

ipsogen[®] JAK2 MutaSearch[®] Kit Příručka



Verze 1

IVD

Kvalitativní diagnostika in vitro

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®],
ABI PRISM[®] a LightCycler[®]



REF 673823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY

R4 **MAT** 1072502CZ



Technologie QIAGEN pro zpracování a analýzu vzorků

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše pokročilé produkty a služby nejvyšší kvality Vám zajistí úspěch od odběru vzorku až po výsledek.

QIAGEN vytváří standardy pro:

- Purifikaci DNA, RNA a proteinů
- Analýzy nukleových kyselin a proteinů
- Výzkum mikroRNA a RNAi
- Automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýzu

Naším cílem je poskytovat zaručený úspěch a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách **www.qiagen.com**.

Obsah

Účel použití	4
Shrnutí a vysvětlení	4
Princip Postupu	5
Materiál poskytovaný se soupravou	9
Obsah kitu	9
Požadovaný materiál, který není součástí soupravy	10
Upozornění a bezpečnostní opatření	11
Obecná ustanovení	11
Skladování činidel a manipulace s nimi	12
Postup	13
Příprava vzorku DNA	13
Skladování nukleových kyselin	13
Protokoly	
■ qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM se 72-zkumavkovým rotorem	14
■ qPCR na přístrojích Applied Biosystems7500, ABI PRISM 7900HT, nebo LightCycler 480	18
■ qPCR na přístroji LightCycler 1.2	22
Interpretace výsledků	26
Výpočet $\Delta\Delta C_T$ (nebo $\Delta\Delta C_p$) a genotypizace	26
Kontroly	29
Návod na řešení problémů	29
Kontrola kvality	31
Omezení	31
Výkonnostní charakteristiky	32
Laboratorní studie	32
Klinické studie	34
Reference	34
Symboly	35
Kontaktní informace	36
Informace pro objednání	37

Účel použití

Soupravy *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit jsou určeny pro detekci mutací JAK2 V617F/G1849T v genomové DNA od pacientů s podezřením na myeloproliferativní nádor. Nepřítomnost JAK2 V617F/G1849T nevylučuje přítomnost jiných mutací JAK2. Tento test je schopen uvést falešně negativní výsledky v případě dalších mutací v nukleotidech 88,504 až 88,622 (NCBI reference NT_008413).

Poznámka: Tato souprava musí být použita dle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými činidly a přístroji. Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo rozsah příručky nebo úpravy jeho součástí budou mít za následek zrušení odpovědnosti společnosti QIAGEN.

Shrnutí a vysvětlení

V roce 2005 byla identifikována recidivující somatická mutace, V617F, ovlivňující gen Janus tyrozinkinázy 2 (JAK2), což vedlo k velkému průlomů v pochopení, klasifikaci a diagnostice myeloproliferativních neoplazií (MPN) (1-5). JAK2 je důležitou intracelulární signální molekulou pro množství cytokinů, včetně erythropoetinu.

Mutace V617F genu JAK2 je detekována u > 95 % pacientů s pravou polycytémií (polycythemia vera (PV)), 50–60 % pacientů s esenciální trombocytémií (ET), a 50 % pacientů s primární myelofibrózou (PMF). JAK2 V617F byla také zjištěna u některých vzácných případů chronické myelomonocytické leukémie, myelodysplazického syndromu, systémové mastocytózy a chronické neutrofilní leukémie, avšak v 0 % u chronické myeloidní leukémie (CML) (5).

Tato mutace odpovídá jedno nukleotidové změně nukleotidu 1849 genu JAK2 v exonu 14, což má za následek unikátní substituci valinu (V) za fenylalanin (F) na pozici 617 proteinu (doména JH2). To vede ke konstitutivní aktivaci genu JAK2, hematopoetické transformaci *in vitro* a růstu erytroidních kolonií nezávislých na erythropoetinu (EEC) u všech pacientů s pravou polycytémií (PV) a velké části pacientů s esenciální trombocytémií (ET) a primární myelofibrózou (PMF) (6). JAK2 V617F představuje klíčový faktor při transformaci hematopoetických buněk u pacientů s myeloproliferativních neoplazií (MPN), avšak přesný patologický mechanismus, se stejnou jedinečnou mutací u tak rozdílných klinických a biologických entit stále čeká na plné vysvětlení.

Tradičně byla diagnostika MPN založena na klinickém vyšetření, histologii kostní dřeně a cytogenetických kritériích. Díky objevu molekulárního markéru specifického pro určité onemocnění došlo ke zjednodušení procesu a zvýšení přesnosti diagnostiky. Detekce mutace V617F genu JAK2 je nyní součástí referenčních kritérií WHO 2008 pro diagnostiku BCR-ABL negativní MPN (Tabulka 1) a přítomnost této mutace je hlavním kritériem pro potvrzení diagnózy.

Tabulka 1. WHO kritéria pro diagnostiku MPN (adaptované z reference 7)

Kritéria pro diagnostiku pravé polycytemie (PV)	
Hlavní	1. Hemoglobin (Hgb) >18.5 g.dl-1 (muži) nebo >16.5 g.dl-1 (ženy) nebo Hgb nebo hematokrit (Hct) >99. percentil referenčního rozmezí pro věk, pohlaví, nebo nadmořskou výšku bydliště nebo Hgb >17 g.dl-1 (muži) nebo >15 g.dl-1 (ženy) pokud souvisí s trvalým nárůstem ≥ 2 g.dl-1 od výchozích hodnot, které není možné připisovat korekci nedostatku železa nebo zvýšené množství červených krvinek >25% nad průměrnou normální predikovanou hodnotu 2. Přítomnost <i>JAK2V617F</i> nebo podobné mutace
Minoritní	1. Trilineární myeloproliferace kostní dřeně 2. Subnormální hladina sérového erythropoietinu 3. Růst endogenních erytroidních kolonií (EEC)
Kritéria pro diagnostiku esenciální trombocytémie (ET)	
Hlavní	1. Počet krevních destiček $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Proliferace megakaryocytů s velkou a zralou morfolgií. Žádná či slabá granulocytární nebo erytroidní prolyferace. 3. Nesplnění WHO kritérií pro chronickou myeloidní leukémii (CML), PV, primární myelofibrózu (PMF), myelodysplastický syndrom (MDS), nebo jiné myeloidní onemocnění 4. Demonstrace <i>JAK2V617F</i> nebo jiného klonálního markéru nebo Žádný evidentní důkaz o přítomnosti trombocytózy.
Minoritní	-
Kritéria pro diagnostiku primární myelofibrózy (PMF)	
Hlavní	1. Proliferace megakaryocytů a atypie doprovázená retikulínovou fibrózou a/nebo kolagenovou fibrózou nebo Při nepřítomnosti retikulínové fibrózy musí být změny megakaryocytů doprovázeny zvýšením celularity kostní dřeně, granulocytickou proliferací a často sníženou erytropoézou (tzn. prefibrotickou PMF) 2. Nesplnění kritérií WHO pro (CML), PV, MDS, nebo jiné myeloidní neoplazie 3. Demonstrace <i>JAK2V617F</i> nebo jiného klonálního markéru Žádný důkaz o přítomnosti fibrózy kostní dřeně
Minoritní	1. Leukoerytoblastóza 2. Zvýšení laktát dehydrogenázy v séru (LDH) 3. Anémie 4. Hmatatelná splenomegalie

Navíc odborníci v Evropě a USA (8–10) nyní stále více podporují 1% hraniční hodnotu pro stanovené klinické positivity u analýz založených na PCR.

