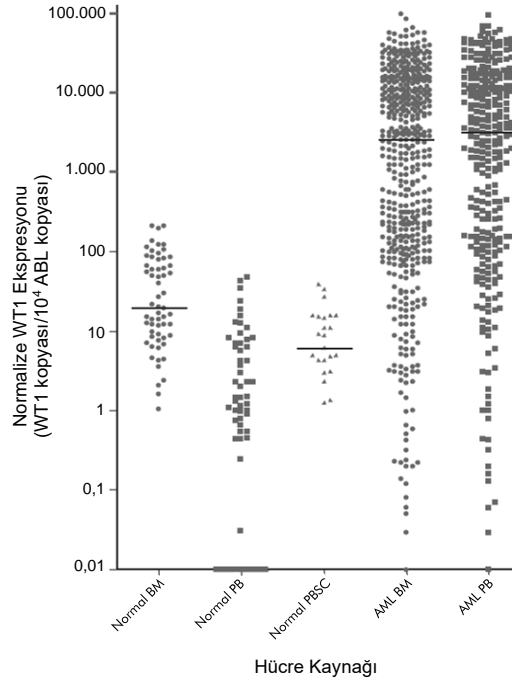
Boş örnek sınırı ve tespit sınırı

Çalışma tasarımında, EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline adlı NCCLS belgesinde açıklanan öneriler temel alınmıştır. Arka plan seviyesi veya boş örnek sınırı (Limit Of Blank, LOB), sağlıklı donörlerden alınan normal kan örneklerinden belirlenmiştir (4 örnek, 73 ölçüm). Bunun 3,66 WT1 NCN'ye eşit olduğu belirlenmiştir.

Analitik hassasiyeti gösteren tespit sınırı (Limit Of Detection, LOD), sağlıklı donörlerden alınan, WT1 ekspresyonunun düşük olduğu bilinen ve yüksek WT1 ekspresyon seviyesine sahip hücreler eklenen örneklerden belirlenmiştir. Böylece, beklenen NCN değerinin LOB'nin 4 katı olması sağlanmıştır. Toplam 4 örnek üzerinde 72 ölçüm yapılmış ve LOD'nin 13,08 WT1 NCN'ye eşit olduğu belirlenmiştir.

Klinik çalışmalar

WT1, normal hematopoetik hücrelerde eksprese olduğundan, rezidüel lösemi ile arka plan amplifikasyonu arasında ayırım yapabilecek bir eşik değer tanımlanabilmesi için normal kontrol örneklerinde görülen ekspresyon seviyesinin tesis edilmesi kritik önem taşır. *ipsogen WT1 ProfileQuant* Kit'te kullanılan ELN tahlili kullanılarak sağlıklı gönüllülerden alınan 204 kontrol örneğinin analizi, çok düşük WT1 ekspresyonunun periferik kan, kemik iliği ve periferik kan kök hücreleri örneklerinde görüldüğünü doğrulamıştır. Medyan değerler, kemik iliğinde 19,8 WT1 kopya /10⁴ ABL kopyası (0–213 aralığı), periferik kanda 0,01 (0,01–47,6 aralığı) ve periferik kan kök hücrelerinde 6,1 (0–39 aralığı) olmuştur (bkz. Şekil 10). WT1'in periferik kandaki ekspresyonu, kemik iliğindeki (p<0,0001) göre önemli ölçüde düşük olmuştur. Bu sonuçlara dayalı olarak, üst normal sınırı kemik iliği 250 NCN, periferik kan için 50 NCN olarak tanımlanmıştır.



Şekil 10. Sağlıklı donörlerden alınan örneklerdeki WT1 ekspresyonu. Akut miyeloid lösemi (**Acute Myeloid Leukemia, AML**); Kemik iliği (**Bone Marrow, BM**); Periferik kan (**Peripheral Blood, PB**); Periferik kan kök hücreleri (**Peripheral Blood Stem Cells, PBSC**). (15)

Cilloni D vd.nin izniyle yeniden basılmıştır: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, tüm hakları saklıdır.

