

Handbok till *ipsogen*[®] JAK2 *MutaQuant*[®]-kit

 12 (katalognr 673522)

 24 (katalognr 673523)

Version 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS,
Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System och
LightCycler[®] -instrument



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1072501SV



QIAGEN Sample & Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar framgång från prov till resultat.

QIAGEN bestämmer normerna vid:

- rening av DNA, RNA och proteiner
- nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- automatisering av provtagnings- och analystekniker

Vårt uppdrag är att göra det möjligt för dig att uppnå utomordentliga framgångar och genombrott. Det finns mer information på **www.qiagen.com**.

Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring	4
Princip för proceduren	6
Material som medföljer	9
Kitinnehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	10
Varningar och försiktighet	12
Allmänna försiktighetsåtgärder	12
Förvaring och hantering av reagens	12
Procedur	14
Beredning av prov-DNA	14
Protokoller	
■ qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor	15
■ qPCR på instrumenten ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480	20
■ qPCR på LightCycler 1.2-instrument	26
Tolkning av resultat	31
Felsökningshandbok	35
Kvalitetskontroll	38
Begränsningar	39
Prestandaegenskaper	40
Bänkstudier	40
Kliniska studier	41
Litteraturhänvisningar	43
Symboler	44
Kontaktinformation	44
Beställningsinformation	45

Avsedd användning

ipsogen JAK2 MutaQuant-kitet är ett kvantitativt in vitro-test som är avsett för detektion och kvantifiering av JAK2 V617F/G1849T-allel i genomiskt DNA som extraheras från perifert blod hos patienter med misstänkt myeloproliferativ neoplasia (MPN).

Även om JAK2 V617F/G1849T-mutationen saknas utesluter det inte förekomsten av andra JAK2-mutationer. Testet kan rapportera falska negativa resultat om det finns ytterligare mutationer i nukleotiderna 88504 till 88622 (1).

Obs! Kitet ska användas enligt anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument. All ej angiven användning av denna produkt och/eller modifiering av komponenterna fritar QIAGEN från ansvar.

Sammanfattning och förklaring

En återkommande somatisk mutation, V617F, som påverkar genen för Janus-tyrosinkinase 2 (JAK2), identifierades år 2005 (2–5), vilket ledde till ett stort genombrott i förståelsen, klassificeringen och diagnostiseringen av myeloproliferativa neoplasier (MPN). JAK2 är en viktig intracellulär signalmolekyl för ett flertal cytokiner, inklusive erytropoetin.

JAK2 V617F-mutationen detekteras hos > 95 % av alla patienter med polycythemia vera (PV), 50–60 % av alla patienter med essentiell trombocytemi (ET) och 50 % av alla patienter med primär myelofibros (PMF). JAK2 V617F har även detekterats i vissa sällsynta fall av kronisk myelomonocytisk leukemi, myelodysplastiskt syndrom, systemisk mastocytos och kronisk neutrofil leukemi, men i 0 % av KML (6).

Mutationen motsvarar en enkel nukleotidförändring av JAK2-nukleotid 1849 i exon 14, vilket leder till ett unikt utbyte av valin (V) till fenylalanin (F) vid position 617 av proteinet (JH2-domänen). Det leder till grundläggande aktivering av JAK2, hematopoetisk transformation in vitro, och tillväxt av erytropoetin-oberoende erytroidkoloni (EEC) hos alla patienter med PV och en stor andel av ET- och PMF-patienter (7). JAK2 V617F utgör en viktig drivkraft i transformationen av hematopoetiska celler vid MPN, men de exakta patologiska mekanismerna som, med samma unika mutation, leder till så olika kliniska och biologiska enheter är ännu inte helt klarlagda.

Traditionellt baserades diagnosen av MPN på kliniska fynd, benmärgshistologi och cytogenetiska kriterier. Upptäckten av en sjukdomsspecifik molekyllär markör ledde både till en förenklad process och bättre diagnostisk noggrannhet. Detektion av JAK2 V617F-mutationen ingår nu i WHO 2008-referenskriterierna för diagnostisering av BCR-ABL-negativ MPN (tabell 1), och närvaron av denna mutation är ett viktigt kriterium för diagnostisk konfirmation.

Tabell 1. WHO-kriterier för diagnostisering av MPN (hämtad från referens 8)

Kriterier för en diagnos på polycythemia vera (PV)	
Viktigt	<p>1. Hemoglobin (Hgb) > 18,5 g.dl⁻¹ (män) eller > 16,5 g.dl⁻¹ (kvinnor) eller Hgb eller hematokrit (Hct) > 99:e percentilen av referensintervallet för ålder, kön eller bostadsortens höjd över havet eller Hgb > 17 g.dl⁻¹ (män) eller >15 g.dl⁻¹ (kvinnor) om associerad med ihållande ökning på ≥ 2 g.dl⁻¹ från baslinjen som inte kan hänföras till korrigerad järnbrist eller Förhöjd röd blodcellsmassa > 25 % över normalt predikterat medelvärde</p> <p>2. Förekomst av <i>JAK2V617F</i> eller likartad mutation</p>
Mindre viktigt	<p>1. Myeloproliferation i benmärg (trilinjär) 2. Subnormal serumnivå av erytropoetin 3. Tillväxt av endogen erytroid koloni (EEC)</p>
Kriterier för en diagnos på essentiell trombocytemi (ET)	
Viktigt	<p>1. Trombocytal ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹ 2. Megakaryocytproliferation med utbredd och mogen morfologi. Ingen eller föga granulocyt- eller erytroidproliferation 3. Uppfyller inte WHO-kriterier för kronisk myeloisk leukemi (KML), PV, primär myelofibros (PMF), myelodysplastiskt syndrom (MDS) eller annan myeloid neoplasi</p> <p>4. Demonstration av <i>JAK2V617F</i> eller annan klonal markör eller Ingen evidens för reaktiv trombocytos</p>
Mindre viktigt	-
Kriterier för en diagnos på primär myelofibros (PMF)	
Viktigt	<p>1. Megakaryocytproliferation och -atypi åtföljt av antingen retikulinoch/eller kollagenfibros eller I frånvaro av retikulinfibros måste megakaryocytförändringarna åtföljas av ökad cellularitet i benmärgen, granulocytisk proliferation och ofta minskad erytropoes (dvs. prefibrotisk PMF) 2. Uppfyller inte WHO-kriterier för (KML), PV, MDS eller annan myeloid neoplasi</p> <p>3. Demonstration av <i>JAK2V617F</i> eller annan klonal markör eller Ingen evidens för reaktiv mägdfibros</p>
Mindre viktigt	<p>1. Leukoerytroblastos 2. Förhöjt laktatdehydrogenas (LDH) i serum 3. Anemi 4. Palpabel splenomegali</p>

Nyligen har internationella experter föreslagit kriterier för terapeutiska prövningar med PV och ET. Baserat på data om allograft, alfa-interferon eller hydroxikarbamid, har JAK2V617F-kvantifiering inkorporerats som ett potentiellt användbart verktyg för att övervaka behandlingssvar (9). En minskning av JAK2 V617F-bördan har observerats vid svar på vissa av de nya anti-JAK2-riktade läkemedlen som håller på att utvecklas kliniskt (10).

Princip för proceduren

Flera olika metoder har föreslagits för att kvantitativt bestämma andelen enkla nukleotida polymorfismer (SNP:er) i DNA-prover. Av dessa rekommenderas metoder som baseras på realtids kvantitativ polymeraskedjereaktion (qPCR) på grund av deras högre känslighet vilket möjliggör övervakning av allelbördan på ett longitudinellt sätt. Många av dessa metoder har en måttlig känslighet på 1–10 %, t.ex. TaqMan[®] alleldiskriminering, Pyrosequencing[®], smältkurvsanalys och direkt sekvensering. Vissa, t.ex. smältkurva och sekvensering, är endast semikvantitativa, medan andra, t.ex. pyrosekvensering, kräver bearbetning efter PCR eller instrument som inte är omedelbart tillgängliga eller har oöverkomligt höga startkostnader för rutinmässiga laborietester. En höggradigt känslig metod med en känslighet på < 0,1 % kräver användning av en SNP-specifik primer som möjliggör selektiv amplifiering av mutanten eller vildtypsallelen som är lätt att detektera på ett realtids-qPCR-instrument. *ipsogen JAK2 MutaQuant*-kitet är baserat på denna metod.

