

August 2016

Håndbog til *ipsogen*[®] JAK2 MutaQuant[®]-kit

 12 (katalog nr. 673522)

 24 (katalog nr. 673523)

Version 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostik

Til brug sammen med Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT
SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System og
LightCycler[®] instrumenter



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1072501DA



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyse-teknologier, der muliggør isolation og påvisning af indholdet i enhver biologisk prøve. Vores avancerede høj kvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder inden for:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- mikroRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyse-teknologier

Vores opgave er at gøre Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. For yderligere information, se **www.qiagen.com**.

Indhold

Tilsigtet anvendelse	4
Resumé og forklaring	4
Funktionsprincip	6
Medfølgende materialer	9
Kittets indhold	9
Nødvendige materialer, der ikke medfølger	11
Advarsler og forholdsregler	12
Almene forsigtighedsregler	12
Opbevaring og håndtering af reagenser	13
Procedure	14
Klargøring af prøve-DNA	14
Protokoller	
■ qPCR op Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller Rotor- Gene Q 5plex HRM-instrumenter med rotor til 72 rør	15
■ qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og LightCycler 480-instrumentet	20
■ qPCR på LightCycler 1.2-instrumentet	26
Tolkning af resultater	30
Fejlfindingsvejledning	34
Kvalitetskontrol	38
Ansvarsbegrænsninger	38
Ydelsesegenskaber	39
Ikke-kliniske studier	39
Kliniske studier	40
Referencer	42
Symboler	43
Kontaktoplysninger	43
Bestillingsinformation	44

Tilsigtet anvendelse

ipsogen JAK2 MutaQuant-kittet er en kvantitativ in vitro-test, der er beregnet til påvisning og kvantificering af JAK2 V617F/G1849T-allele i genomt DNA ekstraheret af blod fra personer med mistanke om myeloproliferativ neoplasie (MPN).

Fraværet af JAK2 V617F/G1849T-mutationen udelukker ikke tilstedeværelsen af andre JAK2-mutationer. Testen kan rapportere falsk negative resultater, hvis der er flere mutationer i nukleotiderne 88504 til 88622 (1).

Bemærk: Kittet skal bruges i henhold til instruktionerne i denne vejledning og sammen med validerede reagenser og instrumenter. Enhver ikke-godkendt anvendelse af dette produkt og/eller ændring af komponenterne gør QIAGENs ansvar ugyldigt.

Resumé og forklaring

En recidiv somatisk mutation, V617F, som påvirker Janus tyrosin kinase 2 (JAK2) genet, er identificeret i 2005 (2–5), der førte til et stort gennembrud i forståelsen, klassifikationen og diagnosen af myeloproliferative neoplasier (MPN). JAK2 er et kritisk intracellulært signalmolekyle for en række cytokiner, herunder erythropoietin.

JAK2 V617F-mutationen påvises hos >95 % af patienter med polycytæmia vera (PV), hos 50-60 % af patienter med essentiel trombocytæmi (ET) og hos 50 % af patienter med primær myelofibrose (PMF). JAK2 V617F er også blevet påvist i sjældne tilfælde af kronisk myelomonocytisk leukæmi, myelodysplastisk syndrom, systemisk mastocytose og kronisk neutrofil leukæmi, men hos 0 % af CML (6).

Mutationen svarer til en ændring i et enkelt nukleotid i JAK2-nukleotidet 1849 i exon 14, der medfører en unik substitution af valin (V) til fenylalanin (F) på proteinets position 617 (JH2-domæne). Det fører til konstitutiv aktivering af JAK2, hæmatopoietisk transformation in vitro og erythropoietin-uafhængig erytroid kolonidannelse (EEC) hos alle patienter med PV og en stor andel af ET- og PMF-patienter (7). JAK2 V617F repræsenterer en vigtig faktor i transformationen af hæmatopoietiske celler i MPN, men de præcise patologiske mekanismer, der ved samme unikke mutation fører til sådanne forskellige kliniske og biologiske enheder, er endnu ikke fuldt ud klarlagt.

Diagnosen af MPN var traditionelt baseret på klinisk knoglemarvshistologi og cytogene kriterier. Opdagelsen af en sygdomsspecifik molekylær markør forenkler processen og forbedrer samtidig den diagnostiske præcision. Påvisningen af JAK2 V617F-mutationen indgår nu i WHO's 2008 referencekriterier for diagnose af BCR-ABL-negativ MPN (tabel 1), og tilstedeværelsen af denne mutation er et major kriterium til bekræftelse af diagnosen.

Table 1. WHO's criteria for diagnosis of MPN (adapted from reference 8)

Kriterier for en diagnose af polycytæmi vera (PV)	
Major	1. Hæmoglobin (Hgb) >18,5 g.dl ⁻¹ (mænd) eller >16,5 g.dl ⁻¹ (kvinder) eller Hgb eller hæmatokrit (Hct) >99. percentil af referenceområdet for alder, køn eller boligens højde over havet eller Hgb >17 g.dl ⁻¹ (mænd) eller >15 g.dl ⁻¹ (kvinder), hvis knyttet til varig stigning på ≥2 g.dl ⁻¹ fra baseline, der ikke kan tilskrives korrektionen af jernmangel eller Forhøjede røde blodlegemer >25 % over den gennemsnitlige normal forventede værdi 2. Tilstedeværelse af <i>JAK2V617F</i> eller lignende mutation
Minor	1. Knoglemarv trilineage myeloproliferation 2. Subnormalt serum erythropoietin 3. Endogen erytroid kolonidannelse (EEC)
Kriterier for en diagnose af essentiel trombocytæmi (ET)	
Major	1. Trombocytal $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Produktion af megakaryocyt med stor og moden morfologi. Ingen eller lille produktion af granulocytter eller erythrocytter. 3. Opfylder ikke WHO's kriterier for kronisk myeloid leukæmi (CML), PV, primær myelofibrose (PMF), myelodysplastisk syndrom (MDS) eller anden myeloid neoplasie 4. Demonstration af <i>JAK2V617F</i> eller anden klonal markør eller Ingen evidens på reaktiv trombocytose
Minor	-
Kriterier for en diagnose af primær myelofibrose (PMF)	
Major	1. Produktion af megakaryocytter og atypier ledsaget af enten retikuliner og/eller kollagen fibrose eller Hvis der ikke foreligger retikuliner fibrose skal ændringerne i megakaryocytter ledsages af forhøjet knoglecellularitet, produktion af granulocytter og ofte nedsat erythropoiesis (dvs. præfibrotisk PMF) 2. Opfylder ikke WHO's kriterier for (CML), PV, MDS eller anden myeloid neoplasie 3. Demonstration af <i>JAK2V617F</i> eller anden klonal markør eller Ingen evidens på reaktiv knoglefibrose
Minor	1. Leukoerythroblastose 2. Forhøjet serum-laktatdehydrogenase (LDH) 3. Anæmi 4. Palperbar splenomegali

Internationale eksperter har for nyligt foreslået kriterier for terapeutiske forsøg i forbindelse med PV og ET. Ud fra data om allograft, alfainterferon eller hydroxyurea indgår kvantificering af *JAK2V617F* nu som et nyttigt redskab til

monitorering af behandlingsrespons (9). Der er observeret en reduceret JAK2 V617F-byrde som respons på nogle af de nye målrettede lægemidler mod JAK2 i klinisk udvikling (10).