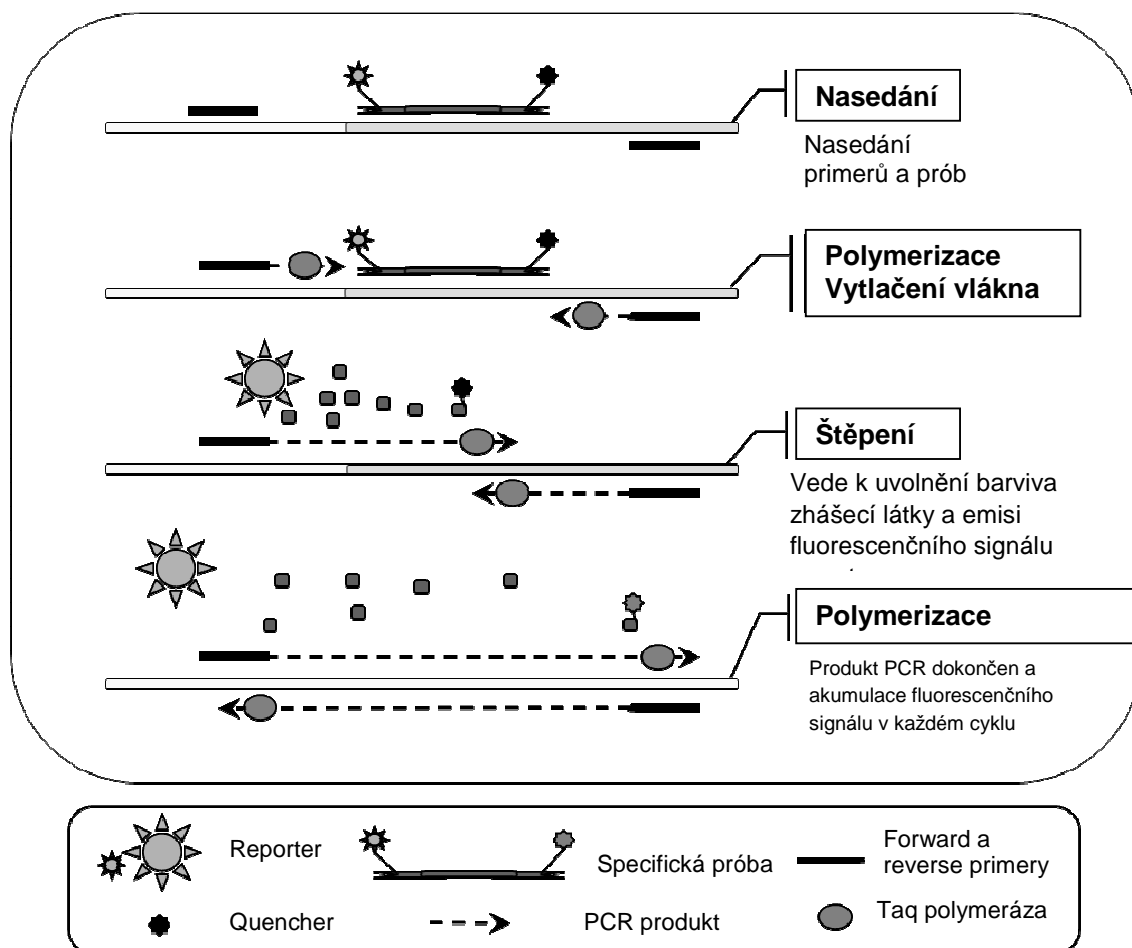
Princip Postupu

qPCR umožňuje přesnou kvantifikaci PCR produktů v exponenciální fázi procesu amplifikace PCR. Kvantitativní údaje PCR lze rychle získat bez nutnosti post-PCR zpracování díky real-time detekce fluorescenčních signálů v průběhu a/nebo po PCR cyklování, čímž se výrazně snižuje riziko kontaminace produktu PCR. V současné době existují 3 hlavní typy qPCR technik: qPCR analýza pomocí SYBR Green I Dye, qPCR analýza pomocí hydrolyzujících sond a qPCR analýza pomocí hybridizačních sond.

Tento test využívá duálního barviva a principu qPCR za pomoci hydrolýzy oligonukleotidů. V průběhu PCR hybridizují forward a reverse primery ke specifické sekvenci. Oligonukleotid s duálním barvivem je obsažen ve stejné směsi. Tato sonda, skládající se z oligonukleotidu značeného na 5' konci reportérovým barvivem a 3' konci quencher barvivem, hybridizuje s cílovou sekvencí v produktu PCR. qPCR analýza s hydrolýzy sondy využívá 5'→3' exonukleázové aktivity *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerázy. Když je sonda intaktní, blízkost reportérového barviva a quencheru vede k potlačení reportérové fluorescence díky Försterovo typem přenosu energie.

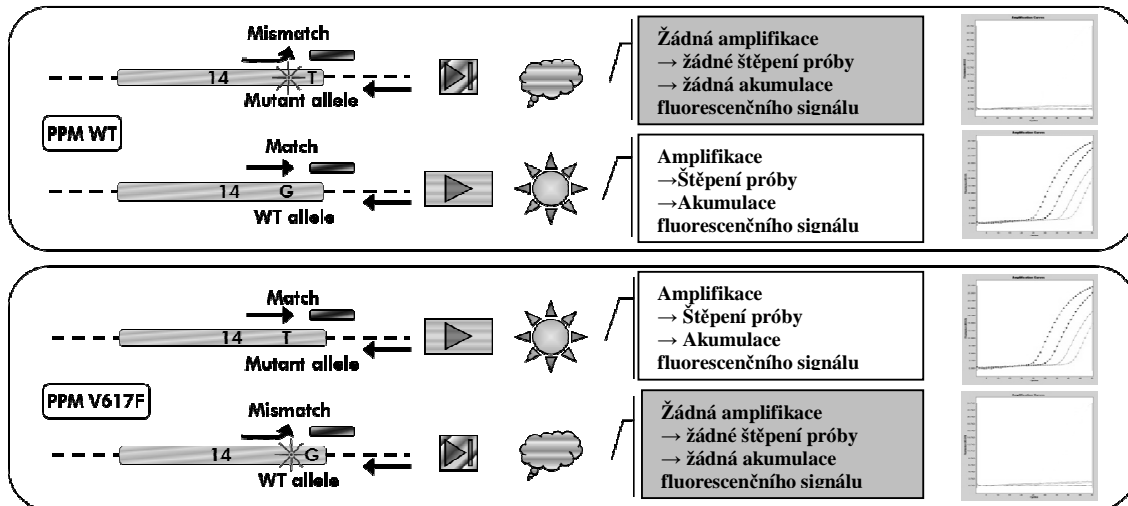
Je-li cílová sekvence přítomna, dochází v průběhu PCR k hybridizaci sondy specificky mezi forward a reverse primer. 5'→3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy štěpí sondu mezi reportérem a zhasěčem pouze tehdy, pokud se sonda hybridizuje k cílovému místu. Fragmenty sondy jsou pak posunuty od cíle a polymerace řetězce pokračuje. 3' konec sondy je blokován, aby se zabránilo extensi sondy během PCR (Obrázek 1). Tento proces probíhá v každém cyklu a není v rozporu s exponenciální akumulací produktu.

Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno pouze v případě, že je cílová sekvence komplementární k sondě a tudíž amplifikována během PCR. Díky těmto požadavkům, není detekována nespecifická amplifikace. To znamená, že zvýšení fluorescence je přímo úměrné amplifikaci cílové sekvence během PCR.



Obrázek 1. Princip reakce.

Alela specifická PCR technologie použitá v tomto testovacím kitu umožňuje citlivou, přesnou a vysoce reprodukovatelnou detekci SNP. Tato technika je založena na použití specifických forward primerů pro alely wild type a V617F. Pouze perfektní shoda mezi primerem a cílovou DNA umožňuje extenzi a amplifikaci v PCR (Obrázek 2).



Obrázek 2. Alelově specifická PCR. Použití wild-typu nebo V617F primerů a směsi prób umožňuje specifickou detekci wild-typu nebo mutované alely v dvou oddělených reakcích provedených s použitím stejného vzorku.

Materiál poskytovaný se soupravou

Obsah kitu

<i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit</i>		(24)
Katalogové č.		673823
Počet reakcí		24
V617F Positive Control (V617F Pozitivní kontrola)	PC-VF JAK2	40 µl
V617F Negative Control (V617F Negativní kontrola)	NC-VF JAK2	40 µl
Cut-Off Sample (1% V617F alela)	COS-VF JAK2	40 µl
Primers and probe mix JAK2 V617F* (Směs primerů a prób JAK2 V617F)	PPM-JAK2 V617F 25x	68 µl
Primers and probe mix JAK2 WT [†] (Směs primerů a prób JAK2 WT [†])	PPM-JAK2 WT 25x	68 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit Handbook</i> (English) (Příručka <i>ipsogen JAK2 MutaSearch Kit</i> (Anglicky))		1

* Směs specifických reverse a forward primerů pro gen *JAK2*, specifická V617F FAM[™]–TAMRA[™] próba.

† Směs specifických reverse a forward primerů pro gen *JAK2*, specifická wild-type FAM–TAMRA próba.

Poznámka: Před použitím zkumavky krátce stočte.

Poznámka: Analýza neznámých vzorků pomocí soupravy *ipsogen JAK2 MutaSearch Kit* vyžaduje extrakci genomové DNA. Činidla potřebná pro provedení extrakce DNA nejsou součástí soupravy a musí být validována v kombinaci se soupravou.

Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Reagencie

- Voda bez nukleáz vhodná pro PCR
- 1x TE pufr bez nukleáz, pH 8.0
- Pufr a *Taq* DNA polymeráza: Validované reagencie jsou TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. č. 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. č. 04535286001) nebo LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, kat. č. 03515567001)

Poznámka: Tento master mix je možné použít jen v přístroji LightCycler 1.2
- Reagencie pro 0.8–1% agarózový gel v 0.5x TBE elektroforetickém pufru

Spotřební materiál

- Sterilní PCR špičky bez nukleáz opatřené hydrofobními filtry, odolávající tvorbě aerosolu
- 0.5 ml nebo 1.5 ml PCR zkušavky bez RNáz a DNáz
- Led

Vybavení

- Mikropipety* určené pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga* s rotorem pro 0.5 ml/1.5 ml reakční zkušavky (dosahující rychlosti 10,000 rpm)
- Spektrofotometr* pro kvantifikaci DNA
- Real-time PCR přístroj:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo jiné přístroje Rotor-Gene Q; LightCycler 1.2 nebo 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nebo ABI PRISM 7900HT SDS; a přidružený specifický materiál

* Zajistěte, aby přístroje byly zkontrolovány a zkalibrovány dle doporučení výrobce.

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Obecná ustanovení

Testy qPCR vyžadují dobrou laboratorní praxi, včetně údržby vybavení, které je určeno pro molekulární biologii a splňuje příslušné předpisy a normy.

Tato souprava je určena pro diagnostiku in vitro. Činidla a pokyny dodané s touto soupravou byly validovány pro zajištění optimálního výkonu. Další ředění činidel nebo změna inkubačních dob a teplot může mít za následek chybné nebo nesouhlasné údaje. U činidla PPM-JAK2 může dojít ke změnám v případě jeho vystavení světlu. Složení všech činidel je specifické pro použití s tímto testem. Pro dosažení optimálního výkonu testu nesmí být provedeny žádné záměny součástí.

Dbejte maximální opatrnosti, abyste zabránili:

- Kontaminaci DNázou, která může vést k degradaci templátové DNA;
- Kontaminaci DNA nebo přenosu PCR produktu vedoucím k falešně pozitivnímu výsledku

Proto doporučujeme následující:

- Při provádění testu používejte laboratorní vybavení bez nukleáz (např. pipety, pipetovací špičky, reakční zkumavky) a používejte rukavice.
- Používejte nové pipetovací špičky s filtrem pro všechny pipetovací kroky, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků a činidel.
- Připravte master mix před PCR pomocí určených materiálů (pipet, špiček, atd.) ve vyhrazeném prostoru, kde nebudou zaneseny žádné matrice DNA (DNA, PCR produkty). Přidejte templát v oddělené zóně (nejlépe v samostatné místnosti) pomocí vyhrazeného materiálu (pipety, špičky, atd.).

Skladování činidel a manipulace s nimi

Soupravy jsou dodávány na suchém ledu a po převzetí musí být skladovány při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Minimalizujte vystavení směsí primerů a sond (zkumavka PPM-JAK2) světlu.
- Zkumavky před otevřením lehce promíchejte a odstředte.
- Všechny součásti soupravy uchovávejte v původních obalech.

Tyto podmínky skladování platí pro otevřené i neotevřené součásti. Součásti skladované za jiných podmínek než jaké jsou uvedeny na štítcích nemusí mít správnou funkci a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky testu.

Datum expirace pro každé činidlo je uvedeno na jednotlivém štítku dané součásti. Při dodržení podmínek skladování zůstanou zachovány vlastnosti výrobku do data expirace vytištěného na štítku.

Neexistují žádné zřejmé známky, které by ukazovaly na nestabilitu tohoto výrobku. Nicméně pozitivní a negativní kontroly by měly být testovány současně s neznámými vzorky.

Postup

Příprava vzorku DNA

Genomová DNA by měla být získána buď z plné krve, purifikovaných lymfocytů z periferní krve, vícejaderných buněk nebo granulocytů. Aby bylo možné porovnat výsledky, doporučujeme provádět stejnou metodu získání buněčných frakcí a metodu extrakce DNA. Extrakce DNA by měla být prováděna “home-made” nebo komerčním kitem.

