

ipsogen[®] WT1 ProfileQuant[®] Kit (ELN*) — Instrukcja obsługi



Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT
SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System i
LightCycler[®]



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R2

MAT

1072503PL

ELN LeukemiaNet[®]
European



Technologie postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń firmy QIAGEN

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń, które umożliwiają izolację i detekcję zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie — od pobrania próbki do otrzymania wyniku.

Firma QIAGEN wyznacza standardy w:

- procedurach oczyszczania DNA, RNA i białek;
- oznaczeniach kwasów nukleinowych i białek;
- badaniach microRNA oraz RNAi;
- automatyzacji technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń.

Naszą misją jest umożliwienie klientom osiągnięcia wybitnych sukcesów i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podsumowanie i objaśnienie	4
Zasada procedury	5
Materiały dostarczone w zestawie	9
Zawartość zestawu	9
Materiały wymagane, ale niedostarczone	10
Uwagi i środki ostrożności	11
Ogólne środki ostrożności	11
Przechowywanie odczynników i sposób postępowania	12
Procedura	13
Przygotowanie RNA próbki	13
Protokół: Zalecana znormalizowana odwrotna transkrypcja EAC	13
Protokół: qPCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 probówki	16
Protokół: qPCR w aparacie ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System I LightCycler 480	20
Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 1.2	25
Interpretacja wyników	29
Zasada analizy danych	29
Wyniki	30
Rozwiązywanie problemów	31
Kontrola jakości	35
Ograniczenia	35
Charakterystyka działania testu	36
Badania niekliniczne	36
Badania kliniczne	38
Literatura	41
Symbole	42
Informacje kontaktowe	43
Informacje dotyczące zamawiania	44

Przeznaczenie

Zestaw *ipsogen WT1 ProfileQuant Kit* jest przeznaczony do ilościowego oznaczenia transkryptów genów guza Wilmsa (Wilm's tumor, WT) w całkowitym RNA wyizolowanym z próbek pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową (acute myeloid leukemia, AML). Uzyskane wyniki mają wspomóc monitorowanie wczesnej odpowiedzi na terapię oraz choroby resztkowej (minimal residual disease, MRD).

Podsumowanie i objaśnienie

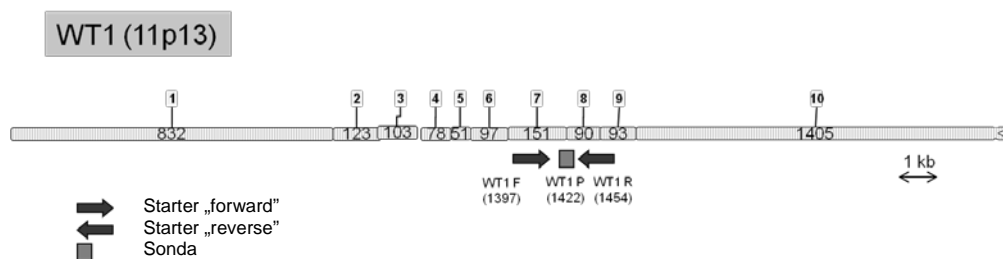
Aktualne protokoły leczenia ostrej białaczki szpikowej (AML) opierają się na czynnikach prognostycznych, na podstawie których dokonuje się stratyfikacji leczenia (1, 2). Do kluczowych czynników prognostycznych zidentyfikowanych do tej pory należą cechy określone przed leczeniem, takie jak wiek i liczba białych krwinek (white blood cell, WBC), jak również kariotyp pacjenta i obecność swoistych mutacji genomowych, takich jak FLT3 i NPM1 (3, 4). Odpowiedź morfologiczna na chemoterapię indukcyjną stanowi dalszy czynnik prognostyczny, który włączono do aktualnych schematów stratyfikacji ryzyka wykorzystywanych do podejmowania decyzji dotyczących wdrożenia leczenia konsolidacyjnego, a zwłaszcza przeszczepu allogenicznego (5). Parametry te dzielą pacjentów na grupy pod względem ryzyka nawrotu choroby, jednakże istnieje nagła potrzeba udoskonalenia stratyfikacji ryzyka, aby zwiększyć niezawodność identyfikacji pacjentów, którzy z największym (lub najmniejszym) prawdopodobieństwem odniosą korzyści z przeszczepu. W wielu badaniach podkreślono możliwość monitorowania MRD za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) wykorzystywanej do wykrywania sekwencji docelowych swoistych dla białaczki, tj. transkryptów genów fuzyjnych (fusion gene, FG), takich jak PML-RARA, CBFβ-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) lub mutacji w swoistych genach, takich jak NPM1. Umożliwia to identyfikację pacjentów narażonych na największe ryzyko nawrotu choroby, tym samym wskazując kandydatów do wczesnej interwencji terapeutycznej (6).

Okolo połowa pacjentów z AML nie posiada odpowiedniej sekwencji docelowej swoistej dla białaczki. Z tego względu znaczną uwagę poświęca się rozwojowi alternatywnych metod, które umożliwiłyby zastosowanie monitorowania MRD u dużo większej liczby pacjentów. Jedną ze strategii polega na wykorzystaniu cytometrii przepływowej do zidentyfikowania i monitorowania nieprawidłowych fenotypów, ale, mimo tego, że ma ona szerokie zastosowanie, jest wymagająca pod względem technicznym (6). Inna metoda obejmuje wykonanie reakcji qPCR w celu detekcji transkryptów, które ulegają nadmiernej ekspresji w komórkach blastycznych w AML w porównaniu do prawidłowych komórek krwi i szpiku kostnego, przy czym największą uwagę skupia się na genie *WT1* (6).

Gen *WT1* jest zlokalizowany na chromosomie 11p13, koduje czynnik transkrypcyjny palca cynkowego i pierwotnie został zidentyfikowany na podstawie jego udziału w patogenezie guza Wilmsa (7). Wykazano, że gen *WT1* ulega wysokiej ekspresji w wielu nowotworach układu krwiotwórczego, w tym AML (7, 8). Pomimo tego że mechanizmy prowadzące do nadekspresji genu *WT1* są słabo poznane, zjawisko to można wykorzystać jako marker, który wskazuje obecność, utrzymywanie się lub nawrót białaczek układu krwiotwórczego.

Zasada procedury

Technika qPCR umożliwia precyzyjne ilościowe oznaczenie produktów PCR podczas fazy wykładniczej procesu amplifikacji reakcji PCR. Dane z reakcji qPCR można uzyskać szybko, bez konieczności ich obróbki po reakcji PCR, poprzez detekcję sygnałów fluorescencyjnych w czasie rzeczywistym podczas i/lub po przeprowadzeniu cykli reakcji PCR, tym samym znacznie zmniejszając ryzyko skażenia produktów PCR. Obecnie dostępne są 3 główne techniki qPCR: analiza qPCR z wykorzystaniem barwnika SYBR® Green I, analiza qPCR z wykorzystaniem sond hydrolitycznych oraz analiza qPCR z wykorzystaniem sond hybrydacyjnych.



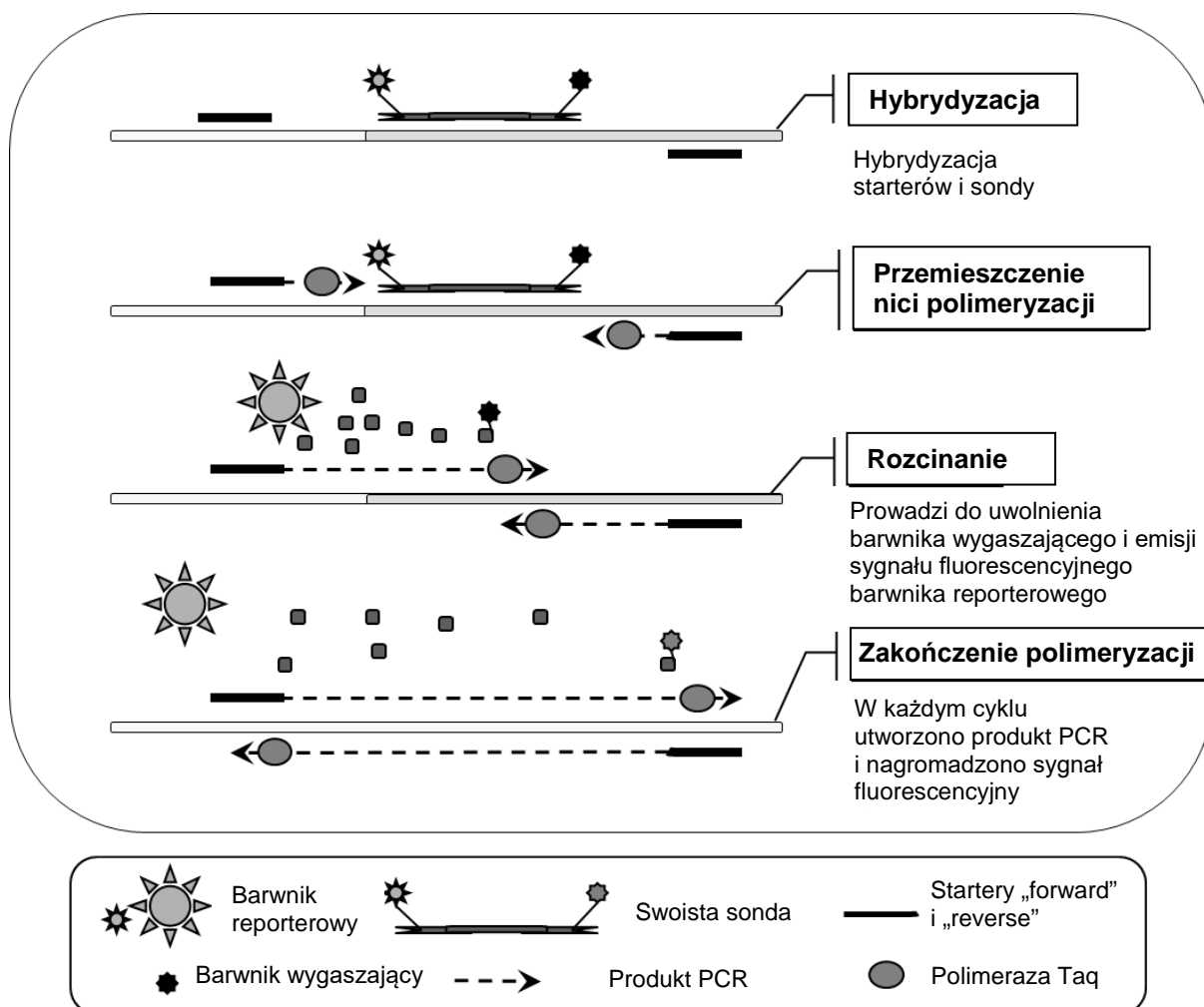
Ryc. 1. Schematyczny rysunek transkryptu genu *WT1* obejmowanego przez zestaw starterów i sond qPCR ELN: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R. Liczba pod starterami i sondą odnosi się do pozycji nukleotydowej, w której znajdują się one w transkrypcie prawidłowego genu. Egzon 5 może ulegać alternatywnemu splicingowi.

