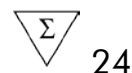


***therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit**

Priručnik

Verzija 1



IVD

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Za uporabu s uređajem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4 **MAT** 1063321HR



QIAGEN tehnologije uzoraka i određivanja

QIAGEN je vodeći dobavljač inovativnih tehnologija za biološke uzorke i ispitivanja, omogućujući izolaciju i detekciju sadržaja bilo kojeg biološkog uzorka. Naši napredni, visokokvalitetni proizvodi i usluge osiguravaju uspješan put od uzorka do rezultata.

QIAGEN postavlja standarde u:

- Pročišćavanju DNA, RNA i proteina
- Ispitivanju nukleinskih kiselina i proteina
- Istraživanju mikro-RNA i RNAi
- Automatizaciji tehnologije uzoraka i ispitivanja

Naša je misija omogućiti Vam postizanje istaknutih uspjeha i otkrića. Za više informacija, posjetite www.qiagen.com.

Sadržaj

Namjena	5
Sažetak i objašnjenje	5
Načelo postupka	6
Priloženi materijali	8
Sadržaj kita	8
Potrebni materijali koji nisu priloženi	9
Upozorenja i mjere opreza	10
Sigurnosne informacije	10
Opća upozorenja	10
Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima	11
Čuvanje uzoraka i rukovanje uzorcima	12
Postupak	13
Određivanje razine tumorskih stanica potrebnih za EGFR analizu	13
Izolacija DNA	13
Protokoli	
■ Procjena uzorka	15
■ Detekcija EGFR mutacija	18
■ Postavke za Rotor-Gene Q EGFR	21
Interpretacija rezultata	30
Analiziranje podataka procjene uzorka	30
Analiziranje podataka EGFR mutacija	34
Vodič za tkrivanje i rješavanje pogrešaka	45
Kontrola kvalitete	46
Ograničenja	46
Karakteristike izvedbe	47
Granične vrijednosti odbacivanja	47
Granica određivanja (LOD)	47
Preciznost	48
Ponovljivost	49
Učinak početne koncentracije DNA	49
Interferirajuće tvari	49

Bibliografija	50
Oznake	51
Informacije o kontaktu	51
Dodatak: Pojediniosti o mutacijama	52
Informacije o naručivanju	54

Namjena

therascreen EGFR RGQ PCR Kit je in vitro dijagnostički test za detekciju 29 somatskih mutacija u EGFR-genu povezanom s karcinomom i daje kvalitativnu procjenu statusa mutacija.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit je namijenjen za korištenje od strane profesionalnih korisnika u profesionalnom laboratorijskom okruženju, s DNA ekstrahiranom iz formalinom fiksiranih u parafin uklopljenih tkiva karcinoma ne malih stanica pluća (NSCLC). Rezultati su namijenjeni za pomoć kliničaru u prepoznavanju bolesnika s NSCLC koji mogu imati koristi od liječenja inhibitorima tirozin kinaze.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu.

Sažetak i objašnjenje

therascreen EGFR RGQ PCR Kit je test spreman za uporabu za detekciju 29 somatskih mutacija u EGFR-genu povezanom s karcinomom pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) na uređaju Rotor-Gene Q.

Koristeći tehnologije Scorpions® i ARMS® *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit omogućuje detekcije sljedećih mutacija u odnosu na pozadinsku genomsku DNA divljeg tipa.

- 19 delecija u eksonu 19 (detektira prisustvo bilo koje od 19 delecija ali ih ne razlikuje)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detektira prisustvo G719S, G719A, ili G719C, ali ih ne razlikuje)
- S768I
- 3 insercije u eksonu 20 (detektira prisustvo bilo koje od 3 insercije, ali ih ne razlikuje)

Korištene metode su visokoselektivne i, ovisno o ukupnoj količini prisutne DNA, omogućuju detekciju niskog postotka mutacija u odnosu na genomsku DNA divljeg tipa. Razlučivost i granice detekcije su nadmoćne tehnologijama kao što je sekvenciranje ograničeno bojama.

Načelo postupka

therascreen EGFR RGQ PCR Kit koristi dvije tehnologije — ARMS i Scorpions — za detekciju mutacija PCR-om u stvarnom vremenu.

ARMS

Umnožavanje specifično za alel ili mutaciju (engl. allele- or mutation-specific amplification) postiže se korištenjem ARMS tehnologije. *Taq* DNA polimeraza (*Taq*) je učinkovita u razlikovanju podudaranja i nepodudaranja na 3' kraju PCR početnice. Specifični mutirani sljedovi selektivno se umnožavaju čak i u uzorcima u kojima većina slijeda nije nositelj mutacije. Kad je početnica u potpunosti podudarna, umnožavanje se nastavlja s potpunom učinkovitošću. Ako je baza na 3' kraju nepodudarna, pojavljuje se niža razina pozadinskog umnožavanja.

Scorpions

Detekcija umnožavanja provodi se uporabom tehnologije Scorpions. Scorpions su bifunkcionalne molekule koje sadrže PCR početnicu kovalentno vezanu za fluorescentno obilježenu sondu. Fluorofor u toj sondi je povezan s hvatačem koji je također ugrađen u sondu, a koji reducira fluorescenciju. Za vrijeme PCR-a, kad se sonda veže za umnoženi slijed, fluorofor i hvatač se razdvajaju. To dovodi do mjerljivog porasta fluorescencije u reakcijskoj epruveti.

Oblikovanje kita

therascreen EGFR RGQ PCR Kitu se nalazi materijal za osam određivanja:

- Jedan kontrolni test (Ctrl)
- Sedam testova za mutacije

Sve reakcijske smjese sadrže reagense za određivanje ciljeva označenih FAM[™]-om i unutarnju kontrolu koja je označena HEX[™]-om. Test unutarnje kontrole provjerava prisustvo inhibitora koji mogu dovesti do lažno negativnih rezultata. Umnožavanje FAM-a može konkurirati umnožavanju unutarnje kontrole i svrha je unutarnje kontrole jednostavno pokazati da je tamo gdje nema umnožavanja FAM-a istinski negativan rezultat a ne neuspjela PCR reakcija.

Postupak

therascreen EGFR RGQ PCR Kit obuhvaća postupak u dva koraka. U prvom koraku provodi se kontrolno ispitivanje zbog procjene ukupne DNA prisutne u uzorku. U drugom koraku provodi se i određivanje kontrole i određivanje mutacije kako bi se utvrdilo prisustvo ili odsustvo mutirane DNA.

Određivanja:

Kontrolno određivanje

Kontrolno određivanje, obilježeno FAM-om, koristi se za procjenu ukupne DNA prisutne u uzorku. Ovo određivanje umnožava regiju eksona 2 EGFR gena. Početnice i sonda pripremljene su za izbjegavanje svih poznatih polimorfizama EGFR gena.

Izrazito se preporučuje uporaba smjese Control Reaction Mix (Ctrl) koja je u sastavu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita za procjenu ukupne DNA prisutne u uzorku. Kontrolno određivanje umnožava regiju eksona 2 EGFR gena.

Preporučuje se postavljanje uzoraka samo uz kontrolna ispitivanja u kojima se koristi EGFR pozitivna kontrola (PC) kao pozitivna kontrola i voda bez nukleaze kao kontrola bez predloška.

Napomena: procjena DNA treba biti temeljena na PCR-u i može se razlikovati od kvantificiranja na temelju očitavanja apsorbancije. Dodatna smjesa za kontrolnu reakciju (Ctrl) sastavni je dio kita a služi za procjenu kvalitete i količine DNA u uzorcima prije analize *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom

Određivanje mutacija

Svako ispitivanje mutacija sadrži FAM-om označenu Scorpion sondu i jednu ARMS početnicu za razlikovanje između divljeg tipa DNA i specifično mutirane DNA.

Kontrole

Napomena: Sve serije ispitivanja trebaju sadržavati pozitivne i negativne kontrole.

Pozitivna kontrola

Svaka serija treba sadržavati pozitivnu kontrolu u epruvetama 1-8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sadrži EGFR pozitivnu kontrolu (PC) koju treba koristiti kao predložak u reakciji pozitivne kontrole. Rezultat pozitivne kontrole treba vrednovati zbog sigurnosti da je izvedba kita unutar navedenih kriterija prihvatljivosti.

Negativna kontrola

Svaka serija treba sadržavati negativnu kontrolu ("kontrolu bez predloška", NTC) u epruvetama 9–16. NTC se sastoji od vode bez nukleaza (H₂O) koja se koristi kao "predložak" za kontrolu bez predloška. Kontrola bez predloška se koristi za procjenu mogućih zagađenja tijekom postavljanja serije određivanja te za procjenu reakcije unutarnje kontrole.

Procjena reakcije unutarnje kontrole

Svaka reakcijska smjesa sadrži unutarnju kontrolu dodatno na ciljnu reakciju. Neuspjeh ukazuje na mogućnost prisustva inhibitora koji mogu dovesti do lažno

negativnih rezultata ili na pogrešku u postavkama koja se dogodila od strane operatera s ovom epruvetom.

Ako unutarnja kontrola nije uspjela zbog inhibicije PCR-a, razrjeđenje uzorka može umanjiti utjecaj inhibitora ali treba napomenuti da bi to također razrijedilo ciljnu DNA. Umnožavanje FAM-a može konkurirati umnožavanju unutarnje kontrole tako da stvorena IC C_T (HEX) vrijednost može pasti izvan specificiranog raspona. Za te uzorke rezultati FAM-a ipak vrijede.

Priloženi materijali

Sadržaj kita

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit			(24)
Kataloški br.			870111
Broj reakcija			24
Crveno	Smjesa kontrolne reakcije	Ctrl	2 x 600 µl
Ljubičasto	T790M reakcijska smjesa	T790M	600 µl
Narančasto	Reakcijska smjesa za delecije	Del	600 µl
Ružičasto	L858R reakcijska smjesa	L858R	600 µl
Zeleno	L861Q reakcijska smjesa	L861Q	600 µl
Žuto	G719X reakcijska smjesa	G719X	600 µl
Sivo	S768I reakcijska smjesa	S768I	600 µl
Plavo	Reakcijska smjesa za insercije	Ins	600 µl
Smeđe	EGFR pozitivna kontrola	PC	300 µl
Tirkizno	Taq DNA polimeraza	Taq	138 µl
Bijelo	Voda bez nukleaza	H ₂ O	2 x 1.9 ml
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbook (priručnik na engleskom)			1

Potrebni materijali koji nisu priloženi

Radeći s kemikalijama, uvijek nosite prikladnu laboratorijsku odjeću, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite na odgovarajućim listovima sa sigurnosnim podacima (safety data sheet - SDS) koje možete dobiti od dobavljača proizvoda.

- Kit za izolaciju DNA (pogledajte "Izolacija DNA", stranica 13)
- Ksilen
- Etanol (96–100%)*
- 1.5 ml ili 2 ml epruvete za mikrocentrifugiranje (za korak liziranja)
- 1.5 ml epruvete za mikrocentrifugiranje (za korake eluiranja) (raspoložive od tvrtki Brinkmann [Safe-Lock, kat. br. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat. br. 0030 120.086], ili Sarstedt [Safety Cap, kat. br. 72.690])[†]
- Namjenske pipete[‡] (podesive) za pripremu uzorka
- Namjenske pipete[‡] (podesive) za pripremu PCR master mješavine
- Namjenske pipete[‡] (podesive) za dispenciju predloška DNA*
- Nastavci za pipetiranje s filtrima bez DNAza, RNAza i DNA (za izbjegavanje međusobnog zagađenja, preporučujemo nastavke za pipetiranje s preprekom za aerosol)
- Termo miješalo, grijani orbitalni inkubator, grijajući blok, ili vodena kupelj s mogućnošću inkubacije na 90°C[‡]
- Stolna centrifuga[‡] s rotorom za reakcijske epruvete od 2 ml
- Vrtložno miješalo
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM uređaj[§] s fluorescentnim kanalima za Cycling Green i Cycling Yellow (detekcija FAM-a i HEX-a, redom)
- Rotor-Gene Q, program verzije 2.0.2 ili više
- 0.1 ml epruvete u nizu i poklopci, za uporabu s rotorom za 72 jažice (QIAGEN, kat. br. 981103 ili 981106)
- Epruvete za mikrocentrifugiranje bez DNAza, RNAza i DNA za pripremu master mješavina
- Blok za unos 72 x 0.1 ml epruveta, aluminijski blok za ručno postavljanje reakcija s jednokanalnom pipetom (QIAGEN, kat. br. 9018901)

* Ne koristiti denaturirani alkohol koji sadrži druge tvari kao što su metanol ili metiletilketon.

[†] Ovo nije popis svih mogućih dobavljača.

[‡] Pobrinite se da su uređaji provjereni i umjereni prema preporukama proizvođača.

[§] Instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM, ako je primjenjivo.

Također poznat kao Rotor-Gene Q MDx u nekim zemljama.

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Sigurnosne informacije

Radeći s kemikalijama, uvijek nosite prikladnu laboratorijsku odjeću, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite na odgovarajućim listovima sa sigurnosnim podacima (safety data sheet - SDS). One su dostupne na mreži, u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi www.qiagen.com/safety. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati list sa sigurnosnim podacima za svaki komplet i komponentu kompleta QIAGEN.

24- sata dostupne hitne informacije

Pomoć u hitnom slučaju ili nesreći koja uključuje opasne kemijske tvari možete dobiti 24 sata dnevno od tvrtke:

CHEMTREC

SAD i Kanada ■ Tel: 1-800-424-9300

Izvan SAD-a i Kanade ■ Tel: +1-703-527-3887 (prihvaćaju se pozivi na račun primatelja)

Opća upozorenja

Korisnik uvijek treba obratiti pažnju na sljedeće.

- Koristiti nastavke za pipete s filtrima bez DNAza, RNAza i DNA i pobrinuti se da su pipete kalibrirane prema uputama proizvođača
- Čuvati i odvajati pozitivni materijal (uzorke i pozitivne kontrole) zasebno od svih drugih reagensa i dodavati ih u reakcijsku smjesu u izdvojenoj prostoriji.
- Prije izvođenja postupka potrebno je na sobnoj temperaturi (15-25°C) potpuno otopiti sve sastavnice.
- Otopljene sastavnice promiješati okretanjem svake epruvete 10 puta i kratko centrifugirati.

Napomena: Posebno pažljivo postupajte kako biste spriječili zagađenje PCR-a sintetskim kontrolnim materijalom. Preporučujemo korištenje zasebnih pipeta namijenjenih samo za pripremu reakcijskih smjesa i dodavanje kalupa DNA. Pripremu i pipetiranje reakcijskih smjesa treba provesti u zasebnom području od onog u kojem se dodaje kalup. Rotor-Gene Q epruvete ne smiju se otvarati nakon završetka PCR-a zbog sprečavanja laboratorijskog zagađenja produktima nakon PCR-a.

Napomena: Reagensi su validirani za ručno postavljanje. Ako se koristi automatizirana metoda, to može smanjiti broj mogućih reakcija zbog reagensa potrebnog za popunjavanje "mrtvih volumena" na tim uređajima.

Napomena: Svi reagensi u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitu posebno su formulirani za optimalnu izvedbu. Svi reagensi u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitu namijenjeni su za korištenje isključivo s drugim reagensima iz istog *therascreen* EGFR RGQ PCR kita. Zbog očuvanja optimalne izvedbe, ne smije se zamjenjivati reagente u kitu.

