

# Handleiding *ipsogen*<sup>®</sup> WT1 Profile *Quant*<sup>®</sup>-kit (ELN\*)



Versie 1

IVD

Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT SDS,  
Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System en  
LightCycler<sup>®</sup>-instrumenten



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
DUITSLAND

R2

MAT

1072503NL

**E:IN** LeukemiaNet<sup>®</sup>  
European



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster- en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

### **QIAGEN zet de toon voor:**

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek met microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Wij stellen ons ten doel ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken kunt bereiken. Kijk voor meer informatie op onze website: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Inhoud

<b>Beoogd gebruik</b>	<b>4</b>
<b>Samenvatting en uitleg</b>	<b>4</b>
<b>Uitgangspunt van de procedure</b>	<b>5</b>
<b>Meegeleverde materialen</b>	<b>9</b>
Inhoud van de kit	9
<b>Benodigde maar niet meegeleverde materialen</b>	<b>10</b>
<b>Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen</b>	<b>11</b>
Algemene voorzorgsmaatregelen	11
<b>Opslag en verwerking van reagentia</b>	<b>12</b>
<b>Procedure</b>	<b>13</b>
Bereiding monster-RNA	13
Protocol: door het EAC aanbevolen en gestandaardiseerde omgekeerde transcriptie	13
Protocol: qPCR in Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes	16
Protocol: qPCR in een ABI PRISM 7900HT SDS-, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System- of LightCycler 480-instrument	20
Protocol: qPCR in een LightCycler 1.2-instrument	24
<b>Interpretatie van de resultaten</b>	<b>28</b>
Principe van de gegevensanalyse	28
Resultaten	29
Problemen oplossen	31
<b>Kwaliteitscontrole</b>	<b>34</b>
<b>Beperkingen</b>	<b>35</b>
<b>Prestatiekenmerken</b>	<b>35</b>
Niet-klinische onderzoeken	35
Klinische onderzoeken	37
<b>Referenties</b>	<b>40</b>
<b>Symbolen</b>	<b>42</b>
<b>Contactgegevens</b>	<b>42</b>
<b>Bestelgegevens</b>	<b>43</b>

## Beoogd gebruik

De *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit is bedoeld voor de kwantificering van gentranscripten van een Wilms-tumor (WT) in totaal-RNA dat uit patiënten met acute myeloïde leukemie (AML) is verkregen. De verkregen resultaten zijn bedoeld als hulpmiddel voor het bewaken van de vroege reactie op de behandeling en voor een minimale restziekte (minimal residual disease MRD).

## Samenvatting en uitleg

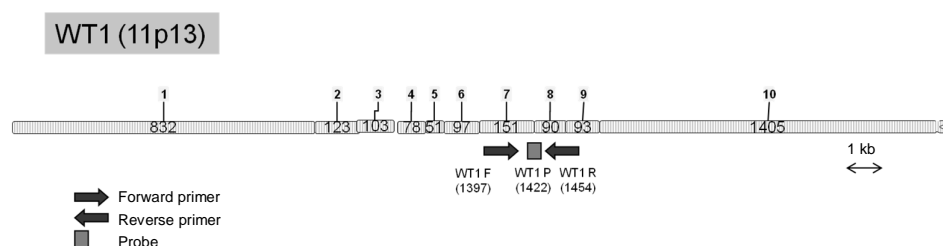
Huidige behandelprotocollen voor acute myeloïde leukemie (AML) zijn gebaseerd op prognostische factoren, die bijdragen aan therapeutische stratificatie (1, 2). Enkele belangrijke prognostische factoren die tot nu toe zijn vastgesteld, zijn kenmerken voorafgaand aan de behandeling, zoals de leeftijd, het aantal witte bloedcellen (white blood cell, WBC), het karyotype van de patiënt en de aanwezigheid van specifieke genmutaties, zoals FLT3 en NPM1 (3, 4). De morfologische reactie op inductiechemotherapie levert nog een voorspellende factor op, die in huidige risico-stratificatiesystemen is opgenomen die worden gebruikt om beslissingen te nemen over consolidatietherapie en met name over allogene transplantaties (5). Hoewel deze parameters kunnen worden gebruikt om groepen patiënten te onderscheiden met een groot verschil in risico op een terugval, is er dringend behoefte aan verbetering van de risico-stratificatie, zodat juist die patiënten die naar alle waarschijnlijkheid het meest (of het minst) baat hebben bij een transplantatie, betrouwbaarder kunnen worden vastgesteld. Uit een aantal onderzoeken is het potentieel van MRD-controle door middel van een kwantitatieve polymerasekettingreactie (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) in realtime naar voren gekomen voor de detectie van leukemiespecifieke doelen, bijvoorbeeld transcripten van fusiegenen (FG) zoals PML-RARA, CBFβ-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) of mutaties in bepaalde genen, zoals NPM1. Hierdoor kunnen patiënten met het hoogste risico op een terugval worden geïdentificeerd, waardoor kandidaten voor een vroege interventie kunnen worden aangeduid (6).

Bij circa de helft van alle AML-patiënten ontbreekt een geschikt leukemiespecifiek doel en er is een aanzienlijk belang bij de ontwikkeling van alternatieve aanpakken waardoor MDR-controle op een veel grotere patiëntenpopulatie kan worden toegepast. Bij één strategie wordt gebruikgemaakt van flowcytometrie voor het vaststellen en controleren van met leukemie geassocieerde afwijkende fenotypen. Hoewel deze strategie een grote toepasbaarheid heeft, is deze technisch niet eenvoudig (6). Bij een andere benadering wordt gebruikgemaakt van qPCR voor de detectie van gentranscripten die een te hoge expressie in AML-blasten hebben ten opzichte van normaal bloed en merg, waarbij de meeste aandacht uitgaat naar het WT1-gen (6).

Het *WT1*-gen bevindt zich op chromosoom 11p13, codeert voor een transcriptiefactor met een zinkvinger en werd oorspronkelijk vastgesteld vanwege zijn betrokkenheid bij de pathogenese van een Wilms-tumor (7). Aangetoond is dat het *WT1*-gen een hoge expressie in meerdere hematopoëtische tumoren heeft, waaronder AML (7, 8). Hoewel de mechanismen die tot *WT1*-overexpressie leiden onduidelijk blijven, kan deze gebeurtenis als marker worden gebruikt waarmee de aanwezigheid, persistentie of hernieuwde verschijning van leukemische hematopoëse wordt aangeeft.

## Uitgangspunt van de procedure

Dankzij de qPCR-techniek is een nauwkeurige kwantificatie van PCR-producten tijdens de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces mogelijk. Er kunnen snel gegevens op basis van de qPCR worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij realtime-detectie van fluorescente signalen tijdens en/of na de PCR-cyclus. Zo wordt het risico op contaminatie van het PCR-product drastisch verminderd. Er zijn momenteel 3 hoofdtypen qPCR-technieken beschikbaar: qPCR-analyse met SYBR® Green I-kleurstof, qPCR-analyse met hydrolyseprobes en qPCR-analyse met hybridisatieprobes.



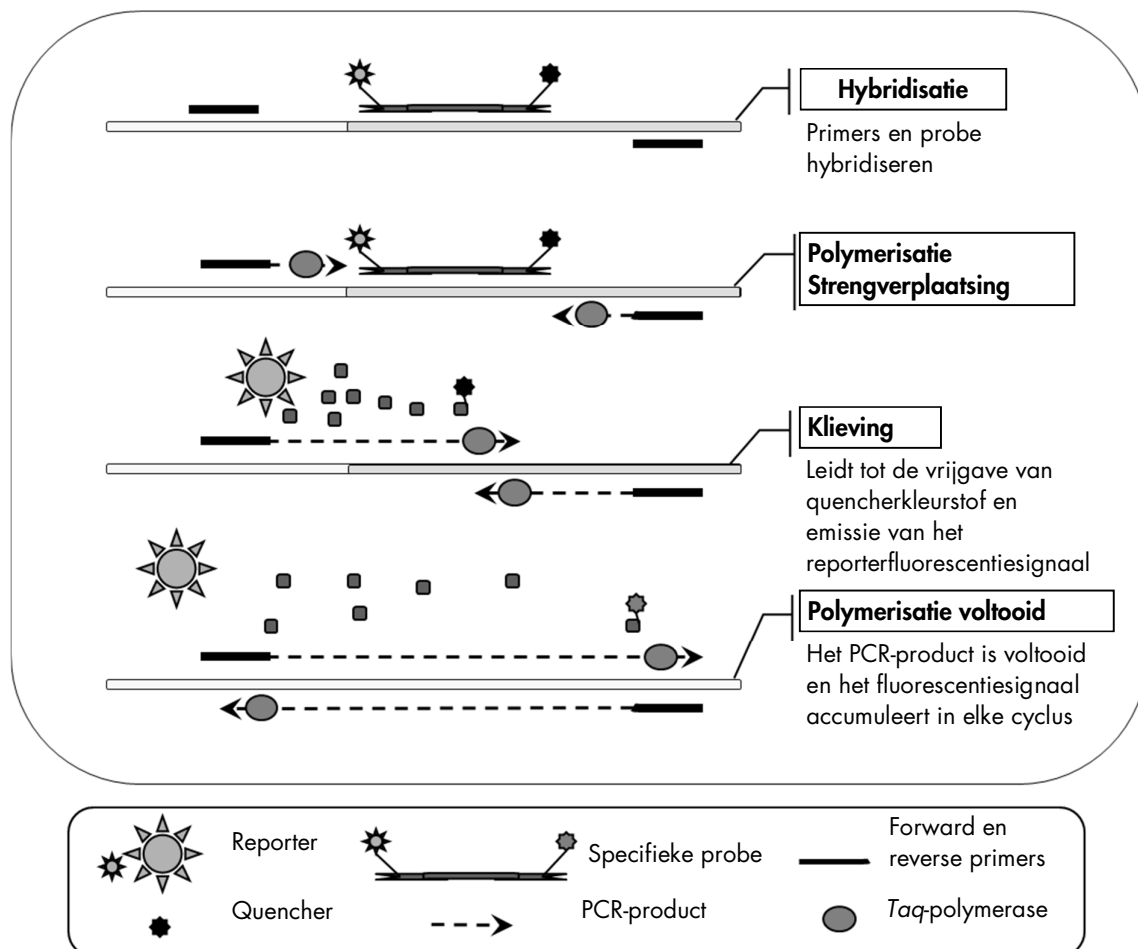
**Afbeelding 1. Schematische afbeelding van het *WT1*-transcript, omhuld door de ELN qPCR-primers en probe: *WT1-ELN F-WT1-ELN P-WT1-ELN R*. Het nummer onder de primers en probe verwijst naar de nucleotidepositie ervan in het normale gentranscript. Exon 5 kan op een andere manier worden gespleten.**