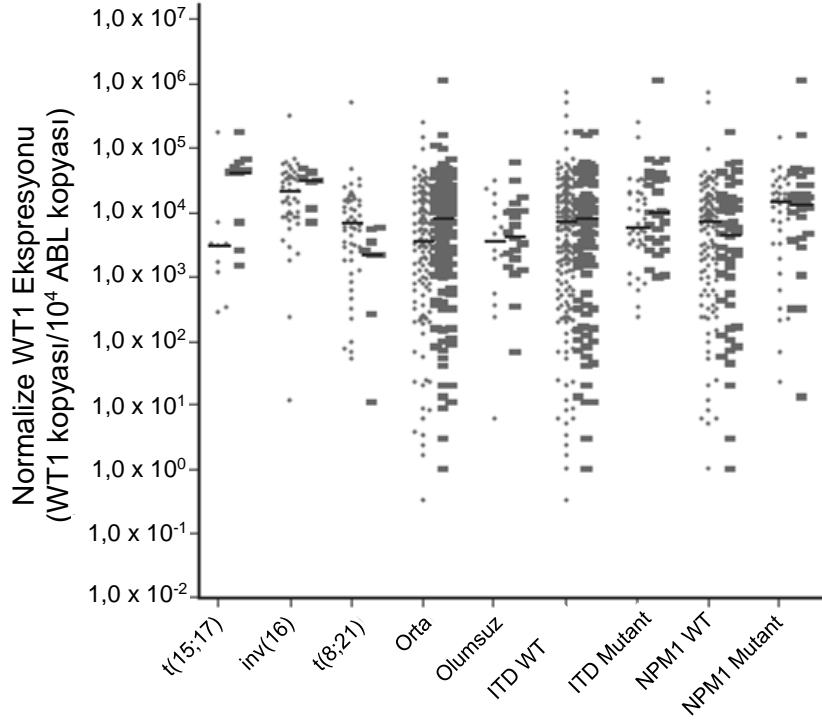
Ön tedavi AML örneklerinde standardize ELN qPCR tahlili ile WT1 ekspresyonunu tanımlama

ipsogen WT1 ProfileQuant Kit'e kullanılan ELN tahlilinin MRD saptamasında uygulanabilirliğini değerlendirmek için 504 hastadan 620 ön tedavi örneği (238 periferik kan ve 382 kemik iliği) analiz edilmiştir.

WT1, tanı amaçlı kemik iliği ve periferik kan AML örneklerinin %86'sında ve %91'inde, arka plan seviyelerinin (sırasıyla kemik iliğinde ve periferik kanda >250 ve >50 WT1 kopyası/10⁴ ABL kopyası olarak tanımlanmıştır) üzerinde aşırı eksprese olmuştur (Şekil 10'da da gösterilmektedir).

WT1 kopyası /10⁴ ABL kopyası oranının medyan değeri, kemik iliğinde 2505 (0–7,5 x 10⁵ aralığı) (normal kemik iliğine karşı p<0,0001) ve periferik kanda 3107 (0–1,13 x 10⁶ aralığı) (normal periferik kana karşı p<0,0001) olmuştur. Kohortun tamamı genelinde, tanı amaçlı periferik kan ve kemik iliği örnekleri eşleştirilen hastalardan elde edilen sonuçlarla da doğrulandığı gibi, periferik kan ile kemik iliği arasında ekspresyon bakımından önemli bir fark görülmemiştir; bkz. Ek, Şekil A3, Cilloni D et al., J Clin Oncol (15).

Normalize WT1 ekspresyon seviyesindeki varyasyon, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ (medyan $2,31 \times 10^4$, $12-3,14 \times 10^5$ aralığı) olan vakalarda özellikle yüksek seviyelerde olmak üzere, hücre genetiğine göre gözlemlenmiştir (Şekil 11, $p < 0,001$). NPM1 mutasyonları (NPM1 mutant: medyan $1,44 \times 10^4$, $0-1,13 \times 10^6$ aralığı; NPM1 doğal fenotipi: medyan 6566, $0-7,5 \times 10^5$ aralığı, $p = 0,005$) görülen AML'de de önemli ölçüde yüksek WT1 seviyeleri tespit edilmiştir.



Şekil 11. Hücre genetiğine göre WT1 ekspresyonunun varyasyonu (15).

Cilloni D vd.nin izniyle yeniden basılmıştır: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201, 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology, tüm hakları saklıdır.

WT1 geninin 7 ve 9 eksonlarında mutasyonlar için 15 vakada yapılan ELN tahliliyle tanımlandığı gibi, WT1 ekspresyonu seviyesi, WT1 doğal fenotipinde görülenle karşılaştırılabilir ($p=0,2$). Bununla birlikte, ELN tahlilinin düşük seviyede WT1 transkripti ekspresyonuna (<250 kopya/10⁴ ABL kopya) işaret ettiği 32 vakadan oluşan bir serinin sekans analizinde, 3 vakada (%9,4) bu düşük ekspresyon seviyesinin ileri primer bağlanma bölgesinde parçalanmaya yol açan mutasyonlar ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur; bkz. Ek, Şekil A4, Cilloni D et al., *J Clin Oncol* (15).