Množství DNA je určeno měřením optické hustoty při vlnové délce 260 nm. Kvalita DNA by měla být posuzována pomocí spektrofotometrie nebo gelové elektroforézy.

Poměr A260/A280 by měl činit 1,7–1,9. Menší poměry obvykle znamenají kontaminaci proteiny nebo organickými chemikáliemi. Elektroforézní analýza na 0,8–1% agarózovém gelu by měla umožnit vizualizaci izolované DNA jako odlišný proužek velikosti přibližně 20 kb. Slabý směr je přijatelný.

Výsledná DNA je zředěna na 5 ng/μl v TE pufru. Reakce qPCR je optimalizována pro 25 ng purifikované genomové DNA.

Skladování nukleových kyselin

Pro krátkodobé skladování do 24 hodin doporučujeme uchovávat purifikované kyseliny při teplotě 2–8 °C. Pro dlouhodobé skladování delší dobu než 24 hodin doporučujeme uchovávat při teplotě –20 °C.

Protokol: qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM se 72-zkumavkovým rotorem

Při použití tohoto přístroje doporučujeme veškerá měření duplikovat, viz Tabulka 2.

Tabulka 2. Počet reakcí pro přístroje Rotor Gene Q s rotorem na 72 zkumavek

Vzorky	Reakce
Se směsí primerů a prób JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA vzorků	n x 2 reakcí
3 DNA kontroly	6 reakcí (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testovaný v duplikátu)
Kontrola s vodou	2 reakce
Se směsí primerů a prób JAK2 WT (PPM-JAK2 WT)	
n DNA vzorků	n x 2 reakce
3 DNA kontroly	6 reakcí (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testovaný v duplikátu)
Kontrola s vodou	2 reakce

Zpracování vzorků v přístroji Rotor-Gene Q s rotorem na 72 zkumavek

Pro optimální využití kontrol a směsi primerů a sond doporučujeme otestovat alespoň 12 vzorků DNA ve stejném experimentu. Schéma rotoru na Obrázku 3 ukazuje příklad takového experimentu.

3. Připravte následující qPCR mixy podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace jsou určeny pro konečný objem reakce.

V Tabulce 3 je popsáno pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi činidel, vypočtené pro získání finálního objemu reakce 25 μ l. Je možné připravit předběžnou směs dle počtu reakcí, a to s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování.

Tabulka 3. Příprava reakčních směsí qPCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	VF: 32+1 reakcí (μ l)	WT: 32+1 reakcí (μ l)	Finální koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	412.5	412.5	1x
Směs primerů a prób, 25x (VF nebo WT, respektive)	1	33	33	1x
Voda pro PCR bez nukleáz	6.5	214.5	214.5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 6)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

4. Vortexujte a krátce centrifugujte každý qPCR mix (přibližně 10 s, 10 000 rpm, aby se tekutina odstranila z víček).
5. Pipetujte 20 μ l qPCR pre-mixu (VF a WT) do každé zkumavky.
6. Přidejte 5 μ l vzorku DNA nebo kontroly do příslušné zkumavky (celkový objem 25 μ l).
7. Jemně promíchejte opakovaným pipetováním.
8. Zavřete PCR zkumavky. Umístěte do 72 zkumavkového rotoru podle doporučení výrobce. Všechna prázdná místa vyplňte prázdnými zkumavkami.

9. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q pro teplotní profil indikovaný v Tabulce 4.

Tabulka 4. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Hold	Teplota: 50 °C Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95 °C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95 stupňů for 15 s 62 stupňů 1 min s akvizicí FAM fluorescence v zeleném kanálu: Jednotlivě

10. Spusťte teplotní program cyklování, jak je vyznačeno v Tabulce 4.
11. Pro přístroje Rotor-Gene Q vyberte pro analýzu "Slope Correct".
Doporučujeme nastavit threshold na 0.03.

Protokol: qPCR na přístrojích Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT, nebo LightCycler 480

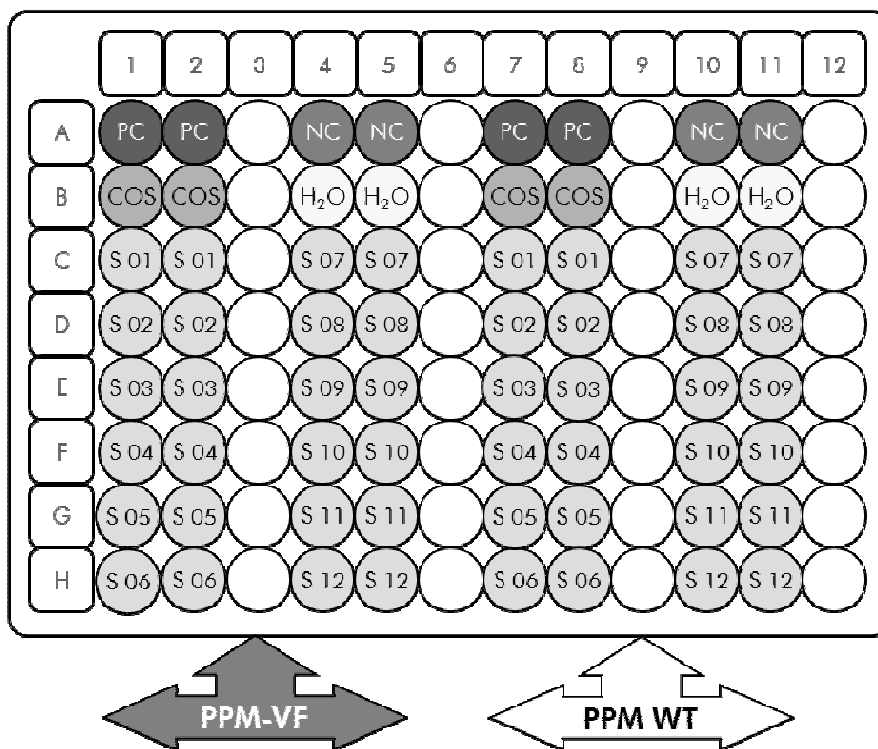
Při použití 96 jamkové destičky v qPCR zařízení doporučujeme provést všechna měření v duplikátech, jak je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5. Počet reakcí pro přístroje Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT, nebo LightCycler 480

Vzorky	Reakce
Se směsí primerů a prób JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA vzorků	n x 2 reakce
3 DNA kontroly	6 reakcí (PC-VF, NC-VF, and COS-VF, každý testovaný v duplikátu)
Kontrola s vodou	2 reakce
Se směsí primerů a prób JAK2 WT (PPM-JAK2 WT)	
n DNA vzorků	n x 2 reakce
3 DNA kontroly	6 reakcí (PC-VF, NC-VF, and COS-VF, každý testovaný v duplikátu)
Kontrola s vodou	2 reakce

Příprava vzorku pro přístroje Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT, nebo LightCycler 480

Pro optimální využití kontrol a směsi primerů a sond doporučujeme otestovat alespoň 12 vzorků DNA ve stejném experimentu. Schéma rozložení destičky na Obrázku 4 ukazuje příklad takového experimentu.