Bij deze assay wordt het qPCR-principe van oligonucleotidehydrolyse met twee kleurstoffen benut. Gedurende de PCR worden forward en reverse primers gehybridiseerd volgens een specifieke sequentie. Hetzelfde mengsel bevat een oligonucleotide met twee kleurstoffen. Deze probe, die bestaat uit een oligonucleotide dat is gemerkt met een 5'-reporterkleurstof en een downstream 3'-quencher met kleurstof, hybridiseert tot een doelsequentie in het PCR-product. Bij de qPCR-analyse met hydrolyseprobes wordt gebruikgemaakt van de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase van *Thermus aquaticus* (*Taq*). Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterkleurstof ten opzichte van de quencherkleurstof in suppressie van de reporters fluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht.

Als het gewenste doel tijdens de PCR aanwezig is, hybridiseert de probe zich vooral tussen de forward en reverse primer. Door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase wordt de probe alleen tussen de reporter en quencher

gespleten als de probe aan het doel hybridiseert. De probefragmenten worden vervolgens verplaatst van het doel en de polymerisatie van de streng gaat verder. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (afbeelding 2). Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet.

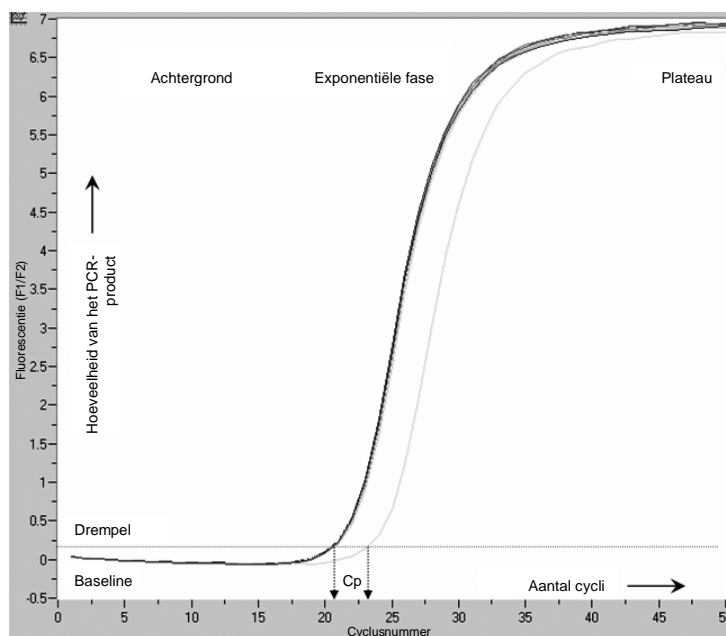
De toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is aan de probe en zodoende tijdens de PCR wordt geamplificeerd. Vanwege deze vereisten wordt niet-specifieke amplificatie niet gedetecteerd. De fluorescentietoename is daarom direct evenredig aan de doelamplificatie tijdens de PCR.



**Afbeelding 2. Reactieprincipe.** Totaal-RNA wordt omgekeerd getranscribeerd en het gegenereerde cDNA wordt met PCR geamplificeerd door middel van een stel specifieke primers en een specifieke interne probe met twee kleurstoffen (FAM™ –TAMRA™). De probe bindt zich tijdens elke hybridisatiestap van de PCR aan het amplicon. Zodra de primer zich aan het amplicon heeft gehecht en Taq het DNA verlengt, wordt het 5'-uiteinde van de probe verplaatst, dat vervolgens door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de Taq-DNA-polymerase degradeert. De klieving gaat door totdat de resterende probe van het amplicon smelt. Bij dit proces worden het fluorofoor en de quencher in een oplossing vrijgegeven en ruimtelijk van elkaar gescheiden, hetgeen leidt tot een toegenomen fluorescentie van de FAM-kleurstof en een afgenomen fluorescentie van de TAMRA-kleurstof.

In afbeelding 3 is de accumulatie van het PCR-product weergegeven, waarbij de fluorescentie tegen het cyclusnummer is afgezet. Deze amplificatiecurve bestaat achtereenvolgens uit een vroege achtergrondfase (onder het detectieniveau van het instrument), een exponentiële fase (of logaritmische fase) en een plateau. De meest nauwkeurige kwantitatieve bepaling kan alleen tijdens de exponentiële fase worden verricht. De eerste cyclus waarin het instrument de door de amplificatie gegenereerde fluorescentie kan onderscheiden als zijnde boven het achtergrondsignaal uitkomend heet de drempelcyclus (threshold cycle,  $C_T$ ) of het 'crossing point' ( $C_p$ ). Door de drempel in de logaritmische/lineaire fase te selecteren, kan het werkelijke aantal initiële startmoleculen worden berekend, aangezien de intensiteit van de fluorescentie direct evenredig is aan de hoeveelheid van het PCR-product in de exponentiële fase.

Tijdens de plateaufase vindt er geen significante toename van het PCR-product plaats. Dit komt vooral vanwege de depletie van PCR-componenten en de nieuwe hechting van PCR-productstrengen als gevolg van de hoge concentratie eindproducten, waardoor er geen verdere hybridisatie van de primers kan plaatsvinden.



**Afbeelding 3. Fluorescentieacquisitie tijdens opeenvolgende cycli en amplificatiefases.**

De meest directe en nauwkeurige aanpak om kwantitatieve gegevens te analyseren, is om gebruik te maken van een standaardcurve die op basis van een verdunningsreeks van een controle-template met een bekende concentratie is opgesteld. Deze aanpak staat bekend als de "standaardcurve-" of "absolute" kwantificering. Na de amplificatie van de standaardverdunningsreeks kan er een standaardcurve worden gegenereerd door het log van het initiële aantal template-kopieën af te zetten tegen het  $C_p$  dat voor elke verdunning is gegenereerd. Door deze punten uit te tekenen, wordt er een standaardcurve

gegenereerd. Door middel van een vergelijking met deze standaardcurve kan het initiële aantal kopieën van de te kwantificeren monsters worden bepaald.

De WT1 ProfileQuant-kit (ELN) bevat specifieke plasmiden en primer- en probemengsels voor WT1 en ABL. Deze componenten zijn samen gevalideerd in het kader van een ringonderzoek onder leiding van een groep experts van het European Leukemia Net-consortium. De assay die eerder door Van Dijk en collega's is gepubliceerd, presteerde consequent beter dan de andere assays en is vanwege zijn samenstelling minder gevoelig voor AML-mutaties (9). Daarom is deze assay als de ELN WT1-assay gekozen. De *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit is op deze techniek gebaseerd. In deze kit wordt een endogene controle (ABL-transcript) uit zowel het monster als uit het WT1-transcript geamplificeerd. Er worden standaard verdunningsreeksen van de controle en WT1 cDNA meegeleverd en door middel van de gegenereerde standaardcurve kan het aantal kopieën van WT1-transcripten en ABL in elk monster nauwkeurig worden berekend.