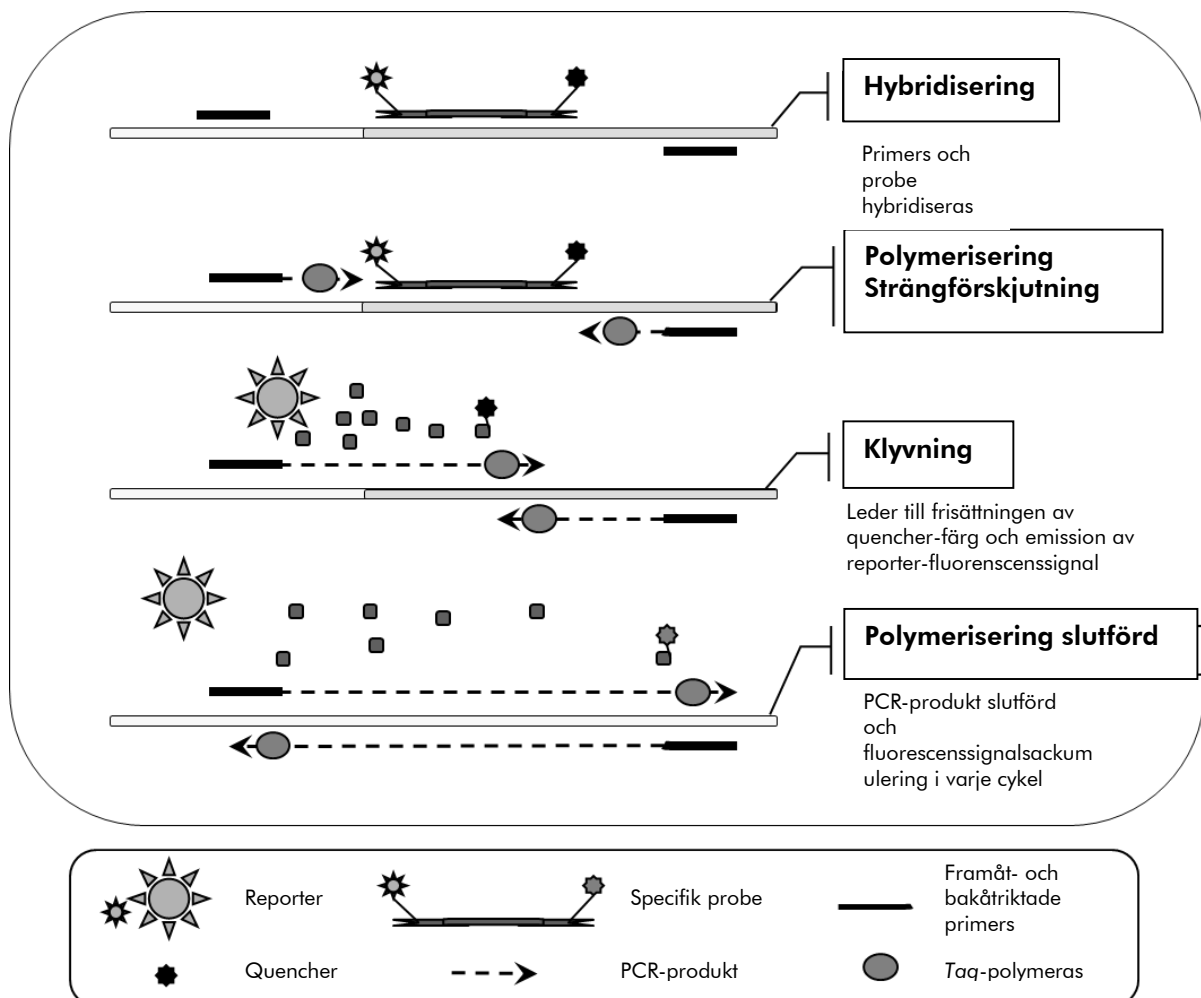
Användningen av qPCR medger noggrann kvantifiering av PCR-produkter under den exponentiella fasen av PCR-amplifieringsprocessen. Kvantitativa PCR-data kan erhållas snabbt, utan bearbetning efter PCR, genom realtidsdetektion av fluorescerande signaler under och/eller omedelbart efter PCR-cykling, och reducerar därmed drastiskt risken för kontamination av PCR-produkten. För närvarande finns det 3 huvudtyper av qPCR-metoder att tillgå: qPCR-analys med SYBR[®] Green I-färg, qPCR-analys med hydrolysprober och qPCR-analys med hybridiseringsprober.

I denna analys används principen för qPCR-dubbelfärgad oligonukleotidhydrolysis. Under PCR hybridiseras framåtriktade primers och bakåtriktade primers till en specifik sekvens. En dubbelfärgad oligonukleotid ingår i samma blandning. Denna probe, som består av en oligonukleotid märkt med en 5' reporter-färg och en nedströms, 3' quencher-färg, hybridiseras till en målsekvens inom PCR-produkten. Vid qPCR-analys med hydrolysprober används 5'→3' exonukleasaktiviteten för *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymeras. När proben är intakt leder närheten mellan reporter-färgen och quencher-färgen till suppression av reporter-fluorescensen främst genom energiöverföring av Förster-typ.

Under PCR, om det intressanta målet är närvarande, hybridiseras proben specifikt mellan ställena för framåt- och bakåtriktad primer. 5'→3'-

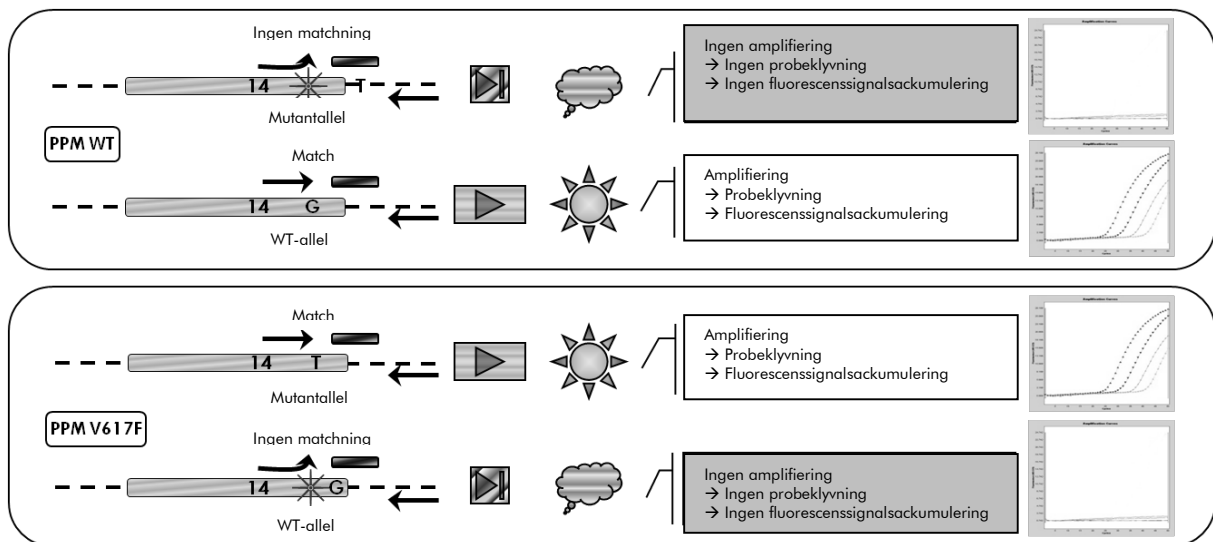
exonukleasaktiviteten för DNA-polymeraset klyver proben mellan reporter och quencher endast om proben hybridiseras till målet. Probefragmenten förskjuts sedan från målet och polymeriseringen av strängen fortsätter. Probens 3'-ände blockeras för att förhindra förlängning av proben under PCR (figur 1). Denna process uppstår i varje cykel och stör inte den exponentiella ackumuleringen av produkt.

Ökningen av fluorescenssignalen detekteras endast om målsekvensen är komplementär till proben och därigenom amplifieras under PCR. På grund av dessa krav detekteras inte icke-specifik amplifiering. Alltså är ökningen av fluorescens direkt proportionell till målamplicifieringen under PCR.



Figur 1. Reaktionsprincip.

Den kvantitativa allelspecifika PCR-tekniken som används i detta analyskit möjliggör en känslig, noggrann och höggradigt reproducerbar detektion av SNP:er. Denna metod baseras på användningen av specifika framåtriktade primers, för vildtypen och V617F-allelen (11). Endast en perfekt match mellan primer och mål-DNA möjliggör förlängning och amplifiering i PCR (figur 2).



