

# *ipsogen*<sup>®</sup> WT1 ProfileQuant<sup>®</sup> Kit (ELN\*) Priručnik



Verzija 1

IVD

Kvantitativna in vitro dijagnostika

Za uporabu s instrumentima Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>  
7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System  
i LightCycler<sup>®</sup>



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

R2

MAT

1072503HR

 **LeukemiaNet**<sup>®</sup>  
European



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vodeći dobavljač inovativnih tehnologija za uzorkovanje i ispitivanje koje omogućuju izolaciju i otkrivanje sadržaja bilo kojeg biološkog uzorka. Naši napredni, visoko kvalitetni proizvodi i usluge osiguravaju uspjeh u postupku od uzimanja uzorka do dobivanja rezultata

QIAGEN postavlja standarde za:

- pročišćavanje DNA, RNA i bjelančevina
- ispitivanje nukleinskih kiselina i bjelančevina
- istraživanje microRNA i RNAi
- automatiziranje tehnologija za uzorkovanje i ispitivanje

Naš je zadatak omogućiti vam postizanje izvanrednog uspjeha i novih otkrića. Za više informacija posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Sadržaj

Namjena	5
Sažetak i objašnjenje	5
Načelo postupka	6
Priloženi materijali	10
Sadržaj kita	10
Potrebni materijali koji nisu priloženi	11
Upozorenja i mjere opreza	12
Opće mjere opreza	12
Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima	13
Postupak	14
Priprema RNA iz uzorka	14
Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija	14
Protokol: qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete	17
Protokol: qPCR na instrumentima ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480	21
Protokol: qPCR na instrumentu LightCycler 1.2	26
Tumačenje rezultata	30
Načelo analize podataka	30
Rezultati	31
Vodič za otkrivanje i rješavanje pogrešaka	32
Kontrola kvalitete	36
Ograničenja	36
Karakteristike izvedbe	37
Ne-kliničke studije	37
Kliničke studije	39
Literatura	42
Simboli	43
Informacije o kontaktu	44



## Namjena

Proizvod *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit namijenjen je za kvantifikaciju transkripata gena Wilmsova tumora (WT) u ukupnoj RNA izoliranoj kod pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). Dobiveni rezultati namijenjeni su za pomoć pri praćenju reakcije na rano liječenje i minimalne ostatne bolesti (MRD).

## Sažetak i objašnjenje

Trenutni protokoli liječenja akutne mijeloične leukemije (AML) temelje se na prognostičkim čimbenicima, koji doprinose stratifikaciji terapije (1, 2). Ključni prognostički čimbenici koji su do sada imenovani uključuju svojstva koja se uzimaju u obzir prije liječenja, kao što su dob i broj bijelih krvnih stanica (WBC), kao i kariotip pacijenta i prisutnost specifičnih mutacija gena kao što su FLT3 i NPM1 (3, 4). Morfološka reakcija na indukcijsku kemoterapiju pruža daljnji čimbenik predviđanja koji je uključen u trenutne sheme stratifikacije rizika koje se koriste za donošenje odluke o konsolidacijskoj terapiji, posebno o alogenoj transplantaciji (5). Dok se pomoću ovih parametara razlikuju skupine pacijenata prema prilično različitim rizicima od povratka bolesti, postoji prijevremena potreba za poboljšanjem stratifikacije rizika kako bi se na pouzdaniji način odredili pacijenti koji bi mogli imati najviše (ili najmanje) koristi od transplantacije. Nekoliko studija ističe potencijal praćenja MRD pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) kako bi se detektirali ciljevi specifični za leukemiju, tj. transkripti fuzijskog gena (FG) kao što su PML-RARA, CFBF-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) ili mutacije specifičnih gena kao što je NPM1. Time se omogućuje prepoznavanje pacijenata s najvišim rizikom od povratka bolesti te se na taj način ukazuje na kandidate za rane postupke liječenja (6).

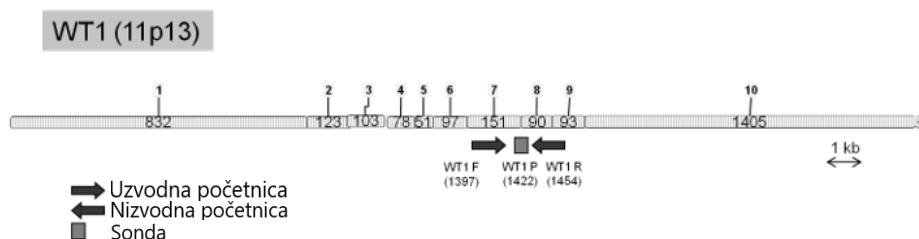
Otpriblike polovica pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML) nema odgovarajući cilj specifičan za leukemiju te u ovom slučaju postoji značajno zanimanje za razvoj alternativnih pristupa koji bi omogućili praćenje MRD-a, što bi se moglo primjenjivati na znatno većem broju pacijenata. Jedna od strategija uključuje uporabu protočne citometrije kako bi se otkrili i pratili aberantni fenotipovi koji se povezuju s leukemijom, ali, iako je ova strategija široko primjenjiva, ona je i tehnički zahtjevnija (6). Drugi pristup uključuje uporabu qPCR kako bi se otkrili transkripti sa znatno višim izražajem u blastu akutne mijeloične leukemije u odnosu na normalnu krv i koštanu srž, a najviše se pozornosti obraća na gen *WT1* (6).

Gen *WT1* nalazi se na kromosomu 11p13 i kodira transkripcijski čimbenik cinkova prsta te se izvorno određivao zbog uključenosti u patogenezu Wilmsova tumora (7). Pokazalo se da gen *WT1* ima visoki izražaj kod nekoliko hematopoetskih

tumora, uključujući akutnu mijeloičnu leukemiju (7, 8). Iako su mehanizmi koji vode do prekomjernog izražaja WT1 slabo shvaćeni, ova se pojava može iskoristiti kao marker koji indicira prisutnost, učestalost i ponovnu pojavu leukemične hematopoeze.

## Načelo postupka

Tehnika za qPCR omogućuje točnu kvantifikaciju PCR produkata tijekom eksponencijalne faze postupka PCR amplifikacije. Podaci za qPCR mogu se brzo dobiti, bez obrade nakon PCR, detekcijom fluorescentnih signala u stvarnom vremenu tijekom i/ili nakon PCR cikliranja, na taj način drastično smanjujući rizik od kontaminacije PCR produkta. Trenutno su dostupne tri glavne vrste tehnika za qPCR: qPCR analiza uz pomoć SYBR® zelene I boje, qPCR analiza uz pomoć sondi za hidrolizu te qPCR analiza uz pomoć sondi za hibridizaciju.

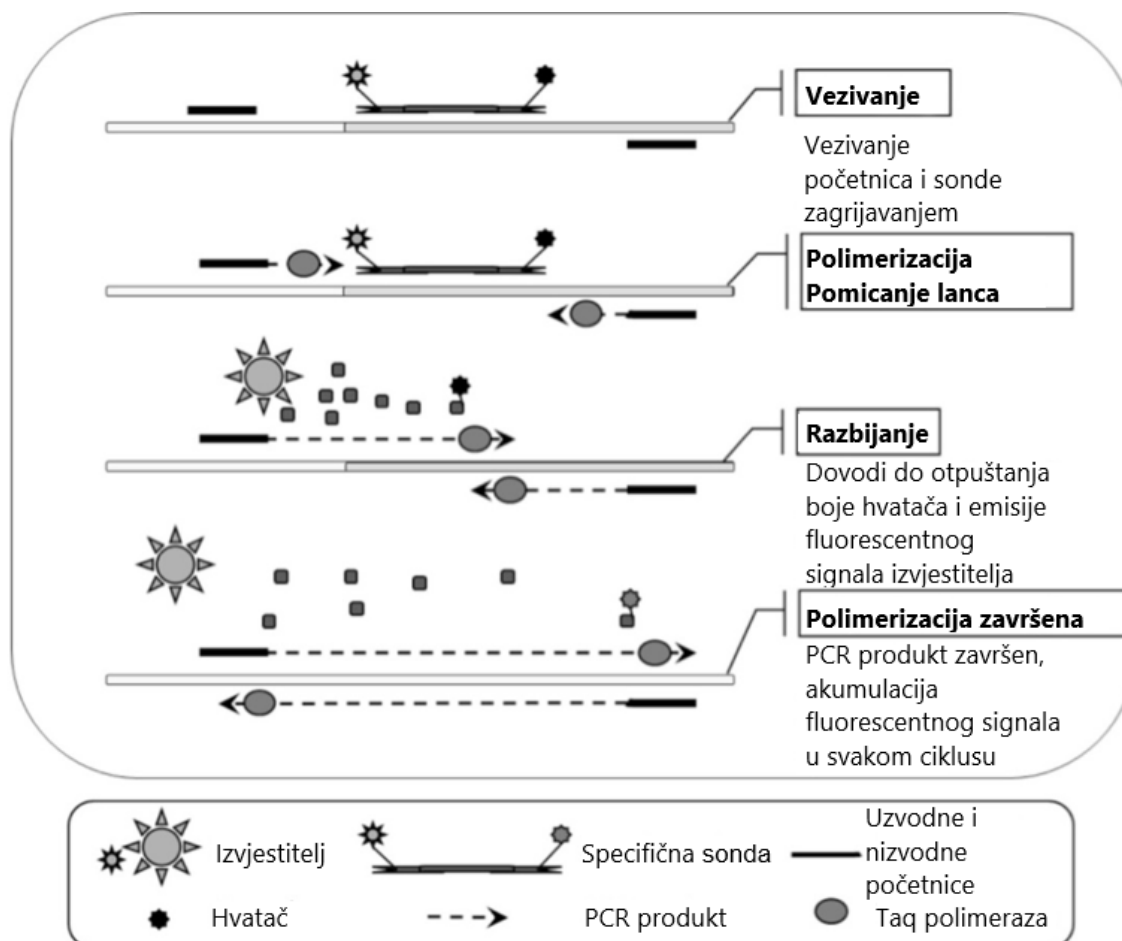


**Slika 1. Shematski prikaz transkripta WT1 prekriženog ELN qPCR početnicama i kompletom sondi: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R.** Broj ispod početnica i sonde odnosi se na položaj njihovih nukleotida pri normalnom transkriptu gena. Ekson 5 može se alternativno prekrojiti.