## Meegeleverde materialen

### Inhoud van de kit

<b><i>ipsogen WT1 ProfileQuant Kit</i></b>		<b>(24)</b>
<b>Catalogusnr.</b>		<b>676923</b>
<b>Aantal reacties</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (Standaardverduunning ABL-controlegen) (10 <sup>3</sup> kopieën/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Standaardverduunning ABL-controlegen) (10 <sup>4</sup> kopieën/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Standaardverduunning ABL-controlegen) (10 <sup>5</sup> kopieën/5 µl)	C3-ABL	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standaardverduunning WT1-profielgen) (10 <sup>1</sup> kopieën/5 µl)	P1-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standaardverduunning WT1-profielgen ) (10 <sup>2</sup> kopieën/5 µl)	P2-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standaardverduunning WT1-profielgen) (10 <sup>3</sup> kopieën/5 µl)	P3-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standaardverduunning WT1-profielgen) (10 <sup>5</sup> kopieën/5 µl)	P4-WT1	50 µl
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standaardverduunning WT1-profielgen) (10 <sup>6</sup> kopieën/5 µl)	P5-WT1	50 µl
Primers and Probe Mix ABL* (Primer-probemengsel ABL*)	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (ELN) <sup>†</sup> (Primer-probemengsel PPP-WT1 (ELN) <sup>†</sup> )	PPP-WT1 (ELN) 25x	110 µl
<i>ipsogen WT1 ProfileQuant Kit Handbook (English)</i> (Handleiding <i>ipsogen WT1 ProfileQuant-kit [Engels]</i> )		1

\* Mengsel van een bepaalde reverse en forward primer voor het ABL-controlegen (CG) plus een FAM-TAMRA-specifieke probe.

† Mengsel van een bepaalde reverse en forward primer voor het WT1-gen (exon 1-2) plus een FAM-TAMRA-specifieke probe.

**Opmerking:** Centrifugeer de standaardverduunningen en het primer-probemengsel kort voor gebruik.

## Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB [safety data sheets ,SDS]) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

### Reagentia

- Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit
- Reagentia voor omgekeerde transcriptie: het gevalideerde reagens is Superscript® II (of Superscript) Reverse Transcriptase, inclusief 5x buffer van eerste streng, 100 mM DTT (Life Technologies, cat.nr. 18064-022)
- RNase-inhibitor: het gevalideerde reagens is RNaseOUT™ (Life Technologies, cat.nr. 10777-019)
- dNTP's, PCR-kwaliteit
- Willekeurige hexanucleotiden
- MgCl<sub>2</sub>
- Buffer en Taq DNA-polymerase: De gevalideerde reagentia zijn TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, cat.nr. 4304437) en LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat.nr. 04535286001)

### Verbruiksartikelen

- Nucleasevrije, aerosolbestendige, steriele PCR-pipettips met hydrofoob filter
- PCR-buisjes van 0,5 ml of 0,2 ml zonder RNase en DNase
- Ijs

### Apparatuur

- Microliterpipet\* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Tafelcentrifuge\* met rotor voor reageerbuisjes van 0,2 ml/0,5 ml en een maximale snelheid van 13.000–14.000 tpm

- Realtime PCR-instrument:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM<sup>®</sup> of een ander Rotor-Gene-instrument; LightCycler 1.2 of 480; of ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; en de materialen die daarbij horen
- Thermocycler\* of waterbad\* (voor omgekeerde transcriptie)

**Opmerking:** zorg ervoor dat de thermocycler of het waterbad is gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostiek

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen. Deze zijn als handige, compacte PDF-bestanden online beschikbaar op [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Hier kunt u ook het VIB voor elke QIAGEN-kit en elke component van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

Gooi monster- en assayafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

## Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor de uitvoering van qPCR-testen zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die geschikt zijn voor moleculaire biologie en die voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn gevalideerd voor optimale prestaties. Een verdere verdunning van de reagentia of het hanteren van andere incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve of tegenstrijdige gegevens. PPC-ABL- en PPP-WT1-reagentia kunnen veranderen bij blootstelling aan licht. Alle reagentia zijn specifiek samengesteld voor gebruik met deze test. Voor een optimale werking van de test mogen er geen vervangende materialen worden gebruikt.

Voor de bepaling van het transcriptiegehalte met behulp van PCR is zowel de omgekeerde transcriptie van het mRNA als de amplificatie van het gegenereerde cDNA door middel van PCR nodig. Daarom mag tijdens de volledige assayprocedure niets in aanraking komen met RNase of DNase.

Wees zorgvuldig ter voorkoming van:

- RNase/DNase-contaminatie, aangezien een dergelijke contaminatie kan leiden tot degradatie van het template-mRNA en het gegenereerde cDNA
- contaminatie door achtergebleven mRNA- of PCR-materiaal, hetgeen resulteert in een foutpositief signaal

We raden u het volgende aan:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosolresistente pipettips ter voorkoming van kruiscontaminatie van de monsters en reagentia.
- Bereid een mastermengsel vóór PCR met speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips enz.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (cDNA, DNA, plasmiden) kunnen worden geïntroduceerd. Voeg de template toe in een afzonderlijke zone (bij voorkeur in een andere ruimte) met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).
- Verwerk de standaardverduunningen (C1 t/m C3 en P1 t/m P5) in een aparte ruimte.

## Opslag en verwerking van reagentia

De kits worden op droog ijs verzonden en moeten na ontvangst bij -30 °C tot -15 °C worden bewaard.

- Stel de primer-probemengsels (PPC- en PPP-buisjes) niet te veel bloot aan licht.
- Meng en centrifugeer de buisjes voorzichtig alvorens ze te openen.
- Bewaar alle kitcomponenten in de originele verpakking.

Deze opslagomstandigheden gelden voor zowel geopende als ongeopende componenten. Componenten die onder andere omstandigheden dan de op de etiketten vermelde omstandigheden worden bewaard, werken mogelijk niet naar behoren en kunnen de assayresultaten negatief beïnvloeden.

De vervaldatum van de verschillende reagentia staan op de etiketten van de afzonderlijke componenten vermeld. Onder goede opslagomstandigheden blijft het product goed presteren tot aan de vervaldatum die op het etiket staat.

Er zijn geen duidelijke tekenen die op instabiliteit van dit product wijzen. U zou echter positieve en negatieve controles met onbekende specimen gelijktijdig moeten uitvoeren.

## Procedure

### Bereiding monster-RNA

De bereiding van RNA uit een patiëntenmonster (bloed of beenmerg) moet aan de hand van een gevalideerde procedure zijn uitgevoerd. De kwaliteit van de assay hangt voor een groot deel af van de kwaliteit van het gebruikte RNA. We raden u daarom aan het gezuiverde RNA voorafgaand aan de analyse te kwalificeren door middel van agarose-gelelektroforese\* of door gebruik te maken van Agilent® Bioanalyzer®.

### Protocol: door het EAC aanbevolen en gestandaardiseerde omgekeerde transcriptie

#### Wat u moet doen voor u begint

- dNTP's voorbereiden, 10 mM per stuk. In gelijke delen bewaren bij -20 °C.
- Willekeurige hexanucleotiden voorbereiden, 50 mM. In gelijke delen bewaren bij -20 °C.
- MgCl<sub>2</sub> voorbereiden, 50 mM. In gelijke delen bewaren bij -20 °C.

#### Procedure

1. **Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.**
2. **Incubeer 1 µg RNA (1–4 µl) 10 minuten bij 70 °C en koel daarna onmiddellijk 5 minuten op ijs.**
3. **Centrifugeer het buisje kort (circa 10 seconden, 10.000 tpm), zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt. Laat het buisje op ijs liggen.**
4. **Bereid het volgende RT-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken (tabel 1).**

\* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril.

**Tabel 1. Bereiding van het RT-mengsel**

<b>Component</b>	<b>Volume per monster (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Uiteindelijke concentratie</b>
Buffer met eerste streng (wordt meegeleverd met Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP's (10 mM per stuk, dient eerder te worden bereid en in gelijke delen bij -20 °C te worden bewaard)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, meegeleverd met Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
RNase-inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0,5	1 U/ $\mu$ l
Willekeurige hexanucleotiden (100 mM)	5,0	25 $\mu$ M
Superscript II (200 U/ $\mu$ l)	0,5	5 U/ $\mu$ l
Verwarmd RNA-monster (toe te voegen bij stap 5)	1,0-4,0	50 ng/ $\mu$ l
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit (toe te voegen bij stap 5)	0,0-3,0	–
Uiteindelijk volume	20,0	–

**5. Pipetteer 16  $\mu$ l van het RT-mengsel in elk PCR-buisje. Voeg daarna 1–4  $\mu$ l (1  $\mu$ g) RNA toe (van stap 3) en verhoog het volume met nucleasevrij water van PCR-kwaliteit tot 20  $\mu$ l (zie tabel 2).**

**Tabel 2. Bereiding van omgekeerde-transcriptiereactie**

<b>Component</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>
RT-mengsel	16,0
Verwarmd monster-RNA (1 $\mu$ g)	1,0-4,0
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	0,0-3,0
Uiteindelijk volume	20,0

6. Meng goed en centrifugeer het buisje kort (circa 10 seconden, 10.000 tpm), zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt.
7. Incubeer 10 minuten bij 20 °C.
8. Incubeer 45 minuten bij 42 °C in een thermocycler en incubeer direct daarna 3 minuten bij 99 °C.
9. Koel het buisje 5 minuten op ijs (om de reactie te stoppen).
10. Centrifugeer het buisje kort (circa 10 seconden, 10.000 tpm), zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt. Laat het buisje op ijs liggen.
11. Verdun het uiteindelijke cDNA met 30  $\mu$ l nucleasevrij water van PCR-kwaliteit, zodat het uiteindelijke volume 50  $\mu$ l bedraagt.
12. Voer een PCR uit in overeenstemming met het hieronder beschreven protocol dat geschikt is voor uw qPCR-instrument.

**Opmerking:** Dit protocol voor omgekeerde transcripties is afgeleid van EAC-onderzoeken (Europe Against Cancer) (10, 11).