Obrázek 4. Navržené schéma rozložení destičky pro experiment se soupravou *ipsogen JAK2 MutaSearch Kit*. PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; COS: vzorek s hraniční hodnotou; S: DNA vzorek; H₂O: Kontrola s vodou.

qPCR na přístrojích Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT, nebo LightCycler 480

Poznámka: Všechny kroky provádějte na ledu.

Postup

- 1. Rozpusťte všechny potřebné komponenty a vložte je na led.**
Součásti kitu by měly být vyjmuty z mrazáku přibližně 10 min před zahájením přípravy.
- 2. Vortexujte a krátce centrifugujte všechny zkumavky (přibližně 10 s, 10,000 rpm, pro přemístění veškeré kapaliny do spodní části zkumavky).**
- 3. Připravte si následující směs qPCR podle počtu vzorků, které budete zpracovávat.**

Všechny koncentrace jsou uvedeny pro konečné objemy reakce.

Tabulka 6 popisuje schéma pipetování pro přípravu jedné směsi reagentů, vypočtené tak, aby se dosáhlo 25 µl konečného reakčního objemu. Pre-mix může být připraven podle počtu reakcí s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování

Tabulka 6. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μl)	VF: 32+1 reakcí (μl)	WT: 32+1 reakcí (μl)	Finální koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	412.5	412.5	1x
Směs primerů a prób, 25x (VF nebo WT, respektive)	1	33	33	1x
Voda pro PCR bez nukleáz	6.5	214.5	214.5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 6)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

4. Vortexujte a krátce odstředte směs qPCR (VF a WT) (přibližně 10 s, 10 000 rpm, pro přemístění veškeré kapaliny do spodní části zkumavky).
5. Rozpipetujte 20 μ l qPCR pre-mixu (VF a WT) do jednotlivých jamek.
6. Přidejte 5 μ l každého vzorku DNA nebo kontroly do odpovídající jamky (celkový objem 25 μ l).
7. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
8. Zavřete destičku a krátce zcentrifugujte (300 x g, přibližně po dobu 10 s).
9. Umístěte destičku do termocykléru podle doporučení výrobce.
10. Naprogramujte termocyklér pro teplotní profil vyznačený v Tabulce 7 pro přístroje Applied Biosystems 7500 a ABI PRISM 7900HT SDS, nebo v Tabulce 8 pro přístroj LightCycler 480.

Tabulka 7. Teplotní profil pro přístroje Applied Biosystems 7500 a ABI PRISM 7900HT SDS

Režim analýzy	Standardní křivka — Absolutní kvantifikace
Hold	Teplota: 50°C Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95°C 15 s 63°C 1 min 30 s s akvizicí FAM fluorescence: Jednotlivě; quencher: TAMRA

Tabulka 8. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480

Režim analýzy	Absolutní kvantifikace (“Abs Quant”)
Detekční formát	Vyberte “Simple Probe” v okně pro detekční formáty
Hold	Teplota: 50°C Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95°C 15 s 63°C 1 min 30 s s akvizicí FAM fluorescence odpovídající (483–533 nm) pro LC verzi 01 a (465– 510 nm) pro LC verzi 02: Jednotlivě

11. Pro Applied Biosystems 7500 a ABI PRISM 7900HT SDS, postupujte podle kroku 11a. Pro LightCycler 480 postupujte v kroku 11b.

11a. Applied Biosystems 7500 a ABI PRISM 7900HT SDS:
Doporučujeme v kroku analýzy nastavit hodnotu threshold na 0.1.
Start programu cyklování je vyznačen v Tabulce 7.

11b. LightCycler 480: Doporučujeme Fit point režimu analýzy s pozadím nastaveným na 2.0 a threshold na 2.0. Start programu cyklování je vyznačen v Tabulce 8.

Protokol: qPCR na přístroji LightCycler 1.2

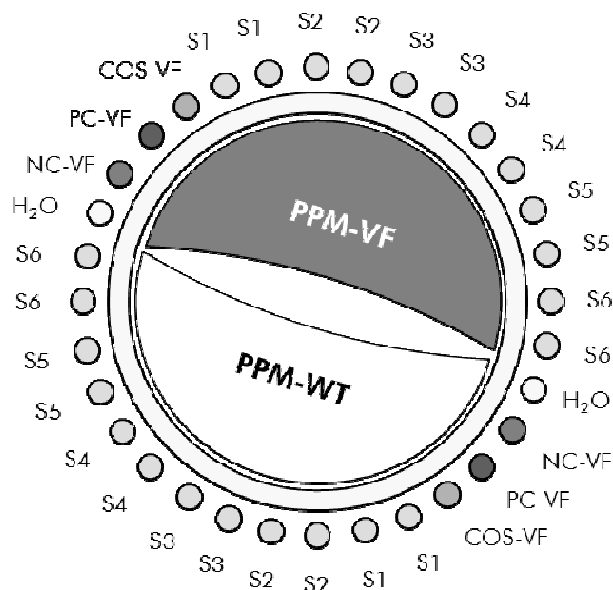
Při použití kapilárních přístrojů doporučujeme měřit vzorky v duplikátech a kontroly v jednotlivém provedení jak je vyznačeno v Tabulce 9.

Tabulka 9. Počet reakcí pro přístroj LightCycler 1.2

Vzorky	Reakce
Se směsí primerů a prób JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA vzorků	n x 2 reakce
3 DNA kontroly	3 reakce (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testován jednou)
Kontrola s vodou	1 reakce
Se směsí primerů a prób JAK2 WT (PPM-JAK2 WT)	
n DNA vzorků	n x 2 reakce
3 DNA kontroly	3 reakce (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testován jednou)
Kontrola s vodou	1 reakce

Příprava vzorku pro přístroj LightCycler 1.2

Pro optimální využití kontrol a směsi primerů a sond doporučujeme otestovat alespoň 6 vzorků DNA ve stejném experimentu. Schéma rozložení kapilár na Obrázku 5 ukazuje příklad takového experimentu.



Obrázek 5. Navržené rotorové uspořádání experiment se soupravou *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit. PC-VF: pozitivní kontrola; NC-VF: negativní kontrola; COS: vzorek s hraniční hodnotou; S: DNA vzorek; H₂O: Kontrola s vodou.

qPCR na přístroji LightCycler 1.2

Poznámka: Vzhledem ke konkrétním technologickým požadavkům, musí být všechny experimenty pro LightCycler 1.2 prováděny za použití specifických reagensů. Doporučujeme použití LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe a připravovat Master Mix 5x dle pokynů výrobce.

Poznámka: Všechny kroky provádějte na ledu.

Postup

- 1. Rozpusťte všechny potřebné komponenty a vložte je na led.**
Součásti kitu by měly být vyjmuty z mrazáku přibližně 10 min před zahájením přípravy.
- 2. Vortexujte a krátce centrifugujte všechny zkumavky (přibližně 10 s, 10,000 rpm, pro přemístění veškeré kapaliny do spodní části zkumavky).**
- 3. Připravte si následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace jsou uvedeny pro konečné objemy reakce.