W tym oznaczeniu wykorzystywana jest technologia qPCR oparta na hydrolizie oligonukleotydów wyznakowanych dwoma barwnikami. Podczas reakcji PCR startery „forward” i „reverse” hybrydują do swoistej sekwencji. W tej samej mieszaninie znajduje się oligonukleotyd wyznakowany dwoma barwnikami. Ta sonda, która składa się z oligonukleotydu wyznakowanego barwnikiem reporterowym (ang. reporter) na końcu 5' i barwnikiem wygaszającym (ang. quencher) na końcu 3', hybryduje do sekwencji docelowej w obrębie produktu PCR. W analizie qPCR z sondami hydrolitycznymi wykorzystywana jest aktywność 5'→3' egzonukleazy polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Jeśli sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika reporterowego i barwnika wygaszającego powoduje wytłumienie fluorescencji barwnika reporterowego głównie poprzez przeniesienie energii typu Förstera.

Podczas reakcji PCR, jeśli sekwencja docelowa jest obecna, sonda swoiście hybryduje między miejsca starterów „forward” i „reverse”. Polimeraza DNA, dzięki aktywności 5'→3' egzonukleazy, rozcina sondę między barwnikiem

reporterowym i barwnikiem wygaszającym, tylko jeśli sonda zhybryduje do sekwencji docelowej. Fragmenty sondy są następnie wypierane z sekwencji docelowej, a polimeryzacja nici jest kontynuowana. Koniec 3' sondy jest blokowany, aby uniknąć wydłużania sondy podczas reakcji PCR (Ryc. 2). Ten proces zachodzi podczas każdego cyklu i nie zakłóca gromadzenia produktu w sposób wykładniczy.

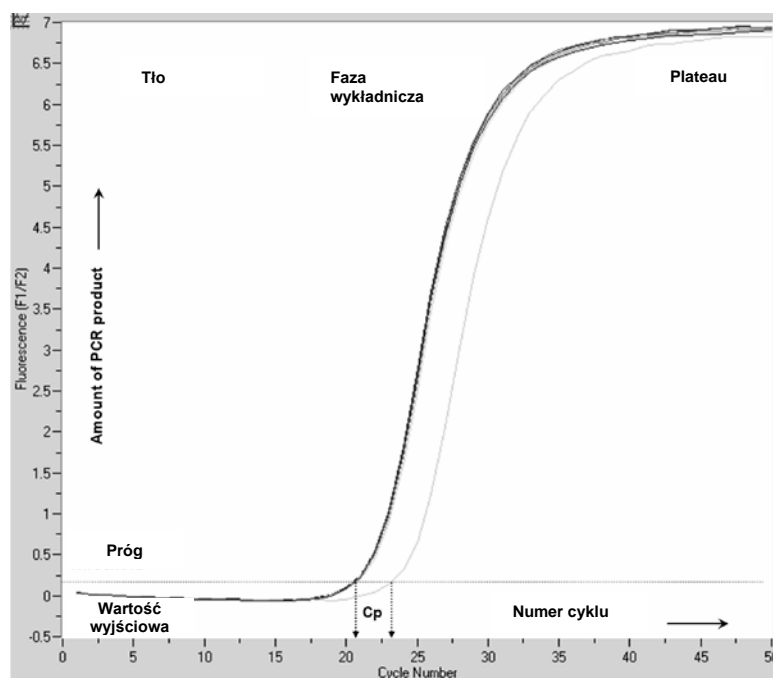
Wzrost sygnału fluorescencyjnego jest wykrywany wyłącznie wtedy, gdy sekwencja docelowa jest komplementarna z sondą i, co za tym idzie, amplifikowana podczas reakcji PCR. Ze względu na powyższe wymogi amplifikacja nieswoista nie jest wykrywana. Wzrost fluorescencji jest więc wprost proporcjonalny do amplifikacji sekwencji docelowej podczas reakcji PCR.



Ryc. 2. Zasada reakcji. Całkowite RNA ulega odwrotnej transkrypcji, a utworzone cDNA jest amplifikowane za pomocą reakcji PCR z parą swoistych starterów i swoistą sondą wewnętrzną znakowaną dwoma barwnikami (FAM™–TAMRA™). Sonda przyłącza się do ampliconu podczas każdego etapu wydłużania reakcji PCR. Gdy polimeraza *Taq* wydłuża nić od startera przyłączonego do ampliconu, powoduje przemieszczenie końca 5' sondy, który jest następnie rozkładany dzięki aktywności 5'→3' egzonukleazy polimerazy DNA *Taq*. Cięcie trwa do momentu odłączenia pozostałej części sondy od ampliconu. Ten proces powoduje uwolnienie fluoroforu i barwnika wygaszającego do roztworu, rozdzielając je od siebie w przestrzeni i prowadząc do wzrostu fluorescencji emitowanej przez barwnik FAM i spadku fluorescencji emitowanej przez barwnik TAMRA.

Na Ryc. 3 przedstawiono nagromadzenie produktu PCR otrzymane po wykreśleniu wartości fluorescencji względem liczby cykli. Ta krzywa amplifikacji składa się kolejno z wczesnej fazy tła (poniżej poziomu detekcji aparatu), fazy wykładniczej (lub fazy logarytmicznej) i fazy plateau. Najdokładniejsze oznaczenie ilościowe można wykonać jedynie podczas fazy wykładniczej. Pierwszy cykl, w którym aparat może rozróżnić fluorescencję wygenerowaną w wyniku amplifikacji jako fluorescencję powyżej sygnału tła, nazywany jest cyklem progowym (threshold cycle, C_T) lub punktem przecięcia (crossing point, C_P). Wybierając próg w obrębie fazy logarytmiczno-liniowej, możliwe jest obliczenie rzeczywistej ilości cząsteczek na początku reakcji, gdyż intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do ilości produktu PCR w fazie wykładniczej.

Podczas fazy plateau nie zachodzi istotny wzrost ilości produktu PCR. Wynika to głównie z wyczerpania składników reakcji PCR i ponownej hybrydyzacji nici produktów PCR spowodowanej wysokim stężeniem produktów końcowych, co uniemożliwia zachodzenie dalszej hybrydyzacji starterów.



Ryc. 3. Rejestracja fluorescencji podczas wykonywania cykli oraz kolejne fazy amplifikacji.

Najbardziej bezpośrednim i precyzyjnym sposobem analizowania danych ilościowych jest skorzystanie z krzywej wzorcowej przygotowanej na podstawie serii rozcieńczeń matrycy kontrolnej o znanym stężeniu. Proces ten jest znany jako oznaczenie ilościowe „krzywej wzorcowej” lub „bezwzględne” oznaczenie ilościowe. Po amplifikacji serii rozcieńczeń wzorcowych krzywą wzorcową otrzymuje się poprzez wykreślenie logarytmu początkowej liczby kopii matrycy względem wartości C_P wygenerowanych dla każdego rozcieńczenia. Po wykreśleniu tych punktów powstaje krzywa wzorcową. Za pomocą równania tej krzywej wzorcowej można określić początkową liczbę kopii w próbkach, które mają być oznaczone ilościowo.