## Protocol: qPCR in Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

Wanneer u dit instrument gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 3.

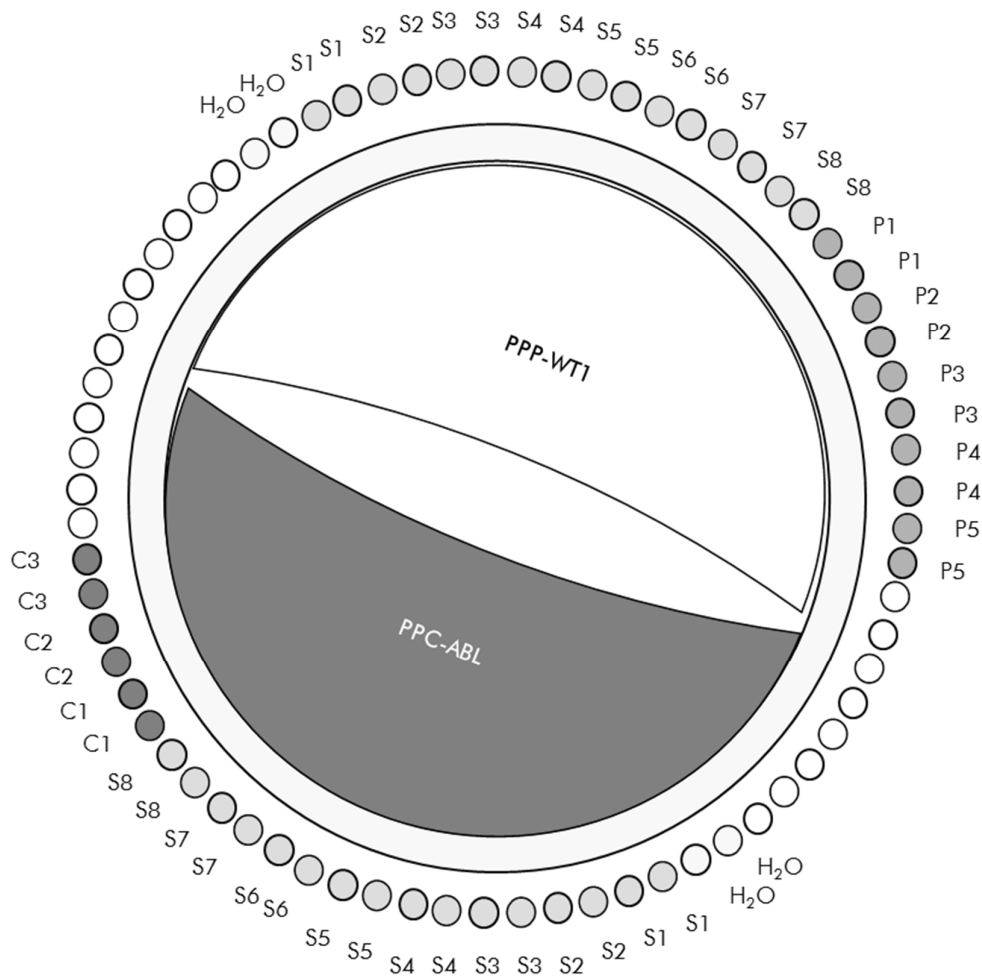
**Tabel 3. Aantal reacties in een Rotor-Gene Q-instrument met rotor voor 72 buisjes**

<b>Monsters</b>	<b>Reacties</b>
<b>Met ABL-primer-probemengsel (PCC-ABL)</b>	
n cDNA-monsters	n x 2 reacties
ABL-standaard	2 x 3 reacties (3 verdunningen, elke verdunning tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties
<b>Met WT1-primer-probemengsel (PCC-WT1)</b>	
n cDNA-monsters	n x 2 reacties
WT1-standaard	2 x 5 reacties (5 verdunningen, elke verdunning tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties

### Monsterverwerking in Rotor-Gene Q-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

We raden u aan om 8 cDNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren.





**Afbeelding 4. Aanbevolen opstelling van de rotor voor elke proef met de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit. P1–5: WT1-standaarden; C1–3: ABL-standaarden; S: cDNA-monster; H<sub>2</sub>O: watercontrole.**

**Opmerking:** Let erop dat u altijd een te testen monster in buispositie 1 van de rotor plaatst. Als u dit niet doet, wordt er tijdens de kalibratiestap geen kalibratie uitgevoerd en worden er onjuiste fluorescentiegegevens verkregen. Plaats lege buisjes in alle andere posities.

#### qPCR in Rotor-Gene Q-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

**Opmerking:** Voer alle stappen op ijs uit.

#### Procedure

1. **Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.**
2. **Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.**

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 4 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25  $\mu$ l. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPC-ABL of PPP-WT1). Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

**Tabel 4. Bereiding van het qPCR-mengsel**

<b>Component</b>	<b>1 reactie (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24 reacties + 1 extra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT1: 28 reacties + 1 extra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Uiteindelijke concentratie</b>
TaqMan Universal PCR- mastermengsel, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primer- probemengsel, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nucleasevrij water van PCR- kwaliteit	6,5	162,5	188,5	–
Monster (toe te voegen in stap 4)	5,0	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25,0	25 elk	25 elk	–

3. Schenk in elk buisje 20  $\mu$ l van het qPCR-voormengsel.
4. Voeg 5  $\mu$ l van het RT-product (cDNA, vergelijkbaar met 100 ng RNA) dat bij de omgekeerde transcriptie is verkregen (zie "Protocol: door het EAC aanbevolen en gestandaardiseerde omgekeerde transcriptie" op pagina 13), aan het betreffende buisje toe (het totale volume is 25  $\mu$ l).
5. Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren.
6. Plaats de buisjes in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
7. Stel het Rotor-Gene Q-instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 5.

**Tabel 5. Temperatuurprofiel**

<b>Analysemodus</b>	Kwantificatie
<b>Constant</b>	Temperatuur: 50 graden Tijd: 2 min.
<b>Constant 2</b>	Temperatuur: 95 graden Tijd: 10 min.
<b>Cyclus</b>	50 keer 95 graden gedurende 15 sec. 60 graden gedurende 1 min. met acquisitie van FAM-fluorescentie in kanaal Groen: enkelkanaals

- 8. Bij gebruik van Rotor-Gene Q-instrumenten selecteert u "Slope Correct" (Hellingcorrectie) voor de analyse. We raden u aan de drempelwaarde in te stellen op 0,03. Start het in tabel 5 aangegeven thermocyclerprogramma.**

## Protocol: qPCR in een ABI PRISM 7900HT SDS-, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System- of LightCycler 480-instrument

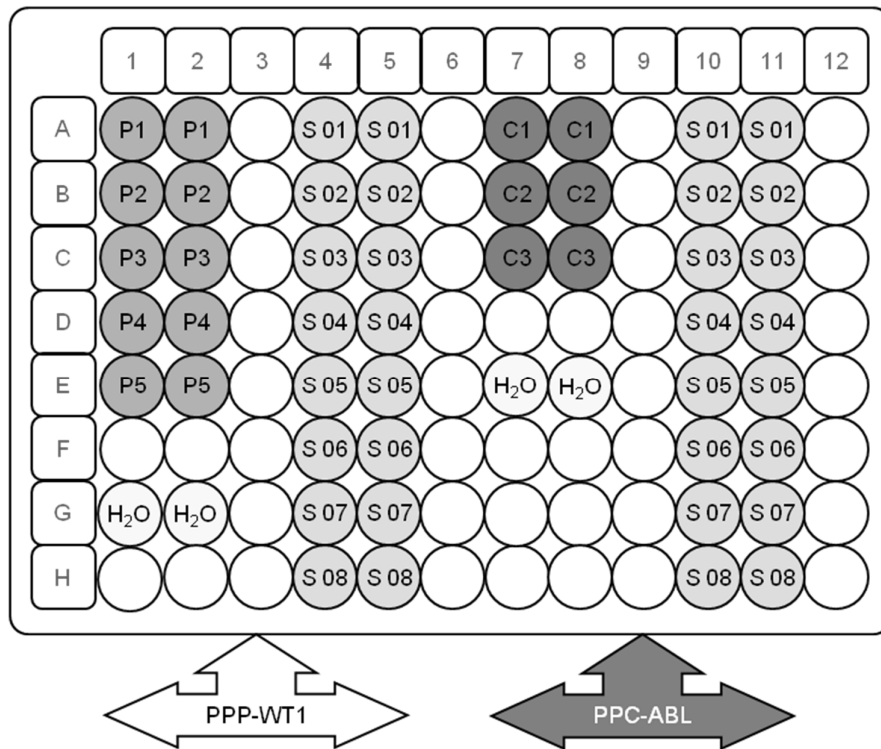
Wanneer u een qPCR-instrument met een plaat voor 96 wells gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 6.