Napomena: Koristiti isključivo *Taq* DNA polimerazu (*Taq*) priloženu u kitu. Ne zamjenjivati *Taq* DNA polimerazom iz drugih kitova iste ili druge vrste, ili *Taq* DNA polimerazom drugih dobavljača.

Napomena: Reagensi za *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit optimalno su razrijeđeni. Ne preporučujemo daljnja razrjeđivanja reagensa jer bi mogla rezultirati gubitkom izvedbe. Ne preporučujemo korištenje reakcijskih volumena manjih od 25 µl jer bi mogli povećati rizik od lažno negativnih rezultata.

Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima

therascreen EGFR RGQ PCR Kit se isporučuje na suhom ledu i prilikom dolaska mora biti zamrznut. Ako *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nije zamrznut prilikom dolaska, vanjsko pakiranje je bilo otvarano za vrijeme prijevoza ili pošiljka ne sadrži napomenu o pakiranju, priručnik ili reagente, molimo kontaktirajte jedan od ureda Tehničke podrške QIAGEN-a ili lokalnog distributera (pogledajte stražnju stranicu ili posjetite www.qiagen.com).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit treba odmah nakon primitka pospremiti na –15 do –25°C na stalnu temperaturu na mjesto zaštićeno od svjetla. Kad se čuva pri navedenim preporučenim uvjetima u originalnom pakiranju, kit je stabilan do roka valjanosti istaknutog na naljepnici. Treba izbjegavati ponavljano odmrzavanje i zamrzavanje. Nemojte premašiti više od 7 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja.

Napomena: Za osiguranje optimalne aktivnosti i izvedbe, *Scorpions* (kao i sve fluorescentno označene molekule) treba zaštititi od svjetla kako bi izbjegli slabljenje njihove fluorescencije.

Napomena: Za osiguranje optimalne iskoristivosti reagensa *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita, uzorke treba analizirati u serijama. Ako se uzorci ispituju pojedinačno, potrošit će se više reagensa i smanjiti ukupan mogući broj određivanja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom.

Čuvanje uzoraka i rukovanje uzorcima

Napomena: Sve uzorke treba tretirati kao moguće zarazni materijal.

Uzorak treba biti ljudska genomska DNA izolirana iz formalinom fiksiranog u parafin uklopljenog tkiva (engl. formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) karcinoma ne malih stanica pluća. Zbog osiguranja kvalitete uzoraka, uzorke treba transportirati u skladu s uobičajenom metodologijom u patologiji.

Uzorci tkiva nisu homogeni i rezultati dobiveni iz uzorka tumora ne moraju se slagati s drugim rezom iz istog tumora. Tumorski uzorci također mogu sadržavati ne-tumorsko tkivo. DNA iz ne-tumorskog tkiva očekivano ne sadrži EGFR mutacije koje detektira *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Postupak

Određivanje razine tumorskih stanica potrebnih za EGFR analizu

Tkivo korišteno za EGFR analizu je formalinom fiksirano u parafin uklopljeno (FFPE) tkivo karcinoma ne malih stanica pluća (NSCLC). DNA ekstrahirana iz stanica tog tumora može, u odnosu na EGFR mutacije, biti divljeg tipa ili može nositi jednu ili više mutacija.

FFPE NSCLC tkivo korišteno za ekstrakciju može također sadržavati normalno, netumorsko tkivo, koje će u odnosu na EGFR mutacije biti divljeg tipa. Divlji tip DNA iz tog tkiva može razrijediti mutiranu DNA, moguće do razine kod koje se više neće moći detektirati kitom. Međutim, preporuča se testiranje čak i uzoraka s niskom razinom tumora jer postoji mogućnost za otkrivanje visoke razine mutacija i donošenja odluke o liječenju bolesnika.

Da biste povećali mogućnosti detekcije mutacija, postupite kako slijedi.

- Hematoksilinom i eozinom (H&E) obojite barem jedan preparat na stakalcu od svakog uzorka bolesnika.
- Pobrinite se da patolog pregleda obojene preparate na prisustvo tumora.
- Ako je moguće, neka patolog pregleda nekoliko preparata iz FFPE bloka.
- Svi uzorci s prisutnim tumorom mogu biti ispitani *therascreen* EGFR RGQ PCR kitom.

Izolacija DNA

Izolaciju DNA treba provesti koristeći QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, kat. br. 56404).

Provedite pročišćavanje DNA prema uputama u priručniku za *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* uz sljedeće izmjene.

- Sakupite FFPE rezove na stakalcima.
- Sastružite suvišak parafina koji okružuje rez tkiva koristeći novi, sterilni skalpel.
- Sastružite rezove tkiva u epruvete za mikrocentrifugiranje koristeći novi skalpel za svaki uzorak koji treba ekstrahirati.
- Digestiju proteinazom K treba provesti u trajanju od 1 sata.
- Pročišćenu genomsku DNA treba eluirati u 200 µl ATE pufera (sastavni dio QIAamp DNA FFPE Tissue Kita).
- Pročišćenu genomsku DNA treba čuvati na –15 do –25 °C

- Gdje je dostupna informacija, treba koristiti rezove susjedne H&E obojenim rezovima s najviše sadržaja tumora.

Napomena: Sva određivanja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom stvaraju kratke PCR produkte. Međutim, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit neće raditi s jako fragmentiranom DNA.

Protokol: Procjena uzorka

Ovaj se protokol koristi za procjenu ukupne DNA za umnožavanje u uzorcima.

Važne pojedinosti prije početka rada

- Prije početka postupka pročitajte "Opća upozorenja", stranica 10.
- Prije početka postupka polako se upoznajte s uređajem Rotor-Gene Q. Pogledajte korisnički priručnik uređaja.
- Nemojte vrtložiti *Taq* DNA polimerazu (*Taq*) ili bilo koju smjesu koja sadrži *Taq* DNA polimerazu, jer bi to moglo inaktivirati enzim.
- Pipetirajte *Taq* DNA polimerazu (*Taq*) uranjanjem nastavka za pipetiranje odmah ispod površine tekućine da biste izbjegli oblaganje nastavka suviškom enzima.

Što učiniti prije početka rada

- Prije svake uporabe potpuno otopite sve reagense tijekom najmanje jednog sata na sobnoj temperaturi (15–25°C), promiješajte preokretanjem 10 puta i kratko centrifugirajte da biste spustili sadržaj na dno epruvete.
- Prije svake upotrebe provjerite da li je *Taq* DNA polimeraza (*Taq*) na sobnoj temperaturi (15–25°C). Kratko centrifugirajte epruvetu da biste sakupili enzim na dnu epruvete.

Postupak

1. **Otopite smjesu za kontrolne reakcije (Ctrl), vodu bez nukleaza za kontrolu bez predloška (NTC) i EGFR pozitivnu kontrolu (PC) na sobnoj temperaturi (15–25°C). Kad su se reagensi otopili, promiješajte ih okretanjem svake epruvete 10 puta zbog izbjegavanja lokaliziranog koncentriranja soli i zatim kratko centrifugirajte da biste sakupili sadržaj na dnu epruvete.**
2. **Pripremite dovoljno smjese master mikseva za uzorke DNA, jednu reakciju pozitivne kontrole i jednu reakciju za kontrolu bez predloška prema volumenima danim u Tablici 1. Uključite reagense za jedan dodatni uzorak osiguravajući suvišak za postupak pripreme PCR-a.**

Smjesa master miks sadrži sve sastavnice potrebne za PCR osim uzorka.

Tablica 1. Priprema smjese master mix kontrolnog određivanja*

Sastavnica	Volumen/reakcija (μl)
Smjesa za kontrolne reakcije (Ctrl)	19.5
<i>Taq</i> DNA polimeraza (<i>Taq</i>)	0.5
Ukupni volumen	20.0

* Kada pripremate master mix, pripremite dovoljno za jedan uzorak u suvišku.

- 3. Dobro promiješajte smjesu master miks pipetirajući gore-dolje 10 puta. Postavite odgovarajući broj epruveta u nizu u blok za unos prema rasporedu na Slici 1. Odmah dodajte 20 μl smjese master miks u svaku PCR epruvetu (nisu priložene).**
Napomena: Za procjenu uzorka treba dodati smjesu za kontrolno određivanje u jednu jažicu pozitivne kontrole, jednu jažicu negativne kontrole i jednu jažicu za svaki uzorak.
- 4. Odmah dodajte 5 μl vode bez nukleaza (H₂O) za kontrolu bez predloška u epruvetu za kontrolu bez kalupa (PCR epruveta broj 9) i začepite epruvetu. Dodajte 5 μl svakog uzorka u epruvete za uzorke i začepite epruvete. Dodajte 5 μl EGFR pozitivne kontrole (PC) u epruvetu za pozitivnu kontrolu (PCR epruveta broj 1) i začepite epruvetu.**
- 5. Postavite PCR epruvete u nizu u odgovarajuća mjesta na rotoru i pregledajte da li sve epruvete sadrže jednaki volumen.**
Napomena: Pobrinite se da nizovi epruveta nisu krivo orijentirani prilikom prijenosa u rotor.
- 6. Ako rotor nije potpuno popunjen, sva prazna mjesta na rotoru treba popuniti začepljenim praznim epruvetama.**
- 7. Odmah postavite rotor sa 72 jažice u uređaj Rotor-Gene Q 5plex HRM. Provjerite da li je sigurnosni prsten (pribor uz uređaj Rotor-Gene Q) postavljen na vrh rotora zbog osiguranja epruveta za vrijeme rada.**
- 8. Da biste kreirali profil temperature, pogledajte "Protokol: Postavke za Rotor-Gene Q EGFR", stranica 21 i pokrenite postupak.**

Tablica 2. Parametri ciklusa

Ciklus i	Temperatura	Vrijeme	Prikupljanje podataka
1	95°C	15 minuta	Nema
40	95°C	30 sekundi	Nema
	60°C	60 sekundi	Zeleno i žuto

- 9. Nakon završetka rada, analizirajte podatke prema postupku “Analiziranje podataka procjene uzorka”, stranica 30.**

Protokol: Detekcija EGFR mutacija

Ovaj je protokol za detekciju mutacija EGFR-a. Kad je uzorak prošao procjenu, može se pristupiti analiziranju mutacija EGFR-a.

Važne pojedinosti prije početka rada

- Prije početka postupka pročitajte "Opća upozorenja", stranica 10.
- Prije početka postupka polako se upoznajte s uređajem Rotor-Gene Q. Pogledajte korisnički priručnik uređaja.
- Nemojte vrtložiti *Taq* DNA polimerazu (*Taq*) ili bilo koju smjesu koja sadrži *Taq* DNA polimerazu, jer bi to moglo inaktivirati enzim.
- Za učinkovito korištenje *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita, uzorci trebaju biti grupirani u serije od 7 za popunjavanje rotora sa 72 jažice. Manje veličine serija značiti će da s *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom može biti ispitano manje uzoraka.
- Pipetirajte *Taq* DNA polimerazu (*Taq*) uranjanjem nastavka za pipetiranje odmah ispod površine tekućine da biste izbjegli oblaganje nastavka suviškom enzima.
- Za svaki uzorak DNA treba analizirati kontrolu i mutirani uzorak u istom postupku PCR-a zbog izbjegavanja odstupanja između serija.

Što učiniti prije početka rada

- Prije svake uporabe, potpuno otopite sve reagense na sobnoj temperaturi (15–25°C), promiješajte preokretanjem 10 puta i kratko centrifugirajte da biste spustili sadržaj na dno epruvete.
- Prije svake upotrebe provjerite da li je *Taq* na sobnoj temperaturi (15–25°C). Kratko centrifugirajte epruvetu da biste sakupili enzim na dnu epruvete.

Postupak

1. Otopite smjesu za kontrolne reakcije (Ctrl), vodu bez nukleaza za kontrolu bez predloška (NTC) i EGFR pozitivnu kontrolu (PC) na sobnoj temperaturi (15–25°C). Kad su se reagensi otopili, promiješajte ih okretanjem svake epruvete 10 puta zbog izbjegavanja lokaliziranog koncentriranja soli i zatim kratko centrifugirajte da biste sakupili sadržaj na dnu epruvete.
2. Pripremite dovoljno smjese master mikseva za uzorke DNA, jednu reakciju pozitivne kontrole i jednu reakciju za kontrolu bez predloška prema volumenima danim u Tablici 3. Uključite reagense

za jedan dodatni uzorak osiguravajući suvišak za postupak pripreme PCR-a.

Smjesa master miks sadrži sve sastavnice potrebne za PCR osim uzorka.

Tablica 3. Priprema smjesa master mix*

Sastavnica	Volumen/reakcija (μl)
Reakcijska smjesa	19.5
<i>Taq</i> DNA polimeraza (<i>Taq</i>)	0.5
Ukupni volumen	20.0

* Kada pripremate master mix, pripremite dovoljno za jedan uzorak u suvišku.

3. Dobro promiješajte smjese pažljivo pipetirajući gore-dolje 10 puta. Odmah dodajte 20 μl smjese master miks u svaku PCR epruvetu (nisu priložene).
4. Odmah dodajte 5 μl vode bez nukleaza (H₂O) za kontrolu bez predloška u epruvete za kontrolu bez predloška (PCR epruvete brojeva 9-16) i začepite epruvete. Dodajte 5 μl svakog uzorka u epruvete za uzorke (PCR epruvete brojeva 17-72) i začepite epruvete. Dodajte 5 μl EGFR pozitivne kontrole (PC) u epruvete za pozitivne kontrole (PCR epruvete brojeva 1-8) i začepite epruvete. Svaki uzorak DNA treba ispitati uz kontrolu i sva određivanja mutacija. Raspored je prikazan u Tablici 4.

Tablica 4. Raspored kontrola i određivanja mutacija

Određivanje	Kontrole		Broj uzorka						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Delecije	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insercije	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. Postavite PCR epruvete u nizu u odgovarajuća mjesta na rotoru i pregledajte da li sve epruvete sadrže jednaki volumen.
Napomena: Pobrinite se da nizovi epruveta nisu krivo orijentirani prilikom prijenosa u rotor.
6. Ako rotor nije potpuno popunjen, sva prazna mjesta na rotoru treba popuniti začepljenim praznim epruvetama.
7. Odmah postavite rotor u uređaj Rotor-Gene Q 5plex HRM. Provjerite da li je prsten za zaključavanje (pribor uz uređaj Rotor-Gene Q) postavljen na vrh rotora zbog osiguranja epruveta za vrijeme rada.
8. Da biste kreirali profil temperature, pogledajte "Protokol: Postavke za Rotor-Gene Q EGFR", stranica 21 i pokrenite postupak.

Tablica 5. Parametri ciklusa

Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Prikupljanje podataka
1	95°C	15 minuta	Nema
40	95°C	30 sekundi	Nema
	60°C	60 sekundi	Zeleno i žuto

9. Nakon završetka rada, analizirajte podatke prema postupku "Analiziranje podataka EGFR mutacija", stranica 34.

Protokol: Postavke za Rotor-Gene Q EGFR

Na ovaj se protokol poziva unutar odjeljaka "Protokol: Procjena uzorka", stranica 15, i "Protokol: Detekcija EGFR mutacija", stranica 18.

Postupak

1. Kreirajte profil temperature prema sljedećim koracima.

Postavljanje općih postavki određivanja	Slike 1–3
Početna aktivacija enzima hot-start	Slika 4
Umnožavanje DNA	Slike 5–7
Prilagođavanje kanala fluorescencije	Slike 8–12
Početak analize	Slika 13

Sažeto, postavke ciklusa su sljedeće.