Funktionsprincip

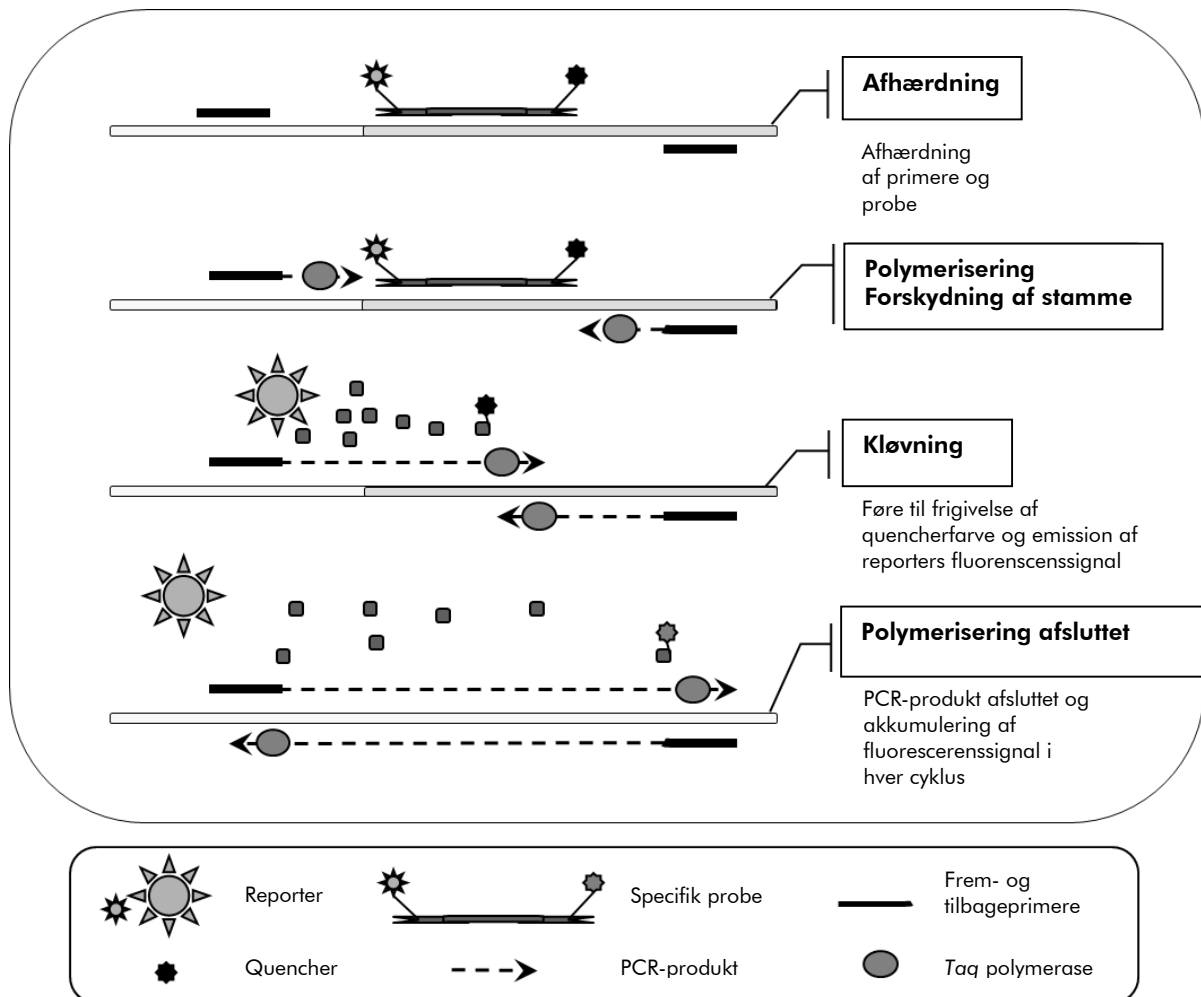
Der er foreslået forskellige teknikker til en kvantitativ bestemmelse af andelen af enkelte nukleotidpolymorfismer (SNP) i DNA-prøver. Af disse foretrækkes metoder, der baseres på i kvantitativ polymerasekædereaktion i realtid på grund af deres højere sensitivitet, der muliggør monitorering af allelbyrden på langs. Mange af disse teknikker har en moderat sensitivitet på 1-10 %, f.eks. TaqMan[®] alleldiskrimination, Pyrosequencing[®], smeltekurveanalyse og direkte sekvensering. Nogle som f.eks. smeltekurve og sekvensering er kun semikvantitative, mens andre som f.eks. Pyrosequencing, kræver behandling efter PCR eller instrumenter, der ikke er umiddelbart tilgængelige eller har prohibitivt høje konfigurationsomkostninger ved rutinemæssige laboratorietests. En meget sensitiv metode med en sensitivitet på <0,1 % kræver brug af en SNP-specifik primer, der tillader selektiv amplifikation af mutanten eller vildtype-allel, der nemt kan påvises på et realtids qPCR-instrument. *ipsogen JAK2 MutaQuant* -kittet er baseret på denne teknik.

Brugen af qPCR muliggør præcis kvantificering af PCR-produkter under den eksponentielle fase af PCR-amplifikationsprocessen. Kvantitative PCR-data kan hurtigt fremskaffes uden behandling efter PCR ved påvisning i realtid af fluorescerende signaler under og/eller efter PCR-cyklussen, hvilket markant reducerer risikoen for kontaminering af PCR-produktet. Der findes i øjeblikket 3 hovedtyper qPCR-teknikker. qPCR-analyse med SYBR[®] Green I Dye, qPCR-analyse med hydrolyseprober og qPCR-analyse med hybridiseringsprober

Denne analyse benytter qPCR-princippet om tofarvet oligonukleotidhydrolyse. Under PCR hybridiseres frem- og tilbageprimere til en specifik sekvens. Samme mix indeholder en tofarvet oligonukleotid. Denne probe, der består af en oligonukleotid, som er mærket med en 5' reporter farve og en efterfølgende 3'quencher farve, hybridiseres til en målsekvens i PCR-produktet. qPCR-analyse med hydrolyseprober benytter 5'→3' eksonukleaseaktivitet af *Thermus aquaticus* (Taq) DNA-polymerase. Når proben er intakt, medfører reporterfarvens nærhed til quencher-farven suppression af reporterfluorescensen primært ved overførsel af energi af typen Förster.

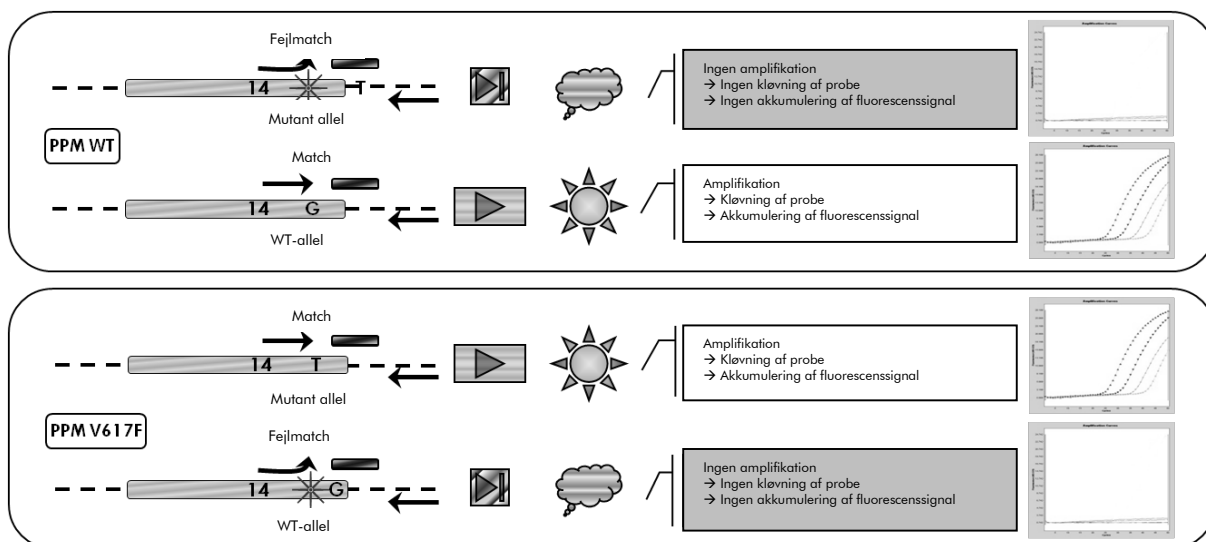
Under PCR afhælder proben mellem frem- og tilbageprimerstederne, hvis der et interessant mål til stede. DNA-polymerasens 5'→3' eksonukleaseaktivitet kløver kun proben mellem reporter og quencher, hvis proben hybridiseres til målet. Probefragmenterne forskydes derefter i forhold til målet, og polymeriseringen af stammen fortsætter. Probens 3'-ende er blokeret for at forhindre udvidelse af proben under PCR (figur 1). Denne proces forekommer i hver cyklus og forstyrrer ikke produktets eksponentielle akkumulering.

Stigningen i fluorescenssignalet påvises kun, hvis målsekvensen supplerer proben og således forstærkes under PCR. Ikke-specifik amplifikation påvises ikke på grund af disse krav. Dermed er stigningen fluorescens direkte proportional til målampifikationen under PCR.



Figur 1. Reaktionsprincip.

Den kvantitative allelspecifikke PCR-teknologi, der bruges i dette analysekit, muliggør en sensitiv, præcis og reproducerbar påvisning af SNP'er. Denne teknik er baseret på brugen af specifikke fremprimere til vildtype- og V617F-allelen (11). Kun en perfekt match mellem primer og mål-DNA muliggør udvidelse og amplifikation i PCR (figur 2).



Figur 2. Allelspecifik PCR. Brug af vildtype- eller V617F-primere og probemix muliggør specifik påvisning af vildtype- eller muteret allel i to særskilte reaktioner gennemført med samme prøve. Resultater kan udtrykkes som procent af VF-kopier blandt totale JAK2-kopier.

Medfølgende materialer

Kittets indhold

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalognr.		673522	673523
Antal reaktioner		12	24
V617F positive control (V617F positiv kontrol) (100% V617F allele) [100 % V617F-allele]	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (V617F negativ kontrol) (100% wild-type allele) [100 % vildtype-allel]	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF standardfortynding, 50 kopier) (5 x 10 ¹ V617F copies/5 µl) [5 x 10 ¹ V617F-kopier/5 µl]	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (M2-VF standardfortynding, 500 kopier) [5 x 10 ² V617F copies/5 µl] (5 x 10 ² V617F-kopier/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (M3-VF standardfortynding, 5000 kopier) (5 x 10 ³ V617F copies/5 µl) [5 x 10 ³ V617F-kopier/5 µl]	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (M4-VF standardfortynding, 50.000 kopier) (5 x 10 ⁴ V617F copies/5 µl) [5 x 10 ⁴ V617F-kopier/5 µl]	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (WT-1 standardfortynding, 50 kopier) (5 x 10 ¹ wild-type copies/5 µl) [5 x 10 ¹ vildtype-kopier/5 µl]	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalognr.		673522	673523
Antal reaktioner		12	24
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (WT-2 standardfortynding, 500 kopier) (5 x 10 ² wild-type copies/5 µl) [5 x 10 ² vildtype-kopier/5 µl]	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (WT-3 standardfortynding, 5000 kopier) (5 x 10 ³ wild-type copies/5 µl) [5 x 10 ³ vildtype-kopier/5 µl]	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT-4 standardfortynding, 50.000 kopier) (5 x 10 ⁴ wild-type copies/5 µl) [5 x 10 ⁴ vildtype-kopier/5 µl]	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Primere og probemix JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (Primere og probemix JAK2 V617F†)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (Håndbog til ipsogen JAK2 MutaQuant-kit (Engelsk))		1	1

* Mix af specifikke tilbage- og fremprimere til vildtype JAK2 kontrolgenet plus en specifik FAM™-TAMRA™-probe.