Ovo ispitivanje koristi se načelom qPCR hidrolize dvostruko obojenih oligonukleotida. Tijekom PCR, uzvodne i nizvodne početnice hibridiziraju se u specifičnu sekvencu. Dvostruko obojeni oligonukleotid sadržan je u istoj mješavini. Ova sonda, koja se sastoji od oligonukleotida označenog na 5' kraju bojom izvjestitelja i na 3' kraju bojom hvatača, hibridizira se do ciljane sekvence unutar PCR produkta. Analiza putem qPCR sa sondama za hidrolizu koristi 5'→3' egzonukleaznu aktivnost *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimeraze. Kada je sonda netaknuta, blizina boje izvjestitelja i boje hvatača rezultira supresijom izvjestiteljske fluorescencije, prvenstveno prijenosom energije Försterovim tipom.

Tijekom PCR, ako je prisutan cilj za koji postoji interes, sonda se specifično vezuje zagrijavanjem između lokacija uzvodne i nizvodne početnice. Egzonukleazna aktivnost 5'→3' DNA polimeraze razbija sondu između izvjestitelja i hvatača samo ako se sonda hibridizira do cilja. Fragmenti sonde potom se udaljavaju od cilja i nastavlja se polimerizacija lanca. 3' kraj sonde blokiran je kako bi se spriječilo širenje sonde tijekom PCR (Slika 2). Ovaj postupak odvija se u svakom ciklusu i ne utječe na eksponencijalnu akumulaciju produkta.

Povećanje fluorescentnog signala detektira se samo ako je ciljna sekvenca komplementarna sa sondom te se prema tome pojačava tijekom PCR. Zbog ovih zahtjeva, nespecifična amplifikacija se ne detektira. Prema tome, povećavanje fluorescencije izravno je proporcionalno ciljnoj amplifikaciji tijekom PCR.

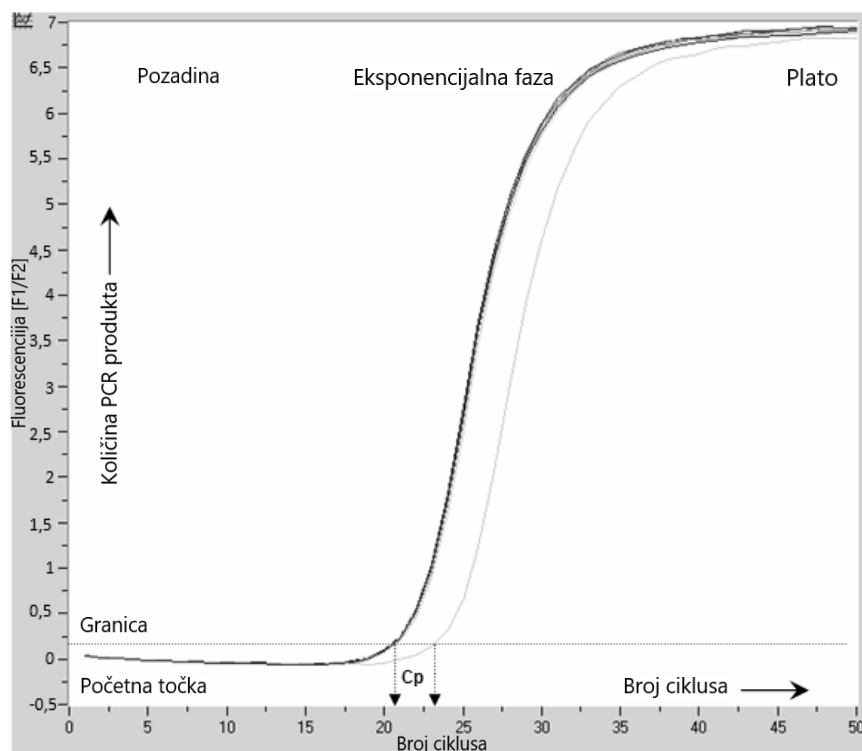


**Slika 2. Načelo reakcije.** Ukupna RNA reverzno se transkribira, a generirana cDNA amplificira se tijekom PCR pomoću para specifičnih početnica i specifične interne sonde s dvostrukim bojenjem (FAM™–TAMRA™). Sonda se povezuje s amplikonom tijekom svakog koraka vezivanja PCR postupka. Kada se *Taq* proširuje od spoja početnice do amplikona, ona pomiče 5' kraj sonde, koji se potom razgrađuje egzonukleaznom aktivnošću 5'→3' *Taq* DNA polimeraze. Razbijanje se nastavlja dok preostala sonda ne istopi amplikon. Ovaj postupak oslobađa fluorofor i hvatač u otopinu, prostorno ih odvajajući i dovodeći do povećavanja fluorescencije od FAM i smanjivanja fluorescencije od TAMRA.

Kada se fluorescencija ucrtava u ovisnosti o broju ciklusa, akumulacija PCR produkta prikazana je na Slici 3. Krivulja amplifikacije sukcesivno se sastoji od rane pozadinske faze (ispod razine detekcije instrumenta), eksponencijalne faze (ili logaritamske faze) i platoa. Najtočnije kvantitativno utvrđivanje može se obaviti samo tijekom eksponencijalne faze. Prvi ciklus, u kojem instrument može prepoznati fluorescenciju nastalu amplifikacijom koja se nalazi iznad pozadinskog

signala, zove se granični ciklus ( $C_T$ ) ili granična točka ( $C_P$ ). Odabirom granice unutar logaritamsko-linearne faze, moguće je izračunati stvarni iznos inicijalnih početnih molekula jer je jačina fluorescencije izravno proporcionalna iznosu PCR produkta u eksponencijalnoj fazi.

Tijekom faze platoa ne dolazi do značajnog rasta količine PCR produkta. Većinom je uzrok tomu deplecija PCR sastavnica i ponovno vezivanje zagrijavanjem lanaca PCR produkta koje je uzrokovano visokom koncentracijom završnih produkata koji sprječavaju daljnje vezivanje početnica pomoću zagrijavanja.



Slika 3. Nastajanje fluorescencije tijekom ciklusa i sukcesivnih faza amplifikacije.

Najizravniji i najprecizniji pristup za analizu kvantitativnih podataka je korištenje standardne krivulje koja se priprema iz niza otopina kontrolnog predloška poznatih koncentracija. To je poznato pod nazivom "standardna krivulja" ili "apsolutna" kvantifikacija. Nakon amplifikacije niza standardnih otopina, standardna krivulja nastaje zapisivanjem logaritma početnog predloška broja kopija u odnosu na vrijednosti  $C_P$  nastalih za svaku otopinu. Crtanje ovih točaka stvara standardnu krivulju. Korištenje jednadžbe ove standardne krivulje omogućuje određivanje početnog broja kopija uzoraka za kvantifikaciju.

WT1 ProfileQuant Kit (ELN) uključuje specifične mješavine plazmida, početnica i sonde za WT1 i ABL. Ove su se sastavnice zajedno validirale u kontekstu međulaboratorijske studije koju je vodila grupa stručnjaka iz konzorcija European Leukemia Net (Europska mreža za leukemiju). Ispitivanje koje su prethodno objavili



Van Dijk i suradnici dosljedno je nadmašilo druga ispitivanja i zbog svoje je konfiguracije manje sklono mutacijama kod akutne mijeloične leukemije (9). Stoga je odabrano kao ELN WT1 ispitivanje. Proizvod *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit temelji se na ovoj tehnici. U ovom kitu, endogena kontrola (ABL transkript) amplificirana je iz uzorka kao i iz transkripta WT1. Priložene su standardne serijske otopine kontrole i WT1 cDNA, a nastale standardne krivulje omogućuju točan izračun broja kopija WT1 transkripata i ABL u svakom uzorku.

# Priloženi materijali

## Sadržaj kita

<b><i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Kataloški broj</b>		<b>676923</b>
<b>Broj reakcija</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL standardna otopina kontrolnog gena) (10 <sup>3</sup> kopija/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL standardna otopina kontrolnog gena) (10 <sup>4</sup> kopija/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL standardna otopina kontrolnog gena) (10 <sup>5</sup> kopija/5 µl)	C3-ABL	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 standardna otopina profila gena) (10 <sup>1</sup> kopija/5 µl)	P1-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 standardna otopina profila gena) (10 <sup>2</sup> kopija/5 µl)	P2-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 standardna otopina profila gena) (10 <sup>3</sup> kopija/5 µl)	P3-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 standardna otopina profila gena) (10 <sup>5</sup> kopija/5 µl)	P4-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 standardna otopina profila gena) (10 <sup>6</sup> kopija/5 µl)	P5-WT1	50 µl
Primers and Probe Mix ABL* (Mješavina početnica i sonde ABL)	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (ELN) <sup>†</sup> (Mješavina početnica i sonde PPP-WT1)	PPP- WT1(ELN) 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit Handbook (English) ( <i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit Priručnik (hrvatski))		1

\* Mix of specific reverse and forward primers for the ABL control gene (CG) plus a specific FAM–TAMRA probe (Mješavina specifičnih uzvodnih i nizvodnih početnica za ABL kontrolni gen plus specifična FAM–TAMRA sonda).

<sup>†</sup> Mix of specific reverse and forward primers for the WT1 (exon 1-2) gene plus a specific FAM–TAMRA probe (Mješavina specifičnih uzvodnih i nizvodnih početnica za WT1 (ekson 1-2) gen plus specifična FAM–TAMRA sonda).

**Napomena:** Nakratko centrifugirajte standardne otopine i mješavine početnica i sonde prije uporabe.

## Potrebni materijali koji nisu priloženi

Prilikom rada s kemikalijama, uvijek nosite prikladnu laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Za više informacija pogledati sigurnosno-tehnički list (SDS), dostupan od dobavljača proizvoda.