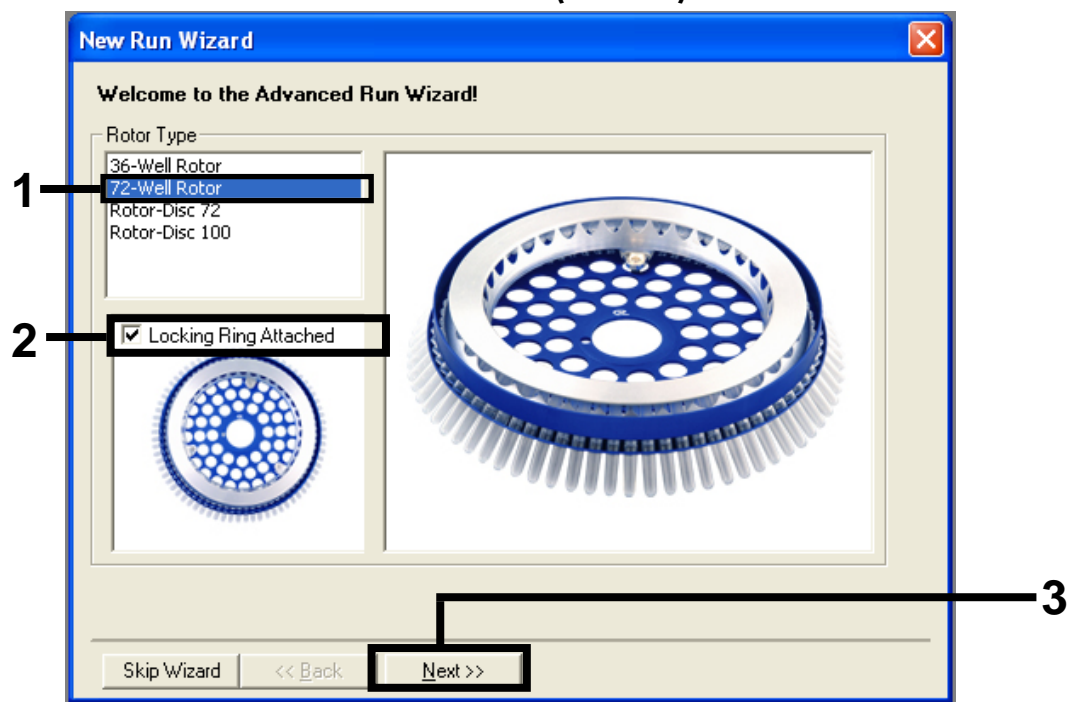
Tablica 6. Parametri ciklusa

Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Prikupljanje podataka
1	95°C	15 minuta	Nema
40	95°C	30 sekundi	Nema
	60°C	60 sekundi	Zeleno i žuto

Sve se specifikacije odnose na Rotor-Gene Q program verzije 2.0.2. Molimo potražite dodatne informacije o programiranju uređaja Rotor Gene Q u korisničkom priručniku uređaja. Na slikovnim prikazima ove su informacije crno uokvirene i podebljane.

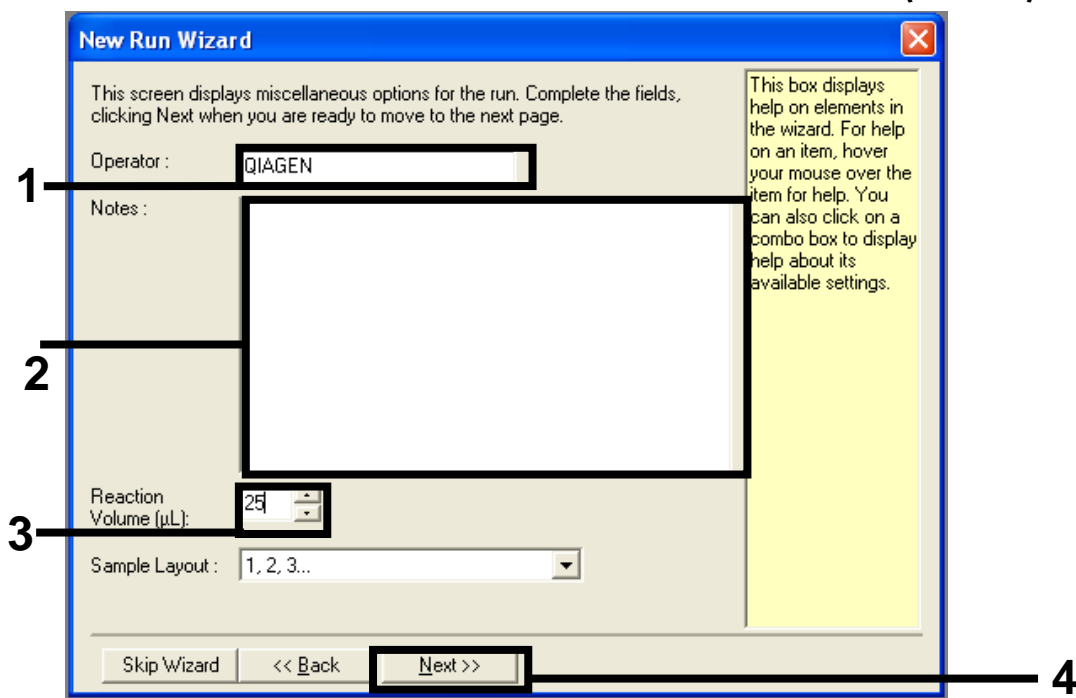
- Dva puta kliknite na ikonu programa Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 na radnoj površini prijenosnog računala povezanog s uređajem Rotor-Gene Q 5plex HRM. Odaberite karticu "Advanced" u prozoru dijaloga "New Run" koji se pojavljuje.**
- Da biste kreirali novi predložak, odaberite "Empty Run" i zatim odaberite "New" da biste ušli u "New Run Wizard".**

4. Odaberite vrstu rotora sa 72 jažice (72-Well Rotor). Potvrdite da li je sigurnosni prsten pričvršćen i označite polje "Locking Ring Attached". Odaberite "Next" (Slika 1).



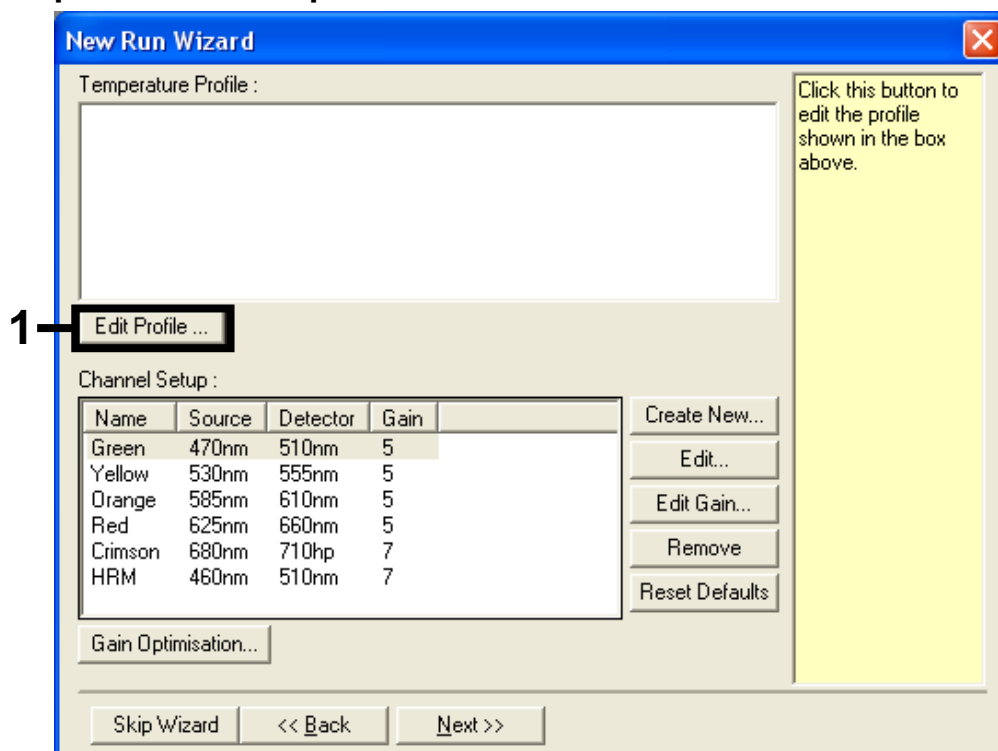
Slika 1. Prozor dijaloga "New Run Wizard".

5. Unesite ime operatera. Dodajte bilo koju napomenu i provjerite da li je reakcijski volumen postavljen na 25, a u polju "Sample Layout" treba biti navedeno "1, 2, 3...". Odaberite "Next" (Slika 2).



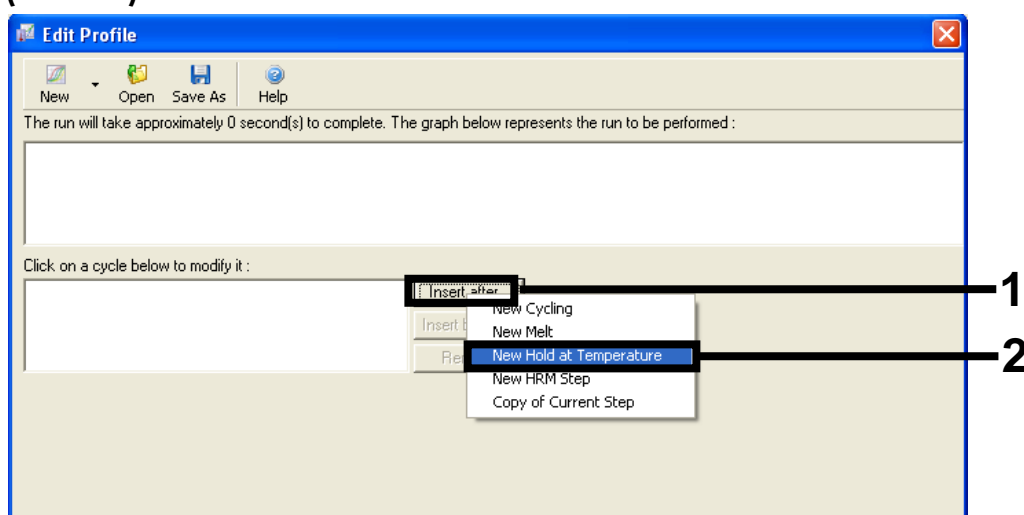
Slika 2. Postavljanje općih postavki analize.

6. Odaberite tipku “Edit Profile” u prozoru dijaloga “New Run Wizard” (Slika 3) i programirajte profil temperature prema informacijama prikazanim u sljedećim koracima.



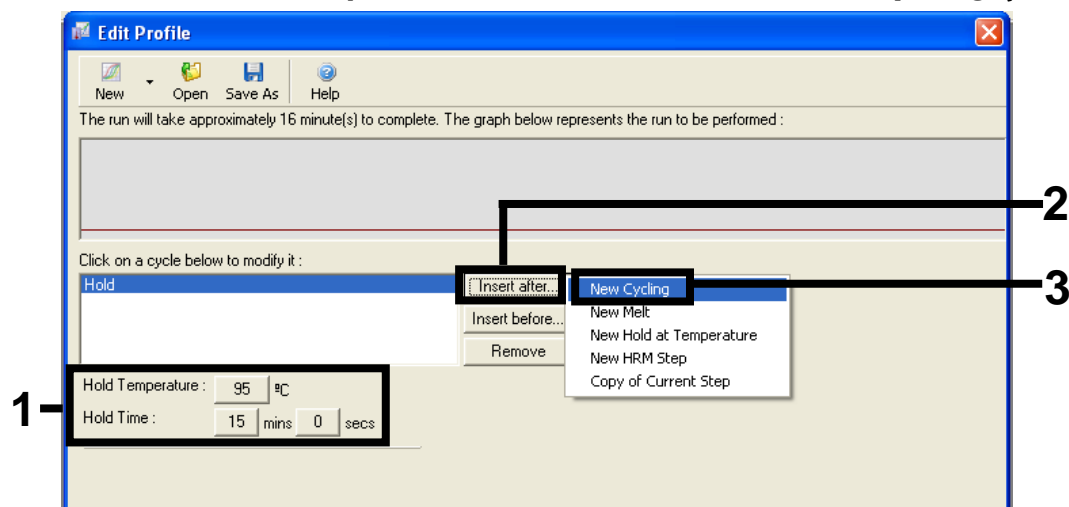
Slika 3. Uređivanje profila.

7. Odaberite tipku “Insert after” te odaberite *New Hold at Temperature* (Slika 4).



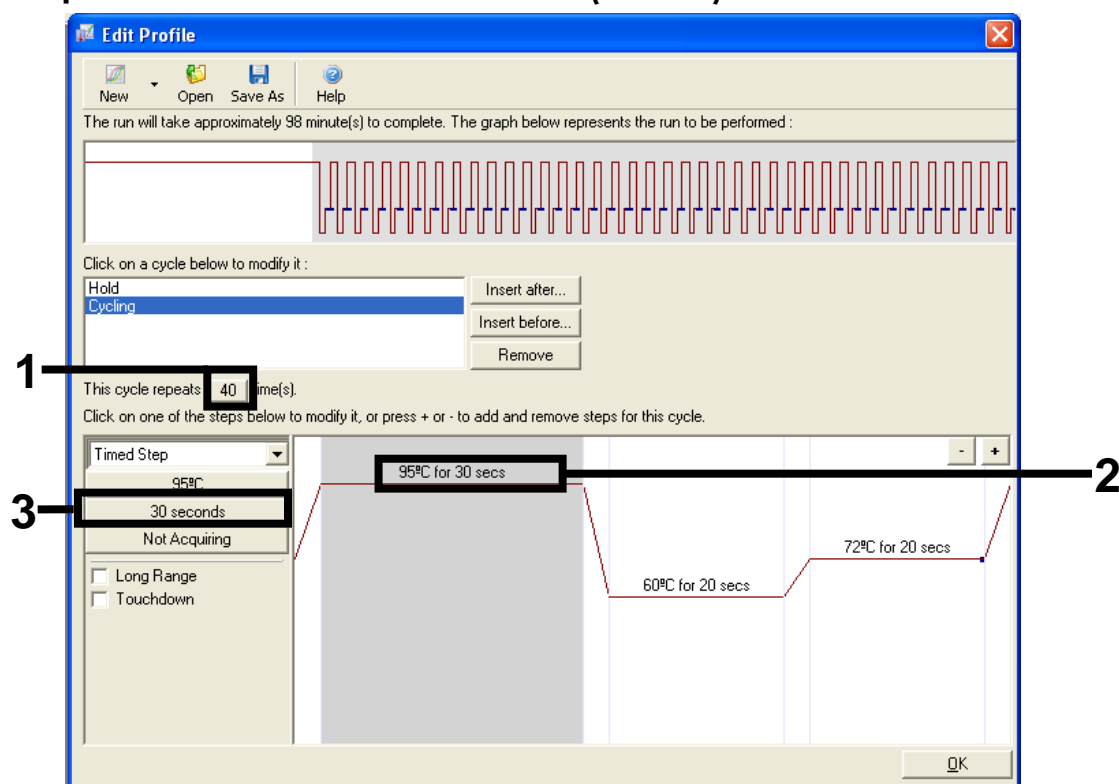
Slika 4. Korak početne inkubacije na 95°C.

8. Promijenite "Hold Temperature" na 95°C i "Hold Time" na 15 mins 0 secs. Odaberite tipku "Insert After" a zatim New Cycling (Slika 5).