Zestaw WT1 Profile*Quant* Kit (ELN) zawiera plazmidy oraz mieszaniny starterów i sond swoistych dla genów WT1 i ABL. Działanie tych składników używanych jednocześnie zwalidowano podczas wspólnego projektu badawczego prowadzonego przez grupę ekspertów z konsorcjum European Leukemia Net. Oznaczenie opublikowane uprzednio przez Vana Dijka i współpracowników w sposób spójny przewyższa wydajnością inne oznaczenia i jest mniej wrażliwe na mutacje w genie AML z powodu jego konfiguracji (9). Z tego względu wybrano je jako oznaczenie WT1 ELN. Zestaw *ipsogen* WT1 Profile*Quant* Kit opiera się na tej technice. W tym zestawie amplifikowana jest kontrola endogenna (transkrypt genu AML) z próbki, jak również transkrypt genu WT1. Dostarczane są seryjne rozcieńczenia kontroli i cDNA genu WT1, a wygenerowane krzywe wzorcowe umożliwiają dokładne obliczenie liczby kopii transkryptów genów WT1 i ABL w każdej próbce.

Materiały dostarczone w zestawie

Zawartość zestawu

<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit		(24)
Nr katalogowy		676923
Liczba reakcji		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe genu kontrolnego ABL) (10 ³ kopii/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe genu kontrolnego ABL) (10 ⁴ kopii/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe genu kontrolnego ABL) (10 ⁵ kopii/5 µl)	C3-ABL	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe profilu genu WT1) (10 ¹ kopii/5 µl)	P1-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe profilu genu WT1) (10 ² kopii/5 µl)	P2-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe profilu genu WT1) (10 ³ kopii/5 µl)	P3-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe profilu genu WT1) (10 ⁵ kopii/5 µl)	P4-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe profilu genu WT1) (10 ⁶ kopii/5 µl)	P5-WT1	50 µl
Primers and Probe Mix ABL (Mieszanka starterów i sondy ABL)*	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (Mieszanka starterów i sondy PPP-WT1) (ELN)†	PPP- WT1 (ELN) 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit Handbook (English) (<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit — Instrukcja obsługi (w języku angielskim))		1

* Mieszanka swoistych starterów „reverse” i „forward” dla genu kontrolnego (control gene, CG) ABL i swoista sonda FAM–TAMRA.

† Mieszanka swoistych starterów „reverse” i „forward” dla genu WT1 (egzon 1–2) i swoista sonda FAM–TAMRA.

Uwaga: Przed użyciem krótko odwirować rozcieńczenia wzorcowe i mieszaniny sond i starterów.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Odczynniki

- Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR
- Odczynniki do odwrotnej transkrypcji: zatwierdzony odczynnik to Superscript® II (lub Superscript) Reverse Transcriptase, zawiera 5x stężony bufor first-strand, 100 mM DTT (Life Technologies, nr kat. 18064-022)
- Inhibitor RNaz: zatwierdzony odczynnik to RNaseOUT™ (Life Technologies, nr kat. 10777-019)
- Zestaw deoksynukleotydów dNTP, odpowiedni do PCR
- Losowy heksamer
- MgCl₂
- Bufor i polimeraza DNA *Taq*: zatwierdzone odczynniki to mieszanina TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x stężona mieszanina Master Mix do reakcji PCR) (Life Technologies, nr kat. 4304437) i mieszanina LightCycler TaqMan Master (5x stężona mieszanina Master Mix do reakcji PCR) (Roche, nr kat. 04535286001)

Materiały eksploatacyjne

- Jałowe końcówki do pipet do przygotowywania reakcji PCR, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami hydrofobowymi
- Probówki do PCR o pojemności 0,5 lub 0,2 ml, wolne od RNaz i DNaz
- Lód

Wyposażenie

- Pipeta mikrolitrowa* przeznaczona do przygotowywania reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 0,2 ml/0,5 ml umożliwiającą wirowanie przy maksymalnie 13 000–14 000 obr./min

- Aparat do przeprowadzania reakcji Real-time PCR*: aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM® lub inny aparat Rotor-Gene; aparat LightCycler 1.2 lub 480; lub aparat ABI PRISM 7900HT SDS; aparat Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; oraz powiązane odpowiednie materiały
- Termocykler* lub łaźnia wodna* (etap odwrotnej transkrypcji)

Uwaga: upewnić się, że termocykler lub łaźnia wodna została sprawdzona i skalibrowana zgodnie z wytycznymi producenta.

Uwagi i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

Pozostałości próbek i odczynników należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Ogólne środki ostrożności

Podczas przeprowadzania testów qPCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.

Ten zestaw jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Odczynniki i instrukcje dostarczone w tym zestawie zostały zwalidowane w celu zapewnienia optymalnej wydajności. Dalsze rozcieńczanie odczynników lub zmiana okresów i temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub sprzecznych danych. Właściwości odczynników PPC-ABL i PPP-WT1 mogą ulec zmianie pod wpływem światła słonecznego. Wszystkie odczynniki opracowano specjalnie do użycia z tym testem. Aby zapewnić optymalną wydajność testu, nie należy zastępować żadnych odczynników.

Określanie stężeń transkryptów za pomocą reakcji qPCR wymaga przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji mRNA i amplifikacji wytworzonego cDNA za pomocą reakcji PCR. Z tego względu całą procedurę oznaczenia należy wykonywać w środowisku wolnym od RNaz/DNaz.

Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec:

- skażeniu RNazami/DNazami, które może doprowadzić do rozkładu matrycowego mRNA i wytworzonego cDNA;
- przenoszeniu skażenia w postaci mRNA lub produktów PCR, które mogą spowodować otrzymanie fałszywie pozytywnego sygnału.

W związku z tym zalecane jest przestrzeganie poniższych środków ostrożności.

- Podczas wykonywania oznaczenia używać sprzętu laboratoryjnego (np. pipet, końcówek do pipet, fiolek reakcyjnych) wolnych od nukleaz i nosić rękawiczki.
- Aby uniknąć skażenia krzyżowego próbek i odczynników, na każdym etapie pipetowania używać świeżych, odpornych na aerozole końcówek do pipet.
- Przygotowywać mieszaninę master mix przed wykonaniem reakcji PCR, używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.) w odrębnym obszarze, do którego nie są wprowadzane żadne matryce DNA (cDNA, DNA, plazmid). Dodawać matrycę w oddzielnej strefie (najlepiej w innym pomieszczeniu), używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.).
- Pracować z rozcieńczeniami wzorcowymi (C1–3 i P1–5) w odrębnym pomieszczeniu.

Przechowywanie odczynników i sposób postępowania

Zestawy są transportowane na suchym lodzie, a po ich dostarczeniu należy je przechowywać w temperaturze od -30°C do -15°C .

- Zminimalizować ekspozycję na światło mieszanin starterów i sond (próbówki PPC i PPP).
- Przed otwarciem delikatnie wymieszać i odwirować próbówki.
- Wszystkie składniki zestawu przechowywać w oryginalnych pojemnikach.

Te warunki przechowywania dotyczą zarówno otwartych, jak i nieotwartych składników. Składniki przechowywane w warunkach innych niż określone na etykietach mogą nie działać prawidłowo i negatywnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.

Daty ważności dla każdego odczynnika są określone na etykietach poszczególnych składników. W prawidłowych warunkach przechowywania wydajność produktu zostanie zachowana do upływu daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

Nie istnieją żadne możliwe do zaobserwowania wyraźne oznaki wskazujące na niestabilność produktu. Jednakże wraz z próbką o nieznanym charakterze należy analizować kontrole pozytywne i negatywne.

Procedura

Przygotowanie RNA próbki

Przygotowanie RNA z próbek pacjentów (krwi lub szpiku kostnego) należy wykonywać za pomocą zatwierdzonej procedury. Jakość oznaczenia jest w dużym stopniu uzależniona od jakości wejściowego RNA. Z tego względu przed rozpoczęciem analizy zalecamy ocenę wyizolowanego RNA za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym* lub systemu Agilent® Bioanalyzer®.

Protokół: Zalecana znormalizowana odwrotna transkrypcja EAC

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przygotować deoksynukleotydy dNTP, o stężeniu 10 mM każdy. Przechowywać w temperaturze -20°C w porcjach.
- Przygotować losowy heksamer, 50 mM. Przechowywać w temperaturze -20°C w porcjach.
- Przygotować MgCl_2 , 50 mM. Przechowywać w temperaturze -20°C w porcjach.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.
2. Inkubuj $1\ \mu\text{g}$ RNA ($1\text{--}4\ \mu\text{l}$) przez 10 minut w temperaturze 70°C i niezwłocznie schłódź na lodzie przez 5 minut.
3. Krótko odwiruj (około 10 s, 10 000 obr./min), aby zebrać płyn na dnie próbki. Następnie przechowuj na lodzie.
4. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę RT odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek (Tabela 1).

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych.