Referanslar

QIAGEN, kendi ürünlerinin kullanıldığı bilimsel yayınları içeren geniş, güncel bir çevrimiçi veri tabanı sağlar. Kapsamlı arama seçenekleri gereksinim duyduğunuz makaleleri basit bir anahtar kelimesi araması veya uygulama, araştırma alanı, başlık vb. belirterek bulmanızı mümkün kılar.

Referansların tam listesi için www.qiagen.com/RefDB/search.asp adresindeki çevrimiçi QIAGEN Referans Veritabanı'nı ziyaret edin ya da QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel distribütörünüzle iletişime geçin.










Alıntılanan referanslar

1. Cheson, B.D. et al. (2003) Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 21, 4642.
2. Estey, E. and Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* 368, 1894.
3. Grimwade D. (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 14, 497.
4. Schlenk, R.F. et al (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 358, 1909.
5. Wheatley, K. et al. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* 107, 69.
6. Freeman, S.D., Jovanovic, J.V., and Grimwade D. (2008) Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 4, 388.
7. Sugiyama, H. (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.* 73, 177.
8. Liu-Yin, J. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. *Blood* 112, 259.
9. Van Dijk J.P. et al. (2003) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* 118, 1027.
10. 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.

11. 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.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013.
13. 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.
14. Cilloni, D. et al., American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2007.
15. Cilloni D. et al., Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* 27, 5195.

Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

	<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir
	Son kullanma tarihi
	In vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Katalog numarası
	Lot numarası
	Materyal numarası
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	Sıcaklık sınırlaması
	Üretici



Kullanma talimatlarına bakın

ELN LeukemiaNet[®] European LeukemiaNet
European

İletişim Bilgileri

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezi'ne bakın, 00800-22-44-6000 numarasını arayın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine veya yerel dağıtıcılara başvurun (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Sipariş Bilgileri

Ürün	İçerik	Kat. no.
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	24 reaksiyon için: ABL Kontrol Geni Standartları, WT1 (ekson 1-2) Geni Standartları, Primerler ve Prob Karışımı ABL, Primerler ve Prob Karışımı PPP-WT1	676923
Rotor-Gene Q MDx – klinik uygulamalarda in vitro tanı amaçlı olarak onaylanmış real-time PCR analizi için		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) ve HRM kanallı Real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) ve HRM kanallı Real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu ürün in vitro tanı amaçlı kullanım içindir. *ipsogen* ürünleri önceden *QIAGEN*'in yazılı onayı olmadan tekrar satılamaz, tekrar satış için modifiye edilemez veya ticari ürünler üretmek için kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgiler haber verilmeden değiştirilebilir. *QIAGEN* bu belgede görülebilecek herhangi bir hata için hiçbir sorumluluk kabul etmez. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. Hiçbir durumda *QIAGEN* size karşı bu belgenin kullanımıyla ilgili veya bundan doğan rastlantısal, özel, çoklu veya dolaylı zarar için yükümlü olmaz.

ipsogen ürünlerinin belirtilen spesifikasyonları karşılayacağı garanti edilir. *QIAGEN*'in yegane yükümlülüğü ve müşterinin yegane telafi hakkı ürünlerin garanti edildiği şekilde uygulanamaması durumunda ürünlerin ücretsiz olarak değiştirilmesi ile sınırlıdır.

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

Sınırlı Lisans Anlaşması

Bu ürünün kullanımı *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit'i satın alan veya kullanan kişinin aşağıdaki şartları kabul ettiğini belirtir:

1. *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit, sadece *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit El Kitabı uyarınca ve sadece bu Kit içinde bulunan bileşenlerle kullanılabilir. *QIAGEN*, fikri mülkiyeti altında bu Kit ile sağlanan bileşenlerin, bu Kit ile sağlanmayan herhangi bir bileşenle, *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit El Kitabı ve www.qiagen.com adresinde bulunan ek protokoller içinde tanımlanan durumlar haricinde birlikte kullanımı veya birleştirilmesine yönelik lisans vermez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, *QIAGEN* Bu Kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. *QIAGEN* açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu Kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. *QIAGEN* herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. www.qiagen.com.

HB-1355-002 © 2013-2015 *QIAGEN*, tüm hakları saklıdır.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

