

ipsogen[®] JAK2 MutaSearch[®] Kit Handbuch



Version 1

IVD

Qualitatives In-vitro-Diagnostikum

Zum Gebrauch mit dem Rotor-Gene[®] Q oder Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] oder LightCycler[®] Thermocyclern



REF

673823



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R4

MAT

1072502DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglicht. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

QIAGEN setzt Standards in:

- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen,
- Nukleinsäure- und Protein-Assays,
- microRNA-Forschung und RNAi sowie
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien.

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website **www.qiagen.com**.

Inhaltsverzeichnis

Vorgesehener Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Hintergrundinformationen	4
Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung	7
Mit dem Kit gelieferte Materialien	10
Kit-Inhalt	10
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	11
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	12
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	12
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	13
Verfahren	14
DNA-Isolierung aus der Probe	14
Lagerung der Nukleinsäuren	14
Protokolle	
■ qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor	15
■ qPCR mit dem Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT oder LightCycler 480 Thermocycler	19
■ qPCR mit LightCycler 1.2 Thermocycler	24
Interpretation der Ergebnisse	28
Berechnung von $\Delta\Delta C_T$ (oder $\Delta\Delta C_p$) und Genotypisierung	28
Kontrollen	31
Hilfe zur Fehlerbehebung	31
Qualitätskontrolle	34
Beschränkungen des Tests	34
Leistungscharakteristik	34
Untersuchung nichtklinischer Proben	34
Untersuchung klinischer Proben	37
Literatur	38
Symbole	39
Kontaktinformationen	39
Bestellinformationen	40

Vorgesehener Verwendungszweck

Der *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit ist für den Nachweis der JAK2-V617F/G1849T-Mutation in genomischer DNA von Personen mit Verdacht auf myeloproliferative Neoplasie vorgesehen. Das Fehlen von JAK2-V617F- bzw. -G1849T schließt das Vorhandensein anderer JAK2-Mutationen nicht aus. Der Test kann falsch-negative Ergebnisse anzeigen, falls zusätzliche Mutationen im Abschnitt zwischen den Nukleotiden 88.504 und 88.622 vorliegen (NCBI-Referenz NT_008413).

Hinweis: Der Kit sollte gemäß den Anweisungen in diesem Handbuch und in Kombination mit validierten Reagenzien und Geräten verwendet werden. Bei nicht vorgesehener Gebrauch (sog. „Off-Label-Use“) dieses Produkts und/oder durch Modifikation seiner Komponenten erlischt jegliche Haftung QIAGENs.

Zusammenfassung und Hintergrundinformationen

Im Jahr 2005 wurde die rekurrente somatische Mutation V617F, die das Janus-Tyrosin-Kinase-2-(JAK2-)Gen betrifft, identifiziert (1–4). Diese Entdeckung stellte einen bedeutenden Durchbruch im Verständnis und für die Klassifizierung und Diagnose myeloproliferativer Neoplasien (MPNs) dar. JAK2 ist ein kritisches Molekül für intrazelluläre Signalwege für eine Reihe von Zytokinen, darunter auch Erythropoetin.

Die JAK2-Mutation V617F lässt sich bei > 95 % der Patienten mit Polycythaemia vera (PV), 50–60 % der Patienten mit essenzieller Thrombozythämie (ET) und bei 50 % der Patienten mit primärer Myelofibrose (PMF) nachweisen. JAK2-V617F wurde auch in einigen seltenen Fällen von chronischer myelomonozytärer Leukämie, myelodysplastischem Syndrom, systemischer Mastozytose und chronischer neutrophiler Leukämie detektiert, gar nicht (0 %) dagegen bei CML (5).

Die Mutation entspricht einer einzelnen Nukleotid-Veränderung, und zwar des JAK2-Nukleotids 1849 im Exon 14, wodurch es zu einer Substitution der Aminosäure Valin (V) durch Phenylalanin (F) in Position 617 des Proteins (in der JH2-Domäne) kommt. Sie führt zu einer konstitutiven JAK2-Aktivierung, einer hämatopoetischen Transformation *in vitro* und einem Erythropoetin-unabhängigen Wachstum endogener erythroider Kolonien (EECs) bei allen Patienten mit PV und einem hohen Prozentsatz der ET- und PMF-Patienten (6). JAK2-V617F ist einer der Hauptfaktoren, der die Transformation der hämatopoetischen Zellen bei MPN fördert. Allerdings müssen die zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen, die – bei Vorliegen derselben, einzigartigen Mutation – zu solch unterschiedlichen klinischen und biologischen Phänotypen führen, noch genauer erforscht werden.

Traditionell erfolgte die Diagnose der MPNs auf der Basis klinischer Befunde sowie aufgrund histologischer Knochenmarks- und zytogenetischer Kriterien. Die Entdeckung eines krankheitsspezifischen molekularen Markers führte

sowohl zu einer Vereinfachung des Verfahrens als auch zu erhöhter diagnostischer Genauigkeit. Der Nachweis der JAK2-Mutation V617F ist jetzt Bestandteil der Referenzkriterien der WHO des Jahres 2008 für die Diagnose einer BCR-ABL-negativen MPN (siehe Tab. 1), und das Vorhandensein dieser Mutation ist ein wesentliches Kriterium bei der Bestätigung der Diagnose.

Tabelle 1. WHO-Kriterien für die Diagnose einer MPN (nach Referenz 7)

Kriterien für die Diagnose einer Polycythaemia vera (PV)	
Hauptkriterien	<p>1. Hämoglobin (Hb) > 18,5 g·dl⁻¹ (Männer) bzw. > 16,5 g·dl⁻¹ (Frauen) oder Hb oder Hämatokrit (Hkt) > 99. Perzentil des Referenzbereichs bezogen auf Alter, Geschlecht oder Höhe des Wohnorts oder Hb > 17 g·dl⁻¹ (Männer) bzw. > 15 g·dl⁻¹ (Frauen), falls assoziiert mit anhaltender Erhöhung um ≥ 2 g·dl⁻¹ über Baseline, die nicht einer Eisenmangel-Korrektur zugeschrieben werden kann, oder Um > 25 % über dem mittleren normalen prognostischen Wert erhöhte Erythrozyten-Fraktion</p> <p>2. Vorhandensein von <i>JAK2-V617F</i> oder einer ähnlichen Mutation</p>
Nebenkriterien	<p>1. Knochenmark mit trilinearer Myeloproliferation</p> <p>2. Serum-Erythropoetin-Spiegel unterhalb des Normalbereichs</p> <p>3. Wachstum endogener erythroider Kolonien (EECs)</p>
Kriterien für die Diagnose einer essenziellen Thrombozythämie (ET)	
Hauptkriterien	<p>1. Thrombozytenzahl ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹</p> <p>2. Megakaryozyten-Proliferation mit großer und reifer Morphologie. Keine oder nur geringe Granulozyten- oder erythroide Proliferation</p> <p>3. Nichterfüllung der WHO-Kriterien für chronische myeloische Leukämie (CML), PV, primäre Myelofibrose (PMF), myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder eine andere myeloische Neoplasie</p> <p>4. Nachweis von <i>JAK2-V617F</i> oder anderer klonaler Marker oder Kein Nachweis einer reaktiven Thrombozytose</p>
Nebenkriterien	–
Kriterien für die Diagnose einer primären Myelofibrose (PMF)	
Hauptkriterien	<p>1. Megakaryozyten-Proliferation und -Atypie, verbunden mit Retikulin- und/oder Kollagenfibrose, oder Bei Nichtvorhandensein einer Retikulinfibrose müssen die megakaryozytären Veränderungen mit Hyperzellularität des Knochenmarks, granulozytärer Proliferation und oftmals einer abgeschwächten Erythropoese verbunden sein (d. h. präfibrotische PMF)</p> <p>2. Nichterfüllung der WHO-Kriterien für (CML), PV, MDS oder eine andere myeloische Neoplasie</p> <p>3. Nachweis von <i>JAK2-V617F</i> oder anderer klonaler Marker oder Kein Nachweis einer reaktiven Knochenmarkfibrose</p>
Nebenkriterien	<p>1. Leukoerythroblastose</p> <p>2. Erhöhte Serum-Lactatdehydrogenase-Aktivität (LDH)</p> <p>3. Anämie</p> <p>4. Tastbare Milzvergrößerung (Splénomegalie)</p>

Ein Cut-Off von 1 % für klinisch positive Werte bei PCR-basierten Assays wird zudem von Experten in Europa und den USA zunehmend für geeignet befunden (8–10).

Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung

Die qPCR ermöglicht die genaue Quantifizierung von PCR-Produkten während der exponentiellen Phase des PCR-Amplifikationsprozesses. Durch die Erfassung der Fluoreszenzsignale in Echtzeit während und/oder im Anschluss an die PCR-Zyklen liegen schnell quantitative PCR-Daten vor, ohne dass eine Weiterverarbeitung nach der PCR notwendig ist, sodass das Risiko einer Kontamination des PCR-Produkts drastisch reduziert ist. Gegenwärtig sind drei Hauptvarianten der qPCR-Methode verfügbar: qPCR-Analyse mit dem Farbstoff SYBR® Green I, qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden und qPCR-Analyse mit Hybridisierungssonden.

Dieser qPCR-Assay nutzt das Prinzip der Hydrolyse eines mit zwei Farbstoffen markierten Oligonukleotids. Während der PCR hybridisieren Vorwärts- und Rückwärts-Primer an eine spezifische Sequenz. Ein Zwei-Farbstoff-Oligonukleotid ist in derselben Mischung vorhanden. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, das mit einem 5'-Reporter-Farbstoff und einem 3'-Quencher-Farbstoff markiert ist; sie hybridisiert an eine Zielsequenz (auch Target-Sequenz) im PCR-Produkt. Die qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden nutzt die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Solange die Sonde intakt ist, führt die Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher-Farbstoff zu einer Unterdrückung der Reporter-Fluoreszenz, primär durch Förster-Resonanzenergietransfer.

Ist die Target-Sequenz vorhanden, lagert sich die Sonde während der PCR spezifisch zwischen der Vorwärts- und Rückwärts-Primerstelle an. Durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde zwischen Reporter und Quencher nur dann gespalten, wenn die Sonde an das Target hybridisiert ist. Die Sondenfragmente lösen sich dann durch Verdrängung von der Target-Sequenz ab und die Polymerisation des Strangs geht weiter. Das 3'-Ende der Sonde ist blockiert, um eine Extension der Sonde während der PCR zu verhindern (siehe Abb. 1). Diese Reaktionsfolge findet bei jedem Zyklus statt und stört die exponentielle Akkumulation des Produkts nicht.

Der Anstieg des Fluoreszenzsignals wird nur detektiert, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und daher während der PCR amplifiziert wird. Aufgrund dieser Anforderungen wird eine unspezifische Amplifikation nicht detektiert. Folglich ist die Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zur Amplifikation der Target-Sequenz im Verlauf der PCR.

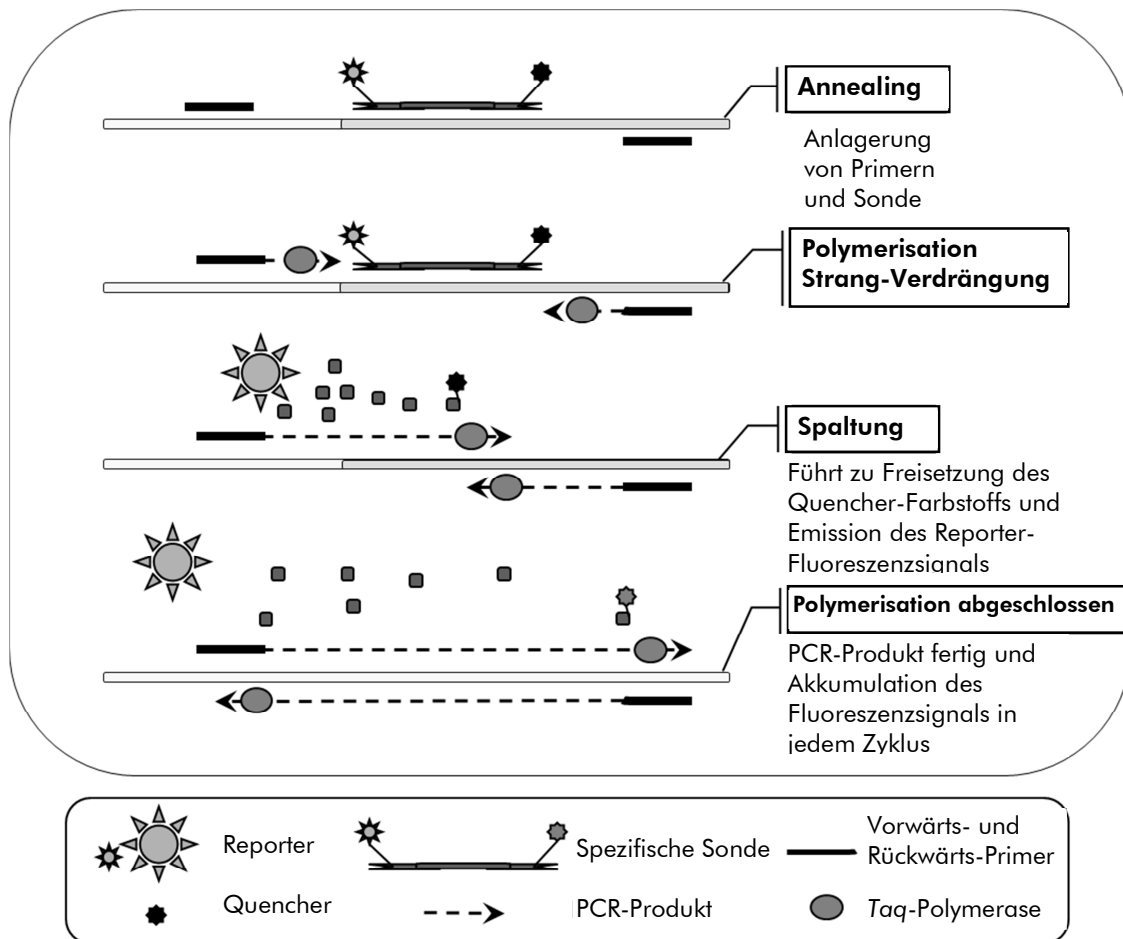


Abbildung 1. Reaktionsprinzip.

Bei diesem Assay-Kit kommt die allelspezifische PCR-Technologie zum Einsatz, die einen empfindlichen, genauen und hoch reproduzierbaren Nachweis der SNPs ermöglicht. Diese Methode beruht auf der Verwendung spezifischer Vorwärts-Primer für das Wildtyp- und das V617F-Allel. Nur bei einer perfekten Übereinstimmung zwischen Primer und Target-DNA kommt es zur Extension und Amplifikation in der PCR (siehe Abb. 2).