† Mix af specifikke tilbage- og fremprimere til JAK2 V617F-mutationen plus en specifik FAM-TAMRA-probe.

Bemærk: Vortex og centrifuger kortvarigt standardfortyndingerne samt primerne og probemix før brug.

Nødvendige materialer, der ikke medfølger

Når der arbejdes med kemikalier skal der altid bæres egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

Reagenser

- Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet
- Buffer og Taq DNA-polymerase: De validerede reagenser er TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. 4304437) og LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat.nr. 04535286001) eller LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, kat.nr. 03515567001)

Forbrugsartikler

- Nukleasefrie, aerosolresistente, sterile PCR-pipettespidser med hydrofobe filtre
- 0,5 ml eller 1,5 ml nukleasefrie PCR-rør
- Is

Udstyr

- Mikroliterpipette* beregnet til PCR (1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l)
- Bordcentrifuge* med rotor til 0,5 ml/1,5 ml reagensglas og mikroplader (centrifugeringshastighed 13.000-14.000 rpm)
- Realtids PCR-instrument:* Rotor-Gene Q 5plex HRM[®] eller anden Rotor- Gene, LightCycler 1.2 eller 480, ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og dermed forbundet specifikt materiale
- Biofotometer

* Sørg for at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anbefalinger.

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnosticering

Når der arbejdes med kemikalier, skal der altid bæres egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller. For at få yderligere oplysninger konsulteres de behørigte sikkerhedsdatablade (SDSs). Dette fås online i praktisk og kompakt PDFformat hos www.qiagen.com/safety hvor du kan finde, se og udskrive sikkerhedsdatabladet for hvert QIAGEN-kit og kit-komponent.

Prøvepræparat- og analyseaffald bortskaffes ifølge de lokale sikkerhedsregler.

Almene forsigtighedsregler

Brugen af qPCR-tests kræver god laboratoriepraksis, inkl. vedligeholdelse af udstyr, der er specielt beregnet til molekylær biologi og opfylder gældende regler og relevante standarder.

Dette kit er beregnet til in vitro-diagnosticering. Reagenser og instruktioner, der leveres med dette kit, er valideret til optimal ydelse. Yderligere fortynding af reagenserne eller ændring af inkubationstider og -temperaturer kan medføre fejlagtige eller diskordante data. PPM-WT- og PPM-VF-reagenser kan ændre sig, hvis de udsættes for lys. Alle reagenser er formuleret specifikt til brug sammen med denne test. For at sikre en optimal testydelse må der ikke foretages substitutioner.

Vær meget forsigtig for at forhindre:

- DNase-kontaminering, der kan forårsage nedbrydning af skabelon-DNA'et
- DNA- eller PCR-overførselskontaminering, der giver falsk positivt signal

Vi anbefaler derfor følgende.

- Brug nukleasefrit laboratorieudstyr (f.eks. pipetter, pipettespidser, reaktionsglas), og brug handsker, når analysen udføres.
- Brug nye aerosolresistente pipettespidser til alle pipetteringstrin for at undgå krydskontaminering af prøverne og reagenserne.
- Klargør præ-PCR-mastermix med det dertil beregnede materiale (pipetter, spidser osv.) i et dertil beregnet område, hvor der ikke indføres DNA-matricer (DNA, plasmid eller PCR-produkter). Tilføj skabelon i et separat område (helst i et andet lokale) med specifikt materiale (pipetter, spidser osv.).

Opbevaring og håndtering af reagenser

Kittene sendes på tøris og skal opbevares ved -15°C til -30°C efter modtagelse.

- Minimér primernes og probemixenes (PPM-WT- og PPM-VF-rør) kontakt med lys.
- Bland forsigtigt og centrifugér rørene, før de åbnes.
- Alle kittets komponenter skal opbevares i de originale beholdere.

Disse opbevaringsbetingelser gælder for både åbnede og uåbnede komponenter. Komponenter, der opbevares under andre betingelser, end angivet på etiketterne, har måske ikke den korrekte ydelse og kan påvirke analyseresultaterne negativt.

Udløbsdatoerne for hvert reagens er angivet på etiketten på hver enkelt komponent. Under korrekte opbevaringsbetingelser bevarer produktet sin ydelse indtil den udløbsdato, der er trykt på etiketten.

Der er ingen tydelige tegn, der angiver produktets instabilitet. Positive og negative kontroller skal dog gennemføres med jævne mellemrum samtidig med ukendte prøver.

Procedure

Klargøring af prøve-DNA

Genomt DNA skal fremskaffes fra enten fuldblod, oprenset perifert blod, lymfocytter fra fuldblod, polynukleære celler eller granulocytter. For at sikre sammenlignelige resultater anbefales det at bruges samme cellulære fraktion og DNA-ekstraktionsmetode. DNA-ekstraktion kan udføres med en hjemmelavet metode eller et kommercielt tilgængeligt kit.

DNA-mængden skal bestemmes ved at måle prøvens optiske densitet (OD) ved 260 nm, og DNA-kvaliteten kan bestemmes enten vha. spektrofotometri eller gel* elektroforese.

- OD_{260}/OD_{280} -forholdet skal være 1,7-1,9, og forhold, der er under dette, kan være tegn på proteinkontaminering eller tilstedeværelse af organiske kemikalier.
- Elektroforetisk analyse af en 0,8-1,0 % agarosegel* burde muliggøre visualisering af det isolerede DNA som et distinkt bånd på ca. 20 kb (en let udstrykning giver acceptable resultater).

Det resulterende DNA skal fortyndes til en koncentration på 5 ng/ μ l i 1x TE-buffer* ved pH 8,0 og derefter opbevares ved +4 til +8° C i 1 uge eller ved -20° C, hvis længere opbevaringstid er påkrævet.

qPCR-reaktionen er optimeret til DNA-prøver med 25 ng oprenset genomt DNA.

* Når der arbejdes med kemikalier skal der altid bæres egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

Protokol: qPCR op Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller Rotor- Gene Q 5plex HRM-instrumenter med rotor til 72 rør

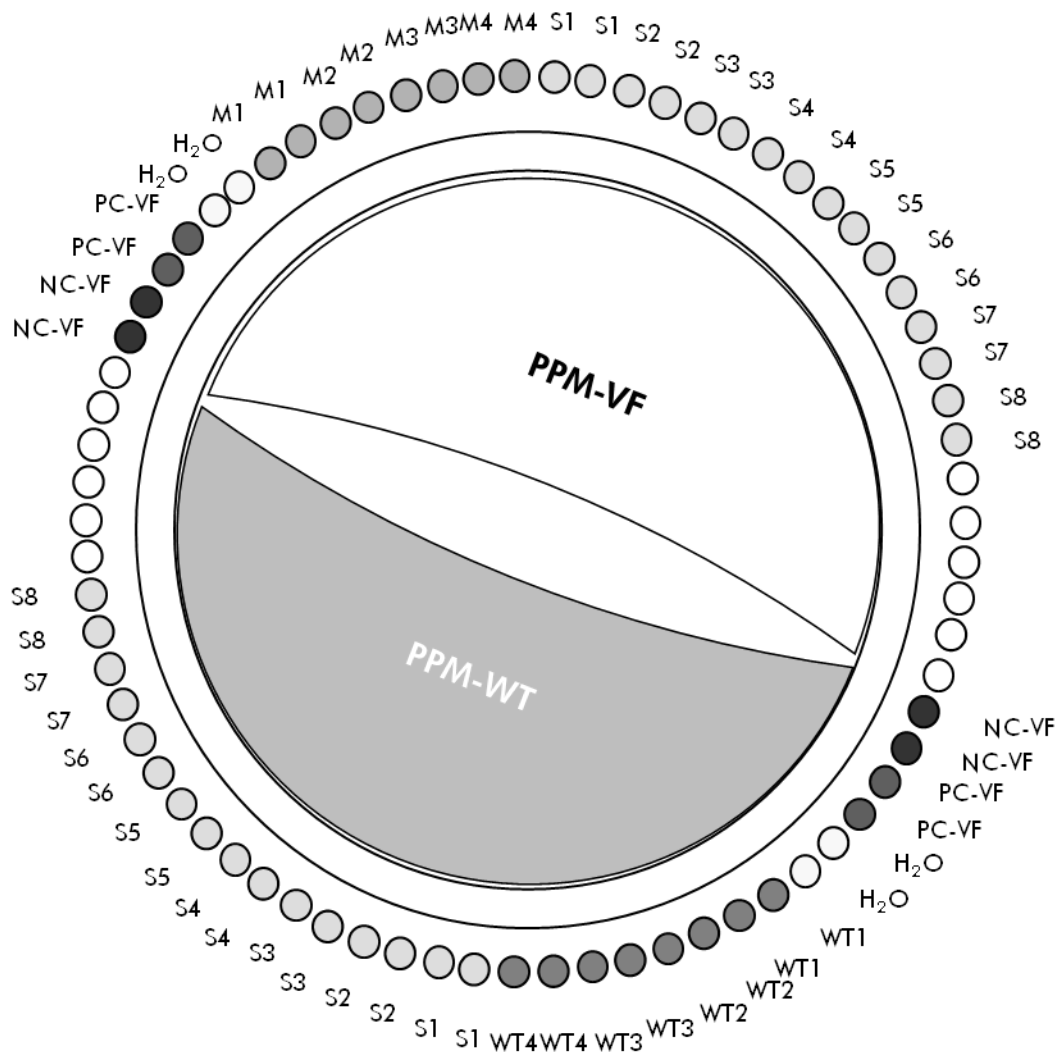
Når dette instrument bruges, anbefaler vi at udføre alle målinger in duplo, som angivet i tabel 2.