Figur 2. Allelspecifik PCR. Användning av vildtyp eller V617F-primers och probeblandning gör det möjligt att specifikt detektera vildtypsallelen eller den muterade allelen i två separata reaktioner som utförs med samma prov. Resultat kan uttryckas som procent av VF-kopior bland det totala antalet JAK2-kopior.

Material som medföljer

Kitinnehåll

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

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalognr		673522	673523
Antal reaktioner		12	24
WT-3 Standard Dilution, 50,000 copies (WT-4-standardspädning, 5000 kopior) (5 x 10 ³ wild-type copies/5 µl [vildtypskopior/5 µl])	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT-4-standardspädning, 50 000 kopior) (5 x 10 ⁴ wild-type copies/5 µl [vildtypskopior/5 µl])	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Primers och probeblandning JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F (Primers och probeblandning JAK2 V617F) [†]	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (engelska)		1	1

* Blandning av specifika bakåt- och framåtriktade primers för vildtyps-JAK2-kontrollgenen plus en specifik FAM[™]-TAMRA[™]-probe.

[†] Blandning av specifika bakåt- och framåtriktade primers för JAK2 V617F-mutationen plus en specifik FAM-TAMRA-probe.

Obs! Vortexblanda och centrifugera kortvarigt standardspädningarna samt primers och probeblandningar före användning.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Om du vill ha mer information hänvisas till tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

Reagenser

- Nukleasfritt vatten av PCR-grad
- Buffert och Taq DNA-polymeras: De validerade reagenserna är TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, kat. nr 4304437) och 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)

Konsumtionsvaror

- Nukleasfria aerosolresistenta sterila PCR-pipettspetsar med hydrofoba filter
- 0,5 ml eller 1,5 ml nukleasfria PCR-rör
- Is

Utrustning

- Mikroliterpipett* avsedd för PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1 000 μ l)
- Bänkcentrifug* med rotor för 0,5 ml/1,5 ml reaktionsrör och mikroplattor (som klarar 13 000–14 000 rpm)
- Realtids-PCR-instrument:* Rotor-Gene Q 5plex HRM[®] eller annan Rotor-Gene; LightCycler 1.2 eller 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; samt tillhörande specifikt material
- Biophotometer

* Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer.

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpligt säkerhetsdatablad (SDS) för mer information. Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut säkerhetsdatablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

Allmänna försiktighetsåtgärder

Användning av qPCR-tester kräver god labororiesed, inklusive underhåll av utrustning som är avsedd för molekylärbioologi och överensstämmer med gällande regler och relevanta standarder.

Detta kit är avsett för in vitro-diagnostik. Reagenser och anvisningar som ingår i satsen har validerats avseende optimal prestanda. Ytterligare spädning av reagenserna eller ändrade inkubationstider och temperaturer kan leda till felaktiga eller diskordanta data. PPM-WT- och PPM-VF-reagenser kan förändras om de utsätts för ljus. Alla reagenser är formulerade specifikt för att användas med detta test. För optimal testprestanda ska inga ersättningar göras.

Var extremt försiktig för att förhindra:

- DNAs-kontamination som kan leda till nedbrytning av templat-DNA
- DNA- eller PCR-överföringskontamination som leder till falsk positiv signal

Därför rekommenderas följande:

- Använd nukleasfritt labbmateriel (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och använd handskar när du utför analysen.
- Använd nya aerosolresistenta pipettspetsar vid samtliga pipetteringssteg för att undvika korskontamination av prover och reagenser.
- Bered pre-PCR-masterblandningen med särskilt material (pipetter, spetsar osv.) i ett särskilt område där inga DNA-matriser (DNA, plasmid eller PCR-produkter) förs in. Tillsätt templat i en separat zon (helst i ett separat rum) med specifikt materiel (pipetter, spetsar osv.).

Förvaring och hantering av reagens

Kiten levereras på kolsyreis och måste förvaras vid -15 °C till -30 °C efter leverans.

- Minimera exponering för ljus när det gäller primers och probeblandningar (PPM-WT- och PPM-VF-rör).

- Blanda och centrifugera rören försiktigt innan de öppnas.
- Förvara alla kitkomponenter i originalbehållarna.

Dessa förvaringsvillkor avser såväl öppnade som oöppnade komponenter. Komponenter som förvaras under andra villkor än de som anges på etiketterna fungerar eventuellt inte som de ska och kan ha en negativ påverkan på analysresultaten.

Utgångsdatum för varje reagens anges på de enskilda komponentetiketterna. Under korrekta förvaringsvillkor behåller produkten sin prestanda fram till utgångsdatumet som står på etiketten.

Det finns inga uppenbara tecken som visar att produkten är instabil. Positiva och negativa kontroller ska dock köras samtidigt med okända prover.

Procedur

Beredning av prov-DNA

Genomiskt DNA ska erhållas antingen från helblod, lymfocyter från renat perifert helblod, polynukleära celler eller granulocyter. För jämförbara resultat rekommenderas att samma cellfraktion och DNA-extraheringsmetod används. DNA-extrahering kan utföras med en egen metod eller ett kit som är tillgängligt i handeln.

DNA-kvantiteten ska bestämmas genom mätning av den optiska densiteten (OD) för provet vid 260 nm och DNA-kvalitet kan bestämmas antingen med spektrofotometri eller gel*-elektrofores.

- OD_{260}/OD_{280} -kvoten ska vara 1,7–1,9 och mindre kvoter än denna kan tyda på proteinkontamination eller förekomsten av organiska kemikalier.
- Elektroforesanalys på en 0,8–1,0 % agarosgel* ska möjliggöra visualiseringen av det isolerade DNA:t som ett tydligt streck på cirka 20 kb (en lätt utstrykning ger acceptabla resultat).

Det resulterande DNA:t måste spädas till en koncentration på 5 ng/ μ l i 1x TE-buffert* vid pH 8,0 och sedan förvaras vid +4 till +8 °C i 1 vecka eller vid –20 °C om det behövs en längre tids förvaring.

qPCR-reaktionen är optimerad för DNA-prover som innehåller 25 ng renat genomiskt DNA.

* Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Om du vill ha mer information hänvisas till tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor

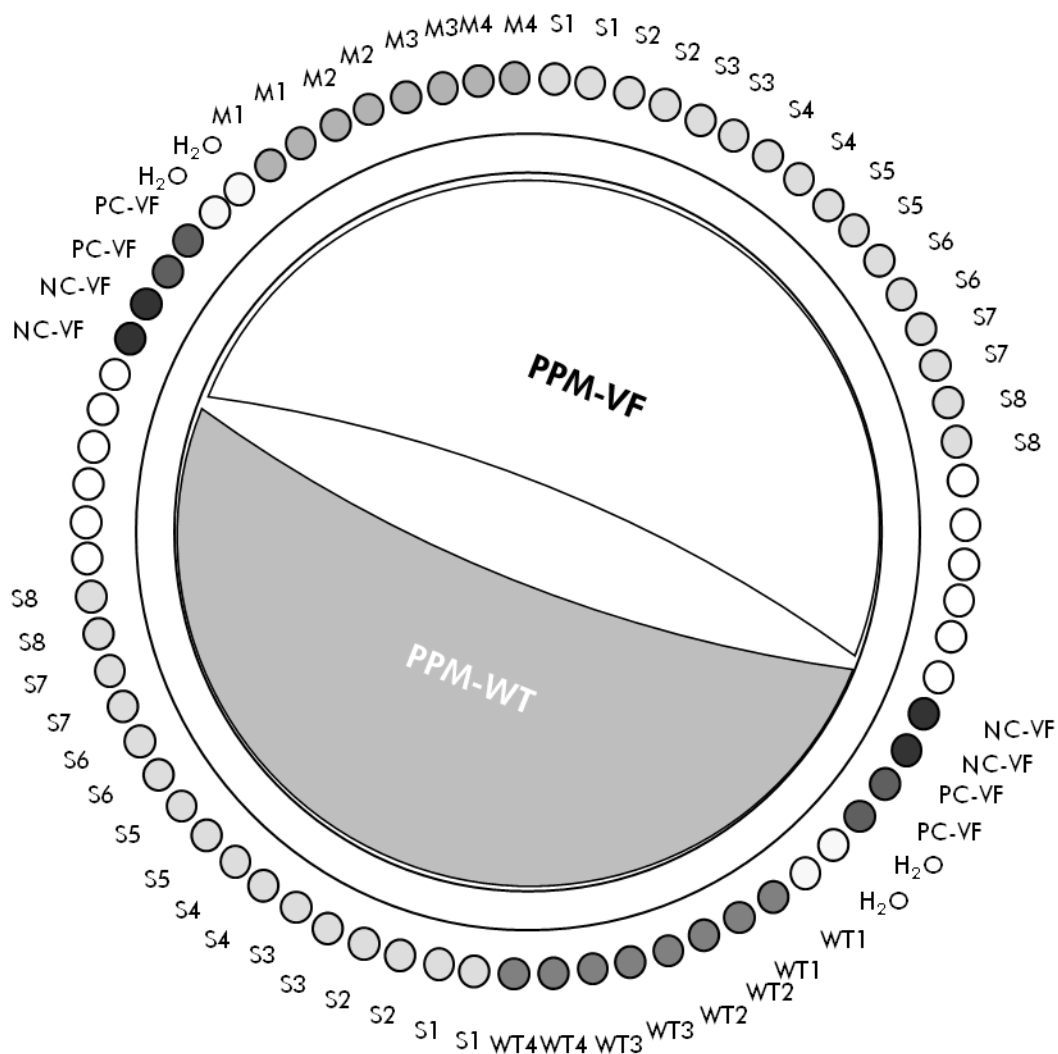
När detta instrument används rekommenderas att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 2.