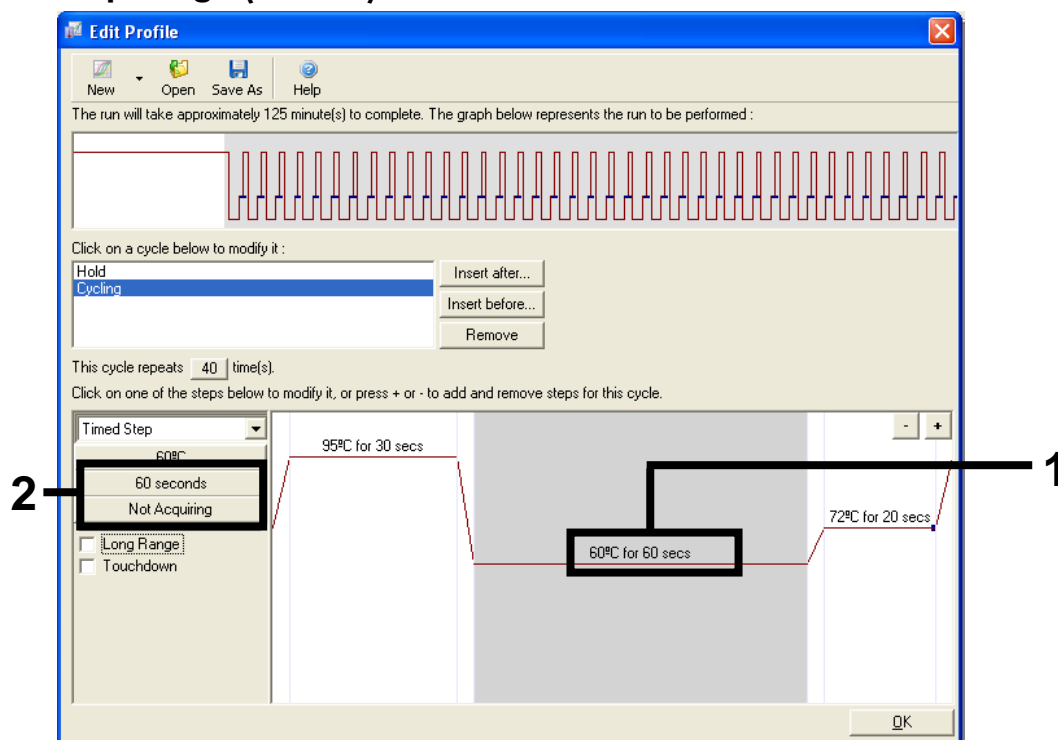
Slika 5. Korak početne inkubacije na 95°C.

9. Promijenite broj ponavljanja ciklusa u 40. Odaberite prvi korak i postavite na "95°C for 30 secs" (Slika 6).



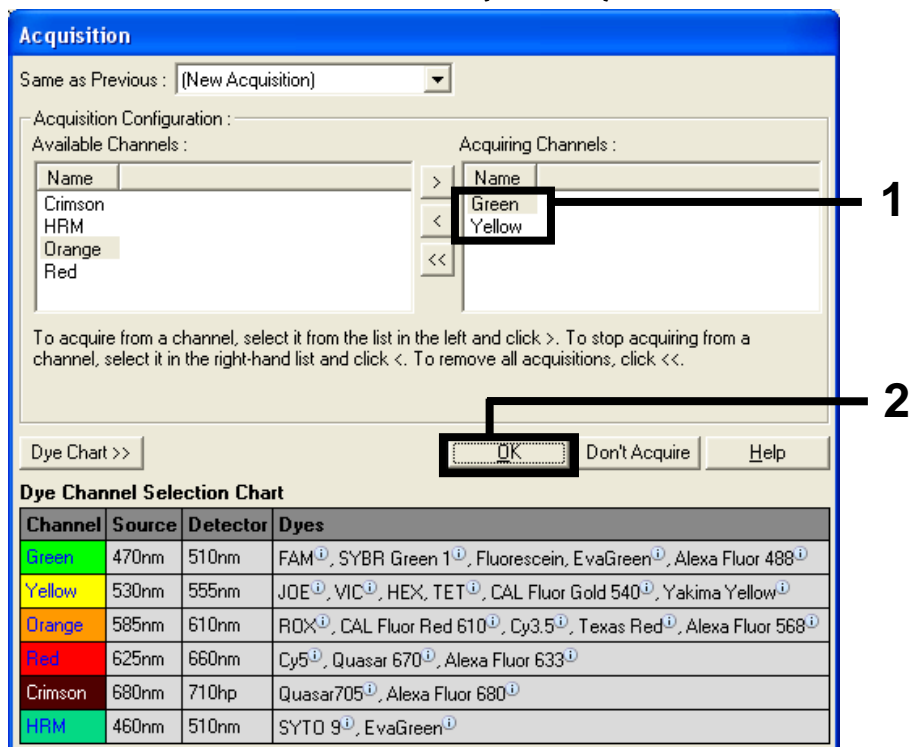
Slika 6. Korak ciklusa na 95°C.

10. Označite drugi korak i postavite na "60°C for 60 secs". Za vrijeme ovog koraka omogućite prihvaćanje podataka odabirom tipke "Not Acquiring" (Slika 7).



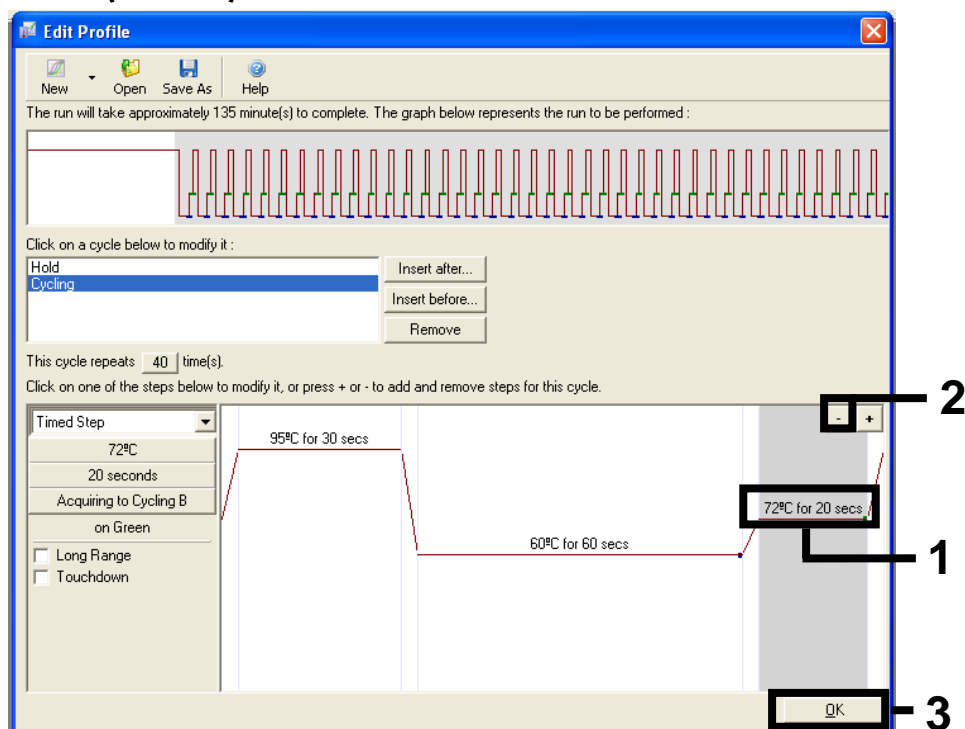
Slika 7. Korak ciklusa na 60°C.

11. Postavite "Green" i "Yellow" za kanale prihvatanja odabirom tipke ">" za njihovo prenošenje iz liste raspoloživih kanala "Available Channels". Odaberite "OK" (Slika 8).



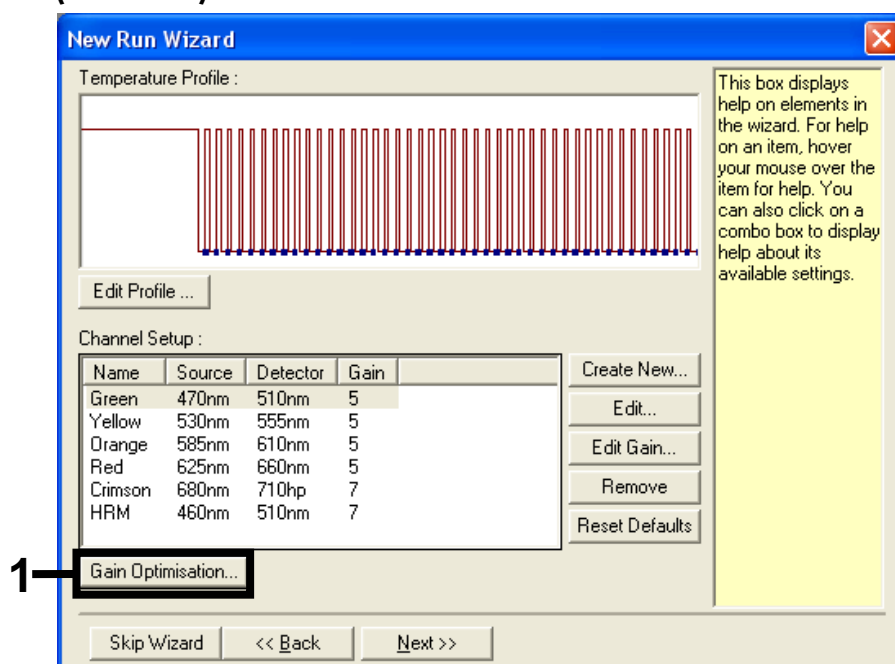
Slika 8. Prihvatanje u koraku ciklusa na 60°C.

12. Označite treći korak i obrišite ga odabirom tipke "-". Odaberite "OK" (Slika 9).



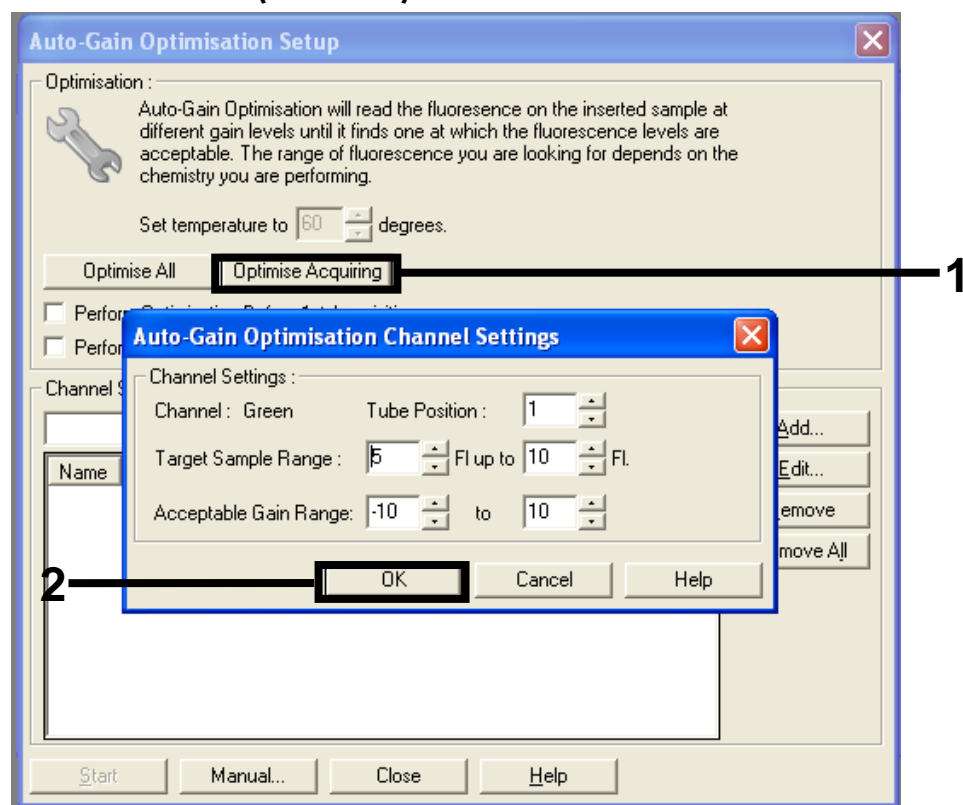
Slika 9. Uklanjanje koraka produljivanja.

13. U sljedećem prozoru dijaloga odaberite tipku “Gain Optimisation” (Slika 10).



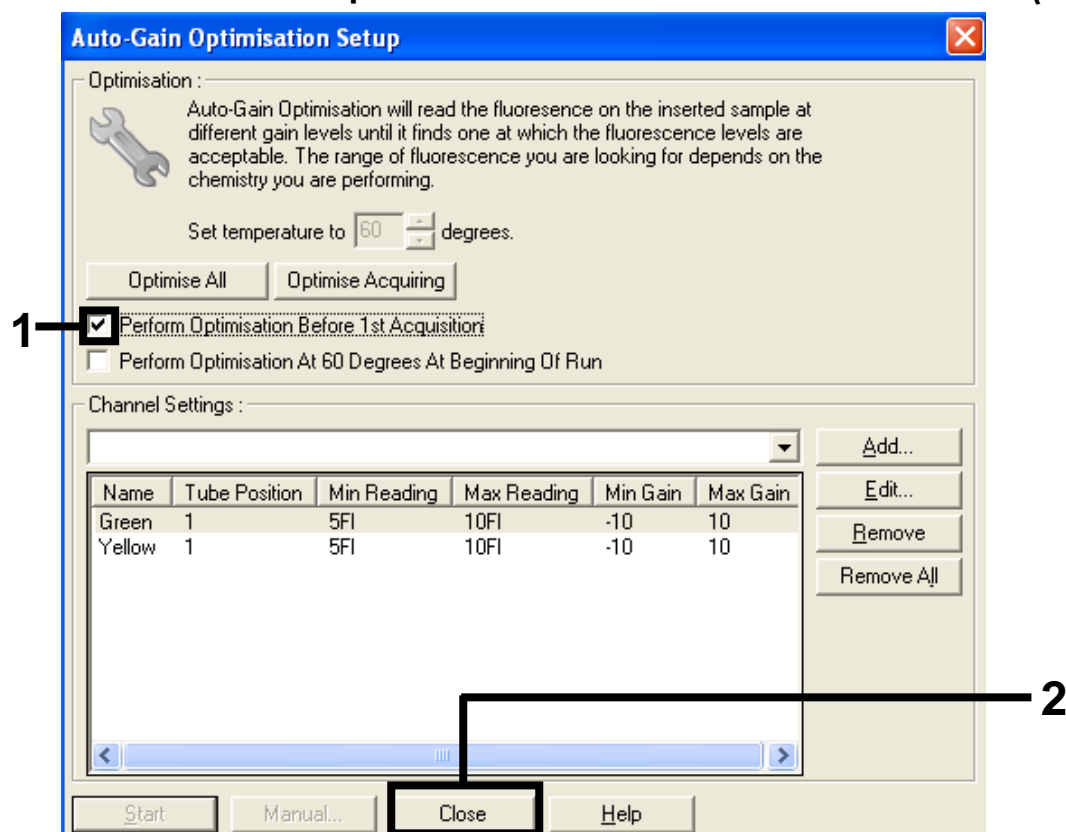
Slika 10. Postizanje optimizacije (Gain optimisation).

14. Odaberite tipku “Optimise Acquiring”. Za svaki su kanal prikazane postavke. Prihvatite ove dodijeljene vrijednosti odabirom tipke “OK” za oba kanala (Slika 11).