Tabela 1. Przygotowanie mieszanki RT

Składnik	Objętość na próbkę (μl)	Stężenie końcowe
Bufor First-Strand Buffer (dostarczany z odczynnikami Superscript II Reverse Transcriptase), 5x stężony	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
Deoksynukleotydy dNTP (o stężeniu 10 mM każdy, do uprzedniego przygotowania i przechowywania w temperaturze -20°C w porcjach)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, dostarczany z odczynnikami Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
Inhibitor RNaz (40 U/ μl)	0,5	1 U/ μl
Losowy heksamer (100 μM)	5,0	25 μM
Odczynnik Superscript II (200 U/ μl)	0,5	5 U/ μl
Podgrzana próbka RNA (do dodania w kroku 5)	1,0–4,0	50 ng/ μl
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR (do dodania w kroku 5)	0,0–3,0	–
Objętość końcowa	20,0	–

- 5. Za pomocą pipety przenieś 16 μl mieszanki RT do każdej próbki PCR. Następnie dodaj 1–4 μl (1 μg) RNA (z kroku 3) i dopełnij wodą wolną od nukleaz, odpowiednią do PCR, do objętości 20 μl (patrz Tabela 2).**

Tabela 2. Przygotowanie reakcji odwrotnej transkrypcji

Składnik	Objętość (μl)
Mieszanka RT	16,0
Podgrzana próbka RNA (1 μ g)	1,0–4,0
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	0,0–3,0
Objętość końcowa	20,0

- 6. Dobrze wymieszaj i krótko odwiruj (około 10 s, 10 000 obr./min), aby zebrać płyn na dnie probówki.**
- 7. Inkubuj w temperaturze 20°C przez 10 minut.**
- 8. Inkubuj w temperaturze 42°C w termocyklerze przez 45 minut, a następnie niezwłocznie przenieś do temperatury 99°C na 3 minuty.**
- 9. Chłódź na lodzie (aby zatrzymać reakcję) przez 5 minut.**
- 10. Krótko odwiruj (około 10 s, 10 000 obr./min), aby zebrać płyn na dnie probówki. Następnie przechowuj na lodzie.**
- 11. Rozcieńcz końcowe cDNA za pomocą 30 μ l wody wolnej od nukleaz, odpowiedniej do PCR, tak aby końcowa objętość wynosiła 50 μ l.**
- 12. Przeprowadź reakcję PCR zgodnie z poniższymi protokołami, odpowiednio do używanego aparatu do qPCR.**

Uwaga: Ten protokół odwrotnej transkrypcji opracowano na podstawie badań w ramach programu „Europe Against Cancer” (EAC) (10, 11).

Protokół: qPCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 probówki

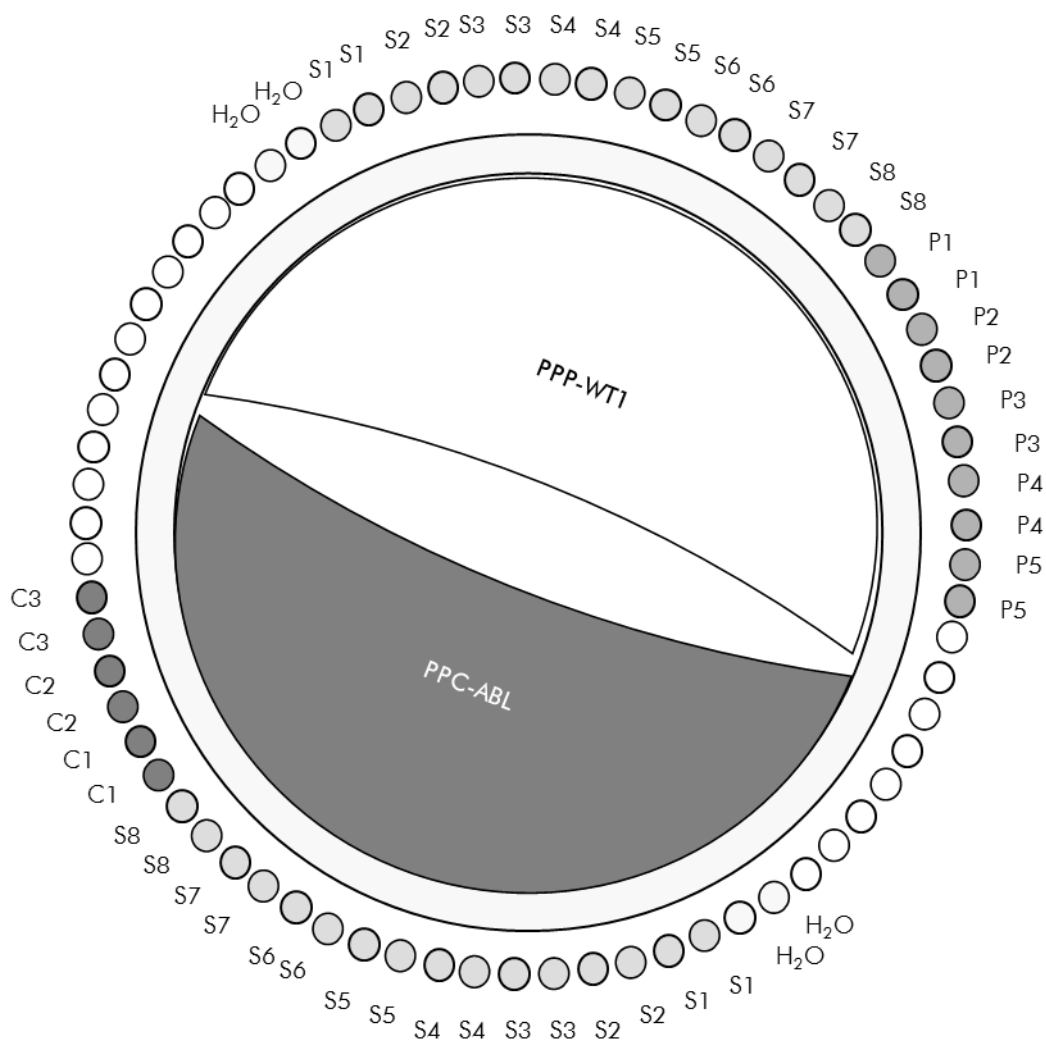
W przypadku używania tego aparatu zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w dwóch powtórzeniach, zgodnie z Tabelą 3.

Tabela 3. Liczba reakcji w przypadku aparatów Rotor-Gene Q z rotorem na 72-probówki

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Wzorzec ABL	2 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia, każde oznaczane w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje
Z mieszaniną starterów i sond WT1 (PPP-WT1)	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Wzorzec WT1	2 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń, każde oznaczane w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparatach Rotor-Gene Q z rotorem na 72 probówki

Aby zoptymalizować zużycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie 8 próbek cDNA w jednym eksperymencie.



Ryc. 4. Sugerowane ustawienie rotora dla eksperymentu z zestawem *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit. P1–5: wzorce WT1; C1–3: wzorce ABL; S: próbka cDNA; H₂O: kontrola — woda.

Uwaga: Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać badaną próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie podczas etapu kalibracji aparat nie wykona kalibracji i zostaną zarejestrowane nieprawidłowe dane fluorescencji.

We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste probówki.

Reakcja qPCR w aparatach Rotor-Gene Q z rotorem na 72 probówki

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.
2. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W tabeli 4 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość wynosiła 25 μl . Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sondy (PPC-ABL lub PPP-WT1). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 4. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	1 reakcja (μl)	ABL: 24 + 1 reakcja (μl)	WT1: 28 +1 reakcja (μl)	Stężenie końcowe
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x stężona	12,5	312,5	362,5	1x
Mieszanina starterów i sondy, 25x stężona	1,0	25,0	29,0	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	6,5	162,5	188,5	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25,0	25 na każdą	25 na każdą	–

- 3. Dodaj po 20 μl wstępnej mieszaniny qPCR na próbkę.**
- 4. Dodaj 5 μl produktu RT (cDNA, odpowiednik 100 ng RNA) uzyskanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz „Protokół: Zalecana znormalizowana odwrotna transkrypcja EAC”, strona 13) do odpowiedniej próbki (łączna objętość 25 μl).**
- 5. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.**
- 6. Umieść próbki w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.**
- 7. Zaprogramuj aparat Rotor-Gene Q na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 5.**

Tabela 5. Profil temperaturowy

Tryb analizy	Oznaczenie ilościowe
Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 50 stopni Czas: 2 min
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95 stopni Czas: 10 min
Cycling (Wykonywanie cykli)	50 razy 95 stopni przez 15 sekund 60 stopni przez 1 min z rejestracją fluorescencji FAM w kanale zielonym: pojedynczy

- 8. W przypadku aparatów Rotor-Gene Q wybierz opcję „Slope Correct” (Korekcja nachylenia) dla analizy. Zalecamy ustawienie wartości progowej na 0,03. Rozpocznij program cykli termicznych, zgodnie z Tabelą 5.**