Tabell 2. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primers och -probeblandning (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	8 reaktioner, var och en testad i duplikat
n DNA-prover	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: positiv kontroll (PC-VF) och negativ kontroll (NC-VF), var och en testad i duplikat
Vattenkontroll	2 reaktioner
Med JAK2-vildtypsprimers och -probeblandning (PPM-WT)	
4 vildtypsstandarder	8 reaktioner, var och en testad i duplikat
n DNA-prover	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: PC-VF och NC-VF, var och en testad i duplikat
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbearbetning på Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Vi rekommenderar att minst 8 DNA-prover testas med 24-reaktionskitet (katalognr 673523) och minst 6 DNA-prover med 12-reaktionskitet (katalognr 673522) i samma experiment för att optimera användningen av standarder och primers och probeblandningar.



Figur 3. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med *ipsogen 24* sample JAK2 MutaQuant-kitet. PC-VF: V617F positiv kontroll; NC-VF: V617F negativ kontroll; M-VF: V617F-standarder; M-WT: vildtypsstandarder; S: DNA-prov; H₂O: vattenkontroll

Obs! Var noga med att alltid placera ett prov som ska testas i position 1 på rotorn. I annat fall, under kalibreringssteget, kommer inte instrumentet att utföra kalibrering, och felaktiga fluorescensdata erhålls.

Fyll alla andra positioner med tomma rör.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Obs! Utför alla moment på is.

Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Bered den följande qPCR-blandningen enligt antalet prover som ska bearbetas.**

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen för reaktionen.

I tabell 3 och 4 beskrivs pipetterings-schemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad för att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 μ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med användning av samma primer och probeblandning (antingen PPM-VF eller PPM-WT). Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 3. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	V617F pre-mix 30 + 1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primers och probeblandning, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	201,5	–
Prov (tillsätts vid steg 4)	5,0	5 av varje	–
Total volym	25,0	25 av varje	–

Tabell 4. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	WT pre-mix 30 + 1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primers och probeblandning, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	201,5	–
Prov (tillsätts vid steg 4)	5,0	5 av varje	–
Total volym	25,0	25 av varje	–

- 3. Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen (VF eller WT) per rör.**
- 4. Tillsätt 5 μ l av materialet som ska kvantifieras (25 ng prov genomiskt DNA eller kontroll) i motsvarande rör (total volym 25 μ l).**
- 5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ner.**
- 6. Placera rören i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.**
- 7. Programmera Rotor-Gene Q-instrumentet med termocyklingsprogrammet så som visas i tabell 5.**

Tabell 5. Temperaturprofil

Analyssätt	Kvantifiering
Uppehåll	Temperatur: 50 grader Tid: 2 min.
Uppehåll 2	Temperatur: 95 C Tid: 10 min.
Cykling	50 ggr 95 °C i 15 sek. 62 °C i 1 min. med insamling av FAM-fluorescens i kanal Green (grön): Enkel

- 8. För Rotor-Gene Q-instrument, välj "Slope Correct" (Lutningskorrigerering) för analysen. Vi rekommenderar att tröskeln ställs in på 0,03. Starta termocyklingsprogrammet så som visas i tabell 5.**

LISTNUM \l 0 \s 0

Protokoll: qPCR på instrumenten ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480

Vid användning av qPCR-utrustning med en platta med 96 brunnar rekommenderas att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 6.

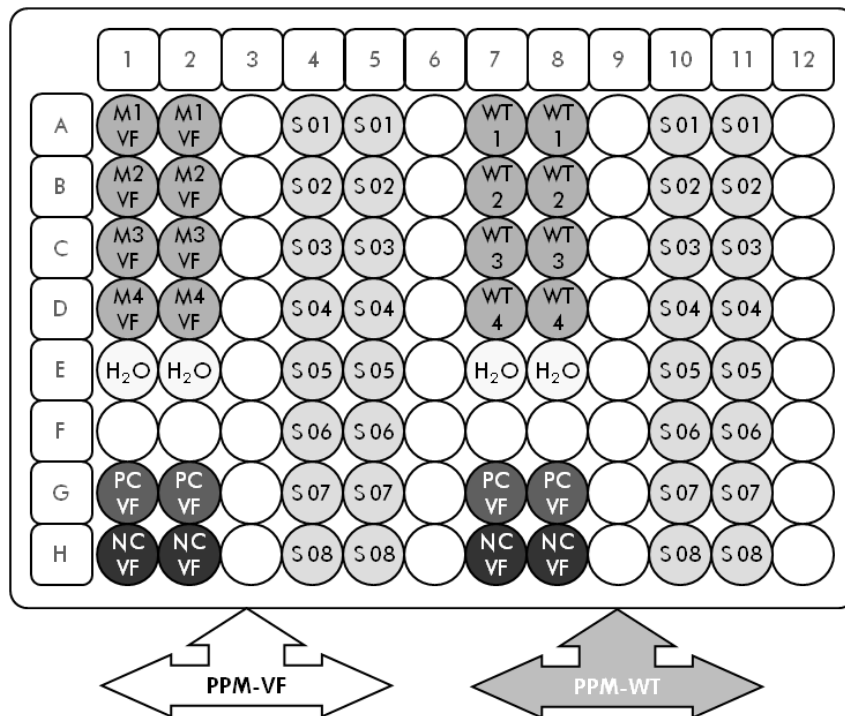
Tabell 6. Antal reaktioner vid användning av qPCR-utrustning med platta med 96 brunnar

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primers och -probeblandning (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	8 reaktioner, var och en testad i duplikat
n DNA-prover	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: PC-VF och NC-VF, var och en testad i duplikat
Vattenkontroll	2 reaktioner
Med JAK2-vildtypsprimers och -probeblandning (PPM-WT)	
4 vildtypsstandarder	8 reaktioner, var och en testad i duplikat
n DNA-prover	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	4 reaktioner: PC-VF och NC-VF, var och en testad i duplikat
Vattenkontroll	2 reaktioner

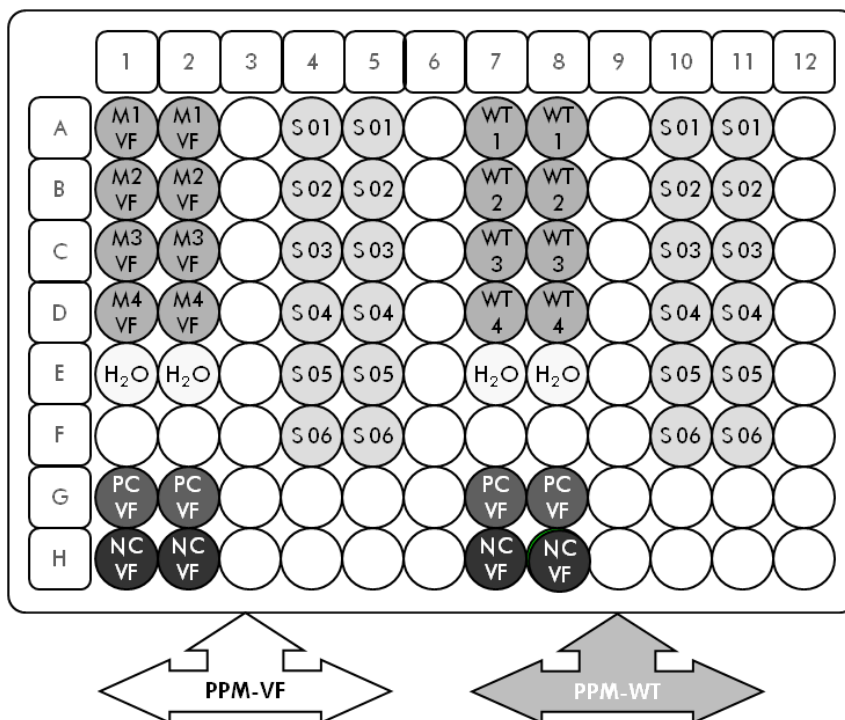
Provbearbetning på instrumenten ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480

Vi rekommenderar att 8 DNA-prover testas med 24-reaktionskitet (katalognr 673523) och minst 6 DNA-prover med 12-reaktionskitet (katalognr 673522) i samma experiment för att optimera användningen av standarder och primers och probeblandningar.