Tabel 2. Antal reaktioner for Rotor-Gene Q-instrumenter med rotor til 72 rør

Prøver	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primere og probemix (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	8 reaktioner, hver testet in duplo
n DNA-prøver	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: positiv kontrol (PC-VF) og negativ kontrol (NC-VF), hver testet in duplo
Vandkontrol	2 reaktioner
Med JAK2 vildtype-primere og probemix (PPM-WT)	
4 vildtype-standarder	8 reaktioner, hver testet in duplo
n DNA-prøver	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: PC-VF og NC-VF, hver testet in duplo
Vandkontrol	2 reaktioner

Prøvebehandling på Rotor-Gene Q-instrumenter med rotor til 72 rør

Vi anbefaler at teste mindst 8 DNA-prøver med kittet til 24 reaktioner (katalognr. 673523) og mindst 6 DNA-prøver med kittet til 12 reaktioner (katalognr. 673522) i samme forsøg for at optimere brugen af standarderne og primerne og probemixene.



Figur 3. Foreslået rotorkonfiguration til hvert forsøg med ipsogen 24 prøver JAK2 MutaQuant-kittet. PC-VF: V617F positiv kontrol, **NC-VF:** V617F negativ kontrol, **M-VF:** V617F-standarder, **M-WT:** vildtype-standarder, **S:** DNA-prøve, **H₂O:** vandkontrol.

Bemærk: Sørg omhyggeligt for altid at placere en prøve, der skal testes, i rotorens position 1. I modsat fald vil instrumentet ikke gennemføre kalibrering under kalibreringstrinnet, og der vil blive opsamlet forkerte fluorescensdata.

Fyld de andre positioner med tomme rør.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrumenter med rotor til 72 rør

Bemærk: Udfør alle trin på is.

Procedure

1. **Optø alle nødvendige komponenter, og anbring dem på is.**
2. **Klargør det følgende qPCR-mix i henhold til det antal prøver, der behandles.**

Alle koncentrationer gælder reaktionens endelige volumen.

Tabel 3 og 4 beskriver pipetteringsskemaet ved klargøring af et reagensmix, beregnet for at opnå et endeligt reaktionsvolumen på 25 μ l. Der kan klargøres et præmix i forhold til antallet af reaktioner med samme primer og probemix (enten PPM-VF eller PPM-WT). Ekstra volumener indgår for at kompensere for pipetteringsfejl.

Tabel 3. Klargøring af qPCR-mix

Komponent	1 reaktion (μl)	V617F-præmix 30 + 1 reaktioner (μl)	Endelig koncentration
TaqMan Universal PCR Master-mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primere og probemix, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet	6,5	201,5	–
Prøve (tilsættes i trin 4)	5,0	5 hver	–
Totalt volumen	25,0	25 hver	–

Tabel 4. Klargøring af qPCR-mix

Komponent	1 reaktion (μl)	WT-præmix 30 + 1 reaktioner (μl)	Endelig koncentration
TaqMan Universal PCR Master-mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primere og probemix, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet	6,5	201,5	–
Prøve (tilsættes i trin 4)	5,0	5 hver	–
Totalt volumen	25,0	25 hver	–

3. **Dispensér 20 μ l af qPCR-præmixet (VF eller WT) pr. rør.**
4. **Tilsæt 5 μ l af det materiale, der skal kvantificeres (25 ng prøve genomt DNA eller kontrol) i det tilhørende rør (totalt volumen 25 μ l).**
5. **Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.**
6. **Anbring rørene i varmecykleren iht. producentens anbefalinger.**
7. **Programmér Rotor-Gene Q-instrumentet med varmecyklusprogrammet som vist i tabel 5.**

Tabel 5. Temperaturprofil

Analyseform	Kvantitering
Hold	Temperatur: 50 °C Tid: 2 min.
Hold 2	Temperatur: 95° C Tid: 10 min.
Cyklus	50 gange 95° C i 15 sek. 62° C i 1 min. med tilegnelse af FAM-fluorescens i kanalen Green: Enkelt

- 8. På Rotor-Gene Q-instrumenter vælges "Slope Correct" (Korriger hældning) til analysen. Vi anbefaler at indstille tærsklen til 0,03. Start varmecyklusprogrammet som vist i tabel 5.**

Protokol: qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og LightCycler 480-instrumentet

Når qPCR-udstyr med plade med 96 brønde bruges, anbefaler vi at udføre alle målinger in duplo, som angivet i tabel 6.

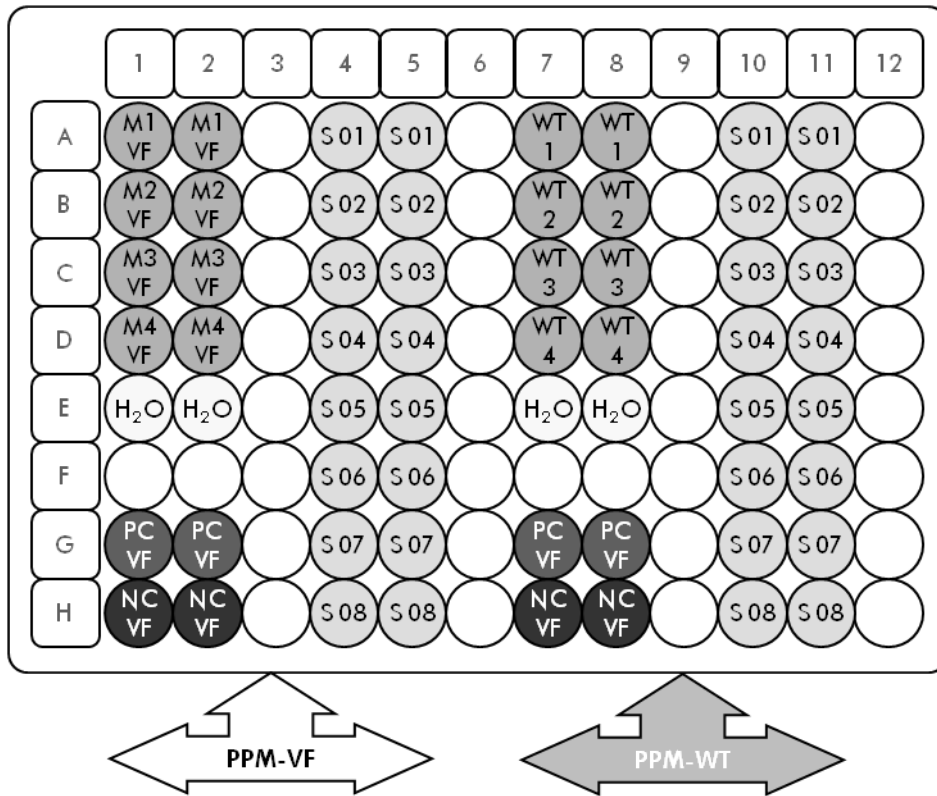
Table 6. Antal reaktioner med qPCR-udstyr med plade med 96 brønde

Prøver	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primere og probemix (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	8 reaktioner, hver testet in duplo
n DNA-prøver	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: PC-VF og NC-VF, hver testet in duplo
Vandkontrol	2 reaktioner
Med JAK2 vildtype-primere og probemix (PPM-WT)	
4 vildtype-standarder	8 reaktioner, hver testet in duplo
n DNA-prøver	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: PC-VF og NC-VF, hver testet in duplo
Vandkontrol	2 reaktioner

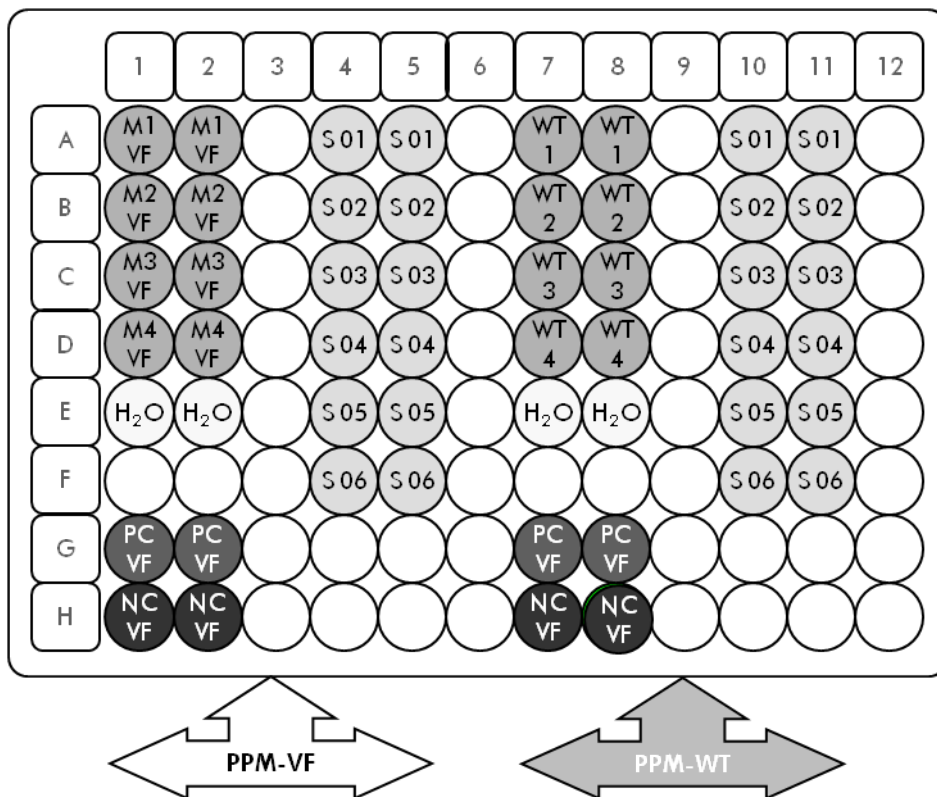
Behandling af prøver på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og LightCycler 480-instrumentet

Vi anbefaler at teste 8 DNA-prøver med kittet til 24 reaktioner (katalognr. 673523) og mindst 6 DNA-prøver med kittet til 12 reaktioner (katalognr. 673522) i samme forsøg for at optimere brugen af standarderne og primerne og probemixene.