Protokół: qPCR w aparacie ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

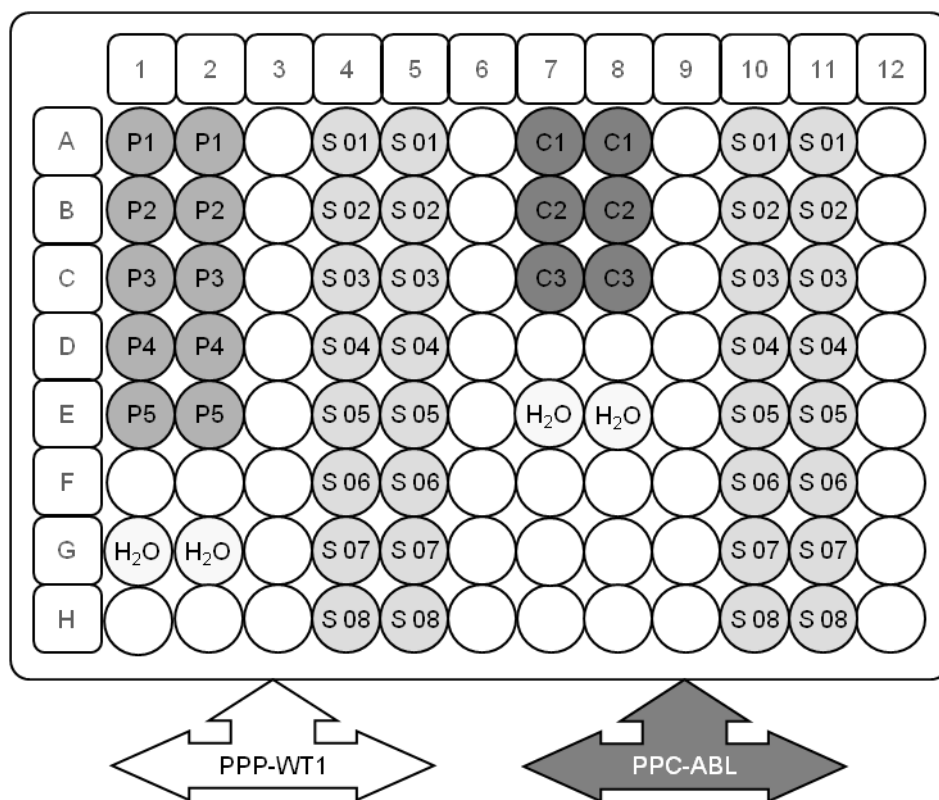
W przypadku używania urządzenia do qPCR przeznaczonego na płytkę 96-dołkową zalecamy wykonanie powtórzeń wszystkich pomiarów, zgodnie z Tabelą 6.

Tabela 6. Liczba reakcji w przypadku używania urządzenia do qPCR przeznaczonego na płytkę 96-dołkową

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Wzorzec ABL	2 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia, każde oznaczone w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje
Z mieszaniną starterów i sond WT1 (PPP-WT1)	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Wzorzec WT1	2 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń, każde oznaczone w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparatach ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Aby zoptymalizować użycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie co najmniej 8 próbek cDNA w jednym eksperymencie. Schemat płytki na Rycinie 5 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Ryc. 5. Sugerowana konfiguracja płytki dla jednego eksperymentu. S: próbka cDNA; P1–5: wzorce WT1; C1–3: wzorce ABL; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparatach ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.
2. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W tabeli 7 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość wynosiła 25 µl. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sondy (PPC-ABL lub PPP-WT1). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 7. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	1 reakcja (μl)	ABL: 24 + 1 reakcja (μl)	WT1: 28 + 1 reakcja (μl)	Stężenie końcowe
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x stężona	12,5	312,5	362,5	1x
Mieszanina starterów i sondy, 25x stężona	1,0	25,0	29,0	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	6,5	162,5	188,5	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25,0	25 na każdą	25 na każdą	–

3. Dodaj po 20 μ l wstępnej mieszaniny qPCR na studzienkę.
4. Dodaj 5 μ l produktu RT (cDNA, odpowiednik 100 ng RNA) uzyskanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz „Protokół: Zalecana znormalizowana odwrotna transkrypcja EAC”, strona 13) do odpowiedniej studzienki (łączna objętość 25 μ l).
5. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
6. Zamknij płytkę i krótko odwiruj (300 x g, około 10 sekund).
7. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta. Zaprogramuj termocykler na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 8 dla aparatu ABI PRISM 7900HT SDS lub Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, lub w Tabeli 9 dla aparatu LightCycler 480.

Tabela 8. Profil temperaturowy dla aparatu ABI PRISM 7900HT SDS lub Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Tryb analizy	Krzywa wzorcowa — bezwzględne oznaczenie ilościowe
Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 50°C Czas: 2 minuty
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 minut
Cycling (Wykonywanie cykli)	50 razy 95°C przez 15 sekund 60°C przez 1 minutę z rejestracją fluorescencji FAM; barwnik wygaszający: TAMRA

Tabela 9. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 480

Tryb analizy	Bezwzględne oznaczenie ilościowe („Abs Quant”)
Detection formats (Formaty detekcji)	Wybrać opcję „Simple Probe” (Pojedyncza próbka) w oknie formatów detekcji
Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 50°C Czas: 2 minuty
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 minut
Cycling (Wykonywanie cykli)	50 razy 95°C przez 15 sekund 60°C przez 1 minutę z rejestracją fluorescencji FAM odpowiednio (483–533 nm) dla wersji LC 01 i (465–510 nm) dla wersji LC 02

8. W przypadku aparatów ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System przejdź do kroku 8a. W przypadku aparatu LightCycler 480 przejdź do kroku 8b.
- 8a. Aparat ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Zalecamy ustawienie wartości progowej na 0,1, co opisano w protokole EAC w kroku analizy i ustawienie wartości początkowej między cyklem 3 a 15. Rozpocznij program cykli, zgodnie z Tabelą 8.

8b. LightCycler 480: Zalecamy korzystanie z trybu analizy punktu dopasowania z wartością t_{1a} 2,0 i wartością progową 2,0. Rozpocznij program cykli termicznych, zgodnie z Tabelą 9.

Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 1.2

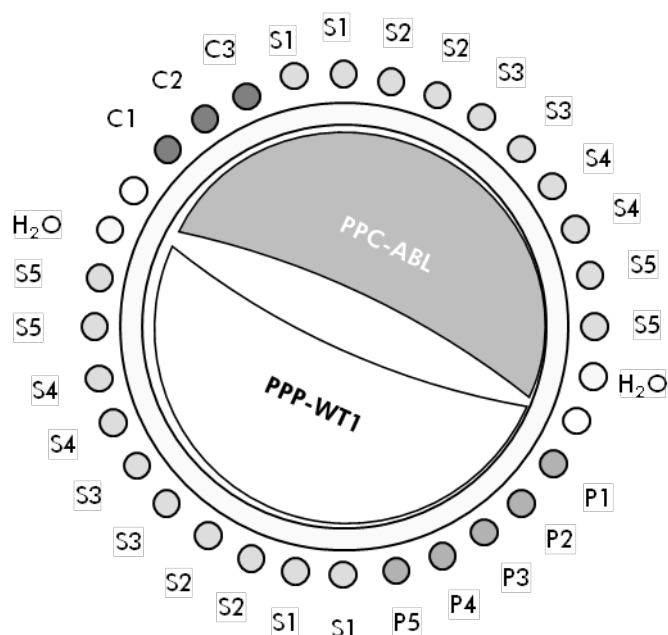
W przypadku korzystania z aparatów kapilarnych zalecamy mierzenie próbek w dwóch powtórzeniach, natomiast kontroli w jednym powtórzeniu, zgodnie z Tabelą 10.

Tabela 10. Liczba reakcji w przypadku aparatu LightCycler 1.2

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sond ABL (PPC-ABL)	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Wzorzec ABL	1 x 3 reakcje (3 rozcieńczenia wzorcowe, każde oznaczane jeden raz)
Kontrola — woda	1 reakcja
Z mieszaniną starterów i sond WT1 (PPP-WT1)	
n próbek cDNA	n x 2 reakcje
Wzorzec WT1	1 x 5 reakcji (5 rozcieńczeń wzorcowych, każde oznaczane jeden raz)
Kontrola — woda	1 reakcja

Przetwarzanie próbek w aparacie LightCycler 1.2

Aby zoptymalizować zużycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie 5 próbek cDNA w jednym eksperymencie. Schemat probówek kapilarnych na Rycinie 6 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Ryc. 6. Sugerowane ustawienie rotora dla eksperymentu z zestawem *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit. P1–5: wzorce WT1; C1–3: wzorce ABL; S: nieznana, analizowana próbka cDNA; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparacie LightCycler 1.2

Uwaga: Ze względu na szczególne wymagania technologiczne podczas wykonywania eksperymentów w aparacie LightCycler należy używać określonych odczynników. Zalecamy używanie mieszanki LightCycler TaqMan Master i przygotowanie 5x stężonej mieszanki Master Mix zgodnie z wytycznymi producenta.

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.**
- 2. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W tabeli 11 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszanki odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość wynosiła 20 μ l. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszanki starterów i sondy (PPC-ABL lub PPP-WT1). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 11. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	1 reakcja (μl)	ABL: 14 + 1 reakcja (μl)	WT1: 16 + 1 reakcja (μl)	Stężenie końcowe
Świeżo przygotowana mieszanina LightCycler TaqMan Master Mix, 5x stężona	4,0	60,0	68,0	1x
Mieszanina starterów i sondy, 25x stężona	0,8	12,0	13,6	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	10,2	153,0	173,4	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	20,0	20 na każdą	20 na każdą	–

3. Dodaj po 15 μ l wstępnej mieszaniny qPCR na próbkę kapilarną.
4. Dodaj 5 μ l produktu RT (cDNA, odpowiednik 100 ng RNA) uzyskanego podczas odwrotnej transkrypcji (patrz „Protokół: Zalecana znormalizowana odwrotna transkrypcja EAC”, strona 13) do odpowiedniej próbki (łączna objętość 20 μ l).
5. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
6. Umieść próbki kapilarne w adapterze dostarczonym z aparatem i krótko odwiruj (700 x g, około 10 sekund).
7. Załaduj próbki kapilarne do termocyklera zgodnie z zaleceniami producenta.
8. Zaprogramuj aparat LightCycler 1.2 na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 12.