Plattschemat i figur 4 visar ett exempel på ett sådant experiment med 24-reaktionskitet (katalognr 673523) och i figur 5 visas ett exempel på ett sådant experiment med 12-reaktionskitet (katalognr 673522).



Figur 4. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment med 24-reaktionskitet (katalognr 673523). **PC-VF:** V617F positiv kontroll; **NC-VF:** V617F negativ kontroll; **M-VF:** V617F-standarder; **M-WT:** vildtypsstandarder; **S:** DNA-prov; **H₂O:** vattenkontroll



Figur 5. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment med 12-reaktionskitet (katalognr 673522). **PC-VF:** V617F positiv kontroll; **NC-VF:** V617F negativ kontroll; **M-VF:** V617F-standarder; **M-WT:** vildtypsstandarder; **S:** DNA-prov; **H₂O:** vattenkontroll

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

Obs! Utför alla moment på is.

Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Bered den följande qPCR-blandningen enligt antalet prover som ska bearbetas.**

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen för reaktionen.

I tabell 7 och 8 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad för att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 μ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med användning av samma primer och probeblandning (antingen PPM-VF eller PPM-WT). Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 7. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	V617F pre-mix			Slutlig 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
Primers och probeblandning, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	175,5	201,5	–
Prov (tillsätts vid steg 4)	5,0	5 av varje	5 av varje	–
Total volym	25,0	25 av varje	25 av varje	–

Tabell 8. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	WT pre-mix			Slutlig 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
Primers och probeblandning, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	175,5	201,5	–
Prov (tillsätts vid steg 4)	5,0	5 av varje	5 av varje	–
Total volym	25,0	25 av varje	25 av varje	–

3. **Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen (VF eller WT) per brunn.**
4. **Tillsätt 5 μ l av materialet som ska kvantifieras (25 ng prov genomiskt DNA eller kontroll) i motsvarande brunn (total volym 25 μ l).**
5. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ner.**
6. **Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 sekunder).**
7. **Placera plattan i termocyklern enligt tillverkarens rekommendationer.**
8. **Programmera termocyklern med termocyklingsprogrammet och ställ in instrumentet för insamling av dubbelmärkt FAM fluorescensprobe så som anges i tabell 9 för instrumenten ABI PRISM 7900HT SDS och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, eller i tabell 10 för LightCycler 480-instrumentet.**

Tabell 9. Temperaturprofil för ABI PRISM 7900HT SDS och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Analyssätt	Standardkurva - Absolut kvantifiering
Uppehåll	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minuter
Uppehåll 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter
Cykling	50 ggr 95 °C i 15 sek. 63 °C i 1 minut och 30 sek. med insamling av FAM-fluorescens; quencher: TAMRA

Tabell 10. Temperaturprofil för LightCycler 480-instrument

Analyssätt	Absolut kvantifiering ("Abs Quant")
Detektionsformat	Välj "Simple Probe" (Enkel probe) i fönstret Detection formats (Detektionsformat)
Uppehåll	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minuter
Uppehåll 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter
Cykling	50 ggr 95 °C i 15 sek. 63 °C i 1 minut och 30 sekunder med insamling av FAM-fluorescens motsvarande (483–533 nm) för LC-version 01 och (465–510 nm) för LC-version 02

9. För ABI PRISM 7900HT och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, följ steg 9a. För LightCycler 480-instrumentet, följ steg 9b.

9a. ABI PRISM 7900HT and Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Vi rekommenderar en tröskel inställd på 0,1. Starta cyklingsprogrammet så som visas i tabell 9.

9b. LightCycler 480: Vi rekommenderar ett Fit point-analyssätt med bakgrund vid 2,0 och tröskel vid 2,0. Starta termocyklingsprogrammet så som visas i tabell 10.

LISTNUM \l 0 \s 0

Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2-instrument

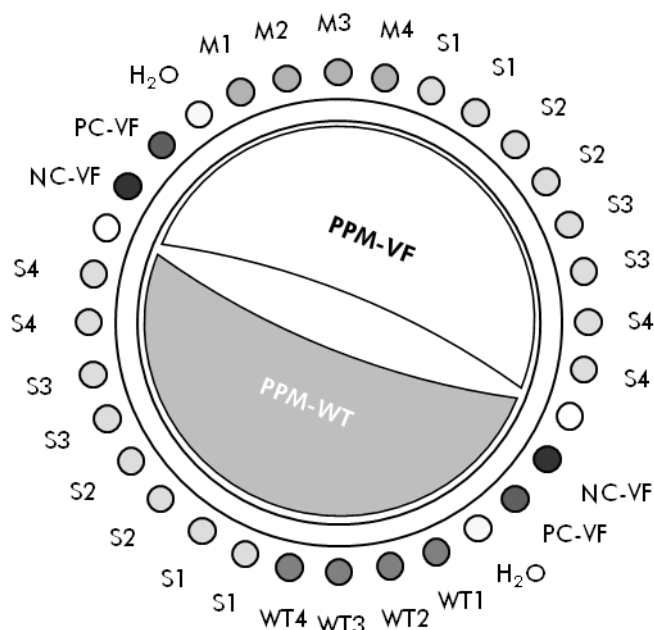
Vid användning av instrument med kapillärrör rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som visas i tabell 11.

Tabell 11. Antal reaktioner för LightCycler 1.2-instrument

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primers och -probeblandning (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	4 reaktioner, var och en testad en gång
n DNA-prover	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	2 reaktioner: PC-VF och NC-VF, var och en testad en gång
Vattenkontroll	1 reaktion
Med JAK2-vildtypsprimers och -probeblandning (PPM-WT)	
4 vildtypsstandarder	4 reaktioner, var och en testad en gång
n DNA-prover	n x 2 reaktioner
2 DNA-kontroller	2 reaktioner: PC-VF och NC-VF, var och en testad en gång
Vattenkontroll	1 reaktion

Provbearbetning på LightCycler 1.2-instrument

Vi rekommenderar att 4 DNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder och primers och probeblandningar. Kapillärschemat i figur 6 visar ett exempel på ett experiment.



Figur 6. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med *ipsogen JAK2 MutaQuant*-kitet. PC-VF: V617F positiv kontroll; NC-VF: V617F negativ kontroll; M-VF: V617F-standarder; M-WT: vildtypsstandarder; S: DNA-prov; H₂O: vattenkontroll.

qPCR på LightCycler 1.2-instrument

Obs! På grund av särskilda tekniska krav måste LightCycler-experiment utföras med specifika reagenser. Vi rekommenderar användningen av LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe och att tillverkarens anvisningar följs vid beredningen av Master Mix 5x.

Obs! Utför alla moment på is.

Procedur

- 1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
- 2. Bered den följande qPCR-blandningen enligt antalet prover som ska bearbetas.**

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen för reaktionen.