Tabulka 10 popisuje schéma pipetování pro přípravu jedné směsi reagensů, vypočtené tak, aby se dosáhlo 20 µl konečného reakčního objemu. Pre-mix může být připraven podle počtu reakcí s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování

Tabulka 10. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μl)	VF: 16+1 reakcí (μl)	WT: 16+1 reakcí (μl)	Finální koncentrace
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x	4	68	68	1x
Směs primerů a prób, 25x (VF nebo WT, respektive)	0.8	13.6	13.6	1x
Voda pro PCR bez nukleáz	10.2	173.4	173.4	–
Vzorek (bude přidán v kroku 6)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	20	20 každý	20 každý	–

4. Vortexujte a krátce odstřed'te směs qPCR (VF a WT) (přibližně 10 s, 10 000 rpm, pro přemístění veškeré kapaliny do spodní části zkumavky).
5. Rozpipetujte 15 μ l qPCR pre-mixu (VF a WT) na kapiláru.
6. Přidejte 5 μ l každého vzorku DNA nebo kontroly do odpovídající jamky (celkový objem 20 μ l).
7. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
8. Zavřete kapiláry a krátce zcentrifugujte (500 x g, přibližně po dobu 5 s).
9. Umístěte kapiláry do termocykléru podle doporučení výrobce.
10. Naprogramujte LightCycler 1.2 pro teplotní profil vyznačený v Tabulce 11.

Tabulka 11. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Hold	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95°C 15 s 66°C 1 min s akvizicí FAM fluorescence: Jednotlivě

11. Pro přístroj LightCycler 1.2 doporučujeme režim F1/F2 a “druhé derivační analýzy“. Spustěte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v Tabulce 11.

Interpretace výsledků

Výpočet $\Delta\Delta C_T$ (nebo $\Delta\Delta C_p$) a genotypizace

Vyberte exportovaná data ze souboru „Analyze Export File“ generovaného systémem a analyzujte výsledky, jak je popsáno níže.

Poznámka: C_T hodnoty jsou získány z přístrojů Rotor-Gene, Applied Biosystems, a ABI PRISM. C_p hodnoty, které jsou získány ze systémů LightCycler, mohou být nahrazeny hodnotou C_T dle níže uvedeného popisu. Výpočty jsou uvedeny pro hodnoty C_T a mohou být aplikovány na C_p hodnoty stejným způsobem.

Důležité: Pokud není pozorována žádná amplifikace (tzn. “nedetekovatelná”, $C_T > 45$, nebo $C_p > 45$ v závislosti na použitém přístroji) pro oba PPM-JAK2 WT a PPM-JAK2 VF, výsledky nemohou být analyzovány. Tyto výsledky ukazují, že koncentrace DNA ve vzorku nebyla v přijatelném rozsahu nebo že DNA matrice byla vynechána. V opačném případě pokračujte s analýzou, která je popsána níže.

Postup

1. **Vypočítejte střední hodnotu C_T získanou z PPM-JAK2 V617F (průměr C_T VF) a PPM-JAK2 WT (průměr C_T WT) pro každý vzorek (kontroly, vzorek s hraniční hodnotou a neznámých vzorků).**

Jestliže jeden z duplikátů vzorku má "neurčenou" hodnotu, neberte ji v úvahu: používejte pouze hodnotu naměřenou pro druhý duplikát. V tomto případě doporučujeme opětovné přetestování vzorku.

Nejsou-li oba duplikáty stanoveny, nastavte hodnotu vzorku na 45.

2. **Vypočítejte vstupní limit (IL) dle následujícího schématu níže.**

Vstupní limit (IL) = Průměrná hodnota C_T WT pro COS + 3.3

Poznámka: Vstupní limit umožňuje ověřit, že s použitým vzorkem DNA pacienta bylo při testech správně zacházeno, aby byly konečné výsledky JAK2 V617F zaručeny.

3. Zkontrolujte kvalitu vzorku pro každý neznámý vzorek podle Tabulky 12.

Tabulka 12. Kritéria pro kvalitu vzorku

Pokud:	Poté:
Průměr C_T VF <40	Pokračujte krokem 4.
Průměr C_T VF \geq 40 a průměr C_T WT <IL	Pokračujte krokem 4.
Průměr C_T VF \geq 40 a průměr C_T WT \geq IL	Vzorek nemůže být analyzován.*

* Koncentrace DNA ve vzorku nebyla v přijatelném rozsahu nebo DNA matrice byla vynechána.

4. Vypočítejte hodnotu ΔC_T pro všechny validní vzorky (ΔC_T Vzorku) a kontrol (ΔC_T PC-VF, ΔC_T NC-VF, a ΔC_T COS) dle schématu uvedeného níže.

$$\Delta C_T = \text{Průměr } C_T \text{ VF} - \text{Průměr } C_T \text{ WT}$$

5. Vypočítejte hodnotu $\Delta\Delta C_T$ pro každý jednotlivý neznámý vzorek ($\Delta\Delta C_T$ Sample) a pro každou kontrolu ($\Delta\Delta C_T$ PC-VF a ($\Delta\Delta C_T$ NC-VF) dle schémat uvedených níže.

$$\Delta\Delta C_T \text{ Vzorku} = \Delta C_T \text{ COS} - \Delta C_T \text{ Vzorku}$$

$$\Delta\Delta C_T \text{ PC-VF} = \Delta C_T \text{ COS} - \Delta C_T \text{ PC-VF}$$

$$\Delta\Delta C_T \text{ NC-VF} = \Delta C_T \text{ COS} - \Delta C_T \text{ NC-VF}$$

6. Vypočítejte šedou zónu nebo oblast nejistoty kolem COS-VF dle schématu uvedeného níže.

Poznámka: Šedá zóna (GZ) testu je definována jako oblast, v které nejsou naměřené hodnoty dostatečně přesné. Hodnota v šedé zóně udává, že cílová sekvence nemůže být hodnocen ani jako přítomna, ani jako chybějící. Šedá zóna musí být vypočítána pro každý experiment. Na základě pozorovaných odchylek v průběhu provádění studií přesnosti (viz "Výkonnostní charakteristiky", strana 32) byla GZ definována jako $\pm 7\%$ z hodnoty $\Delta C_T \text{ COS}$.

Tento výpočet je platný pro všechny experimenty na všech doporučených přístrojích.

$$\text{GZ: } [(-\Delta C_T \text{ COS} \times 0.07); (+\Delta C_T \text{ COS} \times 0.07)]$$

7. Určete genotyp neznámých vzorku podle Tabulky 13.

Tabulka 14 ukazuje příklad výpočtu a interpretace výsledků pro reprezentativní experiment.

Tabulka 13. Interpretace výsledků genotypizaci.

Výsledky	Interpretace
$\Delta\Delta C_{T \text{ Vzorku}} > +\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0.07$	JAK2 V617F mutace je detekována.
$\Delta\Delta C_{T \text{ Vzorku}} < -\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0.07$	JAK2 V617F mutace není detekována.
$\Delta\Delta C_{T \text{ Vzorku}}$ v rámci GZ ($-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0.07 \leq \Delta\Delta C_{T \text{ Vzorku}} \leq +\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0.07$)	Nejasný výsledek.