Slika 11. Automatsko postizanje optimizacije za zeleni kanal.

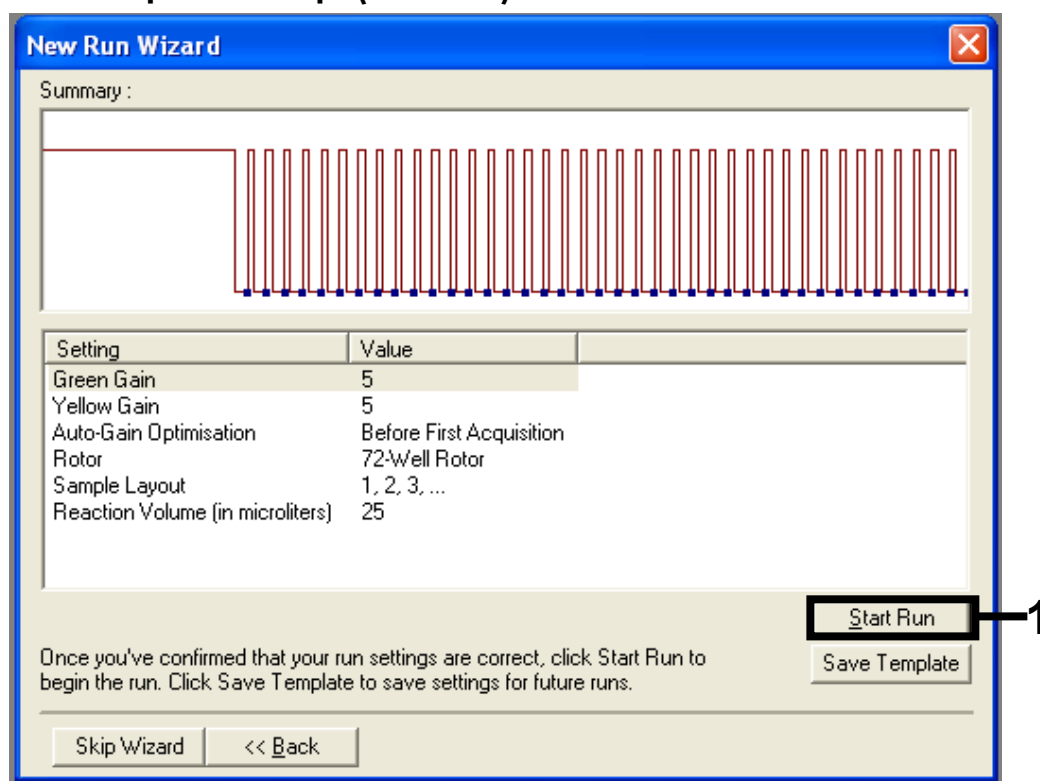
15. Odaberite kućicu "Perform Optimisation before 1st Acquisition" a zatim odaberite tipku "Close" da biste se vratili u izbornik (Slika 12).



Slika 12. Odabir zelenog i žutog kanala.

16. Odaberite "Next" da biste spremili predložak na odgovarajuće mjesto odabirom "Save Template".

17. Provjerite sažetak i odaberite “Start Run” da biste spremili podatke o analizi i pokrenuli je (Slika 13).



Slika 13. Pokretanje analize.

18. Nakon pokretanja analize, pojavljuje se novi prozor u koji možete unijeti imena uzoraka ili odabrati “Finish” i unijeti ih kasnije odabirom tipke “Sample” za vrijeme rada ili nakon završetka analize.

19. Nakon završetka rada, analizirajte podatke prema odgovarajućem protokolu:

- Za procjenu uzorka pogledajte “Sample assessment data analysis”, stranica 30.
- Za analizu mutacija pogledajte “EGFR mutation data analysis”, stranica 34.

Interpretacija rezultata

ΔC_T metoda analize

Scorpions određivanja u stvarnom vremenu koriste broj PCR ciklusa koji je potreban za detekciju fluorescentnog signala iznad signala pozadine kao mjera prisustva ciljne molekule s početka reakcije. Točka u kojoj se detektira signal iznad fluorescencije pozadine zove se granica prihvatanja ciklusa (C_T).

ΔC_T vrijednosti uzorka računaju se kao razlika između C_T određivanja mutacije i C_T kontrolnog određivanja za isti uzorak:

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutacije} - C_T \text{ kontrole}$$

Napomena: Uzorci se razvrstavaju kao pozitivni na mutaciju ako daju ΔC_T manji od granične vrijednosti ΔC_T za dotično određivanje. Iznad te vrijednosti, uzorci mogu ili sadržavati manji postotak mutacije koji se ne može detektirati kitom (ispod granice određivanja), ili je uzorak negativan na mutacije.

Napomena: C_T vrijednost mutacija od 40 ili iznad će biti razvrstana kao negativna ili izvan granica kita.

Kada se koriste ARMS početnice, može se pojaviti neučinkovito započinjanje koje će dati vrlo kasni C_T pozadine za DNA koja ne sadrži mutaciju. Sve vrijednosti ΔC_T izračunate iz umnožavanja pozadine bit će veće od granične vrijednosti ΔC_T i uzorak će biti razvrstan kao negativan na mutacije.

Analiziranje podataka procjene uzorka

Kad je određivanje završeno, analizirajte podatke prema sljedećem postupku.

Postavke programa za analiziranje

1. Otvorite odgovarajući zapis koristeći program Rotor-Gene Q series (verzije 2.0.2 ili više).
2. Provjerite da li su uzorci označeni.
3. Kad ste na početnoj stranici kanala za svaki detektor/kanal, odaberite "Options" i unesite *Crop start cycles*. Na stranici s "Remove data before cycle", unesite 15 i odaberite "OK".
4. Odaberite "Analysis". Na stranici za analiziranje odaberite "Cycling A, (od 15). Yellow" da biste pogledali kanal HEX.
5. Treba biti označeno "dynamic tube". Odaberite "Slope correct" i "Linear scale".
6. Postavite granicu (threshold) na 0.02 i provjerite HEX C_T vrijednosti.
7. Na stranici za analiziranje odaberite "Cycling A (od 15), Green" da biste pogledali kanal FAM.

8. Treba biti označeno "dynamic tube". Odaberite "Slope correct" i "Linear scale".
9. Postavite granicu (treshold) na 0.075 i provjerite FAM C_T vrijednosti.

Kad je određivanje završeno, analizirajte podatke kako slijedi.

- **Negativna kontrola:** Da biste bili sigurni da nema zagađenja predloška, NTC ne smije stvoriti C_T vrijednost na zelenom kanalu ispod 40. Za važne informacije o analizi dijagrama kontrole bez predloška (NTC), pogledajte "Napomene za interpretaciju podataka" na stranici 40. Da biste bili sigurni da je analiza ispravno postavljena, NTC mora pokazati umnožavanje u rasponu od 31–37 na žutom (HEX) kanalu. Ako je pozitivno umnožavanje prisutno na zelenom kanalu/ili je umnožavanje izvan raspona 31-37 za žuti signal, rezultate uzorka treba odbaciti.
- **Pozitivna kontrola:** EGFR pozitivna kontrola (PC) mora dati kontrolno određivanje C_T (FAM kanal) od 26.26–30.95. Određivanje s vrijednosti C_T izvan ovog raspona ukazuje na problem te je stoga serija određivanja neispravna. Ako je određivanje C_T pozitivne kontrole 26.26–30.95 (ekson 2, FAM) ali C_T (HEX) unutarnje kontrole izvan raspona 31-37, nastavite s analizom.

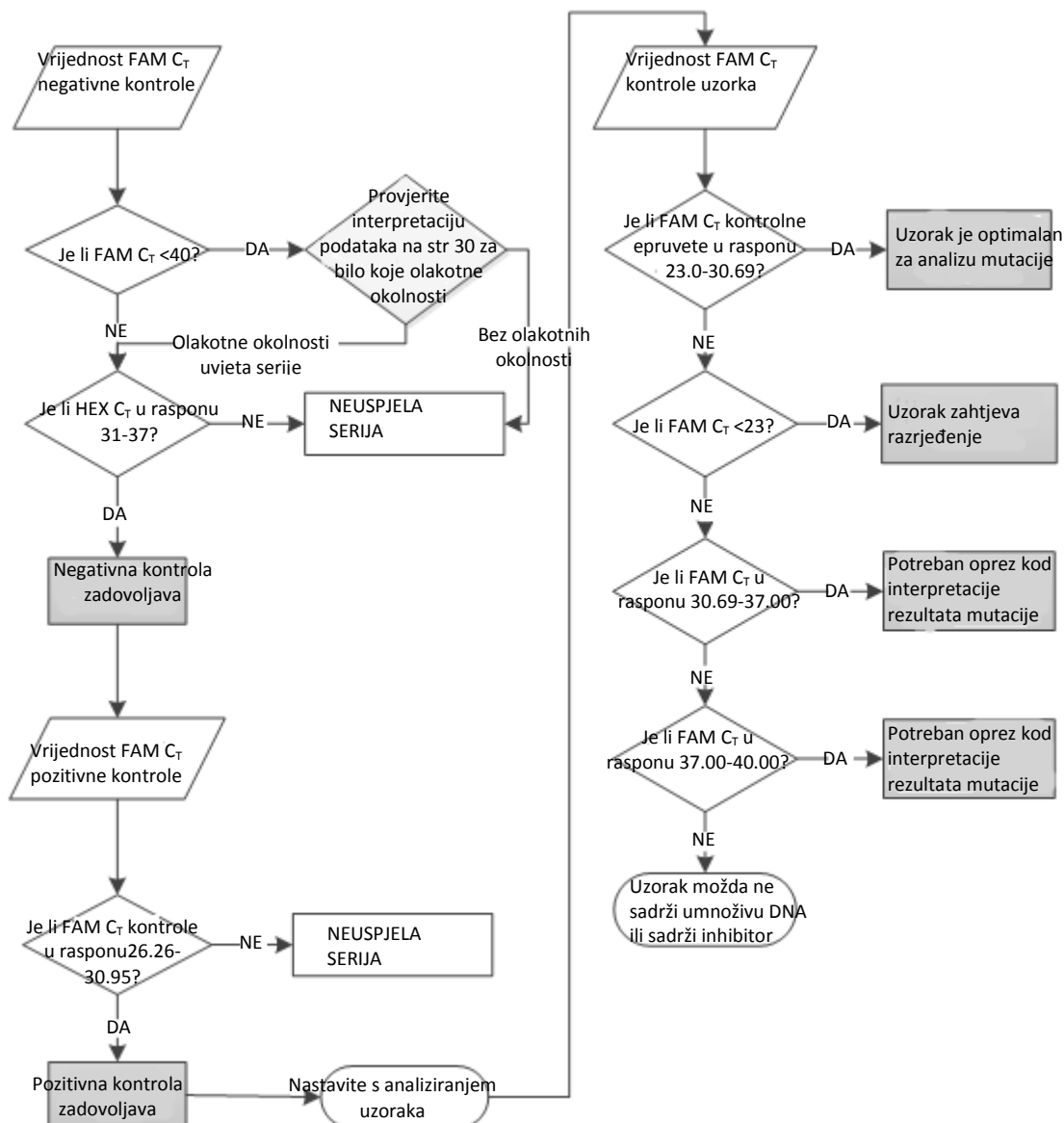
Napomena: Podaci o uzorcima se ne smiju koristiti ako je bilo koje od ova dva kontrolna određivanja neispravno.

Ako su obje kontrole određivanja ispravne, svaka vrijednost C_T uzorka mora biti unutar raspona 23–30.69 zelenog (FAM) kanala. Ako je uzorak izvan tog raspona, na raspolaganju je sljedeća preporuka.

- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću $C_T < 23$:** Uzorci s kontrolom $C_T < 23$ će preopteretiti određivanje mutacija i moraju se razrijediti. Da biste odredili svaku mutaciju na donjoj granici, prekoncentrirani uzorci se moraju razrijediti kako bi upali unutar gornjeg raspona jer će dvostruko razrjeđivanje povećati C_T za 1.
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću C_T 30.69–37:** Interpretirajte s oprezom jer vrlo niske razine mutacija možda neće biti detektirane.
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću C_T 37–40:** Interpretirajte s oprezom jer vrlo visoke razine mutacija možda neće biti detektirane.
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću $C_T > 40$:** Uzorak ne sadržava dovoljno DNA za dozvoljavanje analize.

Napomena: Ako uzorak ne generira C_T (npr., $C_T > 40$), to može biti zbog prisustva inhibitora, pogreške u postavljanju određivanja, ili nema EGFR DNA za umnožavanje.

- **Vrijednost C_T unutarnje kontrole 31–37:** Nema EGFR DNA za umnožavanje.
- **Vrijednost C_T unutarnje kontrole nije unutar raspona 31–37:** Ovo može ukazivati na pogreške u postavljanju određivanja ili prisustvo inhibitora. Moguće je smanjiti utjecaj inhibitora razrjeđujući uzorak, iako će to također razrijediti DNA.



Slika 14. Dijagram analiziranja procjene uzorka.

Analiziranje podataka EGFR mutacija

Kad je određivanje završeno, analizirajte podatke prema sljedećem postupku.

Postavke programa za analiziranje

1. Otvorite odgovarajući zapis koristeći program Rotor-Gene Q series (verzije 2.0.2 ili više).
2. Provjerite da li su uzorci označeni.
3. Kad ste na početnoj stranici kanala za svaki detektor/kanal, odaberite "Options" i unesite *Crop start cycles*. Na stranici s "Remove data before cycle", unesite 15 i odaberite "OK".
4. Odaberite "Analysis". Na stranici za analiziranje odaberite "Cycling A, (od 15). Yellow" da biste pogledali kanal HEX.
5. Treba biti označeno "dynamic tube". Odaberite "Slope correct" i "Linear scale".
6. Postavite granicu (threshold) na 0.02 i provjerite HEX C_T vrijednosti.
7. Na stranici za analiziranje odaberite "Cycling A (od 15), Green" da biste pogledali kanal FAM.
8. Treba biti označeno "dynamic tube". Odaberite "Slope correct" i "Linear scale".
9. Postavite granicu (threshold) na 0.075 i provjerite FAM C_T vrijednosti.

Analiziranje kontrola serije:

Pogledajte dijagram "Analiziranje kontrola određivanja" na Slici 15.

- **Negativna kontrola:** Da biste bili sigurni da nema zagađenja predloška, NTC ne smije stvoriti C_T vrijednost na zelenom kanalu ispod 40. Za važne informacije o analizi dijagrama kontrole bez predloška (NTC), pogledajte "Napomene za interpretaciju podataka" na stranici 40. Da biste bili sigurni da je analiza ispravno postavljena, NTC mora pokazati umnožavanje u rasponu od 31–37 na žutom (HEX) kanalu. Ako je pozitivno umnožavanje prisutno na zelenom kanalu/ili je umnožavanje izvan raspona 31-37 za žuti signal, rezultate uzorka treba odbaciti.
- **Pozitivna kontrola:** EGFR pozitivna kontrola (PC) mora dati kontrolno određivanje C_T (FAM kanal) od 26.26–30.95. Određivanje s vrijednosti C_T izvan ovog raspona ukazuje na problem te je stoga serija određivanja neispravna. Ako je određivanje C_T pozitivne kontrole 26.26–30.95 (ekson 2, FAM) ali C_T (HEX) unutarnje kontrole izvan raspona 31-37, nastavite s analizom.