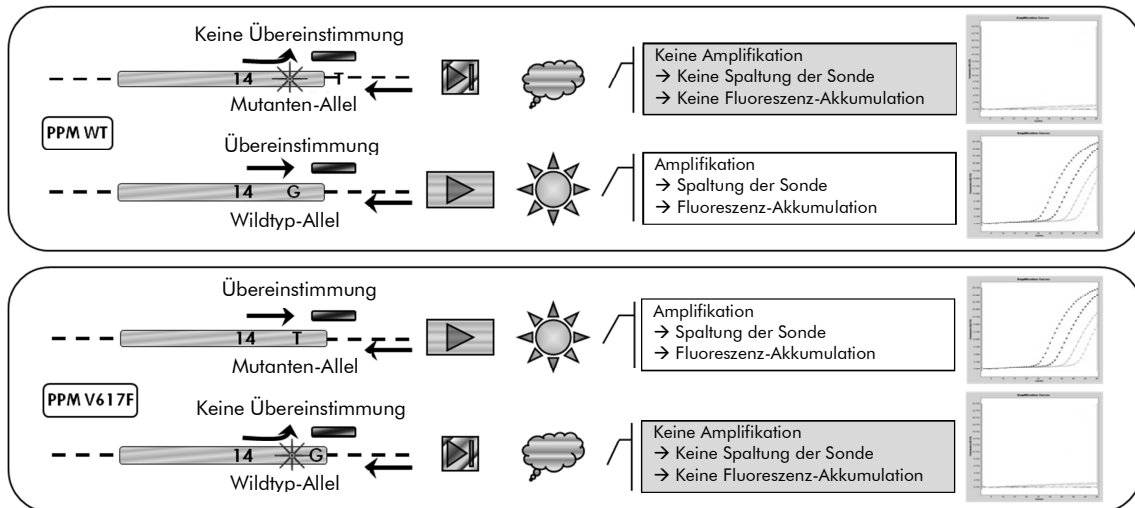


Abbildung 2. Allelspezifische PCR. Durch Verwendung von Wildtyp- oder V617F-Primer und -Sonden-Mix wird die spezifische Detektion des Wildtyp- bzw. mutierten Allels in zwei separaten Reaktionen, die mit derselben Probe durchgeführt werden, ermöglicht.

Mit dem Kit gelieferte Materialien

Kit-Inhalt

<i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit</i>		(24)
Katalog-Nr.		673823
Anzahl Reaktionen		24
V617F Positive Control (V617F-Positivkontrolle)	PC-VF JAK2	40 µl
V617F Negative Control (V617F-Negativkontrolle)	NC-VF JAK2	40 µl
Cut-Off Sample (1% V617F allele)	COS-VF JAK2	40 µl
Primers and probe mix JAK2 V617F* (Primer- und Sonden-Mix JAK2-V617F)	PPM-JAK2 V617F, 25x	68 µl
Primers and probe mix JAK2 WT† (Primer- und Sonden-Mix JAK2-WT)	PPM-JAK2 WT, 25x	68 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit Handbook (Englisch)</i>		1

* Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für das JAK2-Gen sowie spezifischer FAM™ –TAMRA™ -Sonde für V617F.

† Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für das JAK2-Gen sowie spezifischer FAM–TAMRA-Sonde für den Wildtyp.

Hinweis: Zentrifugieren Sie die Röhrchen jeweils kurz, bevor Sie die Reagenzien verwenden.

Hinweis: Voraussetzung für die Analyse unbekannter Proben mit dem *ipsogen JAK2 MutaSearch Kit* ist die Extraktion genomischer DNA. Die Reagenzien, die für die DNA-Extraktion benötigt werden, sind nicht Bestandteil des Kits und müssen in Kombination mit dem Kit validiert werden.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (*Safety Data Sheets, SDS*) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reagenzien

- Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)
- Nukleasefreier 1x-TE-Puffer (pH 8,0)
- Puffer und *Taq*-DNA-Polymerase: Als validierte Reagenzien werden der TaqMan Universal PCR Master Mix (2x-PCR-Master-Mix; von Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 4304437) und der LightCycler TaqMan Master (5-fach-PCR-Master-Mix; von Roche, Kat.-Nr. 04535286001) oder LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (5-fach-Master-Mix; von Roche, Kat.-Nr. 03515567001) verwendet.

Hinweis: Dieser Master-Mix kann nur mit dem LightCycler 1.2 verwendet werden.

- Reagenzien für Agarosegel (0,8–1,0 %) in 0,5x-TBE-Elektrophoresepuffer

Verbrauchsartikel

- Nukleasefreie, sterile PCR-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern
- RNase- und DNase-freie 0,5-ml- oder 1,5-ml-PCR-Reaktionsgefäße
- Eis

Geräte

- Für PCR reservierte Mikroliter-Pipetten* (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 0,5-ml-/1,5-ml-Reaktionsgefäße (erforderliche Drehzahl: 10.000 UpM)
- Spektralfotometer* für die DNA-Quantifizierung
- Real-Time-PCR-Thermocycler:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder andere Rotor-Gene Thermocycler Q; LightCycler 1.2 oder 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System oder ABI PRISM 7900HT SDS; sowie gerätespezifisches Zubehörmaterial

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft und kalibriert werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (*Safety Data Sheets, SDS*). In unserer Online-Sammlung der Materialsicherheits-Datenblätter unter **www.qiagen.com/safety** finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Entsorgen Sie den bei Probenverarbeitung und PCR-Reaktion angefallenen (Flüssig-)Abfall gemäß den geltenden Sicherheitsbestimmungen.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Quantitative PCR-Tests setzen die Einhaltung der guten Laborpraxis voraus, einschließlich der Wartung der für molekularbiologische Zwecke vorgesehenen Geräte gemäß den anzuwendenden Vorschriften und relevanten Normen.

Dieser Kit ist für in-vitro-diagnostische Anwendungen vorgesehen. Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien und mitgelieferten Anweisungen wurden für optimale Leistung validiert. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien oder die Änderung von Inkubationszeiten oder -temperaturen könnte zu fehlerhaften oder widersprüchlichen Daten führen. Die PPM-JAK2-Reagenzien könnten unter Lichteinfluss chemischen Veränderungen unterliegen. Die Formulierung aller Reagenzien ist spezifisch auf den Gebrauch mit diesem Test abgestimmt. Um die optimale Leistungsfähigkeit des Tests zu erhalten, dürfen keine Reagenzien ausgetauscht werden.

Gehen Sie äußerst sorgfältig vor, um Folgendes zu vermeiden:

- DNase-Kontamination, die einen Abbau der Template-DNA verursachen könnte
- DNA- oder PCR-Produkt-Kontaminationen durch Verschleppung, die zu einem falsch-positiven Signal führen könnten

Wir empfehlen daher, folgende Maßnahmen einzuhalten.

- Verwenden Sie nukleasefreie Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) und tragen Sie bei der Durchführung des Assays immer Einmal-Handschuhe.
- Benutzen Sie bei allen Pipettierschritten neue Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere, um eine Kreuzkontamination der Proben und Reagenzien zu vermeiden.
- Setzen Sie den Master-Mix vor der PCR mit dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.) in einem speziell dafür vorgesehenen Labor-

bereich an, in den keine DNA-Matrizen (DNA, PCR-Produkte) hineingetragen werden. Pipettieren Sie die Template-DNA in einem separaten Laborbereich (vorzugsweise in einem anderen Laborraum) mit speziell dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.).

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Kits werden auf Trockeneis verschickt und müssen nach Eingang bei -30 °C bis -15 °C gelagert werden.

- Sorgen Sie dafür, dass die Primer- und Sonden-Mischungen (PPM-JAK2-Röhrchen) nicht (bzw. möglichst wenig) dem Licht ausgesetzt werden.
- Schütteln Sie die Röhrchen vorsichtig und zentrifugieren Sie sie kurz vor dem Öffnen.
- Lagern Sie alle Kit-Komponenten in ihren Originalgefäßen/-behältern.

Diese Lagerungsbedingungen gelten sowohl für geöffnete als auch ungeöffnete Komponenten. Komponenten, die nicht unter den auf den Etiketten angegebenen Bedingungen gelagert wurden, könnten in ihrer Funktion beeinträchtigt sein, was sich ungünstig auf die Assay-Ergebnisse auswirken könnte.

Das Haltbarkeitsdatum eines Reagenzes ist jeweils auf dem Etikett der einzelnen Komponente angegeben. Bei Aufbewahrung unter korrekten Lagerungsbedingungen behält das Produkt seine Leistungsfähigkeit bis zu dem Haltbarkeitsdatum, das auf dem Etikett angegeben ist.

Es liegen keine Anhaltspunkte vor, die auf eine Instabilität dieses Produkts hindeuten. Dennoch sollten beim Testen unbekannter Proben immer Positiv- und Negativkontrollen simultan mitgeführt werden.

Verfahren

DNA-Isolierung aus der Probe

Die genomische DNA sollte entweder aus Vollblut, gereinigten Lymphozyten aus peripherem Blut, polynukleären Zellen oder Granulozyten isoliert werden. Um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, empfehlen wir, dieselbe Zellfraktion und dieselbe DNA-Extraktionsmethode zu verwenden. Die DNA-Extraktion kann nach einer laboreigenen Methode oder mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits erfolgen.