Tabulka 14. Příklad výpočtu a interpretace výsledků pro reprezentativní experiment.

Vzorek	C_T VF	Průměr C_T VF	C_T WT	Průměr C_T WT	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	Ohodnocení
PC	27.82	27.74	40.27	40.24	-12.50	20.12	Pozitivní
PC	27.66		40.20				
NC	41.23	41.10	26.66	26.76	14.34	-6.72	Negativní
NC	40.96		26.85				
COS	35.04	34.85	27.28	27.23	7.62	0	IL = 30.53 GZ: -0.53 to +0.53
COS	34.66		27.17				
Vzorek 1	42.15	41.63	28.86	28.80	12.83	-5.21	Negativní
Vzorek 1	41.10		28.73				
Vzorek 2	30.54	30.73	28.99	29.10	1.63	5.99	Pozitivní
Vzorek 2	30.92		29.20				
Vzorek 3	37.31	37.71	30.11	30.22	7.49	0.13	Nejasný (v rámci GZ)
Vzorek 3	38.11		30.33				
Vzorek 4	45	45	39.25	38.85	Nemohl být analyzován (Průměr C_T VF >40 a průměr C_T WT >IL)		
Vzorek 4	45		38.45				

Kontroly

Kontrola s vodou by neměla dávat žádnou hodnotu C_T (nebo C_p jak s JAK2 V617F, tak i s JAK2 WT. Hodnota C_T (C_p) v kontrole s vodou může znamenat přítomnost křížové kontaminace viz "Návod na řešení problémů" níže.

PC-VF by měla být interpretována jako vzorek ve kterém je detekována přítomnost mutace JAK2 V617F.

NC-VF by měla být interpretována jako vzorek, ve kterém nebyla detekována přítomnost mutace JAK2 V617F.

Sledujte "Návod na řešení problémů" níže pro interpretaci nejasných výsledků.

Návod na řešení problémů

Tento průvodce řešením problémů může být užitečný při řešení případných problémů, které mohou nastat. Další informace viz také stránka Často kladené dotazy na Centru technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z QIAGEN technické podpory vždy rádi zodpovědí všechny Vaše otázky, které můžete mít ohledně informací a protokolů v této příručce nebo vzorcích a technologiích (pro kontaktní informace čtěte "Kontaktní informace", strana 37).

Komentáře a návrhy

Negativní signál pozitivní kontroly

- | | |
|--|--|
| a) Chyba pipetování | Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Zopakujte cyklus PCR. |
| b) Nevhodné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit skladujte při -30 až -15°C a chraňte směs primerů a sond (PPM) před světlem. Viz "Skladování činidel a manipulace s nimi", strana 12.
Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování
Rozdělte reagenty do alikvót pro skladování |

Komentáře a návrhy

Negativní kontroly jsou pozitivní nebo pozitivní kontroly jsou pozitivní se špatným PPM

- | | |
|---------------------|--|
| Křížová kontaminace | Vyměňte všechny nezbytné reagensy.
Zopakujte experiment pomocí nových alikvót reagensů.
Se vzorky, součástmi soupravy a spotřebním materiálem vždy zacházejte v souladu s běžně přijímanou praxí, abyste zabránili kontaminaci |
|---------------------|--|

Žádný signál, ani v pozitivních kontrolách

- | | |
|---|---|
| a) Chyba pipetování nebo vynechané reagensy | Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Opakujte PCR reakci. |
| b) Inhibiční účinky materiálu vzorku způsobené nedostatečnou purifikací | Zopakujte přípravu DNA. |
| c) LightCycler: Nesprávně vybraný detekční kanál | Nastavte parametr kanálu na F1/F2 nebo 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Není naprogramováno pořadí dat. | Zkontrolujte programy cyklů.
U režimu pořizování dat zvolte „single“ na konci každého anealingového segmentu PCR programu. |

Chybějící nebo slabý signál u vzorků, avšak pozitivní kontroly jsou v pořádku.

- | | |
|---|---|
| Špatná kvalita nebo nízká koncentrace DNA | Před zahájením experimentu vždy zkontrolujte kvalitu DNA a koncentraci. |
|---|---|

Komentáře a návrhy

LightCycler: Příliš nízká intenzita fluorescence

- a) Nevhodné skladování součástí soupravy Skladujte soupravu ipsogen JAK2 MutaSearch Kit při -30 až -15°C a chraňte směs primerů a sond (PPM) před světlem, viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“, strana 12.
Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování
Rozdělte reagenty do alikvót pro skladování
- b) Velmi nízké prvotní množství cílové DNA Zvyšte množství DNA ve vzorku.
Poznámka: V závislosti na vybrané metodě přípravy DNA se mohou objevit inhibiční účinky.

LightCycler: Rozdíly v intenzitě fluorescence

- a) Chyba pipetování Variabilita způsobená takzvanou chybou pipetování může být omezena analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.
- b) Nedostatečná centrifugace kapilár. Připravená směs PCR může být stále v horní části nádoby kapiláry nebo může být ve špičce kapiláry zachycena vzduchová bublina.
Vždy proveďte odstředění kapilár naplněných reakční směsí dle popisu v provozní příručce k danému zařízení.
- c) Znečištění vnějšího povrchu kapiláry. Při manipulaci s nimi vždy noste na ruku rukavice.

Kontrola kvality

V souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobků společnosti QIAGEN je každá výrobní šarže souprav *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu. Certifikáty analýzy jsou k dispozici na požádání na stránkách www.qiagen.com/support/.

Omezení

Všechny reagenty mohou být používány výlučně v diagnostice in vitro.

Tento produkt je určen pouze pro použití pracovníky speciálně poučenými a vyškolenými v in vitro diagnostických technikách.

Pro dosažení optimálních výsledků PCR je nutno přísně dodržovat pokyny uvedené v uživatelské příručce.

Je třeba věnovat pozornost datům expirace vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti po datu expirace.

Všechny získané diagnostické výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými nebo laboratorními nálezy. Každý uživatel je zodpovědný za platnost funkčnosti systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčnosti výrobků QIAGEN.

Výkonnostní charakteristiky

Laboratorní studie

Laboratorní studie byly provedeny za účelem stanovení analytické výkonnosti soupravy *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit.

Přesnost v blízkosti hraničních hodnot

Tři nezávislé vzorky s nízkou úrovní mutací byly měřeny 38 krát po třech za použití soupravy *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit na přístroji Applied Biosystems 7500. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 15 a 16.

Tabulka 15. Hodnoty ΔC_T a přesná data pro laboratorní studie

Vzorek (% V617F alela)	ΔC_T [minimum ; maximum]	Variační koeficient (%)
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%

Tabulka 16. Genotypizační výsledky dle výpočtu hodnot $\Delta\Delta C_T$ pro laboratorní studie

Vzorek (% V617F alela)	Replikáty	Detekované mutace	Nejasný výsledek	Nedetekovaná mutace
0.5%	38	0	3	35
1%	38	3	27	4
2%	38	33	5	0

Pro 92% z 0.5% JAK2 V617F vzorků nebyla mutace detekována.