### Reagensi

- Voda za PCR bez nukleaze
- Reagensi za reverznu transkripciju: Validirani reagens je Superscript<sup>®</sup> II (ili Superscript) Reverse Transcriptase (*reverzna transkriptaza*), uključuje 5x pufer za prvi lanac, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. br. 18064-022)
- Inhibitor RNaze: Validirani reagens je RNaseOUT<sup>™</sup> (Life Technologies, kat. br. 10777-019)
- Komplet dNTP-ova, PCR stupnja
- Proizvoljni heksamer
- MgCl<sub>2</sub>
- Pufer i Taq DNA polimeraza: Validirani reagensi su TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (glavna mješavina PCR 2x) (Life Technologies, kat. br. 4304437) i LightCycler TaqMan Master (glavna mješavina PCR 5x) (Roche, kat. br. 04535286001)

### Potrošni materijal

- Sterilni vrhovi pipeta za PCR s hidrofobnim filterima, bez nukleaze i otporni na aerosole
- Epruvete za PCR od 0,5 ml ili 0,2 ml bez RNaze i DNaze
- Led

### Oprema

- Mikrolitarska pipeta\* za PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolna centrifuga\* s rotorom za reakcijske epruvete od 0,2 ml/0,5 ml i maksimalnom brzinom od 13.000–14.000 o/min
- Instrument za PCR u stvarnom vremenu:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM<sup>®</sup> ili drugi instrument Rotor-Gene; LightCycler 1.2 ili 480 ili ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i povezani specifični materijal

- Termocikler\* ili vodena kupelj\* (korak reverzne transkripcije)

**Napomena:** Pobrinite se da su termocikler ili vodena kupelj provjereni i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

## Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Prilikom rada s kemikalijama, uvijek nosite prikladnu laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Za više informacija pogledati odgovarajući sigurnosno-tehničke listove (SDS). Isti su dostupni putem interneta u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na stranici [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), gdje možete pronaći, pregledati i ispisati SDS za svaki QIAGEN® kit i njegove sastavnice.

Otpad od uzoraka i ispitivanja odlažite u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.

## Opće mjere opreza

Uporaba qPCR testova zahtijeva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme koja je namijenjena za molekularnu biologiju i sukladna primjenjivim propisima i relevantnim normama.

Kit je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. Reagensi i upute dostavljeni u ovom kitu validirani su za optimalnu izvedbu. Daljnje razrjeđivanje reagenasa ili izmjena vremena i temperatura inkubacije može rezultirati pogrešnim ili neusklađenim podacima. Može doći do promjene PPC-ABL i PPP-WT1 reagenasa, ako se izlože svjetlosti. Svi su reagensi formulirani posebno za uporabu s ovim testom. Da bi se postigla optimalna izvedba testa, ne smiju se vršiti nikakve preinake.

Za određivanje razina transkripcije pomoću qPCR potrebna je reverzna transkripcija mRNA i amplifikacija generirane cDNA pomoću PCR. Prema tome, cjelokupni postupak ispitivanja mora se obaviti u uvjetima bez RNaze/DNaze.

Budite iznimno oprezni kako biste spriječili:

- Kontaminaciju RNazom/DNazom koja može prouzročiti degradaciju predloška mRNA i generirane cDNA
- Kontaminaciju mRNA ili kontaminaciju zbog prijenosa u PCR koja za rezultat ima lažno pozitivan signal

Stoga preporučujemo sljedeće.

- Koristite laboratorijsko posuđe bez nukleaze (npr. pipete, vrhovi pipeta, bočice za reakciju) i nosite rukavice dok izvodite ispitivanje.
- Koristite svježe vrhove pipeta otporne na aerosole za sve korake pipetiranja kako biste izbjegli unakrsno zagađenje uzoraka i reagensa.
- Pripremite pre-PCR master mješavinu s namjenskim materijalom (pipete, vrhovi itd.) u namijenjenom području gdje se ne uvode DNA matrice (cDNA, DNA, plazmidi). Dodajte predložak na odvojenom mjestu (po mogućnosti u odvojenoj prostoriji), koristeći predviđeni materijal (pipete, vrhovi, itd.).
- Obradite standardne otopine (C1–3 i P1–5) u odvojenoj prostoriji.

## Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima

Kitovi se isporučuju na suhom ledu i po primitku se moraju skladištiti na temperaturi od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ .

- Pobrinite se da se mješavine početnica i sonde što manje izlažu svjetlosti (PPC i PPF epruvete).
- Lagano promiješajte i centrifugirajte epruvete prije otvaranja.
- Čuvajte sve sastavnice kita u originalnim spremnicima.

Ovi uvjeti skladištenja odnose se i na otvorene i na neotvorene sastavnice. Sastavnice koje se pohranjuju pod nekim drugim uvjetima, a ne onima koji su navedeni na naljepnicama, možda neće pravilno funkcionirati i mogu negativno utjecati na rezultate ispitivanja.

Rokovi valjanosti za svaki reagens navedeni su na naljepnicama zasebnih sastavnica. Pod pravilnim uvjetima skladištenja proizvod će zadržati radni učinak do isteka roka valjanosti koji je otisnut na naljepnici.

Ne postoje očiti znakovi koji ukazuju na nestabilnost ovog proizvoda. Međutim, pozitivne i negativne kontrole moraju se provoditi istodobno s nepoznatim uzorcima.

## Postupak

### Priprema RNA iz uzorka

Priprema RNA iz uzoraka pacijenata (iz krvi ili koštane srži) mora se provesti provođenjem validiranog postupka. Kvaliteta ispitivanja u velikoj mjeri ovisi o kvaliteti RNA koja se unosi. Stoga prije analize preporučujemo razblaživanje pročišćene RNA elektroforezom agaroznim\* gelom ili pomoću instrumenta Agilent® Bioanalyzer®.

### Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija

#### Što učiniti prije početka rada

- Pripremite dNTP-ove, 10 mM svaki. Čuvajte na –20°C u alikvotima.
- Pripremite proizvoljni heksamer, 50 mM. Čuvajte na –20°C u alikvotima.
- Pripremite MgCl<sub>2</sub>, 50 mM. Čuvajte na –20°C u alikvotima.

#### Postupak

1. Odmrznite sve potrebne sastavnice i stavite ih na led.
2. Inkubirajte 1 µg RNA (1–4 µl) u trajanju od 10 minuta na 70°C i odmah stavite da se 5 minuta hladi na ledu.
3. Nakratko centrifugirajte (približno 10 sekundi, 10.000 o/min), kako biste sakupili tekućinu na dnu epruvete. Potom držite na ledu.
4. Pripremite sljedeću mješavinu za RT u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju (Tablica 1).

\* Prilikom rada s kemikalijama, uvijek nosite prikladnu laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale.

**Tablica 1 Priprema RT mješavine**

Sastavnica	Volumen po uzorku (μl)	Konačna koncentracija
Pufer za prvi lanac (priložen uz Superscript II reverznu transkriptazu), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP-ovi (10 mM svaki, prethodno pripremiti i čuvati na –20°C u alikvotima)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, priloženo uz Superscript II reverznu transkriptazu)	2,0	10 mM
Inhibitor RNaze (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Proizvoljni heksamer (100 μM)	5,0	25 μM
Superscript II (200 U/μl)	0,5	5 U/μl
Zagrijan RNA uzorak (dodati u koraku 5)	1,0-4,0	50 ng/μl
Voda za PCR bez nukleaze (dodati u koraku 5)	0,0-3,0	–
Konačni volumen	20,0	–

5. Pipetirajte 16 μl RT mješavine u svakoj epruveti za PCR. Zatim dodajte 1–4 μl (1 μg) RNA (iz koraka 3) i podesite volumen na 20 μl s vodom za PCR bez nukleaze (vidjeti Tablicu 2).

Tablica 2. Priprema reakcije za reverznu transkripciju

Sastavnica	Volumen ( $\mu$ l)
RT mješavina	16,0
Zagrijan uzorak RNA (1 $\mu$ g)	1,0-4,0
Voda za PCR bez nukleaze	0,0-3,0
Konačni volumen	20,0

6. Dobro promiješajte i kratko centrifugirajte (približno 10 sekundi, 10.000 o/min) kako biste sakupili tekućinu na dnu epruvete.
7. Inkubirajte na 20°C u trajanju od 10 minuta.
8. Inkubirajte na 42°C u termocikleru u trajanju od 45 minuta, pa neposredno nakon toga na 99°C u trajanju od 3 minute.
9. Hladite na ledu (kako biste zaustavili reakciju) 5 minuta.
10. Nakratko centrifugirajte (približno 10 sekundi, 10.000 o/min), kako biste sakupili tekućinu na dnu epruvete. Potom držite na ledu.
11. Razrijedite konačnu cDNA s 30  $\mu$ l vode za PCR bez nukleaze tako da konačni volumen bude 50  $\mu$ l.
12. Provedite PCR u skladu sa sljedećim protokolima, u skladu s vašim instrumentom za qPCR.

**Napomena:** Ovaj protokol reverzne transkripcije razvijen je prema studiji programa "Europe against cancer" (*Europa protiv raka*) (EAC) (10, 11).