Izračunajte vrijednost ΔC_T za svako određivanje mutacije kako slijedi, osiguravajući da su vrijednosti C_T za mutaciju i kontrolu potekle od pozitivne kontrole.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutacije} - C_T \text{ kontrole}$$

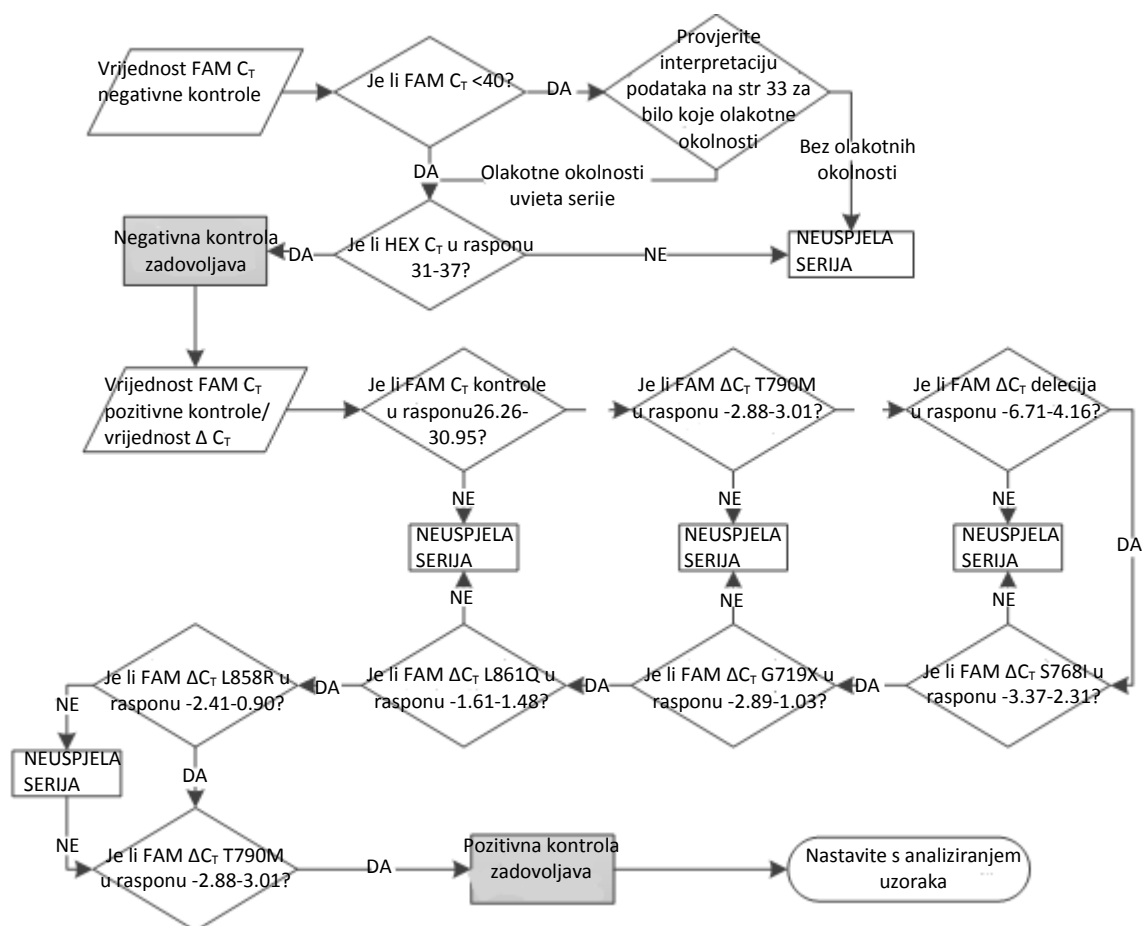
Vrijednosti ΔC_T pozitivne kontrole EGFR-a (PC) trebaju biti unutar vrijednosti navedenih u Tablici 7.

Tablica 7. Očekivane vrijednosti ΔC_T pozitivne kontrole*

Određivanje	ΔC_T vrijednost pozitivne kontrole
T790M	-2.88 to 3.01
Deletions	-6.71 to 4.16
L858R	-2.41 to 0.90
L861Q	-4.61 to 1.48
G719X	-2.89 to 1.03
S768I	-3.37 to 2.31
Insertions	-2.93 to 1.28

* Rotor-Gene Q program (2.0.2)

Napomena: Ne smiju se koristiti podaci za uzorke ukoliko nisu uspjela određivanja bilo negativne bilo pozitivne kontrole.



Analiziranje uzoraka:

Vrijednost FAM C_T kontrole uzorka

U slučaju da su oba kontrolna određivanja ispravna, svaka C_T vrijednost uzorka mora biti unutar raspona od 23–30.69 na zelenom kanalu. Pogledajte “Analiziranje mutacija” na Slici 16.

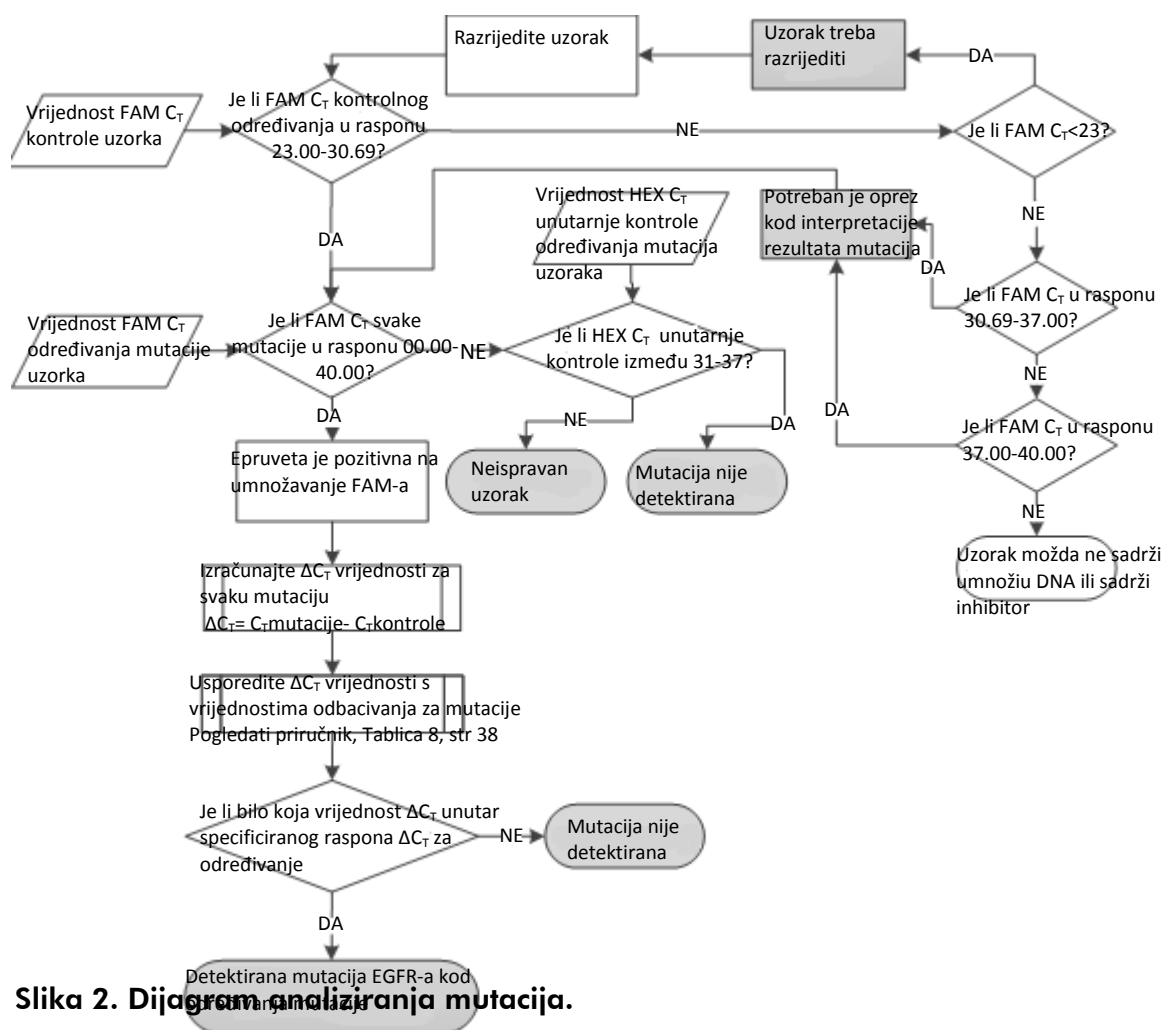
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću C_T <23:** Uzorci s kontrolom C_T <23 će preopteretiti određivanje mutacije i moraju se razrijediti. Da biste odredili svaku mutaciju na donjoj granici, prekoncentrirani uzorci se moraju razrijediti kako bi upali unutar gornjeg raspona jer će dvostruko razrjeđivanje povećati C_T za 1.
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću C_T u rasponu 30.69–37:** Interpretirajte s oprezom jer vrlo niske razine mutacija možda neće biti detektirane.
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću C_T u rasponu 37–40:** Interpretirajte s oprezom jer vrlo visoke razine mutacija možda neće biti detektirane.
- **Određivanje kontrole uzorka s vrijednošću C_T >40:** Uzorak ne sadržava dovoljno DNA za dozvoljavanje analize.

Napomena: Ako je vrijednost FAM C_T između 23 and <37, nema potrebe za vrednovanjem unutarnje kontrole.

Napomena: Ako uzorak ne generira C_T (npr., C_T >40), to može biti zbog prisustva inhibitora, pogreške u postavljanju određivanja, ili nema EGFR DNA za umnožavanje

- **Vrijednost C_T unutarnje kontrole 31–37:** Određivanje ispravno funkcionira, ali nema EGFR DNA za umnožavanje.
- **Vrijednost C_T unutarnje kontrole nije unutar raspona 31–37:** Ovo može ukazivati na pogreške u postavljanju određivanja ili prisustva inhibitora. Moguće je smanjiti utjecaj inhibitora razrjeđujući uzorak, iako će to također razrijediti DNA.

Napomena: Ako kod određivanja mutacije reakcija FAM-a ne stvori vrijednost C_T i reakcija unutarnje kontrole stvori vrijednost C_T izvan raspona 31–37, podatke treba odbaciti zbog mogućeg prisustva inhibitora koji mogu navesti na lažno negativne rezultate. Razrjeđivanje uzorka može umanjiti učinak inhibitora ali treba napomenuti da će to također razrijediti DNA.



Vrijednost FAM C_T određivanja mutacija uzorka

Vrijednosti FAM-a treba provjeriti za svih sedam reakcijskih smjesa prema vrijednostima navedenim u Tablici 8.

Tablica 8. Prihvatljive vrijednosti reakcija određivanja mutacija uzorka (FAM)*

Određivanje	Prihvatljivi raspon C _T	Granična ΔC _T vrijednost
T790M	15.00–40.00	6.38
Delecije	15.00–40.00	9.06
L858R	15.00–40.00	8.58
L861Q	15.00–40.00	9.26
G719X	15.00–40.00	9.31
S768I	15.00–40.00	9.26
Insercije	15.00–40.00	7.91

*Prihvatljive vrijednosti su unutar i uključuju prikazane vrijednosti.

- Ako FAM C_T upada u navedeni raspon 15.00–40.00, FAM umnožavanje je pozitivno.
- Ako je FAM C_T iznad navedenog raspona ili nema umnožavanja, FAM umnožavanje je negativno.

Izračunajte ΔC_T vrijednost za svaku epruvetu s mutacijom koja je pozitivna za umnožavanje FAM-a kako slijedi, uz sigurnost da C_T vrijednosti mutacije i kontrole pripadaju istom uzorku.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutacije} - C_T \text{ kontrole}$$

Usporedite vrijednosti ΔC_T za uzorak s graničnom vrijednosti dotičnog određivanja (Tablica 8), provjeravajući da je primjenjena odgovarajuća granična vrijednost za svaki test.

Granična vrijednost je točka iznad koje pozitivni signal moguće može biti od pozadinskog signala početnice ARMS divljeg tipa DNA. Ako je DC_T vrijednost uzorka viša od granične vrijednosti, klasificira se kao "mutacija nije detektirana" ili izvan granica detekcije kita. Ako je vrijednost uzorka pri ili ispod granične vrijednosti, uzorak se smatra pozitivnim za mutaciju detektiranu tim određivanjem.

Napomena: Za uzorke koji ne pokazuju C_T mutacije FAM-a, potrebna je procjena vrijednosti C_T unutarnje kontrole (HEX) za procjenu da li mutacije nije detektirana ili je određivanje neispravno. Ako je vrijednost HEX C_T između 31 i 37 tada mutacija nije detektirana. Ako je vrijednost HEX C_T izvan raspona 31–37, tada je uzorak neispravan.

Za svaki uzorak, svakoj reakciji mutacije će biti dodijeljen status detektirana mutacija, mutacija nije detektirana ili neispravno, prema sljedećim kriterijima.

- **Detektirana mutacija:** umnožavanje FAM-a pozitivno i ΔC_T su pri ili ispod granične vrijednosti. Ako su određene višestruke mutacije, prikazana će biti mutacija s najmanjom vrijednosti ΔC_T .
- **Mutacija nije detektirana:**
 - Umnožavanje FAM-a je pozitivno i vrijednosti ΔC_T su iznad granične vrijednosti.
 - Umnožavanje FAM-a je negativno i umnožavanje HEX-a (unutarnja kontrola) je pozitivno.
- **Neispravno:**
 - Umnožavanja FAM-a i HEX-a su izvan specifikacija

Napomene za interpretaciju podataka

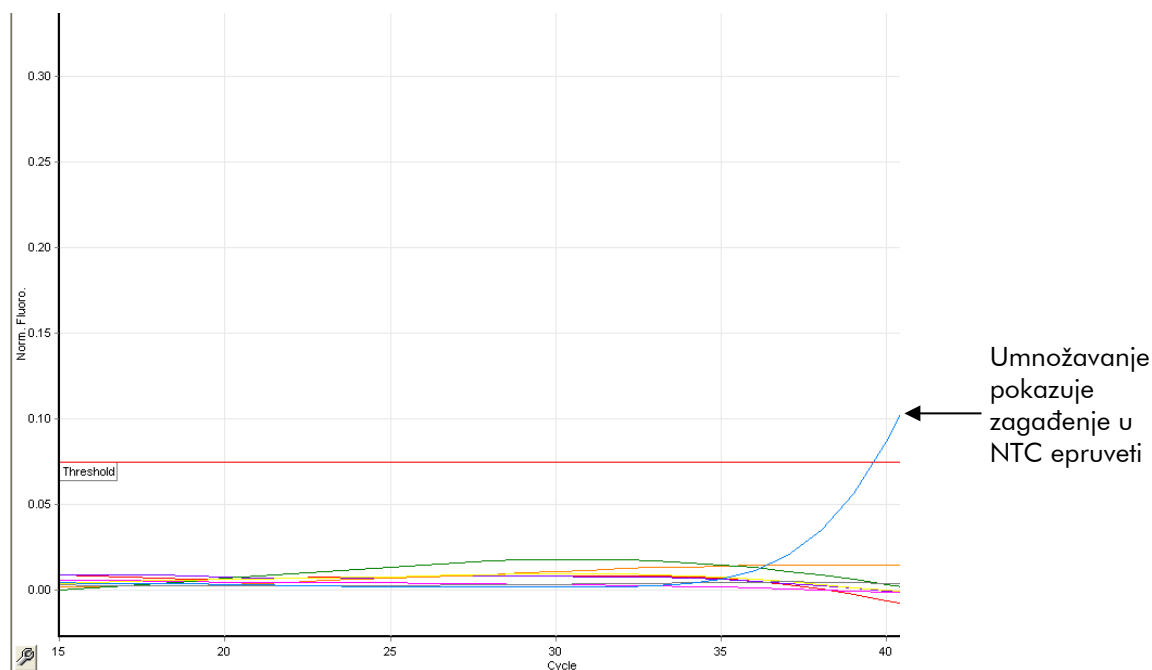
Linearno umnožavanje

Treba provjeriti ispise svih reakcija na Rotor-Gene Q. Povremeno se vidi porast fluorescentnog signala za NTC i negativne uzorke. Ako je to slučaj i dobivena je vrijednost C_T , korisnik treba razlikovati između istinskog umnožavanja, koje bi ukazalo na zagađenje NTC, i linearnog porasta fluorescencije, koje je možda nastalo zbog fluorescentnih artefakata.