Die DNA-Menge sollte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt werden. Die Kontrolle der DNA-Qualität sollte durch Spektrofotometrie oder Gelelektrophorese erfolgen.

Das O_{260}/O_{280} -Absorptionsverhältnis sollte 1,7–1,9 betragen. Geringere Werte deuten in der Regel auf eine Kontamination mit Protein oder organische Chemikalien hin. Bei der elektrophoretischen Analyse in einem 0,8–1,0%igen Agarosegel sollte sich die isolierte DNA als einzelne klare Bande bei ungefähr 20 kb anfärben lassen. Auch ein leichter Schmier ergibt akzeptable Ergebnisse.

Die erhaltene DNA wird auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l in TE-Puffer verdünnt. Die qPCR-Reaktion ist für 25 ng gereinigte genomische DNA optimiert.

Lagerung der Nukleinsäuren

Kurzfristig – für maximal 24 Stunden – können die gereinigten Nukleinsäuren bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für eine längerfristige Lagerung (über 24 Stunden) empfehlen wir, die Nukleinsäuren bei –20 °C einzufrieren.

Protokoll: qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor

Bei Verwendung dieses Thermocyclers empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 2 angegeben, durchzuführen.

Tabelle 2. Anzahl an Reaktionen für Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Proben	Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
3 DNA-Kontrollen	6 Reaktionen (PC-VF, NC-VF und COS-VF, jede als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
Mit JAK2-WT-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-JAK2 WT)	
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
3 DNA-Kontrollen	6 Reaktionen (PC-VF, NC-VF und COS-VF, jede als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

Probenverarbeitung bei Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Wir empfehlen, mindestens 12 DNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Kontroll-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Rotor-Schema in Abbildung 3 gibt beispielhaft die Belegung des Rotors bei einem Experiment wieder.

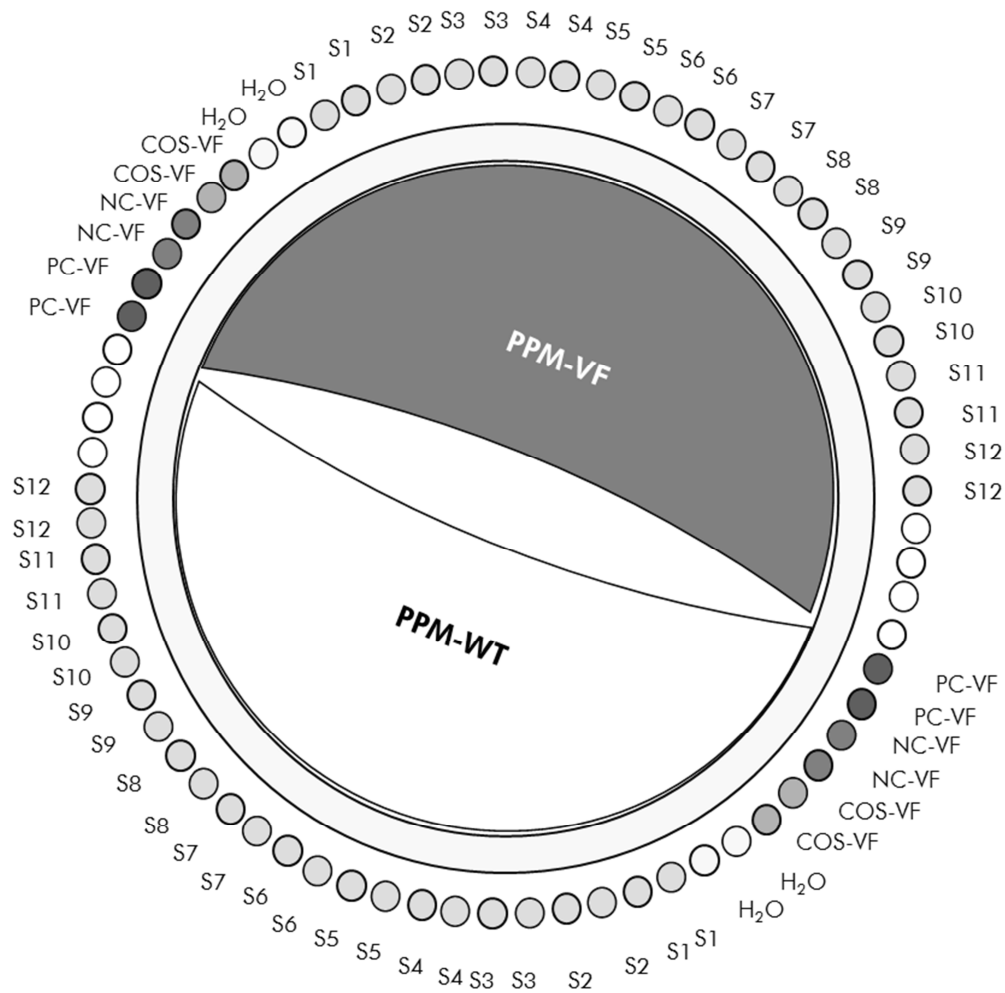


Abbildung 3. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up bei einem Experiment mit dem ipsogen JAK2 MutaSearch Kit. PC-VF: Positivkontrolle; NC-VF: Negativkontrolle; COS-VF: Cut-off-Probe; S: DNA-Probe; H₂O: Wasser-Kontrolle.

Hinweis: Achten Sie darauf, immer eine zu testende Probe in Position 1 des Rotors zu platzieren. Andernfalls wird der Thermocycler während des Kalibrierungsschritts keine Kalibrierung durchführen und es werden falsche Fluoreszenzsignaldaten erfasst.

Setzen Sie in alle übrigen Positionen ein leeres Reaktionsgefäß ein.

qPCR mit Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.

Nehmen Sie die Komponenten ungefähr 10 min vor Beginn der Testdurchführung aus dem Kühlschrank.

2. **Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie alle Reagenzien-Röhrchen (jeweils für ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.**
3. **Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben folgenden qPCR-Mix an.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 3 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 μ l berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 3. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	VF: 32 + 1 Reaktionen (μl)	WT: 32 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x (VF bzw. WT)	1,0	33,0	33,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR- Zwecke)	6,5	214,5	214,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 6)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

4. **Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie jeden PCR-Mix (VF und WT; jeweils für ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.**
5. **Pipettieren Sie 20 μ l des jeweiligen qPCR-Pre-Mix (VF oder WT) pro Reaktionsgefäß.**

6. Geben Sie 5 μ l der genomischen DNA der Probe oder der Kontrolle in die entsprechenden Reaktionsgefäße (Gesamtvolumen 25 μ l).
7. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
8. Verschließen Sie die PCR-Reaktionsgefäße. Setzen Sie die Reaktionsgefäße gemäß den Empfehlungen des Herstellers in den 72er-Rotor. Setzen Sie in alle übrigen Positionen ein leeres Reaktionsgefäß ein.
9. Programmieren Sie den Rotor-Gene Q Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4. Temperaturprofil

Analysemodus	Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 min
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 min
Zykleneinstellungen („Cycling“)	50 Zyklen 95 °C für 15 Ss 62 °C für 1 min mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Kanal Grün: Einzel ("Single")

10. Starten Sie das in Tabelle 4 angegebene zyklische Temperaturprogramm.
11. Aktivieren Sie bei den Rotor-Gene Q Thermocyclern bei der Analyse die Funktion "Slope Correct" („Steigung korrigieren“). Wir empfehlen, den Schwellenwert ("Threshold") auf 0,03 einzustellen.

Protokoll: qPCR mit dem Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT oder LightCycler 480 Thermocycler

Bei Verwendung eines dieser qPCR-Thermocycler für 96-Well-Platten empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 5 angegeben, durchzuführen.