## Protokol: qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete

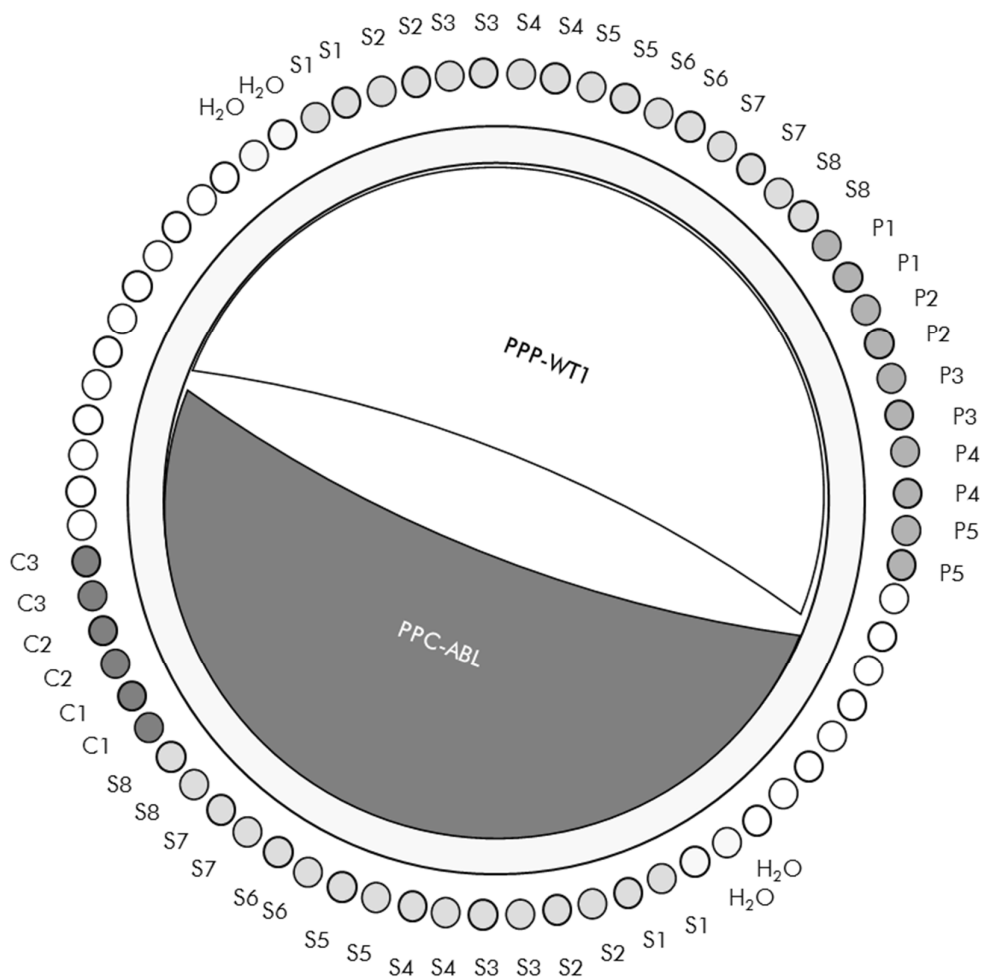
Ako koristite ovaj instrument, preporučujemo provođenje svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u Tablici 3.

Tablica 3. Broj reakcija za instrumente Rotor-Gene Q s rotorom sa 72-epruvete

Uzorci	Reakcije
<b>S mješavinom ABL početnica i sonde (PPC-ABL)</b>	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	2 x 3 reakcije (3 otopine, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije
<b>S mješavinom WT1 početnica i sonde (PPP-WT1)</b>	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
WT1 standard	2 x 5 reakcija (5 otopina, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije

### Obrada uzoraka na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Preporučujemo ispitivanje 8 cDNA uzoraka u istom pokusu kako bi se optimiziralo korištenje standarda i mješavina početnica i sonde.



Slika 4. Preporučeno postavljanje rotora za svaki pokus s proizvodom *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit. P1–5: WT1 standardi; C1–3: ABL standardi; S: cDNA uzorak; H<sub>2</sub>O: kontrola vode.

**Napomena:** Pobrinite se da uzorak koji treba ispitati uvijek postavite u položaj 1 na rotoru. U suprotnom, tijekom koraka kalibracije, instrument neće provesti kalibraciju i prikupit će se netočni podaci o fluorescenciji.

Ispunite sve ostale položaje praznim epruветama.

#### qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruветe

**Napomena:** Sve korake provedite na ledu.

#### Postupak

1. Odmrznite sve potrebne sastavnice i stavite ih na led.
2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije predviđene su za konačni volumen reakcije.

U Tablici 4 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25  $\mu$ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine početnica i sondi (ili PPC-ABL ili PPF-WT1). Dodatni volumeni uključeni su kako bi se kompenzirale pogreške u pipetiranju.

**Tablica 4. Priprema qPCR mješavine**

Sastavnica	1 reakcija ( $\mu$ l)	ABL: 24 + 1 reakcija ( $\mu$ l)	WT1: 28 +1 reakcija ( $\mu$ l)	Konačna koncentracija
TaqMan univerzalna PCR master mješavina, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mješavina početnica i sondi, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Voda za PCR bez nukleaze	6,5	162,5	188,5	–
Uzorak (dodati u koraku 4)	5,0	Svaki po 5	Svaki po 5	–
Ukupni volumen	25,0	Svaki po 25	Svaki po 25	–

3. Dispenzirajte 20  $\mu$ l qPCR predmješavine po epruveti.
4. Dodajte 5  $\mu$ l RT produkta (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 14) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 25  $\mu$ l).
5. Blago pomiješati pipetiranjem gore i dolje.
6. Stavite epruvete u termocikler u skladu s preporukama proizvođača.
7. Programirajte instrument Rotor-Gene Q pomoću programa za toplinsko cikliranje, kako je navedeno u Tablici 5.

Tablica 5. Temperaturni profil

Način analiziranja	Kvantifikacija
Stanka	Temperatura: 50 stupnjeva Vrijeme: 2 minute
Stanka 2	Temperatura: 95 stupnjeva Vrijeme: 10 minuta
Cikliranje	50 puta 95 stupnjeva u trajanju od 15 s 60 stupnjeva u trajanju od 1 min uz prikupljanje FAM fluorescencije u kanalu Zeleno: pojedinačno

8. Za instrumente Rotor-Gene Q odaberite "Slope Correct" (*korekcija smjera*) za analizu. Preporučujemo postavljanje granice na 0,03. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kako je navedeno u Tablici 5.

## Protokol: qPCR na instrumentima ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

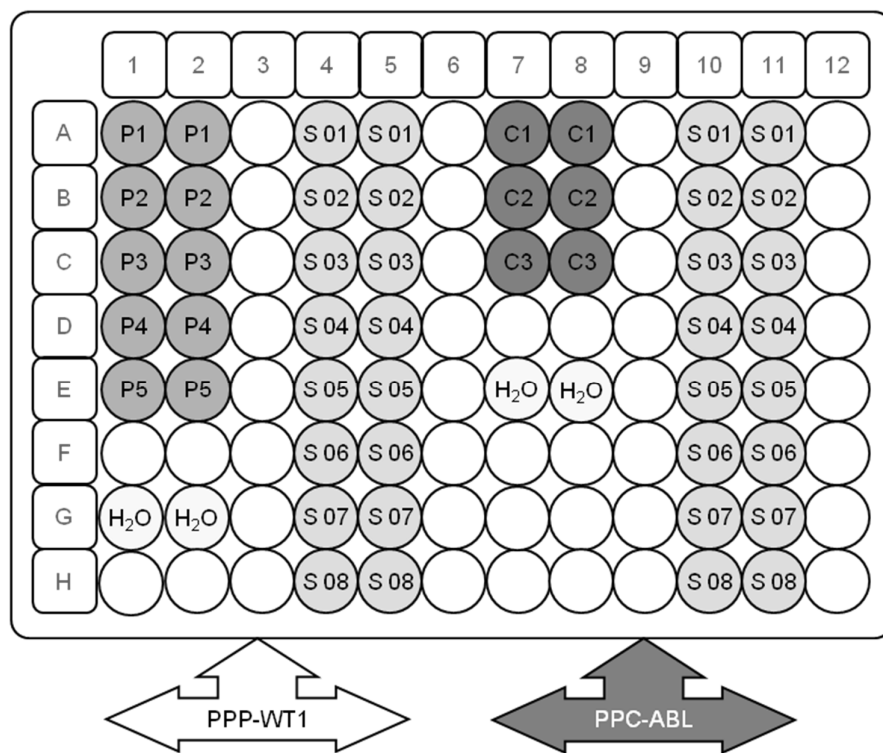
Ako koristite opremu za qPCR s pločom s 96 jažica, preporučujemo provođenje svih mjerenja dvaput, kako je navedeno u Tablici 6.

Tablica 6. Broj reakcija uz uporabu opreme za qPCR s pločom s 96 jažica

Uzorci	Reakcije
<b>S mješavinom ABL početnica i sonde (PPC-ABL)</b>	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	2 x 3 reakcije (3 otopine, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije
<b>S mješavinom WT1 početnica i sonde (PPP-WT1)</b>	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
WT1 standard	2 x 5 reakcija (5 otopina, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije

### Obrada uzoraka na instrumentima ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Preporučujemo ispitivanje najmanje 8 cDNA uzoraka u istom pokusu kako bi se optimiziralo korištenje standarda i mješavina početnica i sonde. Shema ploče na Slici 5 prikazuje primjer takvog pokusa.



Slika 5. Preporučena postavka ploče za jedan pokus. S: cDNA uzorak; P1–5: WT1 standardi; C1–3: ABL standardi; H<sub>2</sub>O: kontrola vode.

## qPCR na instrumentima ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

**Napomena:** Sve korake provedite na ledu.

### Postupak

1. Odmrznite sve potrebne sastavnice i stavite ih na led.
2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije predviđene su za konačni volumen reakcije.

U Tablici 7 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25 µl.

Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine početnica i sondi (ili PPC-ABL ili PPF-WT1). Dodatni volumeni uključeni su kako bi se kompenzirale pogreške u pipetiranju.

Tablica 7. Priprema qPCR mješavine

Sastavnica	1 reakcija (μl)	ABL: 24 + 1 reakcija (μl)	WT1: 28 + 1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
TaqMan univerzalna PCR master mješavina, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mješavina početnica i sonde, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Voda za PCR bez nukleaze	6,5	162,5	188,5	–
Uzorak (dodati u koraku 4)	5,0	Svaki po 5	Svaki po 5	–
Ukupni volumen	25,0	Svaki po 25	Svaki po 25	–

3. Dispenzirajte 20 μl qPCR predmješavine po jažici.
4. Dodajte 5 μl RT produkta (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 14) u odgovarajuću jažicu (ukupni volumen 25 μl).
5. Blago promiješati pipetiranjem gore i dolje.
6. Zatvorite ploču i nakratko centrifugirajte (300 x g, približno 10 sekundi).
7. Stavite ploču u termocikler u skladu s preporukama proizvođača. Programirajte termocikler pomoću programa za toplinsko cikliranje, kako je navedeno u Tablici 8 za instrumente ABI PRISM 7900HT SDS ili Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ili u Tablici 9 za instrument LightCycler 480.