I tabell 12 och 13 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad för att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 20 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med användning av samma primer och probblandning (antingen PPM-VF eller PPM-WT). Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 12. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	V617F pre-mix 15 + 1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
Nyberedd LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primers och probeblandning, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	10,2	163,2	–
Prov (tillsätts vid steg 4)	5,0	5 av varje	–
Total volym	20,0	20 av varje	–

Tabell 13. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μl)	WT pre-mix 15 + 1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
Nyberedd LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primers och probeblandning, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	10,2	163,2	–
Prov (tillsätts vid steg 4)	5,0	5 av varje	–
Total volym	20,0	20 av varje	–

- 3. Dispensera 15 μ l av qPCR-pre-mixen (VF eller WT) per kapillär.**
- 4. Tillsätt 5 μ l av materialet som ska kvantifieras (25 ng prov genomiskt DNA eller kontroll) i motsvarande rör (total volym 20 μ l).**
- 5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ner.**
- 6. Placera kapillärrören i adaptrarna som medföljde maskinen, och centrifugera kortvarigt (700 x g, cirka 10 sekunder).**
- 7. Placera kapillärrören i termocyklern enligt tillverkarens rekommendationer.**
- 8. Programmera LightCycler 1.2-instrumentet med termocyklingsprogrammet så som visas i tabell 14.**

Tabell 14. Temperaturprofil

Analyssätt	Kvantifiering
Uppehåll 1	Temperatur: 55 °C Tid: 2 minuter Ramp: 20
Uppehåll 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter Ramp: 20
Cykling	50 ggr 95 °C i 15 sek.; ramp: 20 66 C i 1 minut; ramp: 20; med insamling av FAM-fluorescens: Enkel

9. För LightCycler 1.2 rekommenderas läget F1/F2 och "2nd derivative analysis" (2:a derivatanalys). Starta termocyklingsprogrammet så som visas i tabell 14.

Tolkning av resultat

Dataanalysprincip

Data för tröskelcykeln (C_T) och korsningspunktvärden (C_P) kan exporteras från qPCR-instrumentet och klistras in i en Excel®-fil för analys. Dessa värden kan sedan användas för att beräkna medelvärdet för C_P och C_T och standardmedelvärden C_T kan ritas in för att erhålla en standardkurva för både vildtyps- och V617F-standarderna med användning av nedanstående ekvation och tabell 15.

$y = \text{medel-}C_P$; $x = \log_{10} \text{CN}$ där CN = genkopieantalet i 5 μl -provet

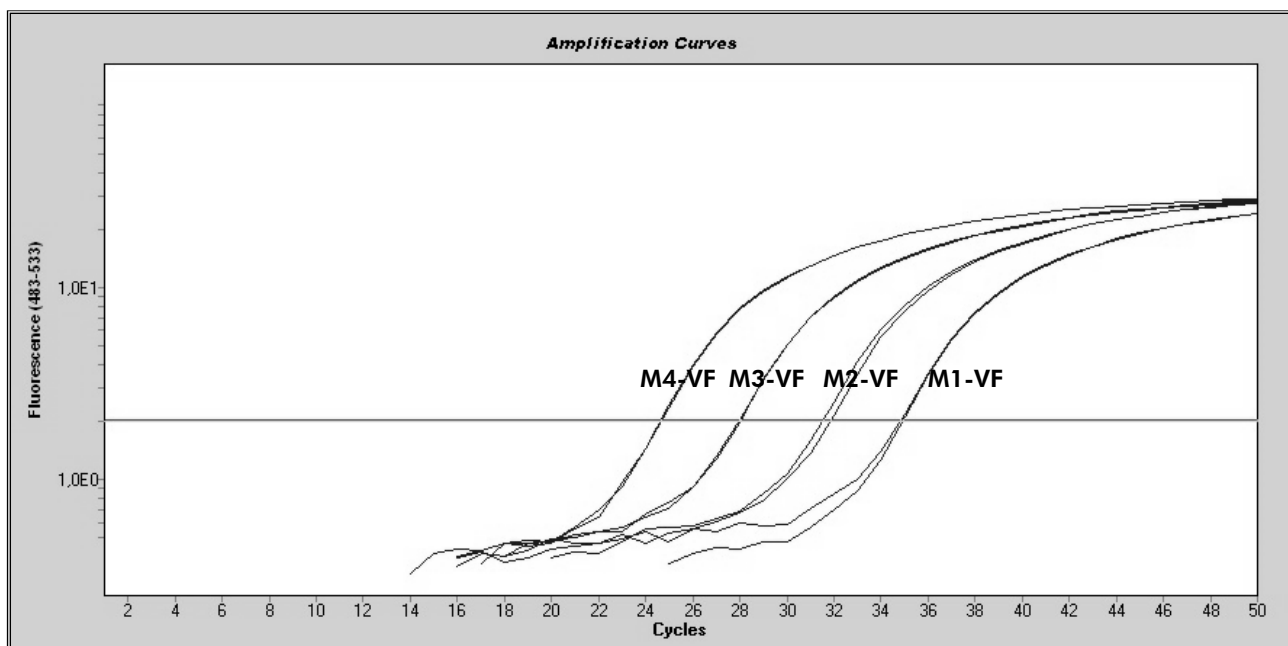
Tabell 15. Kvantitativa data för vildtyps- och V617F-standarderna

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

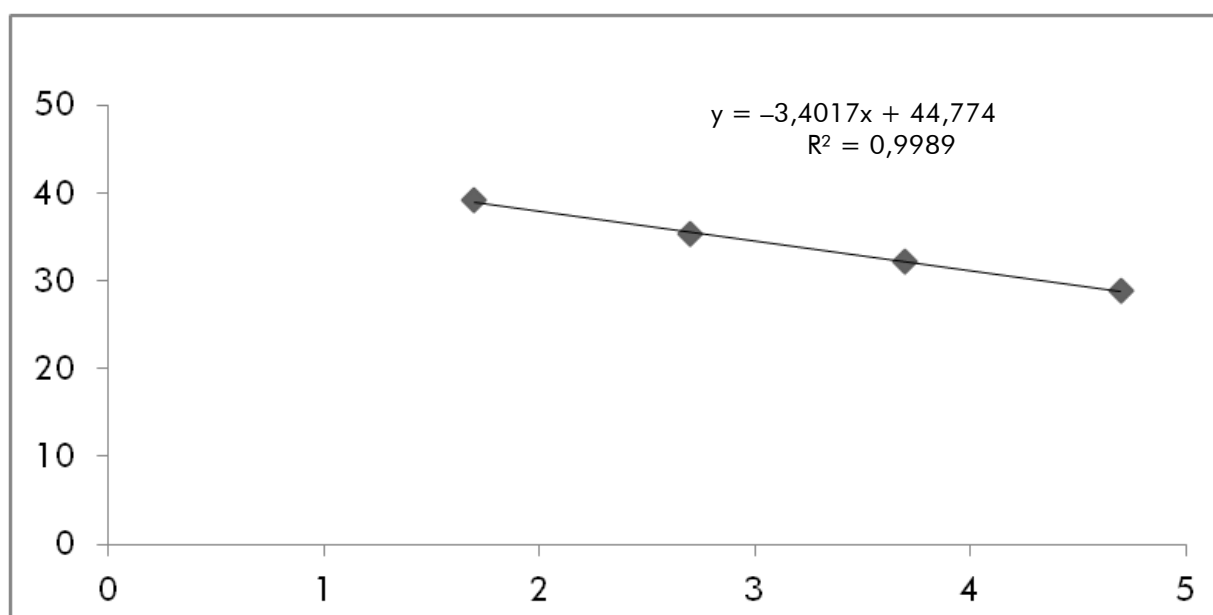
Obs! Varje användare bör mäta den egna reproducerbarheten i sitt laboratorium.