Pladeskemaet i figur 4 viser et eksempel på et sådant forsøg med kittet til 24 reaktioner (katalognr. 673523), og figur 5 viser et eksempel på et sådant forsøg med kittet til 12 reaktioner (katalognr. 673422).



Figur 4. Foreslået pladekonfiguration til ét forsøg med kittet til 24 reaktioner (katalognr. 673523). PC-VF: V617F positiv kontrol, NC-VF: V617F negativ kontrol, M-VF: V617F-standarder, M-WT: vildtype-standarder, S: DNA-prøve, H₂O: vandkontrol



Figur 5. Foreslået pladekonfiguration til ét forsøg med kittet til 12 reaktioner (katalognr. 673522). PC-VF: V617F positiv kontrol, NC-VF: V617F negativ kontrol, M-VF: V617F-standarder, M-WT: vildtype-standarder, S: DNA-prøve, H₂O: vandkontrol

qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System og LightCycler 480-instrumentet

Bemærk: Udfør alle trin på is.

Procedure

1. **Optø alle nødvendige komponenter, og anbring dem på is.**
2. **Klargør det følgende qPCR-mix i henhold til det antal prøver, der behandles.**

Alle koncentrationer gælder reaktionens endelige volumen.

Tabel 7 og 8 beskriver pipetteringsskemaet ved klargøring af et reagensmix, beregnet for at opnå et endeligt reaktionsvolumen på 25 μ l. Der kan klargøres et præmix i forhold til antallet af reaktioner med samme primer og probemix (enten PPM-VF eller PPM-WT). Ekstra volumener indgår for at kompensere for pipetteringsfejl.

Tabel 7. Klargøring af qPCR-mix

Komponent	V617F-præmix			Endelig koncentration
	1 reaktion (μ l)	26 + 1 reaktioner (μ l)	30 + 1 reaktioner (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master-mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primere og probemix, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet	6,5	175,5	201,5	–
Prøve (tilsættes i trin 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalt volumen	25,0	25 hver	25 hver	–

Tabel 8. Klargøring af qPCR-mix

Komponent	WT-præmix			Endelig koncentration
	1 reaktion (μ l)	26 + 1 reaktioner (μ l)	30 + 1 reaktioner (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master-mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primere og probemix, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet	6,5	175,5	201,5	–
Prøve (tilsættes i trin 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalt volumen	25,0	25 hver	25 hver	–

3. **Dispensér 20 μ l af qPCR-præmixet (VF eller WT) pr. brønd.**
4. **Tilsæt 5 μ l af det materiale, der skal kvantificeres (25 ng prøve genomt DNA eller kontrol) i den tilhørende brønd (totalt volumen 25 μ l).**
5. **Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.**
6. **Luk pladen, og centrifuger kortvarigt (300 x g, i ca. 10 sekunder).**
7. **Anbring pladen i varmecyklern iht. producentens anbefalinger.**
8. **Programmér varmecyklern med varmecyklusprogrammet, og indstil instrumentet til tilegnelse af FAM fluorescensprobe med dobbelt etiket som vist i tabel 9 for ABI PRISM 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System eller tabel 10 for LightCycler 480-instrumentet.**

Tabel 9. Temperaturprofil for ABI PRISM 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Analyseform	Standardkurve - Absolut kvantitering
Hold	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
Hold 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
Cyklus	50 gange 95° C i 15 sekunder 63° C i 1 min. 30 sekunder med tilegnelse af FAM-fluorescens, quencher: TAMRA

Tabel 10. Temperaturprofil for LightCycler 480-instrumentet

Analyseform	Absolut kvantificering ("Abs Quant")
Detection formats (Påvisningsformater)	Vælg "Simple Probe" (Enkelt sonde) i vinduet Detection formats
Hold	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
Hold 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
Cyklus	50 gange 95° C i 15 sekunder 63° C i 1 min. 30 sekunder med tilegnelse af FAM-fluorescens, svarende til (483-533 nm) for LC-version 01 og (465-510 nm) for LC-version 02

- 9. Følg trin 9a for ABI PRISM 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Følg trin 9b for LightCycler 480-instrumentet.**
- 9a. ABI PRISM 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR-System: Vi anbefaler en grænse på 0,1. Start cyklusprogrammet som vist i tabel 9.**

9b. LightCycler 480: Vi anbefaler en Fit point-analysefunktion med en baggrund på 2,0 og en grænse på 2,0. Start varmecyklusprogrammet som vist i tabel 10.

Protokol: qPCR på LightCycler 1.2-instrumentet

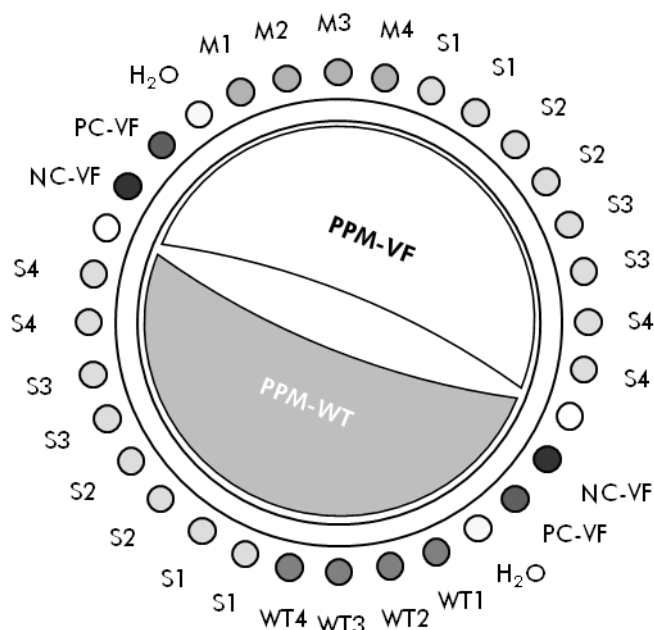
Når der bruges kapillærinstrumenter, anbefaler vi at måle prøve in duplo og kontroller kun én gang som vist i tabel 11.

Tabel 11. Antal reaktioner for LightCycler 1.2-instrumentet

Prøver	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primere og probemix (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	4 reaktioner, hver testet én gang
n DNA-prøver	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	2 reaktioner: PC-VF og NC-VF, hver testet én gang
Vandkontrol	1 reaktion
Med JAK2 vildtype-primere og probemix (PPM-WT)	
4 vildtype-standarder	4 reaktioner, hver testet én gang
n DNA-prøver	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	2 reaktioner: PC-VF og NC-VF, hver testet én gang
Vandkontrol	1 reaktion

Behandling af prøver på LightCycler 1.2-instrumentet

Vi anbefaler at teste 4 DNA-prøver i samme forsøg for at optimere brugen af standarderne og primerne og probemixene. Kapillærskemaet i figur 6 viser et eksempel på et forsøg.



Figur 6. Foreslået rotorkonfiguration til hvert forsøg med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet. PC-VF: V617F positiv kontrol, NC-VF: V617F negativ kontrol, M-VF: V617F-standarder, M-WT: vildtype-standarder, S: DNA-prøve, H₂O: vandkontrol.

qPCR på LightCycler 1.2-instrumentet

Bemærk: Særlige teknologiske krav betyder, at LightCycler-forsøg skal udføres med specifikke reagenser. Vi anbefaler at bruge LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe og følge producentens anvisninger for klargøring af Master Mix 5x.

Bemærk: Udfør alle trin på is.

Procedure

1. **Optø alle nødvendige komponenter, og anbring dem på is.**
2. **Klargør det følgende qPCR-mix i henhold til det antal prøver, der behandles.**

Alle koncentrationer gælder reaktionens endelige volumen.

Tabel 12 og 13 beskriver pipetteringskemaet ved klargøring af et reagensmix, beregnet for at opnå et endeligt reaktionsvolumen på 20 µl. Der kan klargøres et præmix i forhold til antallet af reaktioner med samme primer og probemix (enten PPM-VF eller PPM-WT). Ekstra volumener indgår for at kompensere for pipetteringsfejl.