**Tablica 8. Temperaturni profil za ABI PRISM 7900HT SDS ili Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Način analiziranja</b>	Standardna krivulja - apsolutna kvantifikacija
<b>Stanka</b>	Temperatura: 50°C Vrijeme: 2 minute
<b>Stanka 2</b>	Temperatura: 95°C Vrijeme: 10 minuta
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C u trajanju od 15 sekundi 60°C u trajanju od 1 min uz prikupljanje FAM fluorescencije; hvatač: TAMRA

**Tablica 9. Temperaturni profil za instrument LightCycler 480**

<b>Način analiziranja</b>	Apsolutna kvantifikacija ("Abs Quant")
<b>Format detekcije</b>	Odaberite "Simple Probe" ( <i>jednostavna sonda</i> ) u prozoru "Detection formats" ( <i>formati detekcije</i> )
<b>Stanka</b>	Temperatura: 50°C Vrijeme: 2 minute
<b>Stanka 2</b>	Temperatura: 95°C Vrijeme: 10 minuta
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C u trajanju od 15 sekundi 60°C u trajanju od 1 min uz prikupljanje FAM fluorescencije, što odgovara (483–533 nm) za LC inačicu 01 i (465–510 nm) za LC inačicu 02

8. Za instrumente ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, slijedite korak 8a. Za instrument LightCycler 480, slijedite korak 8b.



- 8a. ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Preporučujemo postavljanje granice na 0,1 kako je opisano u EAC protokolu u koraku analize i postavljanje početne točke između ciklusa 3 i 15. Pokrenite program za cikliranje kako je navedeno u Tablici 8.
- 8b. LightCycler 480: Preporučujemo uporabu "Fit point" načina analize (*prilgođenih točaka*) s pozadinom od 2,0 i granicom na 2,0. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kako je navedeno u Tablici 9.

## Protokol: qPCR na instrumentu LightCycler 1.2

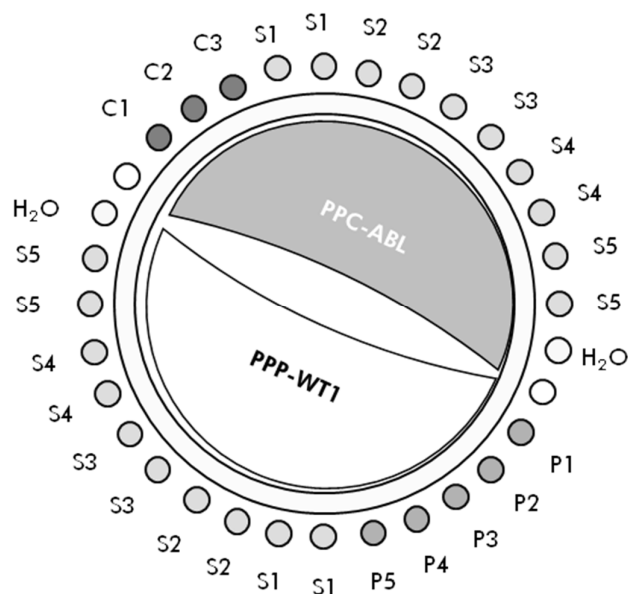
Koristeći kapilarne instrumente, preporučujemo da mjerenje uzoraka provedete dvaput, a mjerenje kontrola jednom i to kako je navedeno u Tablici 10.

Tablica 10. Broj reakcija za instrument LightCycler 1.2

Uzorci	Reakcije
<b>S mješavinom ABL početnica i sondi (PPC-ABL)</b>	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	1 x 3 reakcija (3 standardne otopine, svaka od njih testirana jednom)
Kontrola vode	1 reakcija
<b>S mješavinom WT1 početnica i sondi (PPP-WT1)</b>	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
WT1 standard	1 x 5 reakcija (5 standardnih otopina, svaka od njih testirana jednom)
Kontrola vode	1 reakcija

### Obrada uzoraka na instrumentu LightCycler 1.2

Preporučujemo ispitivanje 5 cDNA uzoraka u istom pokusu kako bi se optimiziralo korištenje standarda i mješavina početnica i sondi. Kapilarna shema na Slici 6 prikazuje primjer takvog pokusa.



Slika 6. Preporučeno postavljanje rotora za svaki pokus s proizvodom *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit. P1–5: WT1 standardi; C1–3: ABL standardi; S: nepoznati uzorak DNA koji je potrebno analizirati; H<sub>2</sub>O: kontrola vode.

## qPCR na instrumentu LightCycler 1.2

**Napomena:** Zbog pojedinih tehnoloških zahtjeva, pokuse na instrumentu LightCycler potrebno je izvoditi koristeći posebne reagense. Preporučujemo uporabu glavne mješavine LightCycler TaqMan Master i slijedenje uputa proizvođača za pripremu mješavine Master Mix 5x.

**Napomena:** Sve korake provedite na ledu.

### Postupak

1. Odmrznite sve potrebne sastavnice i stavite ih na led.
2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije predviđene su za konačni volumen reakcije.

U Tablici 11 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 20 µl. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine početnica i sonde (ili PPC-ABL ili PPF-WT1). Dodatni volumeni uključeni su kako bi se kompenzirale pogreške u pipetiranju.

Tablica 11. Priprema qPCR mješavine

Sastavnica	1 reakcija ( $\mu$ l)	ABL: 14 + 1 reakcija ( $\mu$ l)	WT1: 16 + 1 reakcija ( $\mu$ l)	Konačna koncentracija
Svježe pripremljena glavna mješavina LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Mješavina početnica i sondi, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Voda za PCR bez nukleaze	10,2	153,0	173,4	–
Uzorak (dodati u koraku 4)	5,0	Svaki po 5	Svaki po 5	–
Ukupni volumen	20,0	Svaki po 20	Svaki po 20	–

3. Dispenzirajte 15  $\mu$ l qPCR predmješavine po kapilari.
4. Dodajte 5  $\mu$ l RT produkta (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 14) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 20  $\mu$ l).
5. Blago promiješati pipetiranjem gore i dolje.
6. Ostavite kapilare u adaptere koji su isporučenu zajedno s uređajem i kratko centrifugirajte (700 x g, približno 10 sekundi).
7. Stavite kapilare u termocikler u skladu s preporukama proizvođača.
8. Programirajte instrument LightCycler 1.2 pomoću programa za toplinsko cikliranje, kako je navedeno u Tablici 12.

Tablica 12. Temperaturni profil

<b>Način analiziranja</b>	Kvantifikacija
<b>Stanka</b>	Temperatura: 95°C Vrijeme: 10 minuta Stopa promjene temperature: 20
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C u trajanju od 10 sekundi; stopa promjene temperature: 20 60°C u trajanju od 1 minute; stopa promjene temperature: 20; uz prikupljanje FAM fluorescencije: pojedinačno
<b>Stanka 2</b>	45°C u trajanju od 1 minute; stopa promjene temperature: 20

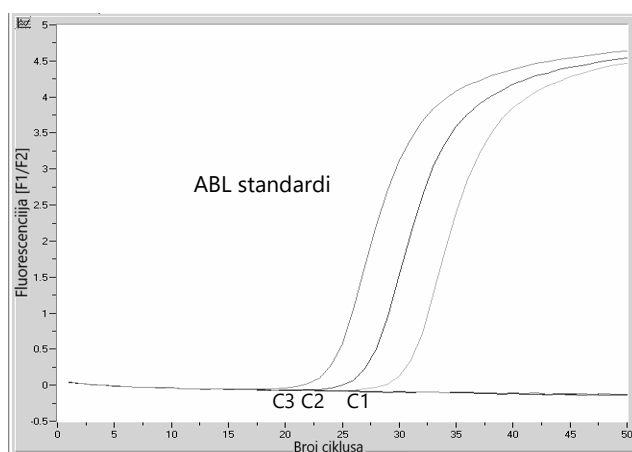
9. Za instrument LightCycler 1.2, preporučuje se način rada F1/F2 i "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (2. *derivativna analiza*). Pokrenite program za toplinsko cikliranje kako je navedeno u Tablici 12.

# Tumačenje rezultata

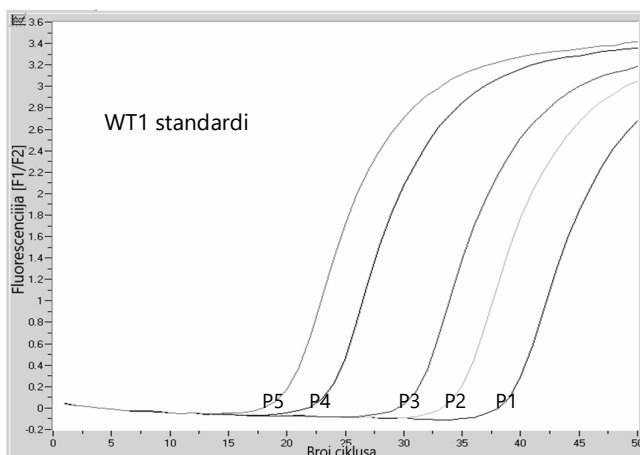
## Načelo analize podataka

Pri korištenju tehnologije TaqMan, broj PCR ciklusa potrebnih za detekciju signala iznad granice naziva se granični ciklus ( $C_T$ ) i izravno je proporcionalan iznosu cilja koji je prisutan na početku reakcije.

Koristeći standarde s poznatim brojem molekula, moguće je odrediti standardnu krivulju i ustanoviti točan iznos ciljeva prisutnih u ispitnom uzorku. *ipsogen* standardne krivulje na osnovi su plazmida i koriste 3 standardne otopine plazmida za ABL kontrolni gen (CG) i 5 standardnih otopina za WT1 gen kako bi se osiguralo točne standardne krivulje. Slike 7 i 8 prikazuju primjer TaqMan amplifikacijskih krivulja dobivenih pomoću proizvoda *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit.