Tabelle 5. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT oder LightCycler 480 Thermocyclers

Proben	Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
3 DNA-Kontrollen	6 Reaktionen (PC-VF, NC-VF und COS-VF, jede als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-JAK2 WT)	
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
3 DNA-Kontrollen	6 Reaktionen (PC-VF, NC-VF und COS-VF, jede als Doppelbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

Probenverarbeitung bei Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT oder LightCycler 480 Thermocycler

Wir empfehlen, mindestens 12 DNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Kontroll-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Platten-Schema in Abbildung 4 gibt beispielhaft die Belegung einer Platte bei einem Experiment wieder.

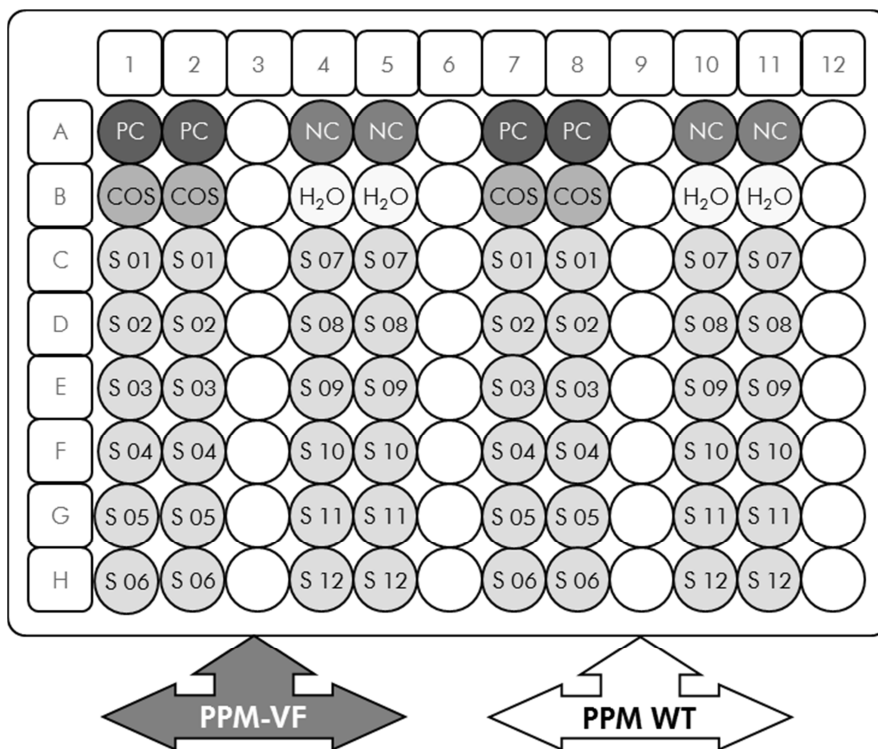


Abbildung 4. Vorgeschlagenes Platten-Set-up bei einem Experiment mit dem ipsogen JAK2 MutaSearch Kit. PC: Positivkontrolle; NC: Negativkontrolle; COS: Cut-off-Probe; S: DNA-Probe; H₂O: Wasser-Kontrolle.

qPCR mit dem Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT oder LightCycler 480 Thermocycler

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.

Nehmen Sie die Komponenten ungefähr 10 min vor Beginn der Testdurchführung aus dem Kühlschrank.

2. Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie alle Reagenzien-Röhrchen (jeweils für ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.

3. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 6 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben

Primer- und Sonden-Mix ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 6. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	VF: 32 + 1 Reaktionen (μl)	WT: 32 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x (VF bzw. WT)	1,0	33,0	33,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	214,5	214,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 6)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

4. **Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren jeden und PCR-Mix (VF und WT; jeweils für ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.**
5. **Pipettieren Sie 20 μ l des jeweiligen qPCR-Pre-Mix (VF oder WT) pro Well.**
6. **Geben Sie 5 μ l der genomischen DNA der Probe oder der Kontrolle in das entsprechende Well (Gesamtvolumen 25 μ l).**
7. **Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
8. **Schließen Sie die Platte und zentrifugieren Sie kurz (300 x g, ca. 10 s).**
9. **Setzen Sie die Platte gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler.**
10. **Programmieren Sie den Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 7 für den Applied Biosystems 7500 oder den ABI PRISM 7900HT SDS bzw. in Tabelle 8 für den LightCycler 480 Thermocycler angegeben.**

Tabelle 7. Temperaturprofil für Applied Biosystems 7500 und ABI PRISM 7900HT SDS Thermocycler

Analysemodus	Standardkurve – absolute Quantifizierung
Halten (“Hold”)	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 min
Halten 2 (“Hold 2”)	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 min
Zykleneinstellungen („Cycling“)	50 Zyklen 95 °C für 15 s 63 °C für 1 min und 30 s mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz: Einzel (“Single”); Quencher: TAMRA

Tabelle 8. Temperaturprofil für den LightCycler 480 Thermocycler

Analysemodus	Absolute Quantifizierung (“Abs Quant”)
Detektionsformat („Detection formats“)	Wählen Sie im “Detection formats“-Fenster („Detektionsformate“) die Option “Simple Probe” („Einfach markierte Sonde“).
Halten (“Hold”)	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 min
Halten 2 (“Hold 2”)	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 min
Zykleneinstellungen („Cycling“)	50 Zyklen 95 °C für 15s 63 °C für 1 min und 30 s mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Bereich 483–533 nm bei LC-Version 01 bzw. im Bereich 465–510 nm bei LC-Version 02: Einzel

11. Bei Verwendung eines Applied Biosystems 7500 oder ABI PRISM 7900HT SDS fahren Sie mit Schritt 11a fort. Bei einem LightCycler 480 Thermocycler fahren Sie mit Schritt 11b fort.

11a. Bei Applied Biosystems 7500 oder ABI PRISM 7900HT SDS: Wir empfehlen, beim Analyseschritt einen Schwellenwert von 0,1

einzustellen. Starten Sie das in Tabelle 7 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

11b. LightCycler 480: Wir empfehlen, den Fit-Point-Analysemodus mit einem Hintergrundwert von 2,0 und einem Schwellenwert von 2,0 zu verwenden. Starten Sie das in Tabelle 8 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Protokoll: qPCR mit LightCycler 1.2 Thermocycler

Bei Verwendung eines Kapillar-Thermocyclers empfehlen wir, die Proben in Doppelbestimmung und die Kontrollen lediglich in Einfachbestimmung zu testen, wie in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines LightCycler 1.2 Thermocyclers

Proben	Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
3 DNA-Kontrollen	3 Reaktionen (PC-VF, NC-VF und COS-VF, jede als Einfachbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion
Mit JAK2-WT-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-JAK2 WT)	
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
3 DNA-Kontrollen	3 Reaktionen (PC-VF, NC-VF und COS-VF, jede als Einfachbestimmung getestet)
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion

Probenverarbeitung bei LightCycler 1.2 Thermocycler

Wir empfehlen 6 DNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Kontroll-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Kapillaren-Schema in Abbildung 5 gibt beispielhaft die Belegung der Kapillaren bei einem Experiment wieder.

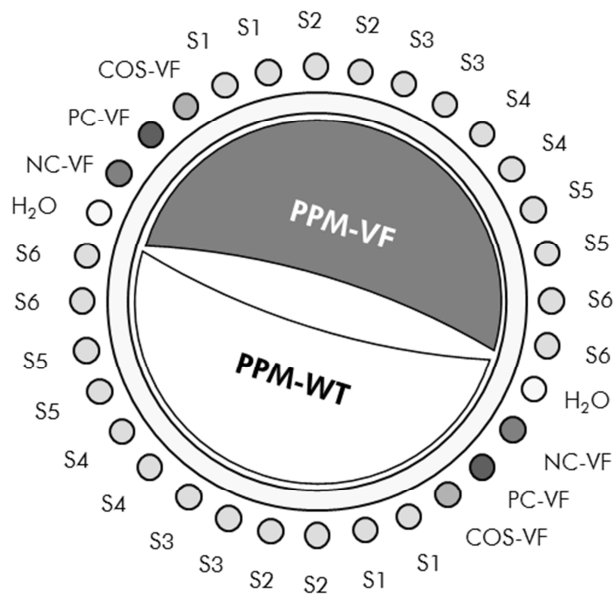


Abbildung 5. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up bei einem Experiment mit dem ipsogen JAK2 MutaSearch Kit. PC-VF: Positivkontrolle; **NC-VF:** Negativkontrolle; **COS-VF:** Cut-off-Probe; **S:** DNA-Probe; **H₂O:** Wasser-Kontrolle.

qPCR mit LightCycler 1.2 Thermocycler

Hinweis: Wegen der besonderen technologischen Anforderungen müssen Experimente mit einem LightCycler 1.2 unter Verwendung spezifischer Reagenzien durchgeführt werden. Wir empfehlen, beim Ansetzen des 5-fach konzentrierten Master-Mix LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe zu benutzen und dabei die Anweisungen des Herstellers zu befolgen.