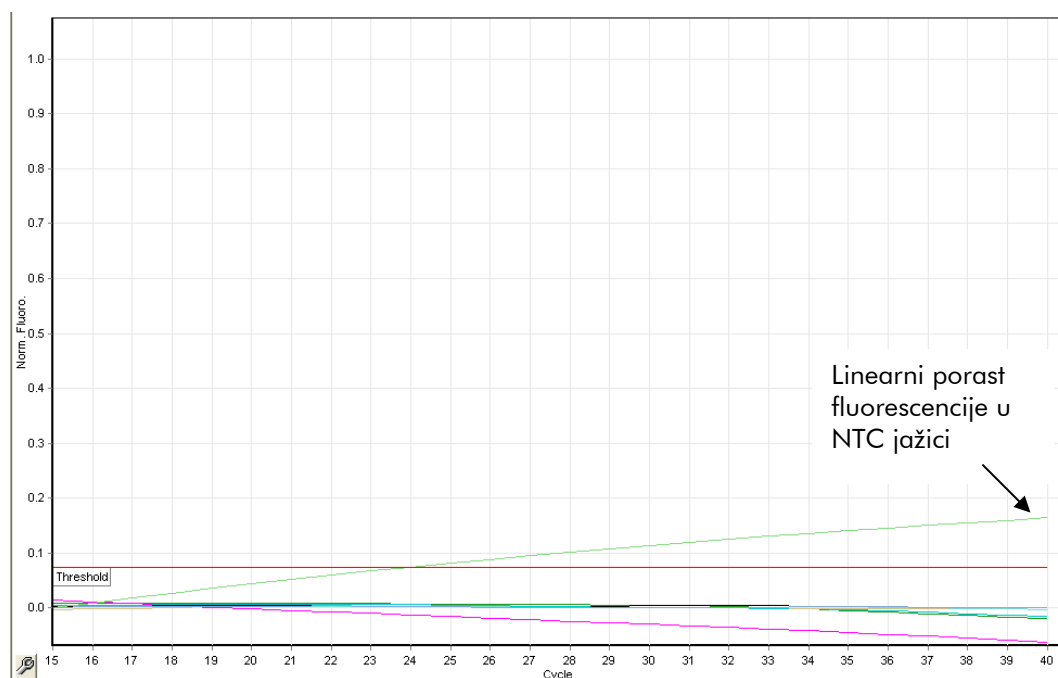
Analiziranje NTC

Slike 17–18 prikazuju dva primjera ponašanja NTC uzoraka. Na Slici 17, vidi se nelinearno (pravo umnožavanje) zbog zagađenja uzorka. Tu seriju treba odbaciti a uzorke ponovo testirati. Na Slici 18 prikazano je linearno umnožavanje NTC. U tim slučajevima treba ispitati početnu fluorescenciju. Odgovarajući prikaz početne fluorescencije prikazan je na Slici 19, pokazuje

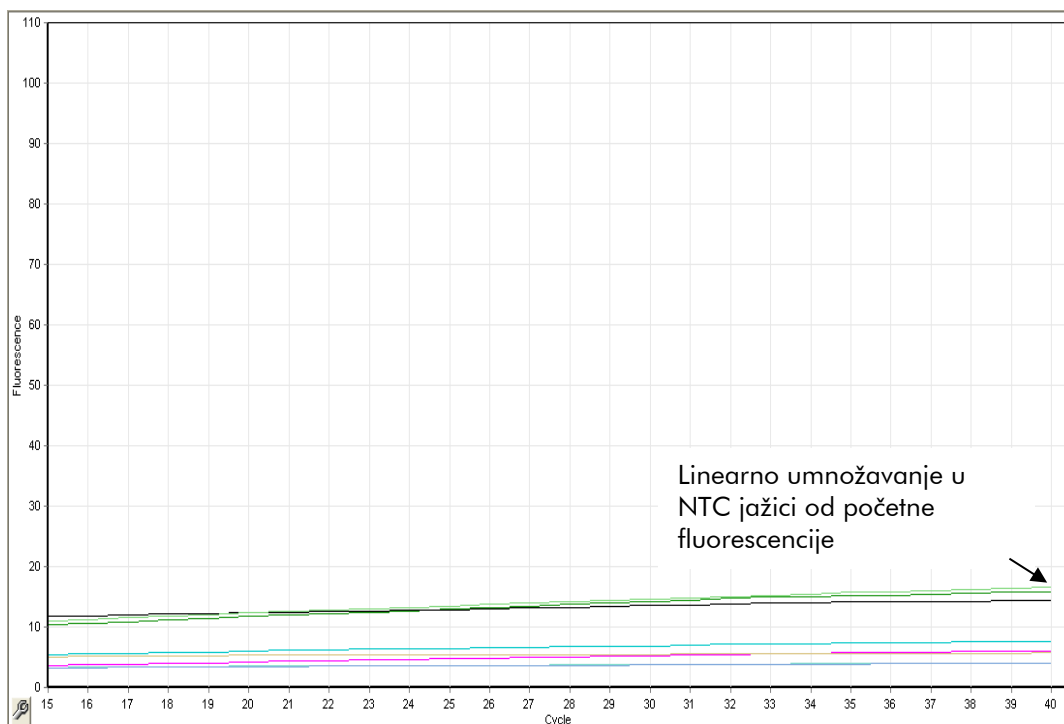
linearno povećanje fluorescencije koje nije pravo umnožavanje. Podaci iz ove serije mogu se upotrijebiti ako su uredne pozitivna i unutarnja kontrola. Za usporedbu sa Slikom 19, Slika 20 prikazuje podatke o početnoj fluorescenciji zbog pravog umnožavanja. U tim okolnostima podatke treba odbaciti a uzorke ponovo testirati jer to ukazuje na prisustvo zagađenja.



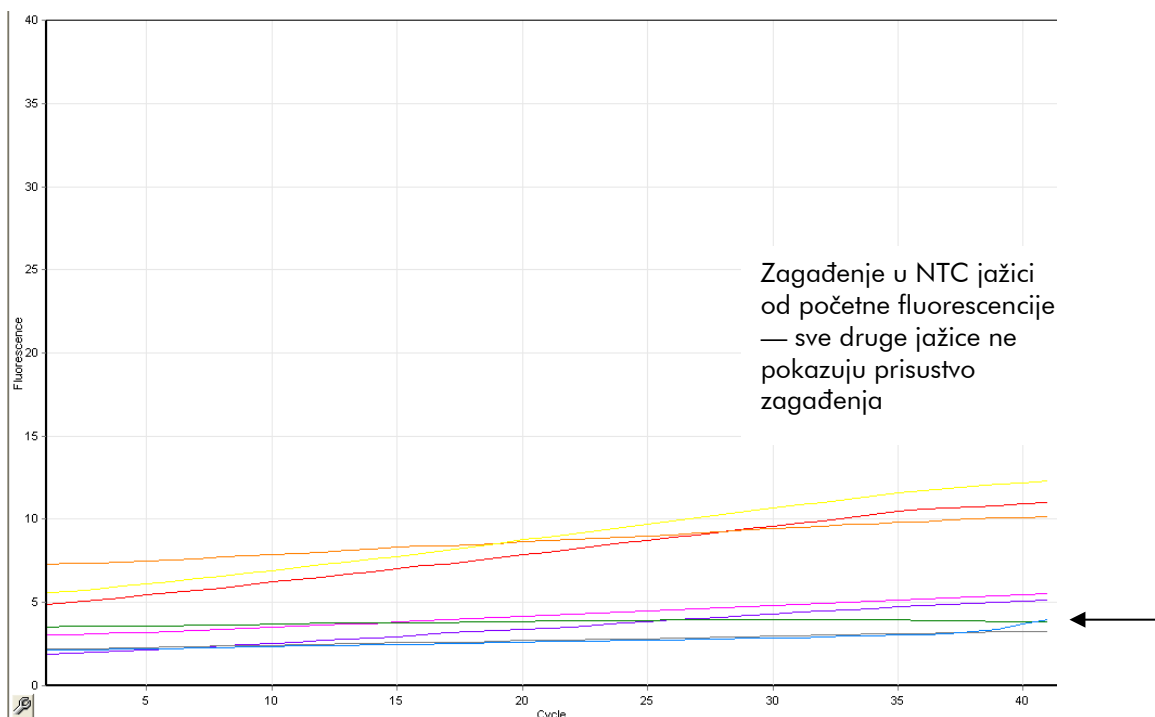
Slika 3. Zagađenje u određivanju NTC u ispitivanoj seriji.



Slika 4. Primjer linearnog porasta fluorescencije u NTC jažici.



Slika 5. Početna fluorescencija Slike 18.

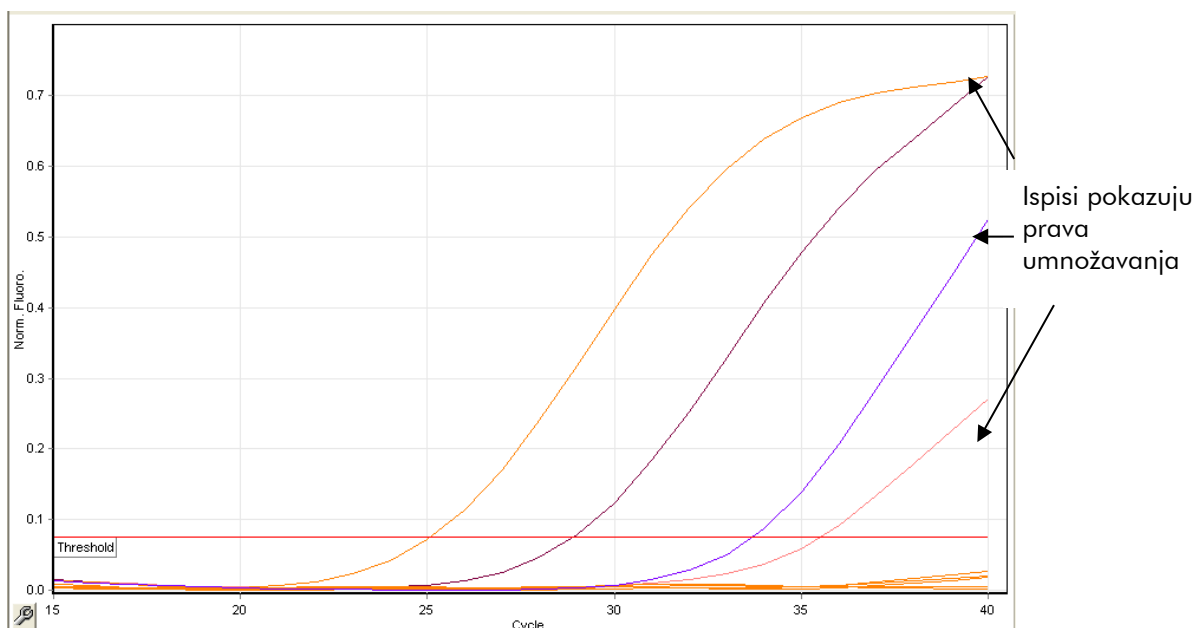


Slika 6. Podaci o početnoj fluorescenciji pokazuju NTC jažicu s pravim umnožavanjem.

Analiziranje uzoraka

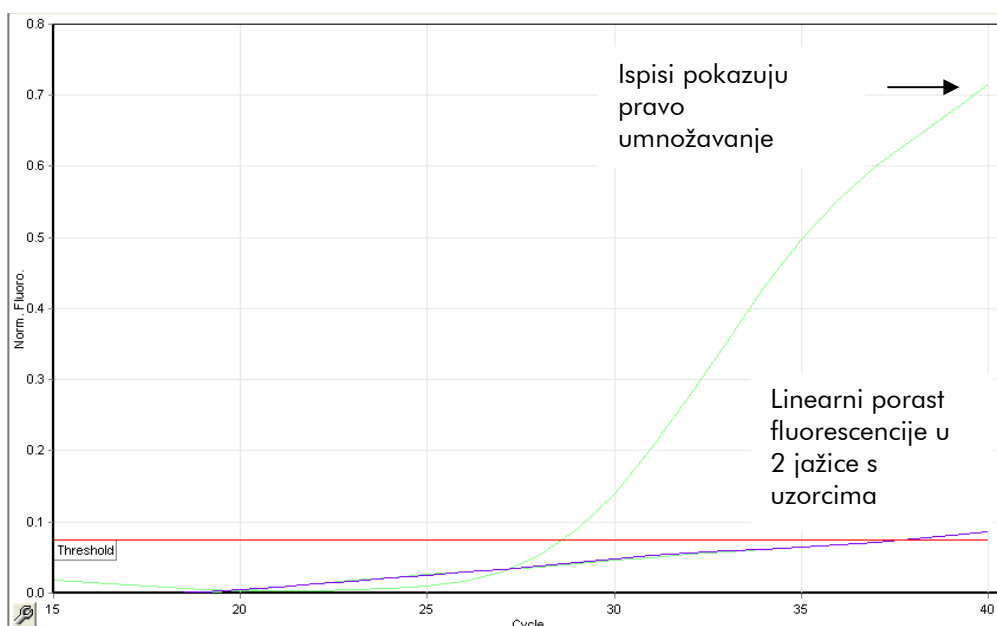
Slike 21–22 prikazuju dva primjera umnožavanja u reakcijama uzoraka. Primjer pravog umnožavanja u jažici s uzorkom u analiziranoj seriji prikazan je na Slici 21. Ako serija pokazuje ovu vrstu sigmoidalne krivulje umnožavanja, to

je pravo umnožavanje i podaci iz ove serije se mogu koristiti ako su uredne pozitivna i unutarnja kontrola.