Slika 7. Detekcija ABL standarda (C1, C2, C3).  $10^3$ ,  $10^4$ , i  $10^5$  kopija/5  $\mu$ l.



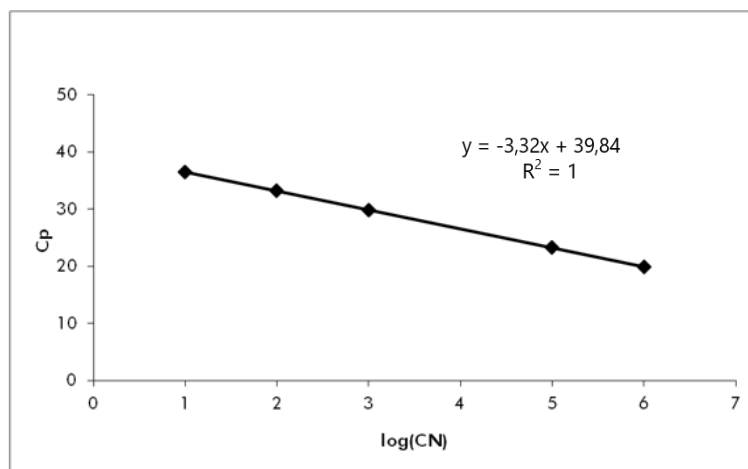
Slika 8. Detekcija WT1 standarda ( P1–P5).  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  kopija/5  $\mu$ l.

## Rezultati

### Standardna krivulja i kriteriji kvalitete

Neobrađene podatke moguće je kopirati u Excel® datoteku u svrhe analize.

Za svaki pojedini gen (ABL i WT1), neobrađene vrijednosti za  $C_p$  /  $C_T$  dobivene pomoću standardnih otopina plazmida obilježavaju se u skladu s brojem kopija zapisa (3, 4 i 5 za C1, C2 i C3; 1, 2, 3, 5 i 6 za P1, P2, P3, P4 i P5). Slika 9 prikazuje primjer teoretske krivulje izračunate s 5 standardnih otopina.



Slika 9. Teoretska krivulja izračunata iz 5 standardnih otopina. Linearna regresijska krivulja ( $y = ax + b$ ) izračunava se za svaki gen (ABL i WT1), pri čemu je  $a$  pad linije, a  $b$  je  $y$ -sjecište, što predstavlja koordinatu  $y$  točke u kojoj linija siječe  $y$  os. Njezina jednadžba i koeficijent za određivanje ( $R^2$ ) ispisani su na grafikonu.

Budući da su standardi 10-erostruke otopine, teoretski pad krivulje je -3,32. Pad između -3,0 i -3,9 prihvatljiv je dok god je  $R^2 > 0,95$  (12). Međutim, za precizne rezultate poželjna je vrijednost  $R^2 > 0,98$  (13).

### Normalizirani broj kopija (NCN)

Jednadžbu ABL standardne krivulje trebalo bi koristiti kako bi se neobrađene  $C_p$  vrijednosti (dobivene pomoću PPC-ABL) za nepoznate uzorke pretvorile u ABL broj kopija ( $ABL_{CN}$ ).

$$\text{Log}_{10} \text{uzorak } ABL_{CN} = \frac{\begin{matrix} P5 & P4 & P3 & P2 & P1 \\ \text{srednja vrijednost ABL } C_p - \text{ sjecište ABL} \\ \text{standardne krivulje} \end{matrix}}{\text{pad ABL standardne krivulje}}$$

Jednadžbu WT1 standardne krivulje trebalo bi koristiti kako bi se neobrađene  $C_p$  vrijednosti (dobivene pomoću PPC-WT1) za nepoznate uzorke pretvorile u WT1 broj kopija ( $WT1_{CN}$ ).

$$\text{Log}_{10} \text{uzorak } WT1_{CN} = \frac{\text{srednja vrijednost } WT1 C_p - \text{sjecište } WT1 \text{ standardne krivulje}}{\text{pad } WT1 \text{ standardne krivulje}}$$

Omjer između ovih CN vrijednosti (broja kopija) daju nam normalizirani broj kopija (NCN) po 10.000 ABL kopija:

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

### Kontrola kvalitete ABL vrijednosti

Loša kvaliteta RNA ili problemi za vrijeme koraka qPCR rezultiraju niskom vrijednosti  $ABL_{CN}$ . Preporučujemo odbacivanje rezultata onih uzoraka kod kojih je  $ABL_{CN} < 4246$ .

### Reproduktibilnost između replikacija

Varijacije u vrijednostima  $C_p$  replikacija trebale bi biti  $< 2$ , što odgovara četverostrukoj promjeni u vrijednosti broja kopija.

Varijacije u vrijednostima  $C_p$  replikacija uobičajeno je  $< 1,5$  ako je srednja  $C_p$  vrijednost replikacija  $< 36$  (12).

**Napomena:** Svaki korisnik bi u svojem laboratoriju trebao izmjeriti njegovu vlastitu reproduktibilnost.

### Kontrole vode

Negativne kontrole trebale bi iznositi nula CN i za ABL i za WT1.

Pozitivna kontrola voda rezultat je unakrsne kontaminacije. Kako biste pronašli rješenje, pogledajte "Vodič za otkrivanje i rješavanje pogrešaka" u tekstu ispod.

### Vodič za otkrivanje i rješavanje pogrešaka

Ovaj vodič za otkrivanje i rješavanje pogrešaka može biti koristan u rješavanju problema koji se mogu pojaviti. Za više informacija pogledajte još i Često postavljana pitanja na stranici našeg Središta za tehničku podršku: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Znanstvenici u QIAGEN Tehničkoj podršci



uvijek rado odgovaraju na svako pitanje koje možete imati bilo o informacijama i protokolu u ovom priručniku ili tehnologijama uzorkovanja i određivanja (za informacije o kontaktu, pogledajte "Informacije o kontaktu", stranica 44).

### Komentari i prijedlozi

---

#### Negativni rezultat za kontrolni gen (ABL) i WT1 u svim uzorcima - standard u redu

- |  |  |
|--|--|
| a) Loša kvaliteta RNA                                  | Prije započinjanja, uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju RNA.<br>Usporedno izvedite pozitivnu kontrolu stanične linije RNA. |
| b) Nemogućnost izvođenja koraka reverzne transkripcije | Prije započinjanja, uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju RNA.<br>Usporedno izvedite pozitivnu kontrolu stanične linije RNA. |

#### Negativni rezultat za kontrolni gen (ABL) u uzorcima - standard u redu

- |  |  |
|--|--|
| a) Loša kvaliteta RNA                                  | Prije započinjanja, uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju RNA.<br>Usporedno izvedite pozitivnu kontrolu stanične linije RNA. |
| b) Nemogućnost izvođenja koraka reverzne transkripcije | Prije započinjanja, uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju RNA.<br>Usporedno izvedite pozitivnu kontrolu stanične linije RNA. |

#### Signal standarda negativan

- |  |   |
|--|---|
| a) Pogreška u pipetiranju                  | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije.<br>Ponovite PCR ciklus.   |
| b) Nepravilno skladištenje sastavnica kita | <i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit skladištite između -15 do -30°C, a mješavine početnica i sonde (PPC i PPP) zaštitite od svjetla. Vidi "Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima", stranica 13.<br>Izbjegavajte ponavljanje zamrzavanja i otapanja.<br>Alikvoti reagensa za skladištenje. |

## Komentari i prijedlozi

---

### Negativne kontrole su pozitivne

- |                    |  |
|--------------------|--|
| Unakrsno zagađenje | Zamijenite sve kritične reagense.<br>Ponovite pokus s novim alikvotima svih reagensa.<br>Uvijek rukujte uzorcima, sastavnicama kita i potrošnim materijalom u skladu s opće prihvaćenom praksom kako bi ste spriječili prijenosno zagađenje. |
|--------------------|--|

### Nema signala, čak ni u standardnim kontrolama

- |  |   |
|--|---|
| a) Greška u pipetiranju ili izostavljen reagens                                    | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije.<br>Ponovite PCR ciklus.   |
| b) Inhibitorni učinci uzorkovanog materijala uzrokovani nedovoljnim pročišćavanjem | Ponovite pripremu RNA   |
| c) LightCycler: Neispravna detekcija odabranog kanala                              | Podesite Channel Setting ( <i>postavke kanala</i> ) na F1/F2 ili 530 nm/640 nm.   |
| d) LightCycler: Nije programirano prikupljanje podataka                            | Provjerite programe ciklusa.<br>Nakon završetka svakog pojedinog dijela PCR programa koji se odnosi na vezivanje, odaberite način rada za prikupljanje "single" ( <i>pojedinačno</i> ). |

### Odsutan ili nizak signal u uzorcima, ali standardne kontrole su u redu.

- |  |  |
|--|--|
| a) Loša kvaliteta ili niska koncentracija RNA          | Prije započinjanja, uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju RNA.<br>Usporedno izvedite pozitivnu kontrolu stanične linije RNA. |
| b) Nemogućnost izvođenja koraka reverzne transkripcije | Prije započinjanja, uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju RNA.<br>Usporedno izvedite pozitivnu kontrolu stanične linije RNA. |

## Komentari i prijedlozi

---

### Jačina fluorescencije je preniska

- a) Nepravilno skladištenje sastavnica kita     *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit skladištite između  $-15$  do  $-30^{\circ}\text{C}$ , a mješavine početnica i sonde (PPC i PPP) zaštitite od svjetla. Vidi "Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima", stranica 13. Izbjegavajte ponavljanje zamrzavanja i otapanja. Alikvoti reagensa za skladištenje.
- b) Jako niska početna količina ciljane RNA.     Povećajte količinu uzorka RNA.
- Napomena:** Ovisno o odabranoj metodi pripreme RNA, mogu se pojaviti sljedeći inhibični učinci:

## Komentari i prijedlozi

---

### LightCycler: Jačina fluorescencije se razlikuje

- a) Pogreška u pipetiranju      Varijabilnost uzrokovanu tzv. "pogreškom u pipetiranju" moguće je smanjiti analiziranjem podataka u načinu rada F1/F2 ili 530 nm/640 nm.
- b) Nedovoljno centrifugiranje kapilara      Moguće je da se pripremljena PCR mješavina još uvijek nalazi u gornjoj žili kapilare ili postoji mogućnost da se zračni mjehurić zaglavio u vrhu kapilare.  
  