**Tabel 6. Aantal reacties met qPCR-instrument met plaat voor 96 wells**

<b>Monsters</b>	<b>Reacties</b>
<b>Met ABL-primer-probemengsel (PCC-ABL)</b>	
n cDNA-monsters	n x 2 reacties
ABL-standaard	2 x 3 reacties (3 verdunningen, elke verdunning tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties
<b>Met WT1-primer-probemengsel (PCC-WT1)</b>	
n cDNA-monsters	n x 2 reacties
WT1-standaard	2 x 5 reacties (5 verdunningen, elke verdunning tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties

### Monsterverwerking in een ABI PRISM 7900HT SDS-, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System- of LightCycler 480-instrument

We raden u aan om ten minste 8 cDNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren. In afbeelding 5 ziet u het plaatschema voor een dergelijke proef.



**Afbeelding 5. Aanbevolen opstelling van de plaat voor één proef. S:** cDNA-monster; **P1–5:** WT1-standaarden; **C1–3:** ABL-standaarden; **H<sub>2</sub>O:** watercontrole.

### qPCR in een ABI PRISM 7900HT SDS-, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System- of LightCycler 480-instrument

**Opmerking:** Voer alle stappen op ijs uit.

#### Procedure

1. **Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.**
2. **Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.**

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 7 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPC-ABL of PPP-WT1). Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

**Tabel 7. Bereiding van het qPCR-mengsel**

<b>Component</b>	<b>1 reactie (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24 reacties + 1 extra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT1: 28 reacties + 1 extra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Uiteindelijke concentratie</b>
TaqMan Universal PCR- mastermengsel, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primer- probemengsel, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Nucleasevrij water van PCR- kwaliteit	6,5	162,5	188,5	–
Monster (toe te voegen in stap 4)	5,0	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25,0	25 elk	25 elk	–

- 3. Schenk in elke well 20  $\mu$ l van het qPCR-voormengsel.**
- 4. Voeg 5  $\mu$ l van het RT-product (cDNA, vergelijkbaar met 100 ng RNA) dat bij de omgekeerde transcriptie is verkregen (zie "Protocol: door het EAC aanbevolen en gestandaardiseerde omgekeerde transcriptie" op pagina 13), aan de betreffende well toe (het totale volume is 25  $\mu$ l).**
- 5. Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren.**
- 6. Sluit de plaat en centrifugeer kort (circa 10 seconden bij 300 g).**
- 7. Leg de plaat in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Stel de thermocycler in op het programma voor het ABI PRISM 7900HT SDS- of Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System-instrument (zie tabel 8) of het LightCycler 480-instrument (zie tabel 9).**

**Tabel 8. Temperatuurprofiel van ABI PRISM 7900HT SDS en Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Analysemodus</b>	Standaardcurve - absolute kwantificering
<b>Constant</b>	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 minuten
<b>Constant 2</b>	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 minuten
<b>Cyclus</b>	50 keer 95 °C gedurende 15 seconden 60 °C gedurende 1 minuut met acquisitie van FAM-fluorescentie; quencher: TAMRA

**Tabel 9. Temperatuurprofiel van het LightCycler 480-instrument**

<b>Analysemodus</b>	Absolute kwantificering ("Abs Quant")
<b>Detectievormen</b>	Selecteer "Simple Probe" (Enkele probe) in het venster "Detection formats" (Detectievormen)
<b>Constant</b>	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 minuten
<b>Constant 2</b>	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 minuten
<b>Cyclus</b>	50 keer 95 °C gedurende 15 seconden 60 °C gedurende 1 minuut met acquisitie van FAM-fluorescentie overeenkomend met (483–533 nm) voor LC versie 01 en (465–510 nm) voor LC versie 02

- 8. Volg stap 8a voor het ABI PRISM 7900HT SDS- en Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System-instrument. Volg stap 8b voor het LightCycler 480-instrument.**

**8a. ABI PRISM 7900HT SDS en Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System:** We raden u aan een drempelwaarde op 0,1 in te stellen, conform het EAC-protocol dat in de analysestap is beschreven, en een baseline tussen cyclus 3 en cyclus 15 in te stellen. Start het in tabel 8 aangegeven cyclusprogramma.

**8b. LightCycler 480:** we raden een analysemodus met passende meetpunten aan met een achtergrond op 2,0 en een drempel op 2,0. Start het in tabel 9 aangegeven thermocyclerprogramma.

## Protocol: qPCR in een LightCycler 1.2-instrument

Wanneer u een instrument met capillaire buisjes gebruikt, raden we u aan de monsters tweemaal en de controles eenmaal te meten, zoals vermeld in tabel 10.

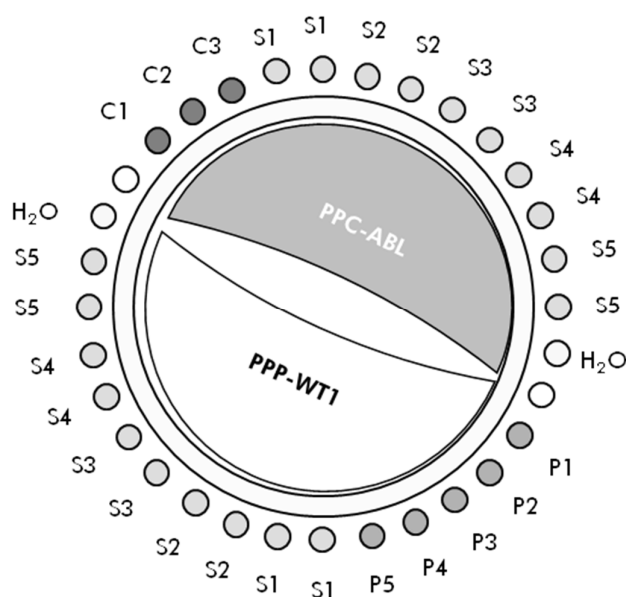
**Tabel 10. Aantal reacties met een LightCycler 1.2-instrument**

<b>Monsters</b>	<b>Reacties</b>
<b>Met ABL-primer-probemengsel (PCC-ABL)</b>	
n cDNA-monsters	n x 2 reacties
ABL-standaard	1 x 3 reacties (3 standaardverdunningen, elke verdunning eenmaal getest)
Watercontrole	1 reactie
<b>Met WT1-primer-probemengsel (PCC-WT1)</b>	
n cDNA-monsters	n x 2 reacties
WT1-standaard	1 x 5 reacties (5 standaardverdunningen, elke verdunning eenmaal getest)
Watercontrole	1 reactie

## Monsterverwerking in een LightCycler 1.2-instrument

We raden u aan om 5 cDNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren. In afbeelding 6 ziet u het schema van capillaire buisjes voor een dergelijke proef.





**Afbeelding 6. Aanbevolen opstelling van de rotor voor elke proef met de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit.** P1–5: WT1-standaarden; C1–3: ABL-standaarden; S: het te analyseren onbekende DNA-monster; H<sub>2</sub>O: watercontrole.

### qPCR in LightCycler 1.2-instrument

**Opmerking:** Vanwege specifieke technologische vereisten moeten proeven met de LightCycler met bepaalde reagentia worden uitgevoerd. We raden u aan de LightCycler TaqMan Master te gebruiken en de instructies van de fabrikant op te volgen voor de bereiding van het mastermengsel 5x.

**Opmerking:** Voer alle stappen op ijs uit.

### Procedure

1. **Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.**
2. **Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.**

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 11 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 20 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPC-ABL of PPP-WT1). Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

**Tabel 11. Bereiding van het qPCR-mengsel**

<b>Component</b>	<b>1 reactie (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 14 reacties + 1 extra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT1: 16 reacties + 1 extra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Uiteindelijke concentratie</b>
Recent bereid LightCycler TaqMan- mastermengsel, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Primer- probemengsel, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	10,2	153,0	173,4	–
Monster (toe te voegen in stap 4)	5,0	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	20,0	20 elk	20 elk	–

3. Schenk in elk capillair buisje 15  $\mu$ l van het qPCR-voormengsel.
4. Voeg 5  $\mu$ l van het RT-product (cDNA, vergelijkbaar met 100 ng RNA) dat bij de omgekeerde transcriptie is verkregen (zie "Protocol: door het EAC aanbevolen en gestandaardiseerde omgekeerde transcriptie" op pagina 13), aan het betreffende buisje toe (het totale volume is 20  $\mu$ l).
5. Meng voorzichtig door op en neer te pipetteren.
6. Plaats de capillaire buisjes in de adapter die met het instrument is meegeleverd en centrifugeer kort (circa 10 seconden bij 700 g).
7. Plaats de capillaire buisjes in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
8. Stel het LightCycler 1.2-instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 12.

**Tabel 12. Temperatuurprofiel**

<b>Analysemodus</b>	Kwantificering
<b>Constant</b>	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 minuten Helling: 20
<b>Cyclus</b>	50 keer 95 °C gedurende 10 seconden; helling: 20 60 °C gedurende 1 minuut; helling: 20; met acquisitie van FAM-fluorescentie: enkelkanaals
<b>Constant 2</b>	45 °C gedurende 1 minuut; helling: 20

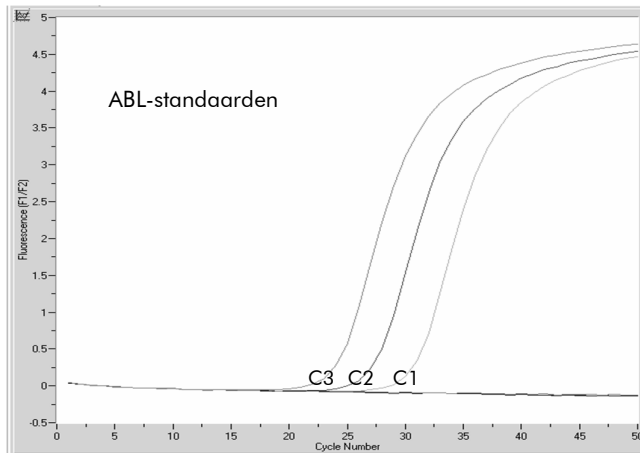
9. Bij gebruik van het LightCycler 1.2-instrument wordt de modus F1/F2 en "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (2e afgeleide analyse) aanbevolen. Start het in tabel 12 aangegeven thermocyclerprogramma.