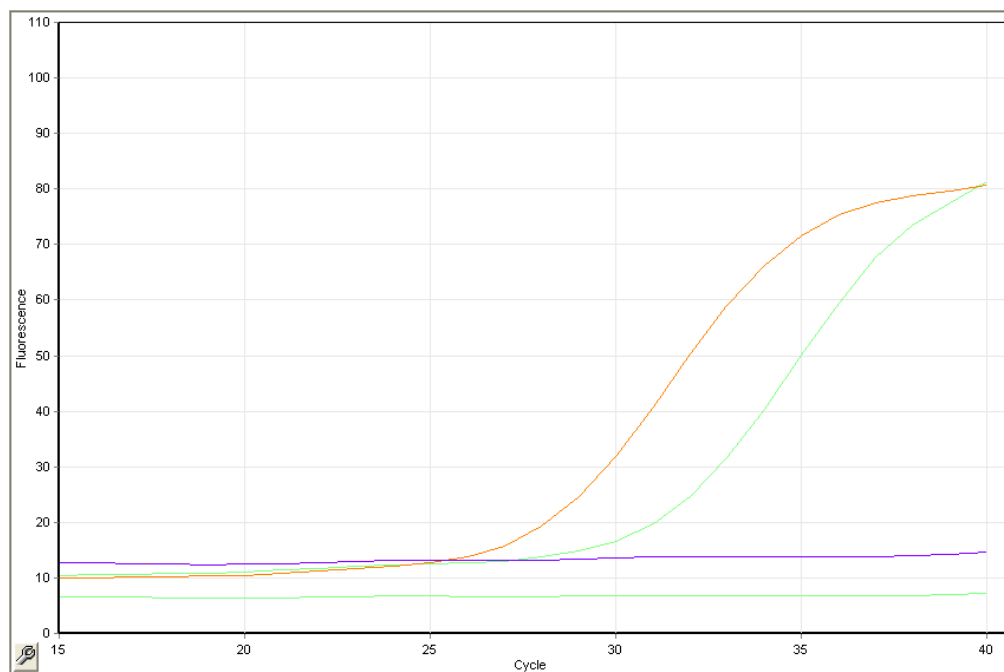


Slika 7. Pravo umnožavanje u jažici uzorka analizirane serije.

Primjer linearnog umnožavanja u reakciji uzorka prikazan je na Slici 22. U tim slučajevima treba ispitati početnu fluorescenciju. Odgovarajući prikaz početne fluorescencije (Slika 23) pokazuje da linearno povećanje primijećeno na Slici 22 odgovara početnoj fluorescenciji te nije pravo umnožavanje. Ako provjere pozitivne i unutarnje kontrole zadovoljavaju, rezultati za uzorke iz ove se serije mogu koristiti, a takvo se linearno umnožavanje naziva "no C_T ".



Slika 8. Primjer linearnog povećanja fluorescencije u dvije jažice s uzorcima.



Slika 9. Početna fluorescencija Slike 22.

Vodič za otkrivanje i rješavanje pogrešaka

Ovaj vodič za otkrivanje i rješavanje pogrešaka može biti od koristi 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. Znanstvenici u Tehničkoj podršci QIAGEN-a uvijek rado odgovaraju na svako pitanje koje možete imati bilo o informacijama i protokolima u ovom priručniku ili tehnologijama uzorka i određivanja (za informacije o kontaktu, pogledajte stražnju stranicu ili posjetite www.qiagen.com).

Komentari i prijedlozi

Nema signala s EGFR pozitivnom kontrolom (PC) na fluorescencijskom kanalu Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) Odabrani fluorescencijski kanal za PCR analizu ne odgovara protokolu | Za analizu podataka odaberite fluorescencijski kanal Cycling Green za analitički EGFR PCR a fluorescencijski kanal Cycling Yellow za unutarnju kontrolu PCR-a. |
| b) Netočno programiranje profila temperature na uređaju Rotor-Gene | Usporedite profil temperature s protokolom i ako je netočan, ponovite seriju određivanja. |
| c) Netočno konfiguriranje PCR-a | Provjerite radne korake pomoću sheme pipetiranja i ponovite PCR, ako je potrebno. |
| d) Uvjeti čuvanja za jednu ili više sastavnica kita nisu bili u skladu s uputama danim u "Čuvanje reagensa i rukovanje reagensima" (stranica 11) | Provjerite rok valjanosti reagensa (vidi naljepnicu na kitu) pa ako je potrebno, upotrijebite novi kit. |
| e) Istekao je rok valjanosti <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kita | Provjerite rok valjanosti reagensa (vidi naljepnicu na kitu) pa ako je potrebno, upotrijebite novi kit. |

Signali s negativnom kontrolom na fluorescencijskom kanalu Cycling Green analitičkog PCR-a

- | | |
|---|---|
| a) Došlo je do zagađenja tijekom pripreme PCR-a | Ponovite PCR u duplikatu s novim reagensima. Ako je moguće, zatvorite PCR epruvete odmah nakon dodavanja ispitivanog uzorka.

Provjerite da li su radna prostorija i instrumenti dekontaminirani u propisanim vremenskim razmacima. |
| b) Došlo je do zagađenja tijekom ekstrakcije | Ponovite ekstrakciju i PCR uzorka kojeg treba ispitati koristeći nove reagense.

Provjerite da li su radna prostorija i instrumenti dekontaminirani u propisanim vremenskim razmacima. |

Kontrola kvalitete

U skladu s QIAGEN-ovim ISO-certificiranim Sustavom za cjelokupno upravljanjem kvalitetom, svaka proizvodna serija *artus theascreen EGFR RGQ PCR* Kita je ispitana prema predodređenim specifikacijama zbog osiguranja dosljedne kvalitete proizvoda.

Ograničenja

Rezultati dobiveni upotrebom ovog proizvoda trebaju biti interpretirani u kontekstu svih važnih kliničkih i laboratorijskih nalaza i ne trebaju se u dijagnostici koristiti samostalno.

Proizvod treba isključivo koristiti osoblje posebno obučeno i educirano za in vitro dijagnostičke postupke i uređaj Rotor-Gene Q 5plex HRM.

Analitička validacija je provedena upotrebom ljudske DNA ekstrahirane iz formalinom fiksiranih u parafin uklopljenih tumorskih uzoraka.

Proizvod je validiran uz korištenje QIAGEN-ovih proizvoda za pročišćavanje DNA.

Proizvod je namjenjen za uporabu jedino na uređaju Rotor-Gene Q za PCR u stvarnom vremenu, iz serije 5plex HRM.

Za optimalne rezultate potrebno je strogo pridržavanje Priručnika za *therascreen EGFR RGQ PCR* Kit. Nije preporučljivo razrjeđivanje reagensa drugačije nego je opisano u ovom priručniku, koje bi rezultiralo gubitkom izvedbe.

Važno je procijeniti količinu i kvalitetu DNA u uzorku prije izvođenja analize s *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom. Priložena je dodatna kontrolna smjesa (Ctrl) zbog određivanja prihvatljive vrijednosti C_T . Ne smiju se koristiti očitavanja apsorbancije jer ne koreliraju s C_T vrijednostima u fragmentiranim uzorcima DNA.

Treba obratiti pažnju na rokove valjanosti i uvjete čuvanja ispisane na kutiji i naljepnicama svih sastavnica. Ne koristite istekle ili nepravilno skladištene sastavnice.

Karakteristike izvedbe

Granične vrijednosti odbacivanja

Ispitano je 171 FFPE uzoraka uporabom metode navedene u preporukama NCCLS EP17-A (2004). Za određivanje granične vrijednosti kita upotrijebljeni su podaci dobiveni od 159 uzoraka. Raspon vrijednosti C_T kontrolne reakcije je uspostavljen od 23.00 do 30.69 C_T . Postavljene su granične vrijednosti odbacivanja prikazane u Tablici 8.

Granica određivanja (LOD)

Da bi odredili LOD za *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, napravljena je serija uzoraka miješanjem sintetske mutirane DNA s divljim tipom genomske DNA zbog simulacije raspona udjela mutacija za svaku od 29 mutacija. LOD je za svako određivanje određen kao postotak mutirane DNA kod kojeg će 95% ponavljanja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom dati pozitivnu reakciju za mutaciju. LOD vrijednosti su dane u Tablici 9. Za višestruka određivanja, koja određuju višestruke mutacije (G719X, delecije i insercije), dana je vrijednost one reakcije s najvećim LOD.

Tablica 8. LOD za svaki od sedam određivanja mutacija EGFR-a

Mutacija	Detektabilni postotak mutacije (%)
T790M	7.02
Delecije	1.64
L858R	1.26
L861Q	0.50
G719X	5.43
S768I	1.37
Insercije	2.03

Preciznost

Preciznost *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita je određena miješanjem sintetske mutirane DNA s divljim tipom genomske DNA zbog simulacije niskog udjela mutacija za svaku od sedam određivanja mutacija. Preciznost je određena ispitivanjem uzoraka na jednom mjestu, koristeći više serija kitova, operatera i serija određivanja kroz različite dane, uz dva ponavljanja za svaki uzorak. Analiza sastavnica varijance bila je manja od 1 ΔC_T i može se koristiti kao procjena preciznosti (Tablica 10).

Tablica 9. Rezultati ispitivanja unutar laboratorija*

Određivanje	Postotak ispitanih pozitivnih mutacija	Procjena standardnog odstupanja (ΔC_T)
T790M	100%	0.33
Delecije	100%	0.40
L858R	100%	0.45
L861Q	100%	0.49
G719X	97.9%	0.59
S768I	97.9%	0.31
Insercije	97.9%	0.38

* Za svaku mutaciju je ispitano 93 ponavljanja.

Ponovljivost

Ponovljivost je procijenjena ispitivanjem uzoraka s visokom razinom mutacija u odnosu na divlji tip genomske DNA na tri ispitna mjesta, koristeći više serija kitova, operatera i serija određivanja kroz različite dane, s dva ponavljanja za svaki uzorak. Za svih sedam ispitivanja mutacija 96.1–100% uzoraka s mutiranom DNA je dalo pozitivan rezultat. Uzorci divljeg tipa su dali negativan rezultat na mutacije u svim određivanjima na svim ispitnim mjestima.

Učinak početne koncentracije DNA

Učinak ukupne ulazne razine DNA na status određivanja mutacija uporabom *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita je procijenjen analiziranjem podataka dobivenih blizu LOD-a. Serija uzoraka za svih 29 mutacija je načinjena miješanjem sintetske mutirane DNA s divljim tipom genomske DNA za dobivanje uzoraka s niskim, srednjim i visokim ukupnim početnim razinama DNA.

Visoke i niske razine početne DNA su ciljano predstavljale C_T raspon vrijednosti kontrolnog određivanja (23.50 to 29.50).

Procjena početnih podataka DNA (29 mutacija, kod koncentracija blizu LOD i tri različite početne razine DNA) dala je 95.44% udjela pozitivnih mutacija.

Ti podaci ukazuju da variranje razine početne DNA, unutar radnog raspona testa, ne utječe na ΔC_T ili na odaziv mutacija uzorka.

Interferirajuće tvari

Procijenjen je učinak mogućih zagađenja prenešenih iz QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kita za vrijeme procesiranja FFPE uzoraka.

Formalin, parafinski vosak, ksilen, etanol, pufer ATL, proteinaza K, pufer AL, pufer za ispiranje AW1, i pufer za ispiranje AW2 korišteni su kod najviših očekivanih koncentracija ("najgori slučaj") (podrazumijevajući da je svaki korak ispiranja ili pročišćavanja u protokolu ekstrakcije rezultirao u smanjenju koncentracije tvari za 1 log).

Ispitivanje je koristilo uzorke s trostrukim LOD radije nego mnogo više razine mutacija zbog osiguranja detekcije mogućih interferencija.

Razlika u ΔC_T od ≥ 3 standardna odstupanja (preuzeta iz ispitivanja preciznosti) između "testa" i "kontrole" (npr., bez interferirajuće tvari) smatrana je da upućuje na moguću interferenciju.

Niti jedna od ispitanih moguće interferirajućih tvari nije pokazala promjenu ΔC_T od ≥ 1 standardnog odstupanja u usporedbi s kontrolama.

Bibliografija

QIAGEN održava veliku, ažuriranu internetom dostupnu bazu podataka znanstvenih publikacija u kojima se koriste QIAGEN proizvodi. Sveobuhvatne mogućnosti pretraživanja pomoći će Vam pronaći članke koje trebate, bilo jednostavnim pretraživanjem ključne riječi ili specificiranjem aplikacije, područja istraživanja, naslova i sl.

Za potpuni popis referenci, posjetite QIAGEN-ovu bibliografsku bazu na www.qiagen.com/RefDB/search.asp ili kontaktirajte QIAGEN-ovu tehničku podršku ili Vašeg lokalnog distributera.

Oznake



<N>

Sadržaj reagensa dovoljan za <N> reakcija



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Kataloški broj



Broj lota



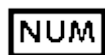
Broj materijala



Sastavnice



Sadržaj



Broj



Ograničenja temperature



Proizvođač



Pogledati upute za upotrebu

Informacije o kontaktu

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku pomoć na www.qiagen.com/Support, nazovite na broj 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite web-stranicu www.qiagen.com).

Dodatak: Pojedivosti o mutacijama

COSMIC ID-ovi su preuzeti iz Kataloga tjelesnih mutacija raka (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Tablica 10. Lista mutacija i identifikacijske oznake COSMIC ID.

Mutacija	Ekson	Promjena baze	COSMIC ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Insercije	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delecije	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complex)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complex)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complex)	12422
		2238_2252>GCA (complex)	12419

**Tablica 11. Lista mutacija i identifikacijske oznake COSMIC ID
(nastavak)**

Mutacija	Ekson	Promjena baze	COSMIC ID
Delecije	19	2239_2256del18	6255
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complex)	12382
		2239_2258>CA (complex)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (complex)	12383

Informacije o naručivanju

Proizvod	Sadržaj	Kat.br.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Za 24 reakcije: 1 kontrolno određivanje, 7 određivanja mutacija, pozitivna kontrola, <i>Taq</i> DNA Polimeraza	870111
Rotor-Gene Q i pribor		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Uređaj za PCR cikluse 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	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Uređaj za PCR cikluse 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 5plex HRM System	Uređaj za PCR cikluse 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	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Uređaj za PCR cikluse 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	9001580

Proizvod	Sadržaj	Kat.br.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcija s jednokanalnom pipetom za 72 x 0.1 ml epruvete	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 nizova od 4 epruvete s čepovima za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x nizova od 4 epruvete s čepovima za 10,000 reakcija	981106

Za ažurirane informacije o licenciranju te za proizvode specifična ograničenja, pogledajte odgovarajući QIAGEN priručnik ili uputu. QIAGEN priručnici i upute dostupni su na www.qiagen.com ili ih možete zatražiti od QIAGEN-ove tehničke podrške ili Vašeg lokalnog distributera.

Ova je stranica namjerno ostavljena praznom.

Naručivanje ovog proizvoda dozvoljava naručitelju njegovo korištenje u dijagnostičke svrhe za ljudsku in vitro dijagnostiku. Naručivanjem se ne dodjeljuje opće patentno pravo ili druga dozvola bilo koje vrste osim specifičnog prava korištenja.

Zaštićena imena: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Grupa); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit je CE označen dijagnostički kit prema European In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC. Nije raspoloživ u svim zemljama.

Ugovor o ograničenoj licenci za komplet *therascreen* EGFR RGQ PCR

Korištenje ovog proizvoda znači sporazumnost bilo kojeg naručitelja ili proizvoda sljedećim uvjetima:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licencu za svoje intelektualno vlasništvo za upotrebu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnim na stranici www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima. Tvrtka QIAGEN nije temeljito pregledala ili optimizirala te protokole. Tvrtka QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedene licence, QIAGEN ne daje nikakva jamstva da ovaj kit i/ili njegova upotreba ne proturječi 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 nagoviještene, 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 Ograničenja licenciranja na bilo kojem sudu te povratiti svoje istražne i sudske troškove, uključujući naknadu za odvjetnika, u vezi bilo kojeg djela koje narušava ovo ograničenje licenciranja ili intelektualno vlasništvo koje je u vezi s ovim kitom i/ili njegovim sastavnicama.

© 2012–2013 QIAGEN, sva prava pridržana.

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