Uvijek centrifugirajte kapilare napunjene reakcijskom mješavinom na način opisan u odgovarajućem priručniku za rukovanje uređajem.
- c) Vanjska površina vrha kapilare je onečišćena      Uvijek nosite rukavice prilikom rukovanja kapilarama.

### LightCycler: Greška vezana uz standardnu krivulju.

- Pogreška u pipetiranju      Varijabilnost uzrokovanu tzv. "pogreškom u pipetiranju" moguće je smanjiti analiziranjem podataka u načinu rada F1/F2 ili 530 nm/640 nm.

## Kontrola kvalitete

Kontrola kvalitete cijelog kita izvršena je na instrumentu LightCycler 480. Ovaj kit proizveden je sukladno normi ISO 13485 : 13485. Certifikati analize dostupni su na zahtjev na [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Ograničenja

Prije uporabe ovog uređaja, korisnici moraju proći obuku za rad s ovom tehnologijom te biti upoznati s istom. Kit treba koristiti slijedeći upute dane u ovome priručniku, u kombinaciji s validiranim uređajem navedenim u "Potrebni materijali koji nisu priloženi", na stranici 11.

Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti u skladu s ostalim kliničkim ili laboratorijskim nalazima. Korisnik je odgovoran validirati izvedbu sustava za sve postupke koji se provode u laboratoriju, a koji nisu obuhvaćeni QIAGEN studijama o izvedbi.

Treba obratiti pažnju na datume roka valjanosti otisnute na kutiji i naljepnicama svih sastavnica. Ne koristite sastavnice kojima je istekao rok valjanosti.

**Napomena:** Kit je dizajniran u skladu sa studijama "European LeukemiaNet" (ELN) (Europske mreže za leukemiju) (10, 11). Kit treba koristiti slijedeći upute dane u ovome priručniku, u kombinaciji s validiranim reagensima i instrumentima. Bilo kakva nedozvoljena uporaba ovoga proizvoda i/ili modifikacija sastavnica poništava odgovornost društva QIAGEN.

## Karakteristike izvedbe

### Ne-kliničke studije

#### Materijali i metode

Studije linearnosti provedene su na 14 uzoraka; svaki od uzoraka dobiven je iz različite mješavine RNA ekstrahirane iz stanične linije visokog izražaja i uzoraka zdravih darivatelja koji su imali nisku razinu izražaja WT1 gena. Svaki uzorak ispitivan je tri puta. Za NCN, vrijednosti su se kretale u rasponu od 2,20 do 3838,11 NCN te je ova studija pokazala da proizvod *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit daje linearne rezultate u navedenom rasponu vrijednosti.

#### Preciznost

Studija preciznosti provedena je na 4 uzorka; svaki od uzoraka dobiven je iz različite mješavine RNA ekstrahirane iz staničnih linija s visokim i niskim izražajem WWT1 gena. Ova ispitivanja ponavljana su do 16 puta za svaki uzorak. Analitički podaci sažeti su u sljedećim tablicama.

Tablica 13. Analitički podaci iz studije preciznosti - plazmidi

	Otopina	Srednji $C_T$	$\sigma$	n	CV (%) (koeficijent varijacije)
WT1 plazmidi	P1: $10^1$ kopija/5 $\mu$ l	36,13	0,87	15	2,42
	P2: $10^2$ kopija/5 $\mu$ l	32,70	0,40	16	1,21
	P3: $10^3$ kopija/5 $\mu$ l	29,39	0,43	16	1,45
	P4: $10^5$ kopija/5 $\mu$ l	22,62	0,41	16	1,80
	P5: $10^6$ kopija/5 $\mu$ l	19,25	0,38	16	1,98
ABL plazmidi	C1: $10^3$ kopija/5 $\mu$ l	29,59	0,35	16	1,20
	C2: $10^4$ kopija/5 $\mu$ l	26,11	0,40	15	1,52
	C3: $10^5$ kopija/5 $\mu$ l	22,77	0,28	16	1,22

Tablica 14. Analitički podaci iz studije preciznosti - stanične linije

	Otopina	Srednji NCN	$\sigma$	n	CV (%)
Stanična linija otopine RNA	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

### Granica slijepe probe i granica detekcije

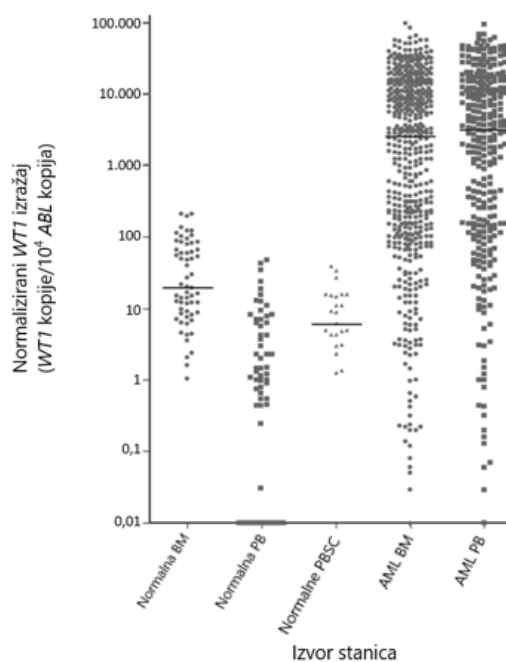
Dizajn studije temeljen je na preporukama opisanim u NCCLS dokumentu EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline (*Protokoli za određivanje granica detekcije i granica kvantifikacije; odobrena smjernica*). Pozadinska razina ili granica slijepe probe (LOB) određena je na normalnim uzorcima krvi dobivenim od zdravih darivatelja (4 uzorka, 73 mjerenja). Navedenim se dobio rezultat 3,66 WT1 NCN.

Granica određivanja (LOD), kojom se prikazuje analitička osjetljivost, određena je na uzorcima s poznatim niskim izražajem WT1 koji su dobiveni od zdravih darivatelja i kojima su dodane stanice s visokim izražajem WT1. Ovime se osiguralo

da očekivana NCN vrijednost bude četverostruko veća od LOB vrijednosti. Napravljeno je ukupno 4 uzorka i 72 mjerenja te je ustanovljeno da LOD iznosi 13,08 WT1 NCN.

## Kliničke studije

Budući da je WT1 izražen u normalnim u hematopoetskim stanicama, ključno je odrediti razinu izraženosti vidljivu u normalnim kontrolnim uzorcima kako bi se mogla odrediti granica koja čini razliku između preostalih tragova leukemije i pozadinske amplifikacije. Analiza 204 kontrolna uzroka prikupljena od zdravih dobrovoljnih darivatelja korištenjem ELN ispitivanja za koje se koristi proizvod *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit potvrdila je da se u uzorcima periferne krvi, koštane srži i perifernih matičnih stanica uočava jako niski izražaj WT1. Prosječne vrijednosti iznosile su 19,2 WT1 kopija/ $10^4$  ABL kopija (raspon 0-213) u koštanoj srži, 0,01 (raspon 0,01-47,6) u perifernoj krvi i 6,1 (raspon 0-39) u perifernim matičnim stanicama (vidi Sliku 10). Izražaj WT1 u perifernoj krvi bio je značajno niži od onoga u koštanoj srži ( $p < 0,0001$ ). Na temelju navedenih rezultata, gornja granica određena je kao 250 NCN za koštanu srž i 50 NCN za perifernu krv.



**Slika 10. Izražaj WT1 u uzorcima zdravih darivatelja. Akutna mijeloična leukemija (AML); koštana srž (BM); periferna krv (PB); periferne matične stanice (PBSC). (15)**

Umnoženo uz odobrenje 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(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, sva prava pridržana.

## Određivanje WT1 izražaja standardiziranim ELN qPCR ispitivanjem u prethodno obrađenim AML uzorcima

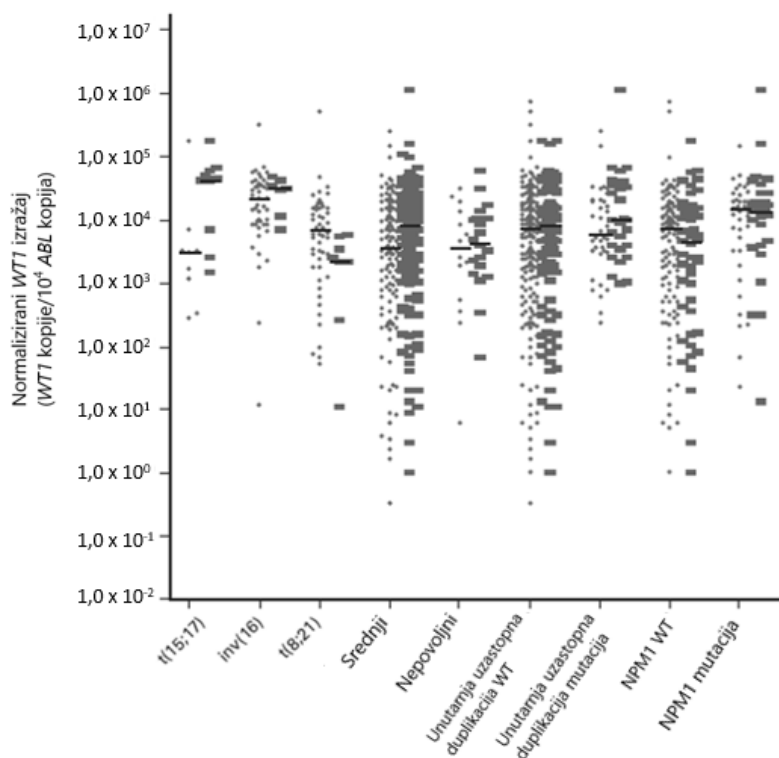
Za procjenu primjenjivosti ELN ispitivanja koje se koristi na proizvodu *ipsogen* WT1 ProfileQuant Kit u svrhe detekcije minimalne ostatne bolesti (MRD) analizirano je 620 prethodno obrađenih uzoraka prikupljenih od 504 pacijenta (238 iz periferne krvi i 382 iz koštane srži).