Hinweis: Führen Sie alle Arbeitsschritte auf Eis durch.

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.

Nehmen Sie die Komponenten ungefähr 10 min vor Beginn der Testdurchführung aus dem Kühlschrank.

2. Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie alle Reagenzienröhrchen (jeweils für ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.

3. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabelle 10 dient als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 20 µl berechnet ist. Sie

können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 10. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	VF: 16 + 1 Reaktionen (μl)	WT: 16 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x	4,0	68,0	68,0	1x
Primer- und Sonden-Mix, 25x (VF bzw. WT)	0,8	13,6	13,6	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	10,2	173,4	173,4	–
Probe (Zugabe bei Schritt 6)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	20,0	jeweils 20,0	jeweils 20,0	–

4. **Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie jeden PCR-Mix (VF und WT; jeweils für ca. 10 s bei 10.000 UpM), um Tröpfchen im Deckel mit der restlichen Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu vereinigen.**
5. **Pipettieren Sie 15 μ l des jeweiligen qPCR-Pre-Mix (VF oder WT) pro Kapillare.**
6. **Geben Sie 5 μ l der genomischen DNA der Probe oder der Kontrolle in die entsprechende Kapillare (Gesamtvolumen 20 μ l).**
7. **Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
8. **Schließen Sie die Kapillare und zentrifugieren Sie kurz (500 x g, ca. 5 s).**
9. **Setzen Sie die Kapillaren gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler ein.**
10. **Programmieren Sie den LightCycler 1.2 Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 11 angegeben.**

Tabelle 11. Temperaturprofil

Analysemodus	Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 min
Zykleneinstellungen („Cycling“)	50 Zyklen 95 °C für 15 s 66 °C für 1 min; mit Erfassung der FAM- Fluoreszenz: Einzel ("Single")

11. Für den LightCycler 1.2 wird der F1/F2- und "2nd derivative"-Analysemodus („2. Ableitung“) empfohlen. Starten Sie das in Tabelle 11 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Interpretation der Ergebnisse

Berechnung von $\Delta\Delta C_T$ (oder $\Delta\Delta C_p$) und Genotypisierung

Extrahieren Sie die Daten aus der vom System generierten Datei ("Analyse Export File") und werten Sie die Ergebnisse wie im Folgenden beschrieben aus.

Hinweis: C_T -Werte beziehen sich auf Ergebnisse, die mit einem Rotor-Gene, Applied Biosystems oder ABI PRISM System erhalten wurden. In der folgenden Beschreibung können die C_T -Werte durch C_p -Werte, die bei LightCycler Systemen erhalten werden, ersetzt werden. Die Berechnungen werden für C_T -Werte dargestellt; sie können auf gleiche Weise auf C_p -Werte angewendet werden.

WICHTIG: Falls sowohl bei PPM-JAK2 WT als auch PPM-JAK2 VF keine Amplifikation registriert wird (d. h. Ergebnis „nicht detektiert“, $C_T > 45$ oder $C_p > 45$, je nach verwendetem Thermocycler), können die Ergebnisse nicht ausgewertet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die DNA-Konzentration in der Probe nicht innerhalb des akzeptablen Wertebereichs war oder dass die DNA-Matrix nicht pipettiert wurde. Andernfalls fahren Sie mit der Auswertung fort, wie im Folgenden beschrieben.

Durchführung

- 1. Berechnen Sie für jede Probe (Kontrollen, Cut-off-Probe und unbekannte Proben) den mittleren C_T -Wert, der mit PPM-JAK2 V617F (VF- C_T -Mittelwert) und PPM-JAK2 WT (WT- C_T -Mittelwert) erhalten wurde.**

Falls bei einer Probe eines der Replikate (bei den Doppelbestimmungen) ein „unbestimmtes“ Ergebnis ("undetermined") hat, berücksichtigen Sie es bei der Auswertung nicht: Verwenden Sie nur das andere der beiden Replikate. In diesem Fall empfehlen wir dringend, die Probe erneut zu testen.

Falls beide Wiederholproben ein „unbestimmtes“ Ergebnis haben, setzen Sie den Proben-Wert auf „45“.

- 2. Berechnen Sie den Ausgangs-Grenzwert (IL; "Input Limit") nach folgendem Schema.**

Ausgangs-Grenzwert (IL) = WT- C_T -Mittelwert für COS + 3,3

Hinweis: Der Ausgangs-Grenzwert ermöglicht die Überprüfung, dass die für den Test verwendete Patienten-DNA-Probe korrekt gehandhabt wurde, um die Korrektheit des erhaltenen Endergebnisses zum JAK2-V617F-Status garantieren zu können.

3. Überprüfen Sie gemäß Tabelle 12 die Probenqualität für jede unbekannte Probe.

Tabelle 12. Kriterien für die Probenqualität

Wenn:	Dann:
VF-C _T -Mittelwert < 40	Fahren Sie mit Schritt 4 fort.
VF-C _T -Mittelwert ≥ 40 und WT-C _T -Mittelwert < IL	Fahren Sie mit Schritt 4 fort.
VF-C _T -Mittelwert ≥ 40 und WT-C _T -Mittelwert ≥ IL	Probe kann nicht ausgewertet werden.*

* DNA-Konzentration in der Probe war nicht innerhalb des akzeptablen Wertebereichs oder die DNA-Matrix wurde nicht pipettiert.

4. Berechnen Sie für alle gültigen Proben und Kontrollen den ΔC_T -Wert ($\Delta C_{T \text{ Probe}}$ bzw. $\Delta C_{T \text{ PC-VF}}$, $\Delta C_{T \text{ NC-VF}}$ und $\Delta C_{T \text{ COS}}$) nach folgender Gleichung.

$$\Delta C_T = \text{VF-C}_T\text{-Mittelwert} - \text{WT-C}_T\text{-Mittelwert}$$

5. Berechnen Sie den $\Delta\Delta C_T$ -Wert für jede unbekannte Probe ($\Delta\Delta C_{T \text{ Probe}}$) und für jede Kontrolle ($\Delta\Delta C_{T \text{ PC-VF}}$ und $\Delta\Delta C_{T \text{ NC-VF}}$) nach folgenden Gleichungen.

$$\Delta\Delta C_{T \text{ Probe}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ Probe}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ PC-VF}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ PC-VF}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ NC-VF}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ NC-VF}}$$

6. Bestimmen Sie nach folgendem Schema die Grauzone, oder den Bereich der Unsicherheit, um den COS-VF-Wert herum.

Hinweis: Die Grauzone (GZ) eines Tests ist definiert als der Wertebereich, in dem die diskriminatorische Leistung unzureichend genau ist. Ist ein Wert in der Grauzone, so bedeutet dies, dass der Target-Marker weder als vorhanden noch als fehlend gewertet werden kann. Die Grauzone muss für jedes Experiment berechnet werden. Auf der Grundlage der Varianzen, die bei Untersuchungen zur Assay-Präzision festgestellt wurden (siehe den Abschnitt „Leistungscharakteristik“ auf Seite 34), wurde die GZ als $\pm 7\%$ des $\Delta C_{T \text{ COS}}$ -Werts definiert.