Tabel 12. Klargøring af qPCR-mix

Komponent	1 reaktion (μl)	V617F-præmix 15 + 1 reaktioner (μl)	Endelig koncentration
Nyligt klargjort LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primere og probemix, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet	10,2	163,2	–
Prøve (tilsættes i trin 4)	5,0	5 hver	–
Totalt volumen	20,0	20 hver	–

Tabel 13. Klargøring af qPCR-mix

Komponent	1 reaktion (μl)	WT-præmix 15 + 1 reaktioner (μl)	Endelig koncentration
Nyligt klargjort LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primere og probemix, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasefrit vand i PCR-kvalitet	10,2	163,2	–
Prøve (tilsættes i trin 4)	5,0	5 hver	–
Totalt volumen	20,0	20 hver	–

3. Dispensér 15 μ l af qPCR-præmixet (VF eller WT) pr. kapillær.
4. Tilsæt 5 μ l af det materiale, der skal kvantificeres (25 ng prøve genomt DNA eller kontrol) i det tilhørende rør (totalt volumen 20 μ l).
5. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.
6. Anbring kapillærerne i de adaptore, der blev leveres med apparatet, og centrifugér kortvarigt (700 x g, i ca. 10 sekunder).
7. Anbring kapillærerne i varmecykleren iht. producentens anbefalinger.
8. Programmér LightCycler 1.2-instrumentet med varmecyklusprogrammet som vist i tabel 14.

Tabel 14. Temperaturprofil

Analyseform	Kvantificering
Hold 1	Temperatur: 55 °C Tid: 2 minutter Rampe: 20
Hold 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter Rampe: 20
Cyklus	50 gange 95° C i 15 sekunder, rampe: 20 66 °C i 1 minut, rampe. 20, med tilegnelse af FAM-fluorescens: Enkelt

9. Til LightCycler 1.2 anbefales F1/F2 og funktionen "2nd derivative analysis" (2. afledte analyse). Start varmecyklusprogrammet som vist i tabel 14.

Tolkning af resultater

Dataanalyseprincip

Data for værdien for grænsecyklus (C_T) og krydspunkt (C_P) kan eksporteres fra qPCR-instrumentet og indsættes i en Excel®-fil til analyse. Disse værdier kan derefter bruges til at beregne gennemsnitsværdien for C_P og C_T , og standardgennemsnitsværdierne C_T kan plottes for at få en standardkurve for både vildtype- og V617F-standarderne ved hjælp af følgende ligning og tabel 15.

$y =$ Gennemsnit C_P , $x = \log_{10} CN$, hvor $CN =$ genkopinummer i 5 μ l-prøven

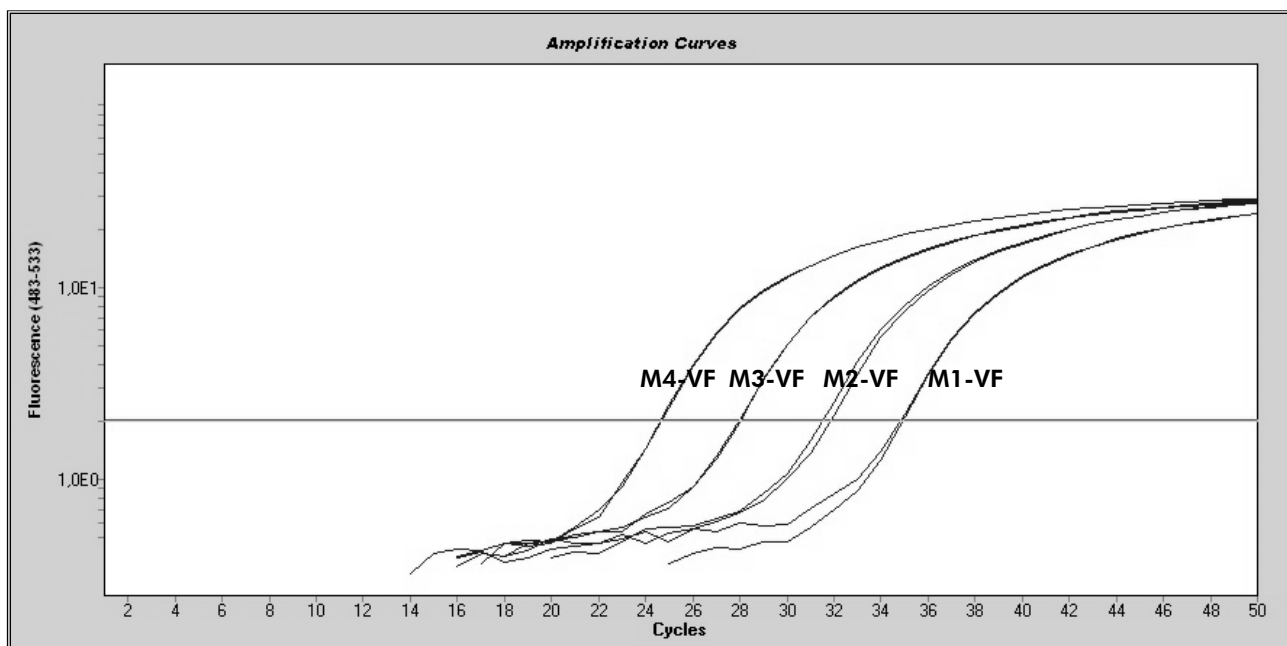
Tabel 15. Kvantitative data for vildtype- og V617F-standarderne

Standard	Kopinummer (CN)	$\log_{10} CN$
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

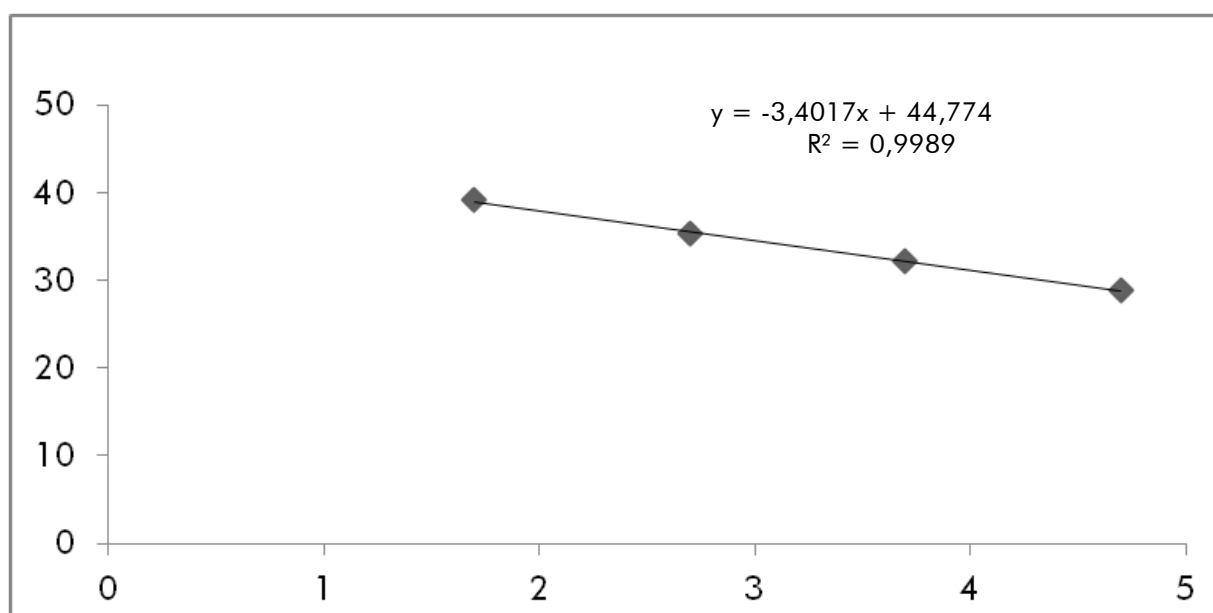
Bemærk: Hver bruger skal måle sin egen reproducerbarhed på deres laboratorium.

Standardkurve og kvalitetskriterier

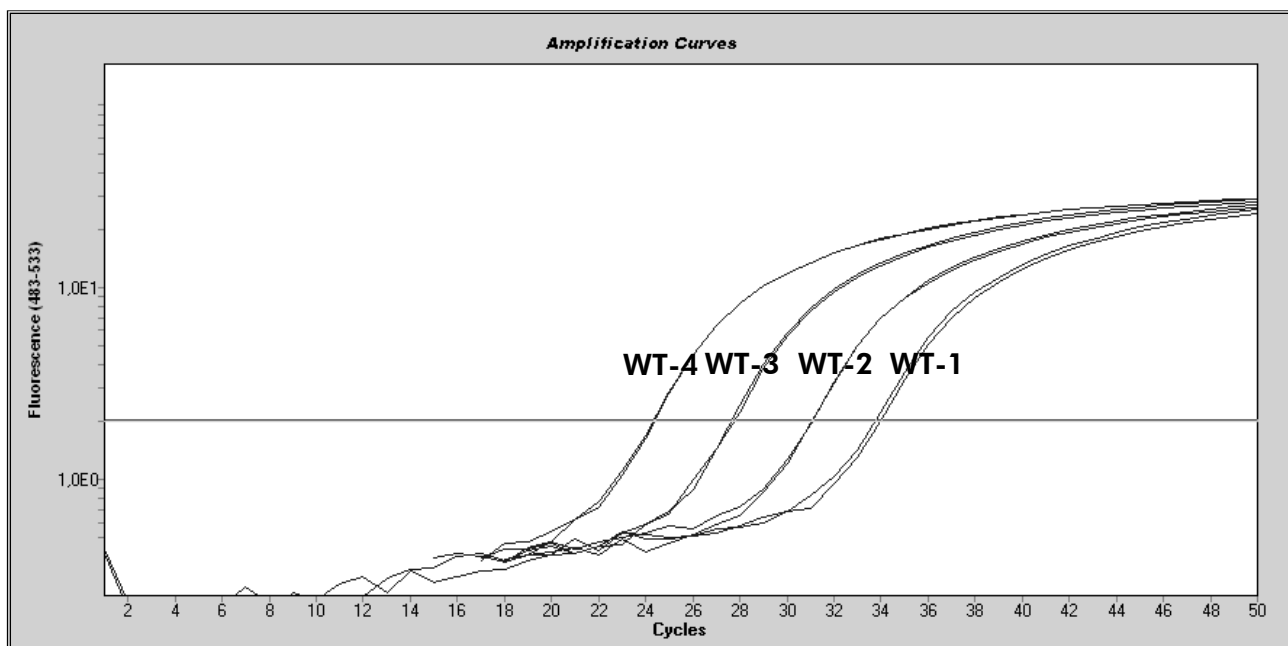
Figur 7 og 9 viser eksempler på resultater, der er opnået med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet, og figur 8 og 10 viser et eksempel på den teoretiske kurve, der er beregnet ud fra 4 standardfortyndinger.