# Interpretatie van de resultaten

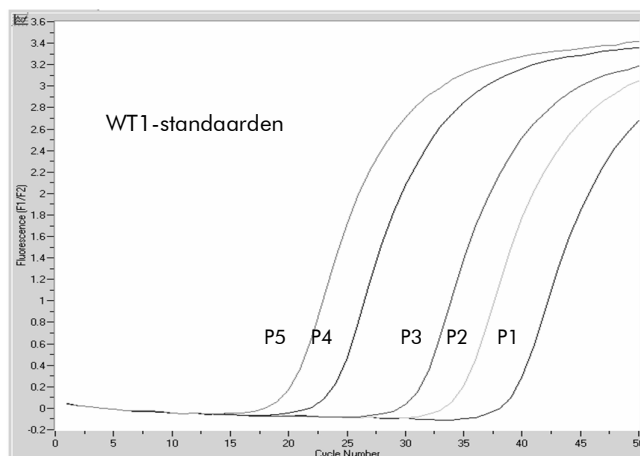
## Principe van de gegevensanalyse

Bij de TaqMan-technologie wordt het aantal PCR-cycli dat nodig is om een signaal boven de drempelwaarde te detecteren een drempelcyclus ( $C_T$ ) genoemd. Dit aantal is direct evenredig aan de doelhoeveelheid die aan het begin van de reactie aanwezig is.

Door een standaard met een bekend aantal moleculen te gebruiken, kan er een standaardcurve worden opgesteld en kan de precieze doelhoeveelheid die in het testmonster aanwezig is, worden bepaald. Voor *ipsogen*-standaardcurven, op basis van plasmiden, wordt gebruikgemaakt van 3 standaard plasmideverduningen voor het ABL-controlegen (CG) en 5 standaardverduningen voor het WT1-gen, zodat er nauwkeurige standaardcurven worden verkregen. In afbeelding 7 en 8 wordt een voorbeeld weergegeven van TaqMan-amplificatiecurven die met de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit zijn verkregen.



**Afbeelding 7. Detectie van ABL-standaarden (C1, C2, C3).  $10^3$ ,  $10^4$  en  $10^5$  kopieën/ $5 \mu\text{l}$ .**



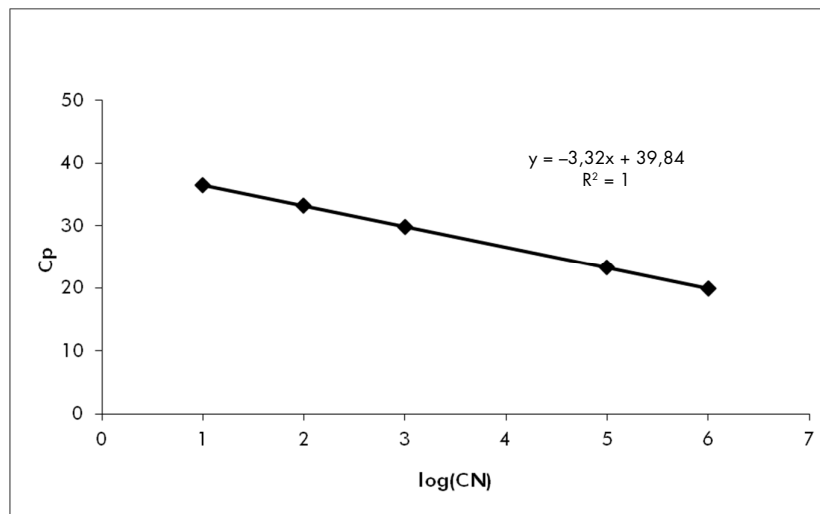
**Afbeelding 8. Detectie van WT1-standaarden (P1 t/m P5).  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  en  $10^5$  kopieën/ $5 \mu\text{l}$ .**

## Resultaten

### Standaardcurve en kwaliteitscriteria

Onbewerkte gegevens kunnen voor analyse in een Excel®-bestand worden geplakt.

De onbewerkte  $C_P$ -/ $C_T$ -waarden van elk gen (ABL en WT1) die op basis van standaard plasmideverduunningen zijn verkregen, worden overeenkomstig hun logkopienummer in kaart gebracht (3, 4 en 5 voor C1, C2 en C3; 1, 2, 3, 5 en 6 voor P1, P2, P3, P4 en P5). In afbeelding 9 is een voorbeeld van de theoretische curve weergegeven die op basis van 5 standaardverduunningen is berekend.



**Afbeelding 9. Theoretische curve die op basis van 5 standaardverduunningen is berekend.** Voor elk gen (ABL en WT1) wordt een lineaire-regressiecurve ( $y = ax + b$ ) berekend, waarbij  $a$  de helling van de lijn is en  $b$  de  $y$ -asafsnede, het  $y$ -coördinaat van het punt waarop de lijn de  $y$ -as kruist. De vergelijking en determinatiecoëfficiënt ( $R^2$ ) van de curve worden op de grafiek weergegeven.

Aangezien de standaarden 10-voudige verduunningen zijn, is de theoretische helling van de curve  $-3,32$ . Een helling tussen de  $-3,0$  en  $-3,9$  is aanvaardbaar, zolang  $R^2 > 0,95$  is (12). Een waarde van  $R^2 > 0,98$  is wenselijk voor nauwkeurige resultaten (13).

### Genormaliseerd aantal kopienummers (normalized copy number, NCN)

Gebruik de vergelijking van de ABL-standaardcurve om onbewerkte  $C_P$ -waarden (verkregen met PPC-ABL) van de onbekende monsters naar het aantal ABL-kopienummers om te zetten (ABL copy numbers,  $ABL_{CN}$ ).

$$ABL_{CN} \text{ van } \log_{10}\text{-monster} = \frac{\text{Gemiddelde } C_P \text{ ABL} - \text{asafsnede ABL-standaardcurve}}{\text{Helling van ABL-standaardcurve}}$$

Gebruik de vergelijking van de WT1-standaardcurve om onbewerkte  $C_P$ -waarden (verkregen met PPP-WT1) van de onbekende monsters naar het aantal WT1-kopienummers om te zetten ( $WT1_{CN}$ ).

$$WT1_{CN} \text{ van } \log_{10}\text{-monster} = \frac{\text{Gemiddelde } C_P \text{ WT1} - \text{asafsnede WT1-standaardcurve}}{\text{Helling van WT1-standaardcurve}}$$

De verhouding tussen deze CN-waarden levert het genormaliseerde aantal kopienummers (NCN) per 10.000 ABL-kopieën op:

$$NCN = \frac{WT1_{CN}}{ABL_{CN}} \times 10.00$$

### Kwaliteitscontrole van ABL-waarden

Een slechte RNA-kwaliteit of problemen tijdens de qPCR-stappen leiden tot een laag  $ABL_{CN}$ . We raden u aan de resultaten van monsters te negeren waarbij  $ABL_{CN} < 4246$  is.

### Reproduceerbaarheid tussen replica's

De variatie in de  $C_P$ -waarden tussen replica's zou  $< 2$  moeten zijn, wat overeenkomt met een 4-voudige verandering in het aantal kopienummers.

De variatie in de  $C_P$ -waarden tussen replica's is meestal  $< 1,5$  als de gemiddelde  $C_P$ -waarde van de replica's  $< 36$  is (12).

**Opmerking:** Iedere gebruiker dient de reproduceerbaarheid zelf in zijn eigen laboratorium te meten.

### Watercontroles

Negatieve controles zouden nul CN moeten opleveren voor zowel ABL als WT1.

Een positieve watercontrole komt voort uit een kruisbesmetting. Zie "Problemen oplossen" hieronder voor een oplossing.

## Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de lijst met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). De wetenschappers van de afdeling Technische services van QIAGEN geven graag antwoord op uw vragen over de informatie of protocollen in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (zie "Contactgegevens" op pagina 42 voor contactgegevens).