Tabela 12. Profil temperaturowy

Tryb analizy	Oznaczenie ilościowe
Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 95°C Czas: 10 minut Spadek: 20
Cycling (Wykonywanie cykli)	50 razy 95°C przez 10 sekund; spadek: 20 60°C przez 1 minutę; spadek: 20; z rejestracją fluorescencji FAM: pojedynczy
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	45°C przez 1 minutę; spadek: 20

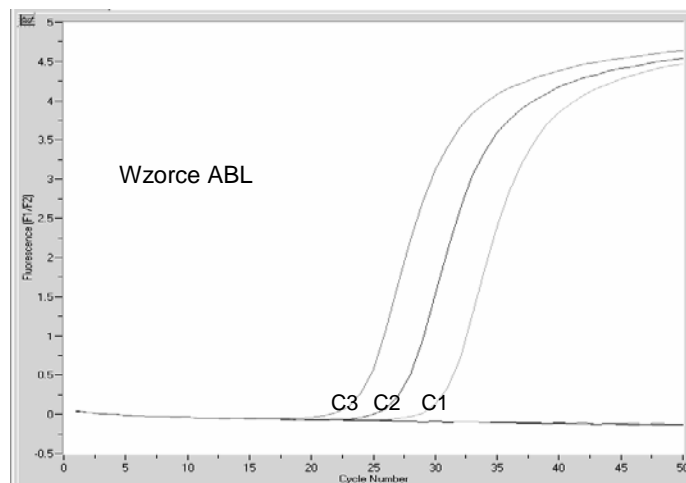
9. W przypadku aparatu LightCycler 1.2 zalecany jest tryb F1/F2 i „2nd derivative analysis” (Analiza drugiej pochodnej). Rozpocznij program cykli termicznych, zgodnie z Tabelą 12.

Interpretacja wyników

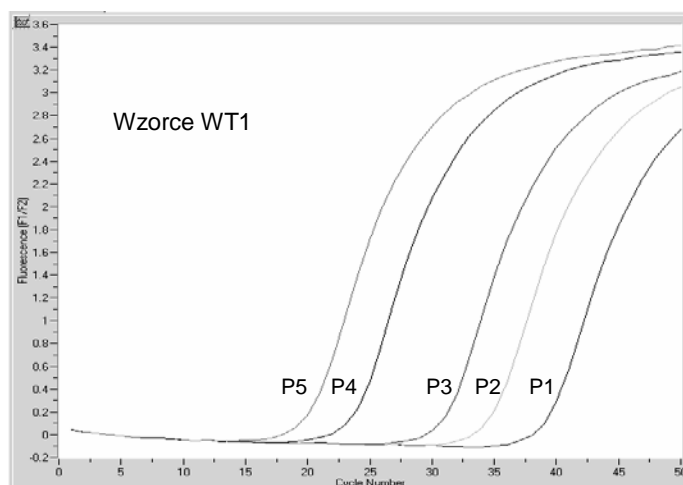
Zasada analizy danych

W przypadku technologii TaqMan liczba cykli PCR wymaganych do wykrycia sygnału powyżej wartości progowej jest nazywana cyklem progowym (C_T) i jest wprost proporcjonalna do ilości sekwencji docelowej obecnej na początku reakcji.

Używając wzorców o znanej liczbie cząsteczek, możliwe jest ustalenie krzywej wzorcowej i określenie dokładnej ilości sekwencji docelowej obecnej w badanej próbce. Krzywe wzorcowe *ipsogen* opierają się na plazmidach i wykorzystują 3 rozcieńczenia wzorcowe plazmidów dla genu kontrolnego (control gene, CG) ABL oraz 5 rozcieńczeń standardowych dla genu WT1, aby zapewnić dokładne krzywe wzorcowe. Na Rycinach 7 i 8 przedstawiono przykład krzywych amplifikacji TaqMan uzyskanych za pomocą zestawu *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit.



Ryc. 7. Detekcja wzorców ABL (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 i 10^5 kopii/ $5 \mu\text{l}$.



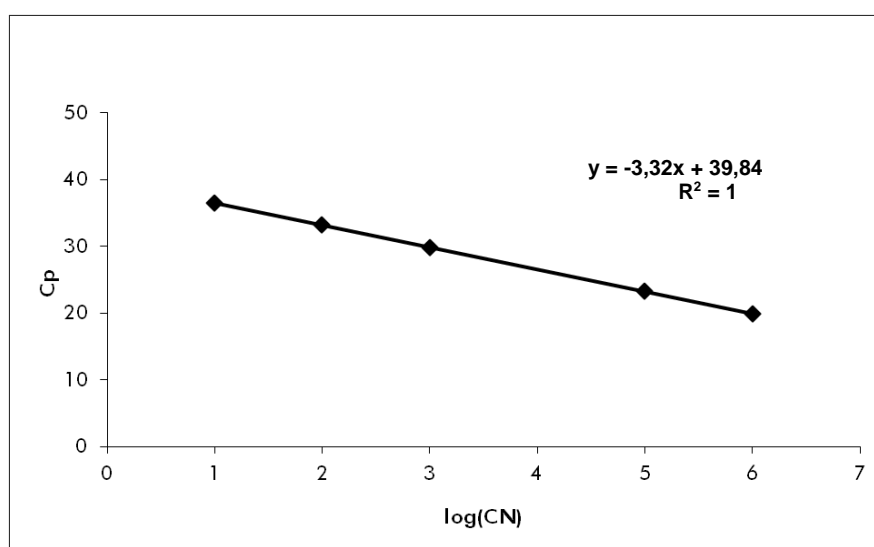
Ryc. 8. Detekcja wzorców WT1 (P1–P5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopii/ $5 \mu\text{l}$.

Wyniki

Krzywa wzorcowa i kryteria jakości

W celu przeanalizowania danych surowych można je wkleić do pliku programu Excel®.

Dla każdego genu (ABL i WT1) wartości surowe C_P/C_T uzyskane dla rozcieńczeń wzorcowych plazmidów są wykreślane względem logarytmu liczby kopii (3, 4 i 5 dla C1, C2 i C3; 1, 2, 3, 5 i 6 dla P1, P2, P3, P4 i P5). Na Ryc. 9 przedstawiono przykład teoretycznej krzywej obliczonej na podstawie 5 rozcieńczeń.



Ryc. 9. Krzywa teoretyczna obliczona na podstawie 5 rozcieńczeń wzorcowych.

Dla każdego genu (ABL i WT1) obliczono krzywą regresji liniowej ($y = ax + b$), gdzie a to nachylenie linii, b to punkt przecięcia z osią y — współrzędna y punktu, w którym linia przecina oś y . Równanie i współczynnik determinacji (R^2) przedstawiono na wykresie.

Wzorce są rozcieńczeniami 10-krotnymi, więc teoretyczne nachylenie krzywej wynosi $-3,32$. Nachylenie między $-3,0$ a $-3,9$ jest akceptowalne, jeśli wartość R^2 jest $>0,95$ (12). Jednakże, w celu uzyskania precyzyjnych wyników, pożądana jest wartość $R^2 >0,98$ (13).

Znormalizowana liczba kopii (normalized copy number, NCN)

Równania krzywej wzorcowej ABL należy użyć do przekształcenia surowych wartości C_P (uzyskanych z PPC-ABL) dla nieznanymi próbek na liczbę kopii ABL (ABL copy numbers, ABL_{CN}).

$$\text{Log}_{10} \text{ABL}_{\text{próbk}} = \frac{\text{Średnia wartość } C_P \text{ ABL} - \text{punkt przecięcia krzywej wzorcowej ABL}}{\text{Nachylenie krzywej wzorcowej ABL}}$$

Równania krzywej wzorcowej WT1 należy użyć do przekształcenia surowych wartości C_P (uzyskanych z PPP-WT1) dla nieznanych próbek na liczbę kopii WT1 (WT1 copy numbers, $WT1_{CN}$).

$$\text{Log}_{10} \text{WT1 próbki}_{CN} = \frac{\text{Średnia wartość } C_P \text{ WT1 – punkt przecięcia krzywej wzorcowej WT1}}{\text{Nachylenie krzywej wzorcowej WT1}}$$

Stosunek tych wartości CN to znormalizowana liczba kopii (NCN) na 10 000 kopii ABL:

$$\text{NCN} = \frac{\text{WT1}_{CN}}{\text{ABL}_{CN}} \times 10,000$$

Kontrola jakości na podstawie wartości ABL

Niska jakość RNA lub wystąpienie problemów podczas etapów qPCR mogą spowodować otrzymanie niskich wartości ABL_{CN} . Zalecamy odrzucenie wyników dla próbek, dla których otrzymano wartości $ABL_{CN} < 4246$.

Powtarzalność między powtórzeniami

Zmienność wartości C_P między powtórzeniami powinna być < 2 , co odpowiada 4-krotnej zmianie wartości liczby kopii.

Zmienność wartości C_P między powtórzeniami zwykle jest $< 1,5$, jeśli średnia wartość C_P powtórzeń jest < 36 (12).

Uwaga: Każdy użytkownik powinien zmierzyć własny poziom powtarzalności w laboratorium.