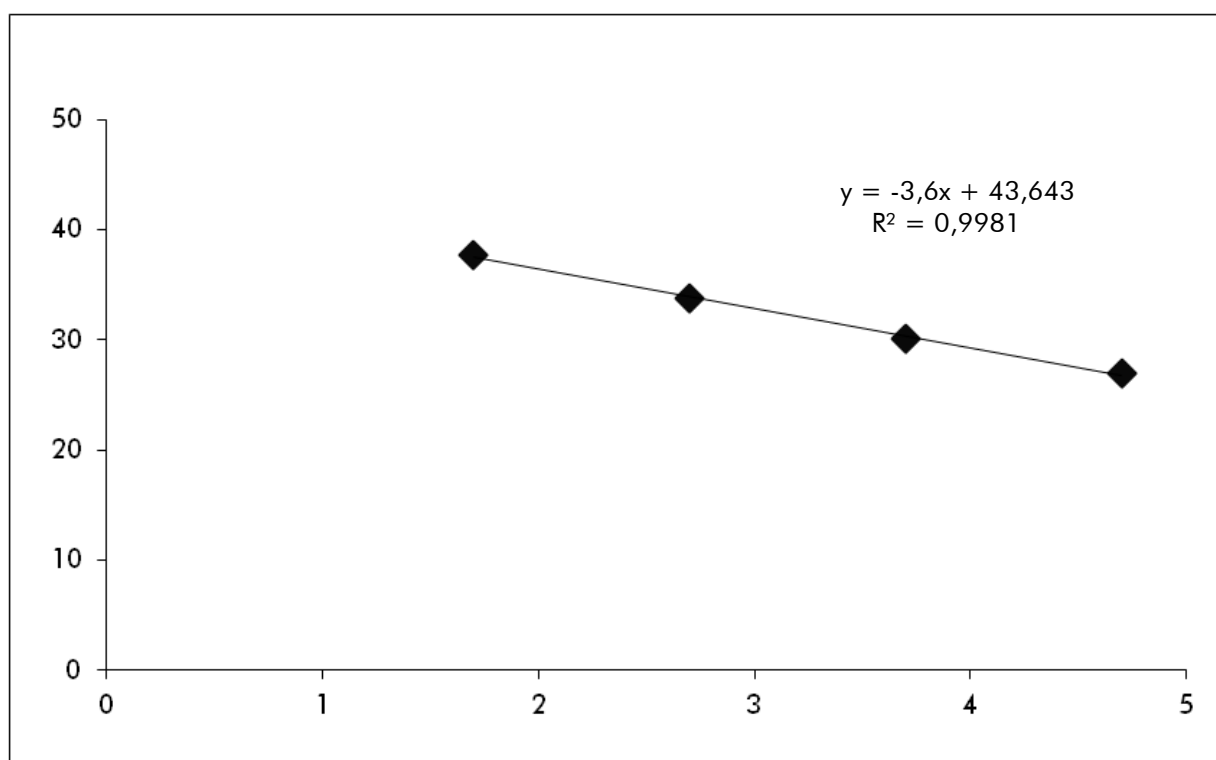
Figur 7. Amplifikationsplot af 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 og 5×10^4 kopier af JAK2 V617F-plasmidet (hhv. kontrol M1-VF, M2-VF, M3-VF og M4-VF).



Figur 8. Standardkurve for JAK2 V617F.



Figur 9. Amplifikationsplot af 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 og 5×10^4 kopier af JAK2-vildtype-plasmidet (hhv. kontrol WT-1, WT-2, WT-3 og WT-4).



Figur 10. Standardkurve for JAK2-vildtype.

Eftersom standarden er 10x fortyndinger, er kurvens teoretiske hældning $-3,32$. En hældning på mellem $-3,0$ og $-3,9$ er acceptabel, så længe R^2 er $>0,95$ (12). En værdi for R^2 på $>0,98$ ønskes for at opnå præcise resultater (13).

Standardkurvens ligninger kan derefter bruges til at beregne V617F og WT- \log_{10} kopinumre i de ukendte prøver.

V617F-standardkurvens ligning skal bruges til at transformere rå C_P/ C_T -værdigennemsnit (opnået med PPM-VF) for de ukendte prøver og kontrollerne til JAK2 V617F-kopinumre (CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Gennemsnit } C_{pV617F} - \text{Standardkurve-intercept}_{V617F})}{\text{Standardkurvehældning}_{V617F}}$$

Vildtypestandardkurvens ligning skal bruges til at transformere rå C_P/ C_T -værdigennemsnit (opnået med PPM-WT) for de ukendte prøver og kontrollerne til JAK2 vildtypekopinumre (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Gennemsnit } C_{pWT} - \text{Standardkurve-intercept}_{WT})}{\text{Standardkurvehældning}_{WT}}$$

Angivelse af resultaterne

Resultaterne er relative til 25 ng totalt genomt DNA og skal udtrykkes som en procent af JAK2 V617F som følger.

$$\text{JAK2 V617F \%} = \frac{CN_{V617F}}{(CN_{V617F} + CN_{WT})} \times 100$$

Reproducerbarhed mellem gentagelser.

De opnåede data skal være konstante fra gentagelse til gentagelse.

Positive og negative kontroller

Den positive kontrol eller PC-VF skal give en JAK2 V617F-procent, der er højere end 99,9 %.

Den negative kontrol eller NC-VF skal give en JAK2 V617F-procent, der er lavere end 0,1 %.

Hvis disse kontroller ikke fungerer korrekt, henvises til en løsning i "Fejlfindingsvejledning" på side 34.

Vandkontroller

Negative kontroller skal give nul CN for både JAK2 V617F- og JAK2-vildtype-påvisningen.

En positiv vandkontrol er et resultat af krydskontaminering. Find en løsning i "Fejlfindingsvejledning" herunder.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsguide kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" [Hyppigt stillede spørgsmål] hos vort Technical Support Center:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se "Kontaktoplysninger" på side 43).

Kommentarer og forslag

Standardkurve for vildtype eller V617F er ikke lineær

Vending af hætteglasset, vending under distribution, krydskontaminering, delvis nedbrydning af standarden, PQPCR-reagens, ikke-specifik amplifikation eller PCR-programfejl.

Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionens konfiguration.

Opbevar *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet ved -15 til -30° C, og beskyt primere og probemixes mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 13.

Undgå gentagen nedfrysning og optøning.

Intet eller lavt signal for en standard

Standard ikke distribueret, eller brug af samme PPM-mix

Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionens konfiguration.

Gentag PCR-kørslen.

Negativ (H₂O) kontrol er positiv

Krydskontaminering,
reagenskontaminering,
instrumentfejl, brønd- eller
kapillærvending eller
probenedbrydning

Udskift alle kritiske reagenser
Prøver, kittets komponenter og
forbrugsartikler skal altid håndteres i
henhold til almindeligt accepteret
praksis for at forhindre overførsel af
kontaminering.

Beskyt primere og probemixes mod
lys.

Se efter falsk positive på
fluorescenskurver.

Intet signal, heller ikke i standardkontrol

a) Forkert påvisningskanal er valgt

Sæt kanalen til F1/F2 eller
530 nm/640 nm.

b) Pipetteringsfejl eller udeladte
reagenser

Kontrollér pipetteringsskemaet og
reaktionens konfiguration.

Gentag PCR-kørslen.

c) Intet datafangstprogram

Kontrollér cyklusprogrammet.

Vælg opsamlingsfunktionen "Single"
(Enkelt) til slut i hvert
afhærdningssegment af PCR-
programmet.

Fraværende eller lavt signal i prøver, men standardkontroller ok

Inhibitoriske effekter af
prøvemateriale på grund af
utilstrækkelig oprensning

Kontrollér altid DNA-kvaliteten
(OD₂₆₀/OD₂₈₀) og -koncentrationen
før start.

Gentag DNA-klargøring

For lav fluorescensintensitet

- a) Forkert opbevaring af kittets komponenter

Alikvotreagenser til opbevaring.

Opbevar ipsogen JAK2 MutaQuant-kittet ved -15 til -30° C, og beskyt primere og probemixes mod lys. Se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 13.

Undgå gentagen nedfrysning og optøning.

- b) Meget lav startmængde af mål-DNA

Kontrollér mængden af prøve-DNA.

Bemærk: Afhængigt af den valgte metode til DNA-klargøring kan der forekomme inhibitoriske effekter.

Negative kontroller er positive

Overfør kontaminering

Udskift alle kritiske reagenser

Gentag forsøget med nye alikvoter af alle reagenser.

Prøver, kittets komponenter og forbrugsartikler skal altid håndteres i henhold til almindeligt accepteret praksis for at forhindre overførsel af kontaminering.