Diese Berechnung ist für alle Experimente gültig, die mit den empfohlenen Thermocyclern durchgeführt werden.

$$\text{GZ: } [(-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07); (+\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07)]$$

7. Bestimmen Sie den Genotyp der unbekannt Proben gemäß Tabelle 13.

In Tabelle 14 ist ein Beispiel für die Berechnungen und die Interpretation der Ergebnisse bei einem repräsentativen Experiment wiedergegeben.

Tabelle 13. Interpretation der Genotypisierungsergebnisse

Ergebnis	Interpretation
$\Delta\Delta C_{T\text{ Probe}} > +\Delta C_{T\text{ COS}} \times 0,07$	JAK2-V617F-Mutation wurde detektiert.
$\Delta\Delta C_{T\text{ Probe}} < -\Delta C_{T\text{ COS}} \times 0,07$	JAK2-V617F-Mutation wurde nicht detektiert.
$\Delta\Delta C_{T\text{ Probe}}$ innerhalb GZ $(-\Delta C_{T\text{ COS}} \times 0,07 \leq \Delta\Delta C_{T\text{ Probe}} \leq +\Delta C_{T\text{ COS}} \times 0,07)$	Ergebnis nicht eindeutig.

Tabelle 14. Beispiel für die Berechnungen und die Interpretation der Ergebnisse bei einem repräsentativen Experiment

Probe	VF-C _T	VF-C _T - Mittelwert	WT-C _T	WT-C _T - Mittelwert	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	Auswertung
PC	27,82	27,74	40,27	40,24	-12,50	20,12	Positiv
PC	27,66		40,20				
NC	41,23	41,10	26,66	26,76	14,34	-6,72	Negativ
NC	40,96		26,85				
COS	35,04	34,85	27,28	27,23	7,62	0	IL = 30,53 GZ: -0,53 bis +0,53
COS	34,66		27,17				
Probe 1	42,15	41,63	28,86	28,80	12,83	-5,21	Negativ
Probe 1	41,10		28,73				
Probe 2	30,54	30,73	28,99	29,10	1,63	5,99	Positiv
Probe 2	30,92		29,20				
Probe 3	37,31	37,71	30,11	30,22	7,49	0,13	Nicht eindeutig (in GZ)
Probe 3	38,11		30,33				
Probe 4	45	45	39,25	38,85	Auswertung nicht möglich (VF-C _T -Mittelwert > 40 und WT-C _T -Mittelwert > IL)		
Probe 4	45		38,45				

Kontrollen

Die Wasser-Kontrolle sollte keinen C_T -Wert (oder C_p -Wert) ergeben, sowohl mit JAK2-V617F als auch mit JAK2-WT. Ein C_T -Wert (bzw. C_p -Wert) bei einer Wasser-Kontrolle könnte auf eine Kreuzkontamination hindeuten. Siehe unten, den Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“.

Die Positivkontrolle PC-VF sollte als Probe, bei der die JAK2-V617F-Mutation detektiert wurde, ausgewertet werden.

Die Negativkontrolle NC-VF sollte als Probe, bei der die JAK2-V617F-Mutation nicht detektiert wurde, ausgewertet werden.

Siehe den folgenden Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“, um Hinweise zur Interpretation unangemessener Ergebnisse zu erhalten.

Hilfe zur Fehlerbehebung

Diese Anleitung zur Fehlerbehebung soll Ihnen eine Hilfe geben, falls einmal Probleme auftreten sollten. Weitere Informationen finden Sie auch auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Außerdem beantwortet das Team vom Technischen Service bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und zu den Protokollen in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme, siehe „Kontaktinformationen“ auf Seite 39).

Kommentare und Vorschläge

Signal bei Positivkontrolle ist negativ

- | | |
|--|--|
| a) Pipettierfehler | Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz.
Wiederholen Sie den PCR-Lauf. |
| b) Unsachgemäße Lagerung von Kit-Komponenten | Lagern Sie den <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit bei -30 °C bis -15 °C und schützen Sie Primer- und Sonden-Mischungen (PPM) vor Lichteinfluss, siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 13.
Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen.
Aliquotieren Sie die Reagenzien vor der Lagerung. |

Kommentare und Vorschläge

Negativkontrollen sind positiv oder Positivkontrollen sind bei falschem PPM-Mix positiv

Kreuzkontamination	Tauschen Sie alle kritischen Reagenzien aus. Wiederholen Sie das Experiment mit neuen Aliquots sämtlicher Reagenzien. Handhaben Sie Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsartikel gemäß den allgemein anerkannten Regeln der guten Laborpraxis, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden.
--------------------	---

Kein Signal, auch nicht bei Positivkontrollen

a) Pipettierfehler oder Reagenzien vergessen	Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz. Wiederholen Sie den PCR-Lauf.
b) Inhibitorische Effekte des Probenmaterials, verursacht durch unzureichende Nukleinsäure-Reinigung	Wiederholen Sie die DNA-Präparation.
c) LightCycler: Falscher Detektionskanal gewählt	Stellen Sie den Kanal auf F1/F2 oder 530 nm / 640 nm ein.
d) LightCycler: Keine Datenerfassung programmiert	Überprüfen Sie das Zyklenprogramm. Wählen Sie den Erfassungsmodus "Single" („Einzel“) am Ende jedes Annealing-Schritts des PCR-Programms.

Kein oder schwaches Signal in Proben, während Positivkontrollen in Ordnung sind

Mindere DNA-Qualität oder geringe Konzentration	Überprüfen Sie immer die DNA-Qualität und -Konzentration vor Testbeginn.
---	--

Kommentare und Vorschläge

LightCycler: Fluoreszenzintensität zu gering

- a) Unsachgemäße Lagerung von Kit-Komponenten Lagern Sie den *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit bei -30 °C bis -15 °C und schützen Sie Primer- und Sonden-Mischungen (PPM) vor Lichteinfluss, siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 13.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen.
- Aliquotieren Sie die Reagenzien vor der Lagerung.
- b) Sehr geringe Ausgangsmenge an Target-DNA Erhöhen Sie die Menge an Proben-DNA.
- Hinweis:** Je nach gewählter Methode für die DNA-Präparation können inhibitorische Effekte auftreten.

LightCycler: Fluoreszenzintensität variiert

- a) Pipettierfehler Die durch sogenannte „Pipettierfehler“ verursachte Variabilität beim LightCycler kann reduziert werden, indem die Daten im Modus F1/F2 oder 530 nm / 640 nm analysiert werden.
- b) Unzureichende Zentrifugation der Kapillaren Der angesetzte PCR-Mix befindet sich noch im oberen Kapillargefäß, oder eine Luftblase ist in der Kapillarenspitze.
- Zentrifugieren Sie die mit dem Reaktionsgemisch gefüllten Kapillaren immer, wie im gerätespezifischen Bedienungshandbuch beschrieben.
- c) Äußere Oberfläche der Kapillarenspitze verschmutzt Tragen Sie beim Umgang mit den Kapillaren immer Laborhandschuhe.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet. Analysenzertifikate sind auf Anfrage unter www.qiagen.com/support erhältlich.

Beschränkungen des Tests

Alle Reagenzien dürfen ausschließlich als In-vitro-Diagnostika verwendet werden.

Das Produkt darf nur von speziell unterwiesenem Personal verwendet werden, das in der Anwendung in-vitro-diagnostischer Verfahren geschult ist.

Um optimale PCR-Ergebnisse zu erzielen, ist es erforderlich, dass Sie die Angaben im Handbuch genau einhalten.

Achten Sie auf die Haltbarkeitsdaten, die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Verwenden Sie keine Kit-Komponenten, deren Haltbarkeitsdatum abgelaufen ist.

Alle erhaltenen diagnostischen Ergebnisse dürfen nur im Zusammenhang mit anderen klinischen und/oder labormedizinischen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Leistungscharakteristik des Systems für jede Methode, die in seinem Labor angewendet wird und die nicht durch die QIAGEN Untersuchungen zur Leistungsevaluierung abgedeckt ist, selbst zu validieren.

Leistungscharakteristik

Untersuchung nichtklinischer Proben

Untersuchungen mit nichtklinischen Proben wurden durchgeführt, um die analytische Leistungsfähigkeit des *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kits zu bestimmen.