Standardkurva och kvalitetskriterier

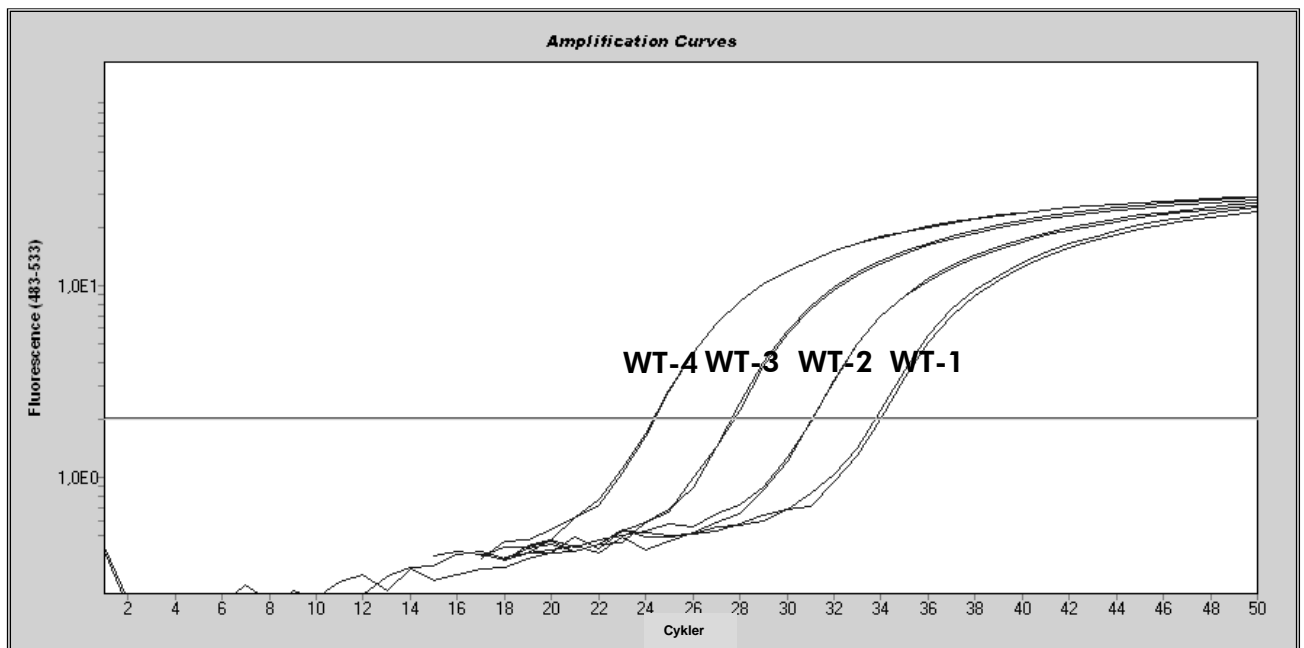
I figur 7 och 9 visas exempel på resultat som erhållits med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet och i figur 8 och 10 visas ett exempel på den teoretiska kurvan som beräknats på 4 standardspädningar.



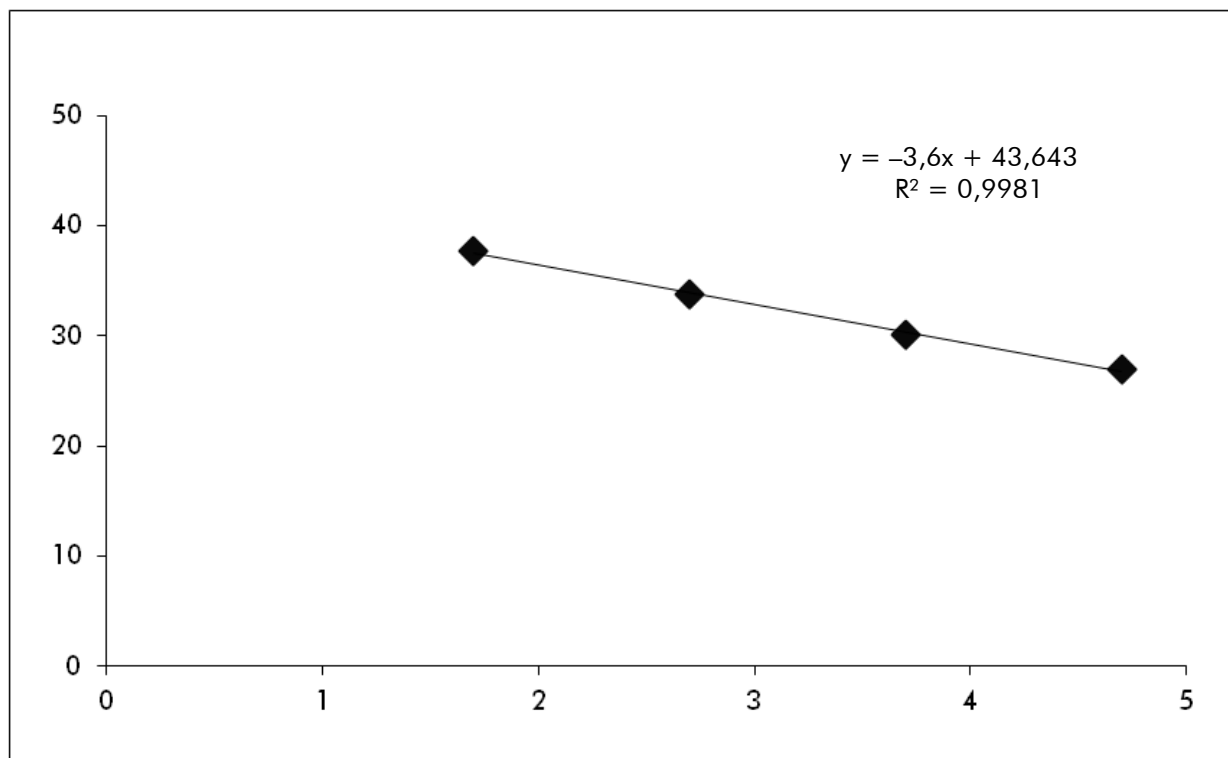
Figur 7. Amplifieringskurva för 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 och 5×10^4 kopior av JAK2 V617F-plasmiden (kontroll M1-VF, M2-VF, M3-VF respektive M4-VF).



Figur 8. Standardkurva för JAK2 V617F.



Figur 9. Amplifieringskurva för 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 och 5×10^4 kopior av JAK2-vildtypsplasmiden (kontroll WT-1, WT-2, WT-3 respektive WT-4).



Figur 10. Standardkurva för JAK2-vildtyp.

Eftersom standarder är 10-faldiga spädningar är kurvans teoretiska lutning $-3,32$. En lutning mellan $-3,0$ och $-3,9$ är acceptabel så länge som R^2 är

> 0,95 (12). Ett värde för $R^2 > 0,98$ är emellertid önskvärt för noggranna resultat (13).

Ekvationerna för standardkurva kan sedan användas för att beräkna \log_{10} -kopieantalen för V617F och WT i okända prover.

Ekvationen för V617F-standardkurvan ska användas för att omvandla råa medelvärden för C_P/ C_T -värden (erhållna med PPM-VF) för de okända proven och kontrollproven, till JAK2 V617F-kopieantal (CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Medel-}C_{pV617F} - \text{standardkurvans skärning}_{V617F})}{\text{Standardkurvans lutning}_{V617F}}$$

Ekvationen för vildtypsstandardkurvan ska användas för att omvandla råa medelvärden för C_P/ C_T -värden (erhållna med PPM-WT) för de okända proven och kontrollproven, till JAK2-vildtypskopieantal (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Medel-}C_{pWT} - \text{standardkurvans skärning}_{WT})}{\text{Standardkurvans lutning}_{WT}}$$

Uttryck av resultaten

Resultat är relativa till 25 ng av totalt genomiskt DNA och ska uttryckas som procentandelen av JAK2 V617F på följande sätt:

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

Reproducerbarhet mellan replikat

Erhållna data ska vara enhetliga mellan duplikat.

Positiva och negativa kontroller

Den positiva kontrollen eller PC-VF ska ge en JAK2 V617F-procent som är högre än 99,9 %.

Den negativa kontrollen eller NC-VF ska ge en JAK2 V617F-procent som är lägre än 0,1 %.

Om dessa kontroller inte fungerar på rätt sätt, se "Felsökningshandbok", sida 35, för att hitta en lösning.

Vattenkontroller

Negativa kontroller ska ge noll CN för både JAK2 V617F-detektion och JAK2-vildtypsdetektion.

En positiv vattenkontroll beror på en korskontamination. Se "Felsökningshandbok" nedan för att hitta en lösning.

Felsökningshandbok

Denna felsökningshandbok kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För ytterligare information, se även sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet hos QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysteknologi, (för kontaktinformation, se "Kontaktinformation", sida 44).

Kommentarer och förslag

Standardkurva för vildtyp eller V617F är inte linjär

Flaskinversion, inversion under distribution, korskontamination, partiell nedbrytning av standarden, RQPCR-reagens, icke-specifik amplifiering eller PCR-programfel

Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.

Förvara *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet vid -15 till -30 °C och skydda primers och probeblandningar från ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 12.

Undvik upprepad infrysning och upptining.

Ingen eller låg signal för en (1) standard

Standard ej distribuerad, eller användning av samma PPM-blandning

Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.

Upprepa PCR-körningen.

Kommentarer och förslag

Negativ (H₂O) kontroll är positiv

Korskontamination,
reagenskontamination,
instrumentfel, inversion av brunn
eller kapillärrör, eller
probenedbrytning

Byt ut alla kritiska reagenser.

Hantera alltid prover, kitkomponenter
och förbrukningsartiklar i enlighet
med vedertagen praxis för att
förhindra överföringskontamination.