Pro 87% z 2% JAK2 V617F vzorků byla mutace detekována.

Vstupní omezení

Doporučené množství genomové DNA je 25 ng. Rozdílné množství vstupní DNA bylo testováno za účelem zjištění, zda množství genomové DNA může mít vliv na interpretaci výsledku. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 17.

Tabulka 17. Efekt množství vstupní genomové DNA

Vzorek (% V617F alela)	Vstupní množství (ng)	Replikáty	Detekované mutace	Nejasný výsledek	Nedetekované mutace
<1%	2.5	6	Vzorky nebyly analyzovány (hodnoty >IL)		
	10	6	0	1	5
	25	6	0	0	6
	100	6	0	0	6
	250	6	0	0	6
Celkem <1%		30	0	1	23
1%	2.5	3	Vzorky nebyly analyzovány (hodnoty >IL)		
	10	3	0	1	2
	25	3	0	2	1
	100	3	0	3	0
	250	3	0	2	1
Celkem 1%		15	0	8	4
2%, 4%, 50%, 78%, nebo 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
Celkem		75	75	0	0

Analýza ředěných nebo vysoce koncentrovaných vzorků (tzn. <5 ng/μl DNA nebo >5 ng/μl DNA, resp.) zhodnotila, že takové koncentrace mohou ovlivnit $\Delta\Delta C_T$ (nebo $\Delta\Delta C_p$). To však nevede k falešně negativním nebo pozitivním výsledkům, jen k nejasným výsledkům s velmi nízkým procentem JAK2 V617F.

Klinické studie

Vzorky DNA od 81 pacientů s podezřením na myeloproliferativní neoplazii (extrahované z krve nebo kostní dřeně) a dříve charakterizovány s použitím soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (QIAGEN, kat. č. 673223), byly analyzovány společně s 9 vzorky DNA od zdravých dárců s použitím soupravy *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit na přístroji Applied Biosystems 7500. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 18.

Tabulka 18. Výsledky pro vzorky s použitím souprav *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit a *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit-

		<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit		
		Detekovaná mutace	Neprůkazné	Nedekované mutace
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit	Vzorky			
	Detekovaná mutace	37	1	1
	Neprůkazné	0	0	1
	Nedetekované mutace	0	0	50

Celková shoda byla 98.9% (95% interval spolehlivosti: 93.8–99.8%).

Pozitivní shoda byla 100.0% (95% interval spolehlivosti: 90.6–100.0%).

Negativní shoda byla 98.0% (95% interval spolehlivosti: 89.7–99.7%).

Literatura

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.

Symbols

On the packaging and labeling, the following symbols may occur:



<N>

Contains sufficient reagents for <N> reactions



Useful until

IVD

In vitro diagnostic device

	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Materiálové číslo
	Číslo Global Trade Item
	Teplotní omezení
	Výrobce
	Zkonzultujte s návodem k použití

Kontaktní informace

Technickou pomoc a další informace naleznete v našem centru technické podpory na stránkách www.qiagen.com/Support, nebo se obraťte telefonicky na 00800-22-44-6000, nebo kontaktujte některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte www.qiagen.com).

Informace pro objednání

Produkt	Obsah balení	Kat. č.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit (24)	Pro 24 reakcí: V617F Pozitivní kontrola, V617F Negativní kontrola, V617F vzorek s hraniční hodnotou, Směs primerů a prób JAK2 a JAK2 V617F	673823
Rotor-Gene Q MDx —validovaný pro IVD real-time PCR analýzu v klinických aplikacích		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cykler a High Resolution Melt analyzér s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus HRM kanál, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení, instalace a zaškolení nejsou zahrnuty	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cykler a High Resolution Melt analyzér s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus HRM kanál, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení, instalace a zaškolení	9002033
QIAamp® DNA Blood Maxi Kit — pro purifikaci genomové DNA z krve		
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10)	Pro 10 DNA maxiprepů: 10 QIAamp Maxi Spin kolonky, QIAGEN Proteáza Pufry, Sběrné zkumavky (50 ml)	51192
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50)	Pro 50 DNA maxiprepů: 50 QIAamp Maxi Spin kolonky, QIAGEN Proteáza, Pufry, Sběrné zkumavky (50 ml)	51194

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty naleznete v příslušných příručkách a uživatelském manuálu. QIAGEN příručky a uživatelské manuály jsou dostupné na www.qiagen.com nebo mohou být vyžádány u QIAGEN technického servisu a u Vašeho místního distributora.

Tento výrobek je určen pro diagnostiku in vitro. Výrobky ipsogen nesmí být dále prodávány, upravovány pro další prodej ani použity pro výrobu komerčních výrobků bez písemného schválení společnosti QIAGEN.

Informace v tomto dokumentu se mohou měnit bez předchozího upozornění. Společnost QIAGEN nepřebírá odpovědnost za jakékoliv chyby, které se mohou vyskytnout v tomto dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době publikace. Společnost QIAGEN nenesou za žádných okolností odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo následné škody v souvislosti nebo vyplývající z použití tohoto dokumentu.

Na výrobky ipsogen se vztahuje záruka, že splňují uváděné specifikace. Výhradní uvážení společnosti QIAGEN a náhrada zákazníkovi je omezeno na bezplatnou výměnu výrobku v případě, že výrobek nespĺní vlastnosti dle záruky.

Tento výrobek je prodáván dle licenčního ujednání se společností Epoch Biosciences, a to pouze pro účely diagnostiky in vitro, a nesmí být použit pro žádný jiný výzkum, komerční ani klinický výzkum nebo jiné účely mimo diagnostiky in vitro.

Mutace JAK2 V617F a její použití je chráněno patentovými právy, včetně Evropského patentu EP1692281, patentů USA 7,429,456 a 7,781,199, podaných patentových žádostí USA US20090162849 a US20120066776, a zahraničních protějšků.

Nákup tohoto výrobku nezaručuje žádná práva na jeho použití v klinických zkouškách pro léky zacílené na JAK2 V617F. Společnost QIAGEN vytváří pro tyto účely specifické licenční programy. Kontaktujte prosím naše právní oddělení na e-mailové adrese jak2licenses@qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, HRM®, ipsogen®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, VIC® (Thermo Fisher Scientific Inc.); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); Excel® (Microsoft Corporation); iCycler® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); MGB™ (Epoch Biosciences).

Ujednání o omezené licenci

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel soupravy ipsogen JAK2 MutaScreen Kit svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Soupravu ipsogen JAK2 MutaScreen Kit lze používat pouze v souladu s pokyny uvedenými v příručce ipsogen JAK2 MutaScreen Kit Handbook a pouze se součástmi, které souprava obsahuje. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění složek, které jsou součástí této soupravy, společně s kterýmikoli složkami, které nejsou součástí této soupravy, s výjimkou případě popsaných v příručce ipsogen JAK2 MutaScreen Kit Handbook a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovně nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

HB-1354-004 © 2013–2016 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