---

### Opmerkingen en suggesties

---

#### Negatief resultaat voor het controleggen (ABL) en WT1 in alle monsters - standaard is goed

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| a) RNA is van slechte kwaliteit       | Controleer voordat u begint altijd de kwaliteit en concentratie van het RNA.<br>Voer gelijktijdig een positieve controle met cellijn RNA uit. |
| b) Omgekeerde transcriptie is mislukt | Controleer voordat u begint altijd de kwaliteit en concentratie van het RNA.<br>Voer gelijktijdig een positieve controle met cellijn RNA uit. |

#### Negatief resultaat voor het controleggen (ABL) in de monsters - standaard is goed

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| a) RNA is van slechte kwaliteit       | Controleer voordat u begint altijd de kwaliteit en concentratie van het RNA.<br>Voer gelijktijdig een positieve controle met cellijn RNA uit. |
| b) Omgekeerde transcriptie is mislukt | Controleer voordat u begint altijd de kwaliteit en concentratie van het RNA.<br>Voer gelijktijdig een positieve controle met cellijn RNA uit. |

#### Standaardsignaal is negatief

- |                  |  |
|------------------|--|
| a) Pipetteerfout | Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie.<br>Herhaal de PCR-run. |
|------------------|--|

## Opmerkingen en suggesties

---

- b) Onjuiste opslag van kitcomponenten
- Bewaar de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit bij -15 tot -30 °C en stel de primer-probemengsels (PPC en PPP) niet bloot aan licht. Zie "Opslag en verwerking van reagentia" op pagina 12.
- Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.
- Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag.

### Negatieve controles zijn positief

- Kruisbesmetting
- Vervang alle essentiële reagentia.
- Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.
- Hanteer de monsters, kitcomponenten en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden om contaminatie door achtergebleven materiaal te voorkomen.

### Geen signaal, zelfs niet in de standaardcontroles

- a) Pipetteerfout of reagentia vergeten
- Controleer het pipetteerschema en de opstelling van de reactie.
- Herhaal de PCR-run.
- b) Remmend effect van het monstermateriaal als gevolg van onvoldoende zuivering
- Herhaal de RNA-bereiding.
- c) LightCycler: Onjuist detectiekanaal geselecteerd
- Stel het kanaal in op F1/F2 of 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: geen gegevensacquisitie geprogrammeerd
- Controleer de cyclusprogramma's.
- Selecteer aan het einde van elk hybridisatiesegment van het PCR-programma de acquisitiemodus "single" (enkelvoudig).



## Opmerkingen en suggesties

---

### Geen of zwak signaal in monsters, maar de standaardcontroles zijn goed

- |  |   |
|--|---|
| a) RNA is van slechte kwaliteit of heeft een lage concentratie | Controleer voordat u begint altijd de kwaliteit en concentratie van het RNA.<br>Voer gelijktijdig een positieve controle met cellijn RNA uit. |
| b) Omgekeerde transcriptie is mislukt                          | Controleer voordat u begint altijd de kwaliteit en concentratie van het RNA.<br>Voer gelijktijdig een positieve controle met cellijn RNA uit. |

### Intensiteit van fluorescentie te laag

- |  |  |
|--|--|
| a) Onjuiste opslag van kitcomponenten      | Bewaar de <i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant-kit bij -15 tot -30 °C en stel de primer-probemengsels (PPC en PPP) niet bloot aan licht. Zie "Opslag en verwerking van reagentia" op pagina 12.<br>Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.<br>Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag. |
| b) Zeer lage initiële hoeveelheid doel-RNA | Verhoog de hoeveelheid monster-RNA.<br><b>Opmerking:</b> Er kunnen remmende effecten optreden, afhankelijk van de gekozen RNA-bereidingsmethode.   |

## Opmerkingen en suggesties

---

### LightCycler: Intensiteit van fluorescentie varieert

- |  |  |
|--|--|
| a) Pipetteerfout                                       | De variabiliteit als gevolg van een zogenoemde 'pipetteerfout' kan worden beperkt door gegevens in de F1/F2- of 530 nm/640 nm-modus te analyseren.   |
| b) Capillaire buisjes zijn onvoldoende gecentrifugeerd | Het bereide PCR-mengsel kan zich nog boven in het capillaire buisje bevinden of er zit een luchtbel in de punt.<br><br>Centrifugeer capillaire buisjes waar het reactiemengsel in zit altijd op de wijze die in de gebruikshandleiding van het apparaat is beschreven. |
| c) Punt van het capillaire buisje is vies              | Draag altijd handschoenen wanneer u met capillaire buisjes werkt.  |

### LightCycler: fout in de standaardcurve

- |               |  |
|---------------|--|
| Pipetteerfout | De variabiliteit als gevolg van een zogenoemde 'pipetteerfout' kan worden beperkt door gegevens in de F1/F2- of 530 nm/640 nm-modus te analyseren. |
|---------------|--|

## Kwaliteitscontrole

De volledige kit is aan een kwaliteitscontrole met een LightCycler 480-instrument onderworpen. Deze kit is geproduceerd conform de norm ISO 13485:2003. Analysecertificaten zijn op aanvraag verkrijgbaar via [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support).

## Beperkingen

Voordat ze dit apparaat gaan gebruiken, moeten gebruikers worden getraind en vertrouwd raken met deze technologie. De kit moet conform de instructies in deze handleiding worden gebruikt, in combinatie met een gevalideerd instrument dat in "Benodigde maar niet meegeleverde materialen" op pagina 10 staat vermeld.

Gegeneerde diagnostische resultaten moeten in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen worden geïnterpreteerd. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden uitgevoerd en die niet in de prestatieonderzoeken van QIAGEN worden behandeld.

Let goed op de vervaldatum op het etiket van de doos en op de etiketten van alle componenten. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken.

**Opmerking:** De kit is op basis van de ELN-onderzoeken (European LeukemiaNet) samengesteld (10, 11). De kit dient conform de instructies in deze handleiding en in combinatie met gevalideerde reagentia en instrumenten te worden gebruikt. Bij afwijkend gebruik van dit product en/of aanpassing van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

## Prestatiekenmerken

### Niet-klinische onderzoeken

#### Materialen en methoden

Er werd een lineairiteitsonderzoek uitgevoerd met 14 monsters; elk monster werd verkregen uit een ander mengsel RNA uit een cellijn met hoge expressie en monsters van gezonde donoren met een lage expressie van het WT1-gen. Elk monster werd in drievoud getest. De NCN-waarden varieerden tussen 2,20 en 3838,11 NCN en dit onderzoek wees uit dat de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit lineaire resultaten in dit waardebereik opleverde.

#### Precisie

Er werd een precisie-onderzoek uitgevoerd met 4 monsters; elk monster werd verkregen uit een ander mengsel RNA uit cellijnen met een hoge en lage WT1-expressie. De assays van elk monster werden maximaal 16 keer herhaald. In de volgende tabellen staat een overzicht van de analytische gegevens vermeld.

**Tabel 13. Analytische gegevens van het precisie-onderzoek - plasmiden**

	<b>Verdunning</b>	<b>Gemiddelde C<sub>T</sub></b>	<b>σ</b>	<b>n</b>	<b>CV (%)</b>
WT1- plasmiden	P1: 10 <sup>1</sup> kopieën/5 μl	36,13	0,87	15	2,42
	P2: 10 <sup>2</sup> kopieën/5 μl	32,70	0,40	16	1,21
	P3: 10 <sup>3</sup> kopieën/5 μl	29,39	0,43	16	1,45
	P4: 10 <sup>5</sup> kopieën/5 μl	22,62	0,41	16	1,80
	P5: 10 <sup>6</sup> kopieën/5 μl	19,25	0,38	16	1,98
ABL- plasmiden	C1: 10 <sup>3</sup> kopieën/5 μl	29,59	0,35	16	1,20
	C2: 10 <sup>4</sup> kopieën/5 μl	26,11	0,40	15	1,52
	C3: 10 <sup>5</sup> kopieën/5 μl	22,77	0,28	16	1,22

**Tabel 14. Analytische gegevens van het precisie-onderzoek - cellijnen**

	<b>Verdunning</b>	<b>Gemiddeld NCN</b>	<b>σ</b>	<b>n</b>	<b>CV (%)</b>
Verdunning cellijn-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

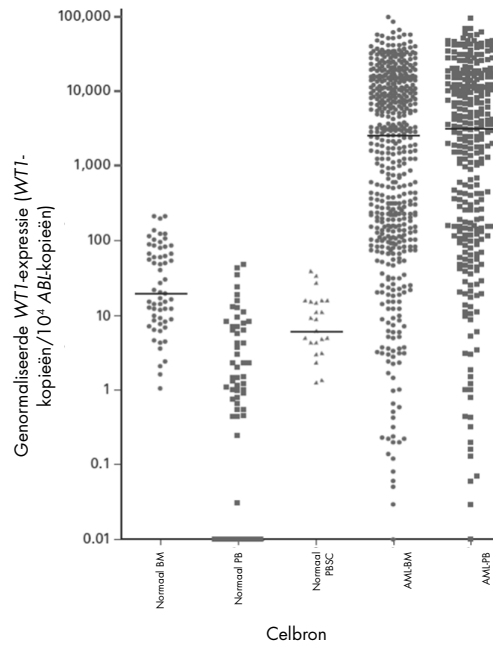
## Blancolimiet en detectielimiet

Het onderzoek werd opgezet op basis van aanbevelingen in het NCCLS-document EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. Het achtergrondgehalte of de blancolimiet (limit of blank, LOB) werd vastgesteld op basis van monsters van normaal bloed van gezonde donoren (4 monsters, 73 metingen). Deze limiet bleek gelijk te zijn aan 3,66 WT1 NCN.

De detectielimiet (limit of detection, LOD), die de analytische gevoeligheid aanduidt, werd vastgesteld op basis van monsters met een bekende lage WT1-expressie, verkregen van gezonde donoren en verrijkt met cellen met een hoge WT1-expressie. Zo werd gegarandeerd dat de verwachte NCN-waarde het 4-voudige was van de LoB. Er werden met 4 monsters in totaal 72 metingen uitgevoerd. De LoD bleek gelijk te zijn aan 13,08 WT1 NCN.