Kontrole — woda

Kontrole negatywne powinny dawać wartość CN równą zero dla ABL oraz WT1.

Pozytywny wynik dla kontroli w postaci wody jest spowodowany skażeniem krzyżowym. Aby rozwiązać ten problem, patrz „Rozwiązywanie problemów” poniżej.

Rozwiązywanie problemów

Przewodnik może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy

z działu serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na pytania dotyczące danych i/lub protokołu opisanego w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń (informacje kontaktowe — patrz „Informacje kontaktowe”, strona 43).

Komentarze i wskazówki

Negatywny wynik dla genu kontrolnego (ABL) i WT1 we wszystkich próbkach — wzorzec prawidłowy

- | | |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Niska jakość RNA | Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość i stężenie RNA.

Równolegle testuj kontrolę pozytywną w postaci RNA wyizolowanego z linii komórkowej. |
| b) Niepowodzenie etapu odwrotnej transkrypcji | Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość i stężenie RNA.

Równolegle testuj kontrolę pozytywną w postaci RNA wyizolowanego z linii komórkowej. |

Negatywny wynik dla genu kontrolnego (ABL) w próbkach — wzorzec prawidłowy

- | | |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Niska jakość RNA | Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość i stężenie RNA.

Równolegle testuj kontrolę pozytywną w postaci RNA wyizolowanego z linii komórkowej. |
| b) Niepowodzenie etapu odwrotnej transkrypcji | Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość i stężenie RNA.

Równolegle testuj kontrolę pozytywną w postaci RNA wyizolowanego z linii komórkowej. |

Negatywny sygnał dla wzorca

- | | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| a) Błąd pipetowania | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórz reakcję PCR. |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|

Komentarze i wskazówki

- b) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu
- Przechowuj zestaw *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit w temperaturze od -15 do -30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPC i PPP) przed światłem. Patrz „Przechowywanie odczynników i sposób postępowania”, strona 12.
- Unikaj wielokrotnego zamrażania i odmrażania.
- W celu przechowywania podziel odczynniki na porcje.

Pozytywny sygnał w kontrolach negatywnych

- Skażenie krzyżowe
- Wymień wszystkie kluczowe odczynniki.
- Powtórz eksperyment, używając nowych porcji wszystkich odczynników.
- Aby uniknąć skażenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze postępuj z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.

Brak sygnału, nawet w kontrolach wzorcowych

- a) Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników
- Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
- Powtórz reakcję PCR.
- b) Efekt inhibicji materiału próbki spowodowany niewystarczającym oczyszczeniem
- Powtórz przygotowanie RNA.
- c) LightCycler: Wybrano nieprawidłowy kanał detekcji
- Zmień ustawienie kanału na F1/F2 lub 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Nie zaprogramowano rejestracji danych
- Sprawdź programy cykli.
- Wybierz „pojedynczy” tryb rejestracji przy końcu każdego segmentu hybrydyzacji w programie reakcji PCR.

Brak sygnału lub słaby sygnał w próbkach, ale prawidłowy sygnał w kontrolach wzorcowych

Komentarze i wskazówki

- a) Słaba jakość lub niskie stężenie RNA Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość i stężenie RNA.
Równolegle testuj kontrolę pozytywną w postaci RNA wyizolowanego z linii komórkowej.
- b) Niepowodzenie etapu odwrotnej transkrypcji Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość i stężenie RNA.
Równolegle testuj kontrolę pozytywną w postaci RNA wyizolowanego z linii komórkowej.

Zbyt niskie natężenie fluorescencji

- a) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu Przechowuj zestaw *ipsogen WT1 ProfileQuant* Kit w temperaturze od -15 do -30°C i chroń mieszaniny starterów i sond (PPC i PPP) przed światłem. Patrz „Przechowywanie odczynników i sposób postępowania”, strona 12.
Unikaj wielokrotnego zamrażania i odmrażania.
W celu przechowywania podziel odczynniki na porcje.
- b) Bardzo niska początkowa ilość docelowego RNA Zwiększ ilość RNA próbki.
Uwaga: W zależności od wybranej metody przygotowania RNA może wystąpić efekt inhibicji.

Należy zwracać uwagę na daty przydatności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich elementów zestawu. Nie używać przeterminowanych odczynników.

Uwaga: Ten zestaw zaprojektowano zgodnie z badaniami konsorcjum „European LeukemiaNet” (ELN) (10, 11). Zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanymi odczynnikami i aparatami. Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy QIAGEN.

Charakterystyka działania testu

Badania niekliniczne

Materiały i metody

Badania liniowości wykonano na 14 próbkach; każdą otrzymano z innej mieszaniny RNA wyizolowanego z linii komórkowej o wysokiej ekspresji oraz próbek zdrowych dawców, u których obserwowano niski poziom ekspresji genu WT1. Każdą próbkę testowano w trzech powtórzeniach. W przypadku NCN, wartości mieściły się w zakresie od 2,20 do 3838,11 NCN, a w badaniu wykazano, że zestaw *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit daje liniowe wyniki w tym zakresie wartości.

Precyzja

Badanie precyzji wykonano na 4 próbkach; każdą z nich otrzymano z innej mieszaniny RNA wyizolowanego z linii komórkowych o wysokiej i niskiej ekspresji genu WT1. Oznaczenia te wykonywano do 16 razy dla każdej próbki. W poniższych tabelach podsumowano dane analityczne.

Tabela 13. Dane analityczne z badania precyzji — plazmidy

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

Tabela 14. Dane analityczne z badania precyzji — linie komórkowe

	Rozcieńczenie	Średnia wartość NCN	σ	n	CV (%)
Rozcieńczenie RNA z linii komórkowej	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

Próg zerowy i próg wykrywalności

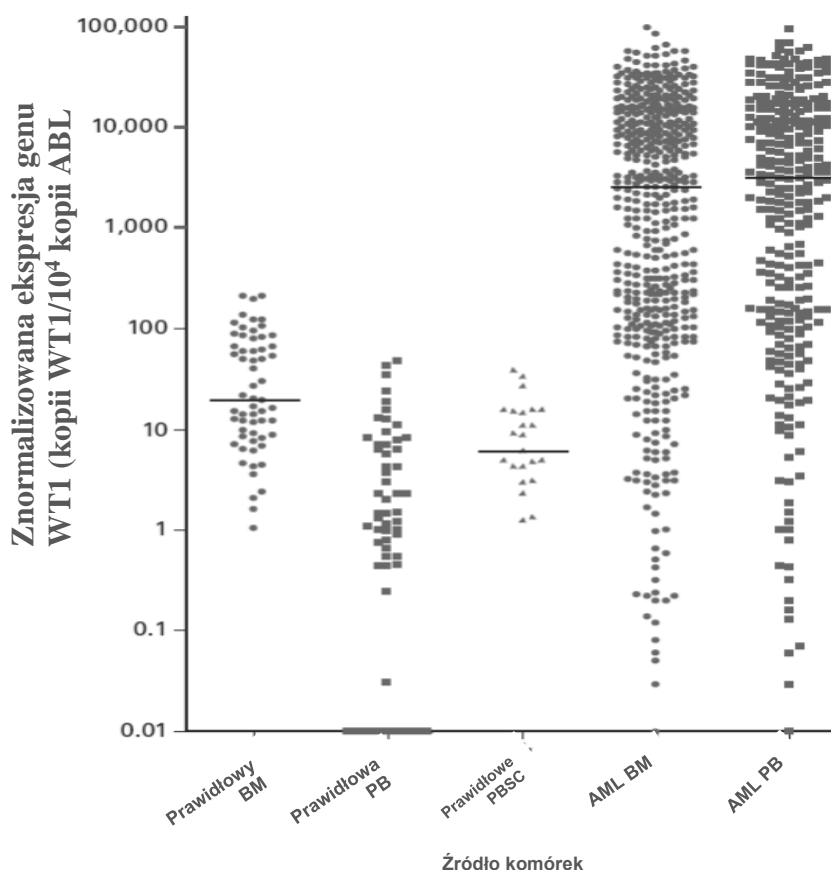
Projekt badania był oparty na zaleceniach opisanych w dokumencie EP17-A „Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline” komitetu NCCLS. Poziom tła lub próg zerowy (limit of blank, LOB) określono na prawidłowych próbkach krwi pobranych od zdrowych dawców (4 próbki, 73 pomiary). Wartość ta była równa 3,66 WT1 NCN.

Próg wykrywalności (limit of detection, LOD), który wskazuje swoistość analityczną, określono na próbkach o znanym, niskim poziomie ekspresji genu WT1, pobranych od zdrowych dawców, do których dodano komórki o wysokim poziomie ekspresji genu WT1. Zapewniło to, że oczekiwana wartość NCN była

4-krotnością wartości LOB. Wykonano 72 pomiary 4 próbek i uzyskano wartość LOD równą 13,08 wartości WT1 NCN.