Präzision nahe am Cut-off-Grenzwert

Drei unabhängig präparierte Proben mit niedrigem Mutationsniveau wurden insgesamt 38 Mal unter Verwendung von drei Chargen des *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kits mit einem Applied Biosystems 7500 Thermocycler getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 15 und 16 zusammengefasst.

Tabelle 15. ΔC_T -Werte und Präzisionsdaten bei Untersuchung nichtklinischer Proben

Probe (% V617F-Allel)	ΔC_T [Minimum ; Maximum]	Variations- koeffizient (%)
0,5 %	[7,8 ; 10,9]	7,2 %
1 %	[6,7 ; 8,8]	5,6 %
2 %	[5,9 ; 7,7]	5,5 %
COS-VF	[6,9 ; 8,8]	6,2 %

Tabelle 16. Genotypisierungsergebnisse, gemäß der $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung, bei der Untersuchung nichtklinischer Proben

Probe (% V617F -Allel)	Replikate	Mutation detektiert	Ergebnis nicht eindeutig	Mutation detektiert
0,5 %	38	0	3	35
1 %	38	3	27	4
2 %	38	33	5	0

Bei 92 % der Proben mit 0,5 % JAK2-V617F wurde die Mutation nicht detektiert.
Bei 87 % der Proben mit 2 % JAK2-V617F wurde die Mutation detektiert.

Ausgangs-Grenzwerte ("Input Limits")

Die empfohlene Ausgangsmenge an genomischer DNA für den Test ist 25 ng. Davon abweichende Ausgangsmengen an DNA wurden getestet, um festzustellen, ob die Menge an genomischer DNA einen Einfluss auf die Interpretationsergebnisse einer Probe haben könnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17. Effekt der Ausgangsmenge ("Input") an genomischer DNA

Probe (% V617F- Allel)	Ausgangs- menge (ng)	Replikate	Mutation detektiert	Ergebnis nicht eindeutig	Mutation nicht detektiert
< 1 %	2,5	6	Proben nicht ausgewertet (Werte > IL)		
	10	6	0	1	5
	25	6	0	0	6
	100	6	0	0	6
	250	6	0	0	6
Gesamt < 1 %		30	0	1	23
1 %	2,5	3	Proben nicht ausgewertet (Werte > IL)		
	10	3	0	1	2
	25	3	0	2	1
	100	3	0	3	0
	250	3	0	2	1
Gesamt 1 %		15	0	8	4
2 %, 4 %, 50 %, 78 % oder 100 %	2,5	15	15	0	0
	10	15	15	0	0
	25	15	15	0	0
	100	15	15	0	0
	250	15	15	0	0
Gesamt > 1 %		75	75	0	0

Die Analyse verdünnter oder hoch konzentrierter Proben (d. h. Proben mit < 5 ng/μl DNA bzw. > 5 ng/μl DNA) ergab, dass derartige Konzentrationen die $\Delta\Delta C_T$ -Werte (oder $\Delta\Delta C_p$ -Werte) beeinträchtigen könnten. Dies könnte zu

falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen, bei sehr niedrigen Prozentzahlen JAK2-V617F jedoch nur zu nicht eindeutigen Ergebnissen.

Untersuchung klinischer Proben

DNA-Proben von 81 Personen mit Verdacht auf myeloproliferative Neoplasie (DNA aus Blut oder Knochenmark extrahiert), die zuvor mithilfe des *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kits (QIAGEN, Kat.-Nr. 673223) charakterisiert worden waren, wurden zusammen mit 9 DNA-Proben, die aus dem Blut gesunder Spender gewonnen wurden, unter Verwendung des *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kits mit einem Applied Biosystems 7500 Thermocycler analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18. Ergebnisse für Proben nach Analyse mit dem *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit und mit dem *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit

		<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit		
		Mutation detektiert	Ergebnis nicht eindeutig	Mutation nicht detektiert
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit	Mutation detektiert	37	1	1
	Ergebnis nicht eindeutig	0	0	1
	Mutation nicht detektiert	0	0	50

Insgesamt betrug die Übereinstimmung 98,9 % (95%-Konfidenzintervall: 93,8–99,8 %).

Die positive Übereinstimmung lag bei 100,0 % (95%-Konfidenzintervall: 90,6–100,0 %).

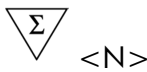









Die negative Übereinstimmung lag bei 98,0 % (95%-Konfidenzintervall: 89,7–99,7 %).

Literatur

1. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. Levine, R.L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
3. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter, E.J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
6. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
7. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14.
8. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
9. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.

Symbole

Folgende Symbole werden auf der Verpackung und den Etiketten verwendet:

	Kit enthält Reagenzien für < N > Reaktionen
	Zur Verwendung bis
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Beachten Sie die Anwendungshinweise

Kontaktinformationen

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support oder erhalten Sie unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit (24)	Für 24 Reaktionen: V617F-Positivkontrolle, V617F-Negativkontrolle, V617F-Cut-off-Probe, Primer- und Sonden-Mischungen JAK2 und JAK2-V617F	673823
Rotor-Gene Q MDx – für IVD-validierte Real-Time-PCR-Analysen bei klinisch-diagnostischen Applikationen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör und 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten; Installation und Unterweisung nicht inbegriffen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten, Installation und Unterweisung	9002033

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QIAamp® DNA Blood Maxi Kit – für die Isolierung genomischer DNA aus Blut		
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10)	Für 10 DNA-Maxi-Präparationen: 10 QIAamp Maxi-Spinsäulen, QIAGEN Protease, Puffer, 50-ml-Auffanggefäße (Collection Tubes)	51192
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50)	Für 50 DNA-Maxi-Präparationen: 50 QIAamp Maxi-Spinsäulen, QIAGEN Protease, Puffer, 50-ml-Auffanggefäße (Collection Tubes)	51194

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

Dieses Produkt ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen. *ipsogen* Produkte dürfen weder wiederverkauft noch für den Wiederverkauf modifiziert oder ohne vorherige schriftliche Zustimmung durch QIAGEN zur Herstellung kommerzieller Produkte verwendet werden.

Die in diesem Dokument gemachten Angaben können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. QIAGEN übernimmt keine Verantwortung für Fehler, die möglicherweise in diesem Dokument vorhanden sind. Die Angaben in diesem Dokument zum Zeitpunkt der Veröffentlichung werden als vollständig und richtig erachtet. In keinem Fall haftet QIAGEN für zufällige, besondere, mehrfache oder Folgeschäden, die aus oder in Verbindung mit dem Gebrauch dieses Dokuments entstehen können.

Die Einhaltung der angegebenen Spezifikationen der *ipsogen* Produkte wird zugesichert. QIAGENS einzige Verpflichtung und der ausschließliche Anspruch des Kunden beschränken sich auf den kostenfreien Ersatz von Produkten für den Fall, dass die Produkte nicht die zugesicherte Leistung einhalten.

Die JAK2-V617F-Mutation und deren Nutzung unterliegen dem Schutz von Patenten, einschließlich des europäischen Patents EP1692281, der US-Patente 7.429.456 und 7.781.199, der beantragten US-Patente US20090162849 und US20120066776 sowie den entsprechenden Patenten in anderen Ländern.

Der Kauf dieses Produkts gewährt keinerlei Recht, das Produkt bei klinischen Studien zu Arzneimitteln, die auf JAK2-V617F abzielen, einzusetzen. Für derartige Verwendungszwecke entwickelt QIAGEN spezifische Lizenzprogramme. Wenden Sie sich diesbezüglich bitte per E-Mail an unsere Rechtsabteilung unter jak2licenses@qiagen.com.

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *ipsogen*®, MutaSearch®, Rotor-Gene® (QIAGEN-Gruppe); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); HybProbe®, LightCycler®, TaqMan® (Roche-Gruppe).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit darf nur gemäß den Angaben im *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit Handbuch und ausschließlich mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit Handbuch und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich genannten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

HB-1354-004 © 2013–2016 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