Variierende fluorescensintensitet

- a) Pipetteringsfejl

Vortex og centrifugér alle reagenser efter optøning.

LightCycler-variabilitet forårsaget af såkaldt "pipetteringsfejl" kan reduceres ved at analysere data i funktionen F1/F2 eller 530 nm/640 nm.

- b) Utilstrækkelig centrifugering af pladen, rørene eller kapillærene, eller den klargjorte PCR-mix er måske stadig i kapillærens øverste beholder, eller der er en luftboble i kapillærens spids.

Centrifugér altid kapillærer med reaktionsmixet som beskrevet i apparatets specifikke betjeningshåndbog.

Kommentarer og forslag

- c) Kapillærspidsens udvendige overflade er snavset Brug altid handsker ved håndtering af kapillærer.

Vildtype eller V617F positive kontrolsignal vha. den gensidige PPM

- Krydskontaminering, reagenskontaminering eller brønd- eller kapillærvending Udskift alle kritiske reagenser
Gentag forsøget med nye alikvoter af alle reagenser.
Prøver, kittets komponenter og forbrugsartikler skal altid håndteres i henhold til almindeligt accepteret praksis for at forhindre overførsel af kontaminering.
Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionens konfiguration.

Omvendt påvisning af positiv kontrol

- Distribueret vending af PPM i brønd eller kapillær eller i præmix Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionens konfiguration.

Intet signal for en positiv kontrol eller begge

- PPM eller kontrol-DNA udeladt Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionens konfiguration.

Høj baggrund

- Fluoroforblegning Under opbevaring og håndtering skal proben beskyttes mod lys.

Ringe reproducerbarhed for duploprøverne

- Pipetteringsfejl eller krydskontaminering Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionens konfiguration.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet. Analysecertifikater er tilgængelig ved anmodning på www.qiagen.com/support.

Ansvarsbegrænsninger

Brugerne skal være uddannede i og fortrolige med denne teknologi, før de bruger udstyret. Kittet skal bruges i henhold til instruktionerne i denne vejledning og sammen med det validerede instrument, der er nævnt i "Nødvendige materialer, der ikke medfølger" på side 11.

Diagnostiske resultater, der genereres, skal fortolkes sammen med andre kliniske eller laboratoriemæssige resultater. Det er brugerens ansvar at validere systemets ydelse for procedurer, der anvendes i deres laboratorium, og som ikke er dækket af QIAGEN-ydelsesundersøgelser.

Bemærk nøje udløbsdatoer, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug aldrig for gamle komponenter.

Ydelsesegenskaber

Ikke-kliniske studier

Præcision

Der blev gennemført et præcisionsstudie med 12 DNA-prøver fra cellelinjer, der svarede til forskellige JAK 2 V617F-allelbyrder. Der blev gennemført i alt 80 målinger af hver prøve med 3 forskellige batches af *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet. Dette præcisionsstudie anvendte et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Analytiske data er opsummeret i tabel 15.

Table 15. Præcisionsdata fra DNA-prøver

Prøve	Teoretisk JAK2 V617F (%)		Gennemsnit (%)	CV (%)	Percentil	
		n*			5	95
A	0	73	0,004	117,5	0,000	0,015
B	0,05	80	0,101	89,2	0,003	0,284
C	0,5	79	0,449	61,6	0,161	0,950
D	1	68	1,169	41,6	0,611	1,998
E	2	80	2,046	33,5	1,168	3,185
F	4	80	3,733	30,6	2,120	5,560
G	5	77	5,246	22,4	3,647	7,309
H	12,5	80	16,633	16,6	12,792	22,335
I	31	80	28,602	14,8	22,705	34,773
J	50	76	56,181	6,6	50,024	63,724
K	78	80	80,153	3,8	75,352	85,551
L	100	70	99,998	0,003	99,992	100,000

* Yderværdier blev udelukket. Disse blev defineret som værdier, der var under den lave kvartil minus 3 gange det interkvartile område, eller over den høje kvartil plus 3 gange interkvartilområdet på et Box & Whisker-plot.

n = antal validerede prøver, CV = Variationskoefficient.

Tom grænse og detektionsgrænse

Baggrundsniveauet eller LOB (level of blank) blev bestemt på negative prøver (8 prøver, 76 målinger). Dette blev bestemt til 0,014 %.

LOD (limit of detection - detektionsgrænsen) blev bestemt med prøver, der var kendt som positive, men med et lavt udtryk (7 prøver, 68 målinger). Dette blev bestemt til 0,061 % med en øvre grænse for 90 %-konfidensintervallet på 0,091 %.

Den optimale sensitivitet kan opnås på prøver med mindst 10.000 kopier af JAK2-genet (vildtype eller V617F-mutation).

Kvantificeringsdata skal rapporteres som følger.

- JAK2 V617F $\leq 0,014$ % kan fortolkes, som om JAK2 V617F-mutation ikke blev påvist.
- JAK2 V617F $> 0,014$ %, men $< 0,091$ % kan fortolkes som et ikke entydigt resultat.
- JAK2 V617F $\geq 0,091$ % kan fortolkes som et positivt resultat, og som om JAK2 V617F-mutationen er blevet påvist.

Linearitet

Linearitetsstudier blev udført på 12 prøver, som hver især kom fra et andet DNA-mix, ekstraheret af cellelinjer, der var positive og negative for JAK2 V617F-mutationen. Hver prøve blev testet 5 gange. Data fra dette studie viste, at *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet gav lineære resultater på tværs af det dynamiske område.

Kliniske studier

DNA fra blod eller knoglemarv blev ekstraheret af 87 patientprøver og analyseret med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet. Desuden blev procenten af JAK2 V617F-mutationer kvantificeret og sammenlignet med screeningstestresultater, der blev opnået med *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ-kittet (katalognr. 673223). De opnåede data vises i tabel 16.

Tabel 16. Eventualitetstabel, der viser overensstemmelsen mellem resultater, der er opnået med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet og *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ-kittet

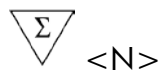




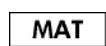




		Resultater fra <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ-kittet			
		Mutation påvist	Ikke entydigt resultat	Mutation ikke påvist	n
Resultater fra <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant-kittet	Mutation påvist	40	2	7	49
	Ikke entydigt resultat	0	0	21	21
	Mutation ikke påvist	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Positiv overensstemmelse	100% (95 % konfidensinterval: 91%, 100%)				
Negativ overensstemmelse	71% (95 % konfidensinterval: 51%, 85%)				
Generel overensstemmelse	89% (95 % konfidensinterval: 79%, 95%)				

Referencer

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413..
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. 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.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. 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.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboler

Følgende symboler kan forekomme på emballage og etiketter:

	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> reaktioner
	Anvendes inden
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer
	Globalt varenummer
	Temperaturbegrænsninger
	Fremstiller
	Læs brugsvejledningen

Kontaktoplysninger

For teknisk service og yderligere information henvises til vort tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, eller henvendelse kan rettes til tlf. 00800-22-44-6000 eller til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Til 12 reaktioner: Wild-type JAK2 Gene Control, JAK2 V617F Control Gene, Primers and Probe Mix PPM-WT, Primers and Probe Mix PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Til 24 reaktioner: Wild-type JAK2 Gene Control, JAK2 V617F Control Gene, Primers and Probe Mix PPM-WT, Primers and Probe Mix PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx - til IVD-valideret PCR-analyse i realtid til kliniske anvendelser		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cykler og High Resolution Melt analyser med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejdskraft. Ekskl. installation og uddannelse	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cykler og High Resolution Melt analyser med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejdskraft, installation og uddannelse	9002033

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller brugervejledning. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan findes på www.qiagen.com eller kan rekvireres fra QIAGENS tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Dette produkt er beregnet til in vitro diagnostisk anvendelse. *ipsogen* produkter må ikke videresælges, ændres til videresalg eller bruges til at fremstille kommercielle produkter uden QIAGENs skriftlige godkendelse.

Oplysningerne i dette dokument gives med forbehold for ændringer uden varsel. QIAGEN påtager sig intet ansvar for evt. fejl, der måtte forekomme i dette dokument. Dette dokument anses for at være fuldstændigt og nøjagtigt på tidspunktet for dets udgivelse. QIAGEN hæfter under ingen omstændigheder for følgeskader, særlige eller flere skader i forbindelse med eller som følge af brugen af dette dokument.

ipsogen produkter opfylder deres anførte specifikationer. QIAGEN's eneste forpligtelse og kundens eneste retsmiddel er begrænset til gratis udskiftning af produkter, hvis produkternes ydelse ikke er som garanteret.

JAK2 V617F-mutation og anvendelser deraf af beskyttet af patentrettigheder, herunder europæisk patent EP1692281, US patent 7,429,456 og 7,781,199, US patentansøgning US20090162849 og US20120066776 samt sidestykker i udlandet.

Købet af dette produkt giver ingen ret til at bruge det i kliniske afprøvninger til lægemidler rettet mod JAK2V617F. QIAGEN udarbejder særlige licensprogrammer til denne anvendelse. Kontakt vores juridiske afdeling på jak2licenses@qiagen.com.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, MutaQuant®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); HybProbe®, LightCycler®, TaqMan® (Roche Group).

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet accepterer følgende vilkår:

1. *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet må kun bruges i overensstemmelse med håndbogen til *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet og kun med de komponenter, der følger med kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkorporere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i håndbogen til *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kittet og yderligere protokoller, som er tilgængelige på www.qiagen.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dens komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbudene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

www.qiagen.com