Badania kliniczne

Ze względu na to, że gen WT1 ulega ekspresji w prawidłowych komórkach układu krwiotwórczego, kluczowe jest ustalenie poziomu ekspresji obserwowanego w prawidłowych próbkach kontrolnych, aby zdefiniować wartość progową, która umożliwi odróżnienie amplifikacji charakterystycznej dla resztkowej białaczki od tła. Analiza 204 próbek kontrolnych pobranych od zdrowych ochotników za pomocą oznaczenia ELN stosowanego w zestawie *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit potwierdziła, że w próbkach krwi obwodowej, szpiku kostnego i macierzystych komórek z krwi obwodowej obserwowany jest bardzo niski poziom ekspresji genu WT1. Otrzymano następujące wartości średnie: 19,8 kopii WT1/10⁴ kopii ABL (zakres 0–213) w szpiku kostnym, 0,01 (zakres 0,01–47,6) w krwi obwodowej i 6,1 (zakres 0–39) w macierzystych komórkach z krwi obwodowej (patrz Ryc. 10). Ekspresja genu WT1 w krwi obwodowej była istotnie niższa niż w szpiku kostnym ($p < 0,0001$). Na podstawie tych wyników określono górny limit wartości prawidłowych równy 250 NCN dla szpiku kostnego i 50 NCN dla krwi obwodowej.



Ryc. 10. Ekspresja genu WT1 w próbkach pobranych od zdrowych dawców. Ostra białaczka szpikowa (Acute myeloid leukemia, AML); szpik kostny (Bone marrow, BM); krew obwodowa (Peripheral blood, PB); komórki macierzyste z krwi obwodowej (Peripheral blood stem cells, PBSC). (15)

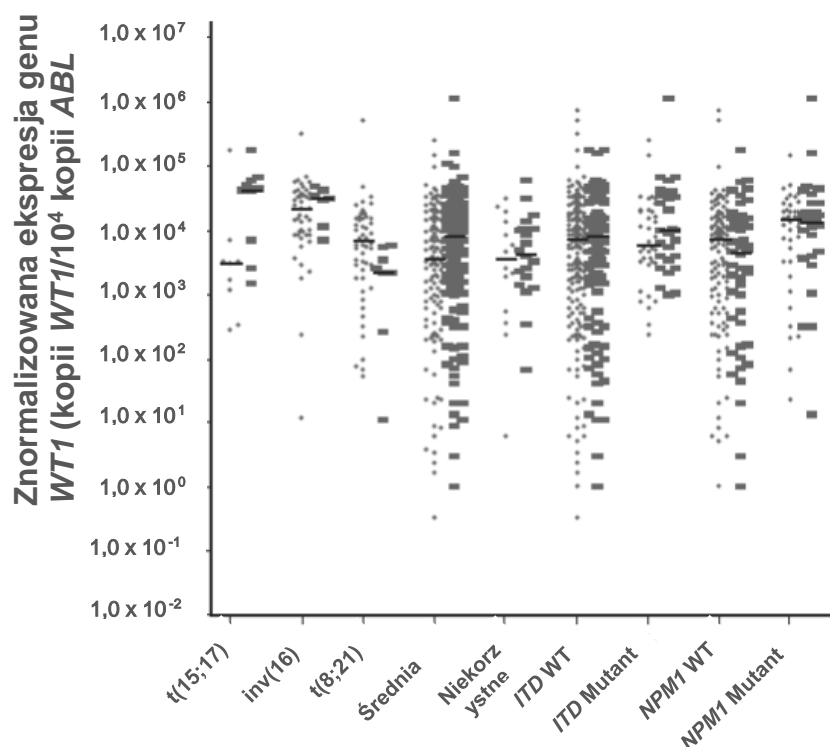
Definiowanie ekspresji genu WT1 za pomocą znormalizowanego oznaczenia qPCR ELN w próbkach AML przed leczeniem

Aby ocenić możliwości zastosowania oznaczenia ELN wykorzystywanego w zestawie *ipsogen WT1 ProfileQuant Kit* do wykrywania MRD, przeanalizowano 620 próbek pobranych przed leczeniem (238 z krwi obwodowej i 382 ze szpiku kostnego) od 504 pacjentów.

Gen *WT1* ulegał nadekspresji powyżej poziomu tła (definiowanego jako >250 i >50 kopii *WT1/10⁴* kopii *ABL* odpowiednio w szpiku kostnym i krwi obwodowej) w 86% i 91% spośród próbek diagnostycznych AML szpiku kostnego i krwi obwodowej (również przedstawiono na Ryc. 10).

Średnia wartość kopii *WT1/10⁴* kopii *ABL* wynosiła 2505, (zakres $0-7,5 \times 10^5$) w szpiku kostnym ($p < 0,0001$ względem prawidłowego szpiku kostnego) i 3107 (zakres $0-1,13 \times 10^6$) w krwi obwodowej ($p < 0,0001$ względem prawidłowej krwi obwodowej). W całej kohorcie nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji między próbkami krwi obwodowej a próbkami szpiku kostnego, co potwierdzono za pomocą wyników uzyskanych dla pacjentów, od których badano pary próbek diagnostycznych krwi obwodowej i szpiku kostnego, patrz Cilloni D i wsp., *J Clin Oncol*, Ryc. A3 w Załączniku (15).

Zmienność w znormalizowanych poziomach ekspresji genu *WT1* obserwowano na podstawie cytogenetyki (Ryc. 11, $p < 0,001$), ze szczególnie wysokimi poziomami w przypadkach z *inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)* (mediana $2,31 \times 10^4$, zakres $12-3,14 \times 10^5$). Istotnie wyższe poziomy genu *WT1* wykryto również w AML z mutacjami *NPM1* (mutant *NPM1*: mediana $1,44 \times 10^4$, zakres $0-1,13 \times 10^6$; *NPM1* typu dzikiego (wild type, WT): mediana 6566, zakres $0-7,5 \times 10^5$, $p = 0,005$).



Ryc. 11. Zmienność ekspresji genu WT1 na podstawie cytogenetyki (15).

Przedrukowano za zgodą Cilloni D i wsp.: 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, wszelkie prawa zastrzeżone.

W 15 przypadkach z mutacją w egzonach 7 i 9 genu *WT1* poziom ekspresji genu *WT1* zdefiniowany za pomocą oznaczenia ELN był porównywalny do poziomów obserwowanych w przypadku genu *WT1* typu dzikiego ($p=0,2$). Jednakże analiza sekwencji serii 32 przypadków, w których oznaczenie ELN sugerowało niski poziom ekspresji transkryptu genu *WT1* (<250 kopii/ 10^4 kopii ABL), wykazała, że w 3 przypadkach (9,4%) ten niski poziom ekspresji był związany z mutacjami powodującymi przerwanie miejsca wiązania startera „forward”, patrz Cilloni D i wsp., *J Clin Oncol*, Ryc. A4 w Załączniku (15).

Literatura

Firma QIAGEN udostępnia obszerną, aktualną bazę danych online publikacji naukowych, w których stosowane są produkty QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania umożliwiają znajdowanie potrzebnych artykułów według słów kluczowych lub zastosowań, obszarów badań, tytułów itp.

W celu uzyskania listy pozycji literaturowych należy odwiedzić internetową bazę danych firmy QIAGEN pod adresem www.qiagen.com/RefDB/search.asp lub skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem firmy QIAGEN.

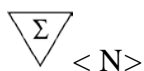
Cytowane odniesienia do literatury

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.

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:



Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji



Termin ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii



Numer materiału



Globalny Numer Jednostki Handlowej



Zakres temperatury



Producent



Zapoznać się z instrukcją użycia



European LeukemiaNet

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego Centrum Pomocy Technicznej pod adresem www.qiagen.com/Support, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona www.qiagen.com).

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Zestaw <i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	Na 24 reakcje: wzorce genu kontrolnego ABL, wzorce genu WT1 (egzon 1–2), mieszanina starterów i sondy ABL, mieszanina starterów i sondy PPP-WT1	676923
Rotor-Gene Q MDx — do analizy Real-time PCR w zastosowaniach klinicznych, zwalidowany do użytku w diagnostyce in vitro (IVD)		
Platforma Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cykler do reakcji Real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032
System Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cykler do reakcji Real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; obejmuje instalację i przeszkolenie	9002033

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Strona celowo pozostawiona pusta

Ten produkt jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Produkty *ipsogen* nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży lub wykorzystywane do produkcji komercyjnych produktów bez pisemnej zgody firmy QIAGEN.

Informacje zawarte w niniejszym dokumencie mogą ulec zmianie bez powiadomienia. Firma QIAGEN nie ponosi żadnej odpowiedzialności za błędy, które mogą wystąpić w niniejszym dokumencie. Dokument ten uważa się za kompletny i dokładny w momencie jego opublikowania. Firma QIAGEN nie ponosi w żadnym wypadku odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody przypadkowe, specjalne lub wynikowe ani z tytułu odszkodowań wielokrotnych w związku z niniejszym dokumentem lub jego użyciem.

Produkty *ipsogen* są objęte gwarancją w odniesieniu do podanych specyfikacji. Wyłącznym obowiązkiem firmy QIAGEN i jedynym zadośćuczynieniem przysługującym klientowi jest bezpłatna wymiana produktów w przypadku, gdy ich działanie nie będzie zgodne z zapisami gwarancji.

Znaki towarowe: 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).

Ograniczona umowa licencyjna

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit na następujące warunki:

1. Zestawu *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit można używać wyłącznie zgodnie z dokumentem *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit — *Instrukcja obsługi* i tylko razem ze składnikami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w dokumencie *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit — *Instrukcja obsługi* oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Ten zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodjęcie ani niepozwolenie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

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

HB-1355-002 © 2013–2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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