WT1 je bio pretjerano izražen iznad pozadinskih razina (određenih kao  $>250$  i  $>50$  WT1 kopija/ $10^4$  ABL kopija u koštanoj srži i perifernoj krvi) u 86% i u 91% dijagnostičkih AML uzoraka koštane srži i periferne krvi (također prikazano na Slici 10).

Prosječna vrijednost WT1 kopija/ $10^4$  ABL kopija iznosila je 2505 (raspon  $0 - 7,5 \times 10^5$ ) u koštanoj srži ( $p < 0,0001$  u usporedbi s normalnom koštanom srži) i 3107 (raspon  $0 - 1,13 \times 10^6$ ) u perifernoj krvi ( $p < 0,0001$  u usporedbi s normalnom perifernom krvi). Nije bilo značajnije razlike u izražaju između periferne krvi i koštane srži u čitavoj kohorti uzoraka, što je potvrđeno rezultatima dobivenima kod pacijenata s uparenim uzorcima periferne krvi i koštane srži, vidi Cilloni D et al., J Clin Oncol, Slika A3 u Prilogu (15).

Varijacija u normaliziranim razinama WT1 izražaja promatrana je u skladu s citogenetikom (Slika 11,  $p < 0,001$ ), s posebice visokim razinama u slučajevima u kojima je  $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$  (prosječna vrijednost  $2,31 \times 10^4$ , raspon  $12 - 3,14 \times 10^5$ ). Značajno više WT1 razine također su detektirane kod AML uzoraka S NPM1 mutacijama (uzorak s NPM1 mutacijom: prosječna vrijednost  $1,44 \times 10^4$ , raspon  $0 - 1,13 \times 10^6$ ; NPM1 divljeg tipa: prosječna vrijednost 6566, raspon  $0 - 7,5 \times 10^5$ ,  $p = 0,005$ ).





**Slika 11. Varijacije izražaja WT1 prema citogenetici (15).**

Umnoženo uz odobrenje 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(31):5195-201, 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology, sva prava pridržana.

Razina izražaja WT1, kako je određena ELN ispitivanjima za 15 slučajeva s mutacijama na eksonima 7 i 9 *WT1* gena, usporediva je s onima s *WT1* divljeg tipa ( $p=0,2$ ). Međutim, analizom sekvenci niza od 32 slučaja u kojima je ELN ispitivanje rezultiralo niskom razinom izražaja transkripta *WT1* ( $<250$  kopija/ $10^4$  ABL kopija), prikazano je da je u 3 slučaja (9,4%) navedena niska razina izražaja povezana s mutacijama koje su poremetile mjesto povezivanja uzvodne početnice, vidi Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, Slika A4 u Prilogu (15).

## Literatura

QUIAGEN održava veliku, ažuriranu internetsku bazu podataka znanstvenih publikacija u sklopu kojih se koriste QUIAGEN proizvodi. Sveobuhvatne opcije pretraživanja omogućuju vam da pronađete članke koji su vam potrebni, bilo pomoću jednostavnog pretraživanja korištenjem ključne riječi ili specificiranjem primjene, područja istraživanja, naslova, itd.

Za potpuni popis literature, posjetite internetsku bazu podataka o literaturi društva QUIAGEN na adresi [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ili kontaktirajte Centar za tehničku podršku društva QUIAGEN ili vašeg lokalnog distributera.

### Citirana literatura

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.

## Simboli

Sljedeći se simboli mogu pojaviti na ambalaži i naljepnicama:



Sadrži dovoljno reagensa za <N> reakcija



Upotrijebiti do



Medicinski proizvod za in vitro dijagnostiku



Kataloški broj



Lot number (lot broj)



Broj materijala



Jedinstveni broj trgovačke jedinice



Granica temperature



Proizvođač



Pogledajte upute za uporabu



European LeukemiaNet (Europska mreža za leukemiju)

## Informacije o kontaktu

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku podršku na [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), nazovite 00800-22-44-6000, ili kontaktirajte jedan od QIAGEN Odjela za tehničku podršku ili lokalne distributere (pogledajte poledinu ili posjetite stranicu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informacije za narudžbu

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	Za 24 reakcije: standardi ABL kontrolnih gena, WT1 (ekson 1-2) standardi gena, mješavina početnica i sonde ABL, mješavina početnica i sonde PPP-WT1	676923
<b>Rotor-Gene Q MDx — za validiranu IVD PCR analizu u stvarnom vremenu u kliničkim primjenama</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Uređaj za PCR cikliranje u stvarnom vremenu i visokorazlučivi analizator taljenja s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, program, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i servis, instalacija i izobrazba nisu uključeni	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Uređaj za PCR cikliranje u stvarnom vremenu i visokorazlučivi analizator taljenja s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, program, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i servis, instalaciju i izobrazbu	9002033

Za ažurirane informacije o licenciranju te za ograničenja specifična za proizvode, pogledajte odgovarajući QIAGEN priručnik ili korisničke upute. QIAGEN priručnici i korisničke upute dostupni su na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili ih možete zatražiti od QIAGEN tehničke podrške ili lokalnog distributera.

Ova je stranica namjerno ostavljena praznom.

Proizvod je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. *ipsogen* proizvodi ne smiju se preprodavati, modificirati za preprodaju ili koristiti za proizvodnju komercijalnih proizvoda bez pisanog odobrenja društva QIAGEN.

Informacije u ovom dokumentu podliježu izmjenama bez prethodne najave. QIAGEN ne preuzima odgovornost za moguće pogreške koje se mogu pojaviti u ovom dokumentu. Vjerujemo da je ovaj dokument potpun i točan u vrijeme objavljivanja. U ni u kojem slučaju QIAGEN neće biti odgovoran za slučajne, posebne, višestruke ili posljedne štete u vezi s korištenjem ovoga dokumenta, kao ni za one štete koje iz toga proizlaze.

Zajamčeno je da *ipsogen* proizvodi ispunjavaju navedene specifikacije. Jedina obveza društva QIAGEN i jedini pravni lijek klijenta ograničen je na zamjenu proizvoda bez naknade u slučaju da izvedba proizvoda nije u skladu s jamstvom.

Zaštitni žigovi: 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).

#### Ugovor o ograničenoj licenci

Korištenje ovog proizvoda znači sporazumnost bilo kojeg naručitelja ili proizvoda *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit sljedećim uvjetima:

1. Proizvod *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit može se upotrebljavati samo u skladu s *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit *priručnikom* i samo sa sastavnicama koje su sadržane u kitu. QIAGEN ne daje nikakvu licencu za svoje intelektualno vlasništvo za upotrebu ili ugrađivanje sastavnica ovog kita s bilo kojom sastavnicom koja nije sadržana u ovom kitu, osim kako je opisano u *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* Kit *priručniku* i dodatnim protokolima dostupnima na stranici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Osim izričito navedene licence, QIAGEN ne daje nikakva jamstva da ovaj kit i/ili njegova(e) upotreba(e) ne proturječi(e) pravima treće strane.
3. Ovaj kit i njegove sastavnice licencirane su za jednokratnu upotrebu i ne mogu biti ponovno korištene, prerađene ili preprodane.
4. QIAGEN specifično poriče bilo koje druge licence, izražene ili pretpostavljene, osim ovih izričito navedenih.
5. Naručitelj i korisnik ovog kita suglasan je da neće poduzeti niti dozvoliti drugima da poduzmu korake koji mogu dovesti do ili omogućiti bilo koji čin koji je ovdje zabranjen. QIAGEN se može pozvati na zabrane ovog Ugovora o ograničenoj licenci na bilo kojem sudu te povratiti svoje istražne i sudske troškove, uključujući naknadu za odvjetnika, u vezi bilo kojeg postupka kojim se provodi ovaj Ugovor o ograničenoj licenci ili u vezi bilo kakvog prava intelektualnog vlasništva povezanog s ovim kitom i/ili njegovim sastavnicama.

Za ažurirane uvjete licence posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1355-002 © 2013-2015 QIAGEN, sva prava pridržana.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ [techservice-au@qiagen.com](mailto:techservice-au@qiagen.com)

**Austria** ■ [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

**Belgium** ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

**Brazil** ■ [suportetecnico.brasil@qiagen.com](mailto:suportetecnico.brasil@qiagen.com)

**Canada** ■ [techservice-ca@qiagen.com](mailto:techservice-ca@qiagen.com)

**China** ■ [techservice-cn@qiagen.com](mailto:techservice-cn@qiagen.com)

**Denmark** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**Finland** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**France** ■ [techservice-fr@qiagen.com](mailto:techservice-fr@qiagen.com)

**Germany** ■ [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

**Hong Kong** ■ [techservice-hk@qiagen.com](mailto:techservice-hk@qiagen.com)

**India** ■ [techservice-india@qiagen.com](mailto:techservice-india@qiagen.com)

**Ireland** ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

**Italy** ■ [techservice-it@qiagen.com](mailto:techservice-it@qiagen.com)

**Japan** ■ [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

**Korea (South)** ■ [techservice-kr@qiagen.com](mailto:techservice-kr@qiagen.com)

**Luxembourg** ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

**Mexico** ■ [techservice-mx@qiagen.com](mailto:techservice-mx@qiagen.com)

**The Netherlands** ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

**Norway** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**Singapore** ■ [techservice-sg@qiagen.com](mailto:techservice-sg@qiagen.com)

**Sweden** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**Switzerland** ■ [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

**UK** ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

**USA** ■ [techservice-us@qiagen.com](mailto:techservice-us@qiagen.com)