## Klinische onderzoeken

Aangezien het WT1-gen in normale hematopoëtische cellen tot expressie wordt gebracht, is het van essentieel belang om de mate van expressie in normale controlemonsters vast te stellen, zodat er een drempelwaarde kan worden berekend waarmee onderscheid tussen residuele leukemie en achtergrondamplificatie kan worden gemaakt. Een analyse van 204 controlemonsters van gezonde vrijwilligers met behulp van de ELN-assay die in de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit wordt gebruikt, bevestigde dat een zeer lage WT1-expressie in monsters van perifere bloed, beenmerg en stamcellen uit perifere bloed kan worden waargenomen. De mediaanwaarden waren 19,8 WT1-kopieën/ $10^4$  ABL-kopieën (bereik 0-213) in beenmerg, 0,01 (bereik 0,01-47,6) in perifere bloed en 6,1 (bereik 0-39) in stamcellen uit perifere bloed (zie afbeelding 10). De WT1-expressie in perifere bloed was significant lager dan die in beenmerg ( $p < 0,0001$ ). Op basis van deze resultaten werd de bovengrens van de normaalwaarde vastgesteld op 250 NCN voor beenmerg en 50 NCN voor perifere bloed.



**Afbeelding 10. WT1-expressie in monsters van gezonde donoren.** Acute myeloïde leukemie (AML); beenmerg (BM); Perifeer bloed (PB); stamcellen uit perifeer bloed (PBSC). (15)

Overgenomen met toestemming van 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 1 september 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology, Alle rechten voorbehouden..

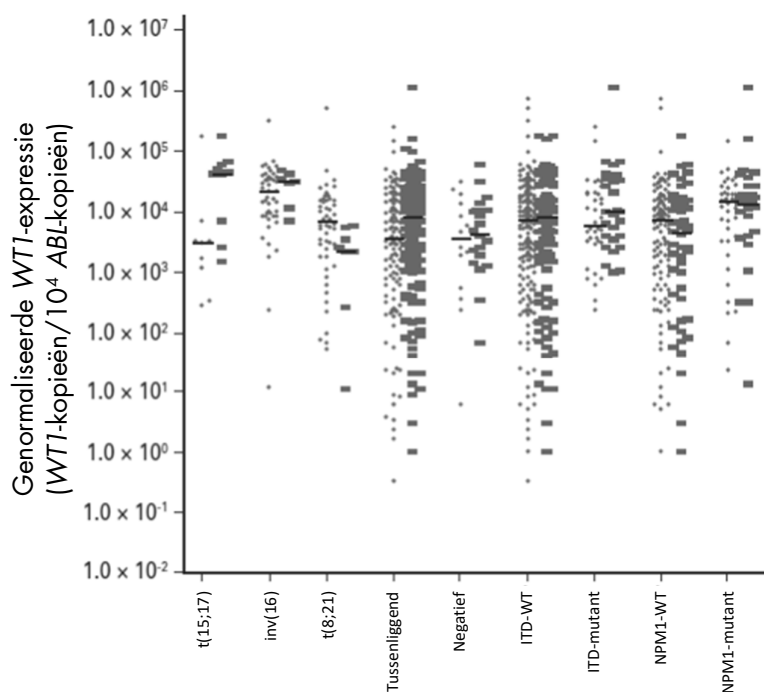
### **WT1-expressie in AML-monsters vóór behandeling bepalen door middel van gestandaardiseerde qPCR-assay van ELN**

Om de toepasbaarheid van de ELN-assay die in de *ipsogen* WT1 ProfileQuant-kit wordt gebruikt voor de detectie van minimale restziekte (MRD) te evalueren, werden er voorafgaand aan de behandeling 620 monsters (238 van perifeer bloed en 382 van beenmerg) van 504 patiënten geanalyseerd.

In 86% en 91% van de diagnostische AML-monsters van beenmerg en perifeer bloed was er sprake van WT1-overexpressie boven het achtergrondgehalte (bepaald als  $> 250$  en  $> 50$  WT1-kopieën/ $10^4$  ABL-kopieën in respectievelijk beenmerg en perifeer bloed) (zie ook afbeelding 10).

De mediaanwaarde van WT1-kopieën/ $10^4$  ABL-kopieën was 2505, (bereik  $0-7,5 \times 10^5$ ) in beenmerg ( $p < 0,0001$  vs. normaal beenmerg) en 3107 (bereik  $0-1,13 \times 10^6$ ) in perifeer bloed ( $p < 0,0001$  vs. normaal perifeer bloed). In de hele partij was geen significant verschil waargenomen in expressie tussen perifeer bloed en beenmerg, hetgeen ook wordt bevestigd aan de hand van de resultaten van patiënten met gepaarde monsters van perifeer bloed en beenmerg (zie Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, afbeelding A3 in de bijlage (15)).

De variatie in het genormaliseerde WT1-expressiegehalte werd volgens de cytogenetica waargenomen (afbeelding 11,  $p < 0,001$ ), met een bijzonder hoog gehalte in gevallen met  $\text{inv}(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$  (mediaan  $2,31 \times 10^4$ , bereik  $12-3,14 \times 10^5$ ). Er werden ook significant hogere WT1-gehalten gedetecteerd bij AML met NPM1-mutaties (NPM1-mutant: mediaan  $1,44 \times 10^4$ , bereik  $0-1,13 \times 10^6$ ; wildtype NPM1: mediaan  $6566$ , bereik  $0-7,5 \times 10^5$ ,  $p = 0,005$ ).



**Afbeelding 11. Variatie in WT1-expressie volgens de cytogenetica (15).**

Overgenomen met toestemming van 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, Alle rechten voorbehouden..

De mate van WT1-expressie zoals bepaald door de ELN-assay, waarbij er in 15 gevallen sprake was van mutaties in exon 7 en 9 van het WT1-gen, was vergelijkbaar met die van een wildtype WT1 ( $p = 0,2$ ). Een sequentie-analyse van 32 gevallen waarbij de ELN-assay een lage expressie van het WT1-transcript suggereerde ( $< 250$  kopieën/ $10^4$  ABL-kopieën), wees uit dat deze lage mate van expressie in 3 gevallen (9,4%) verband hield met mutaties die de bindingsplaats van de forward primer verstoorden (zie Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, afbeelding A4 in de bijlage (15)).

## Referenties

QIAGEN onderhoudt een grote, regelmatig bijgewerkte on-line database van wetenschappelijke publicaties waarin producten van QIAGEN zijn gebruikt. Dankzij uitgebreide zoekopties kunt u de artikelen vinden die u nodig hebt, door eenvoudig te zoeken op trefwoord of door de toepassing, het onderzoeksgebied, een titel, enz. op te geven.

Kijk voor de volledige lijst met referenties in de online referentiedatabase van QIAGEN via [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) of neem contact op met de afdeling Technical services van QIAGEN of met uw plaatselijke leverancier.

### Geciteerde referenties

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. en 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. en 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.

## Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en etiketten zijn weergegeven:



Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties



Vervaldatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer



Global Trade Item Number



Temperatuurbepering



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

 European LeukemiaNet

## Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support). Ook kunt u bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met de afdeling Technical service van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24) (24)	Voor 24 reacties: ABL- controlelegendaarden, WT1- genstandaarden (exon 1-2), ABL- primer-probemengsel, PPP-WT1- probemengsel	676923
<b>Rotor-Gene Q MDx: voor IVD-gevalideerde, realtime PCR-analyse in klinische toepassingen</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9002033

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De (gebruikers)handleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) of kunnen bij de afdeling Technical services van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

Dit product is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen *ipsogen*-producten niet worden doorverkocht, gemodificeerd voor doorverkoop of gebruikt voor de productie van commerciële producten.

De in dit document gegeven informatie kan zonder kennisgeving worden gewijzigd. QIAGEN aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten in dit document. Dit document is voor zover bekend volledig en accuraat op het moment van publicatie. QIAGEN kan in geen enkel geval aansprakelijk worden gehouden voor incidentele schade, speciale schade, meervoudige schade of gevolgschade in verband met of voortvloeiend uit het gebruik van dit document.

Voor *ipsogen*-producten geldt een garantie voor de vermelde specificaties. De enige verplichting van QIAGEN en de enige verhaalmogelijkheid van de klant is beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

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

#### **Beperkte licentieovereenkomst**

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *ipsogen* WT1 *ProfileQuant*-kit dat hij/zij akkoord gaat met de volgende voorwaarden:

1. De *ipsogen* WT1 *ProfileQuant*-kit mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de Handleiding bij de *ipsogen* WT1 *ProfileQuant*-kit en in combinatie met de componenten in de kit. QIAGEN verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de handleiding bij de *ipsogen* WT1 *ProfileQuant*-kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de componenten ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die impliciet of expliciet worden genoemd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord geen stappen te ondernemen of niemand anders stappen te laten ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of die deze mogelijk kunnen maken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke rechtshandeling om deze beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Raadpleeg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) voor de bijgewerkte licentievoorwaarden.

HB-1355-002 © 2013–2015 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

---

**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