Skydda primers och probeblandningar
mot ljus.

Kontrollera om det finns falska
positiva värden på fluorescenskurvor.

Ingen signal, inte ens i standardkontroll

a) Fel detektionskanal har valts

Ställ in kanalen på F1/F2 eller
530 nm/640 nm.

b) Pipetteringsfel eller utelämnade
reagenser

Kontrollera pipetteringsschema och
uppställningen av reaktionen.

Upprepa PCR-körningen.

c) Inget datainsamlingsprogram

Kontrollera cykelprogrammet.

Välj datainsamlingsläget "Single"
(Enkelt) i slutet av varje
hybridiseringssegment för PCR-
programmet.

Ingen eller låg signal i prover men standardkontroller är utan anmärkning

Hämmande effekter av
provmaterial orsakade av
otillräcklig rening

Kontrollera alltid DNA-kvaliteten
(OD₂₆₀/OD₂₈₀) och -koncentrationen
före start.

Upprepa DNA-beredning.

Kommentarer och förslag

Fluorescensintensiteten är för låg

- a) Felaktig förvaring av kitkomponenter
- Alikvotera reagenser för förvaring. Förvara *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och probeblandningar från ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 12.
- Undvik upprepade infrysning och upptining.
- b) Mycket låg initial mängd av mål-DNA
- Kontrollera mängden av prov-DNA.
- Obs!** Beroende på vilken metod som valts för DNA-beredning kan hämmande effekter förekomma.

Negativa kontroller är positiva

Överföringskontamination

Byt ut alla kritiska reagenser.

Upprepa experimentet med nya alikvoter av alla reagenser.

Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med vedertagen praxis för att förhindra överföringskontamination.

Fluorescensintensiteten varierar

- a) Pipetteringsfel
- Vortexblanda och centrifugera alla reagenser efter upptining.
- LightCycler-variabilitet som orsakas av så kallat "pipetteringsfel" kan reduceras genom att data analyseras i läget F1/F2 eller 530 nm/640 nm.
- b) Otillräcklig centrifugering av platta, rör eller kapillärrör, eller den beredda PCR-blandningen är fortfarande kvar i kapillärrörets övre kärl, eller en luftbubbla har fastnat i kapillärrörets spets
- Centrifugera alltid kapillärrör laddade med reaktionsblandningen så som beskrivs i den specifika användarhandboken till maskinen.
- c) Utsidan på kapillärrörets spets är smutsig
- Använd alltid handskar när du hanterar kapillärrören.

Positiva kontroller för vildtyp eller V617F signalerar med användning av reciprok PPM

Korskontamination, reagenskontamination, eller inversion av brunn eller kapillärrör

Byt ut alla kritiska reagenser.

Upprepa experimentet med nya alikvoter av alla reagenser.

Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med vedertagen praxis för att förhindra överföringskontamination.

Kontrollera pipetteringsschema och uppställning av reaktionen.

Inverterad detektion av positiv kontroll

Distribuerad inversion av PPM i brunn eller kapillärrör eller premix

Kontrollera pipetteringsschema och uppställning av reaktionen.

Ingen signal för en positiv kontroll eller båda

PPM eller kontroll-DNA utelämnat

Kontrollera pipetteringsschema och uppställning av reaktionen.

Höga bakgrundssignaler

Fluoroforblekning

Förvara och hantera probe skyddad mot ljus.

Dålig reproducerbarhet för duplikatproverna

Pipetteringsfel eller korskontamination

Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på www.qiagen.com/support/.

Begränsningar

Användarna måste vara utbildade i och förtrogna med denna teknik innan produkten används. Detta kit ska användas enligt anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 10.

Alla diagnostiska resultat som framställs måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd. Det är användarens ansvar att validera systemets prestanda för eventuella procedurer som används i deras laboratorium och inte ingår i QIAGENS prestandastudier.

Var noga med att uppmärksamma de utgångsdatum som är angivna på asken och på etiketterna för alla komponenter. Använd inte utgångna komponenter.

Prestandaegenskaper

Bänkstudier

Precision

En precisionsstudie utfördes med användning av 12 DNA-prover som extraherats från cellinjer som motsvarade olika JAK2 V617F-allelbördor. Totalt 80 mätningar gjordes på varje prov, med 3 olika batcher av *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet. I denna precisionsstudie användes ett Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Analysdata sammanfattas i tabell 15.

Tabell 15. Precisionsdata för DNA-prover

Prov	Teoretisk JAK2 V617F (%)		Medelvärde (%)	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

* Utomliggande värden exkluderades. Dessa definierades som värden som var mindre än den nedre kvartilen minus 3 gånger det interkvartila intervallet eller större än den övre kvartilen plus 3 gånger det interkvartila intervallet på ett Box and Whisker-diagram.

n = antal validerade prover; CV = global variationskoefficient.

Gräns för blankprov och gräns för detektion

Bakgrundsnivån eller gräns för blankprov (level of blank, LOB) bestämdes på negativa prover (8 prover, 76 mätningar). Den bestämdes till 0,014 %.

Gränsen för detektion (limit of detection, LOD) bestämdes med användning av prover som var konstaterat positiva men med lågt uttryck (7 prover, 68 mätningar). Den bestämdes till 0,061 %, med en övre gräns för 90 % konfidensintervall på 0,091 %.

Denna optimala känslighet går att erhålla på prover som innehåller minst 10 000 kopior av JAK2-genen (vildtyp eller V617F-mutation).

Kvantifieringsdata ska rapporteras på följande sätt:

- JAK2 V617F \leq 0,014 % kan tolkas som att JAK2 V617F-mutationen inte har detekterats.
- JAK2 V617F är $>$ 0,014 % men $<$ 0,091 % kan tolkas som ett obestämt resultat.
- JAK2 V617F \geq 0,091 % kan tolkas som ett positivt resultat och att JAK2 V617F-mutationen har detekterats.

Linjäritet

Linjäritetsstudier gjordes på 12 prover, där vart och ett erhöles från olika blandningar av DNA extraherat från cellinjer som var positiva och negativa för JAK2 V617F-mutationen. Varje prov testades 5 gånger. Data från denna studie visade att *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet gav linjära resultat över hela det dynamiska intervallet.

Kliniska studier

DNA från blod eller benmärg extraherades från 87 patientprover och analyserades med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet. Dessutom kvantifierades procentandelen av JAK2 V617F-mutationer och jämfördes med screeningtestresultat som erhöles med *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ-kitet (katalognr 673223). Data som erhöles visas i tabell 16.

Tabell 16. Korstabell som visar överensstämmelsen mellan resultat som erhöles med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet och *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ-kitet

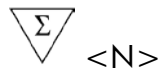
		Resultat från <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ-kitet			
		Mutation detekterad	Obestämt resultat	Mutation ej detekterad	n
Resultat från <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant-kitet	Mutation detekterad	40	2	7	49
	Obestämt resultat	0	0	21	21
	Mutation ej detekterad	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Positiv överensstämmelse	100% (95 % konfidensintervall: 91%, 100%)				
Negativ överensstämmelse	71% (95 % konfidensintervall: 51%, 85%)				
Total överensstämmelse	89% (95 % konfidensintervall: 79%, 95%)				

Litteraturhänvisningar

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

Följande symboler kan finnas på förpackningar och etiketter:



Innehåller reagenser som räcker för <N> reaktioner



Använd före



Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsningar



Tillverkare



Konsultera bruksanvisningen

Kontaktinformation

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ring 00800-22-44-6000 eller ring en av QIAGEN tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	För 12 reaktioner: Wild-type JAK2 Gene Control (JAK2-genkontroll, vildtyp), JAK2 V617F Control Gene (JAK2 V617F-kontrollgen), Primers and Probe Mix PPM-WT (primers och probblandning PPM-WT), Primers and Probe Mix PPM-VF (primers och probblandning PPM-VF)	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	För 24 reaktioner: Wild-type JAK2 Gene Control (JAK2-genkontroll, vildtyp), JAK2 V617F Control Gene (JAK2 V617F-kontrollgen), Primers and Probe Mix PPM-WT (primers och probblandning PPM-WT), Primers and Probe Mix PPM-VF (primers och probblandning PPM-VF)	673523
Rotor-Gene Q MDx – för IVD-validerad realtids-PCR-analys i kliniska tillämpningar		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete (inkluderar inte installation och utbildning)	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete (inkluderar installation och utbildning)	9002033

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. Handböcker och användarhandböcker för QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller från lokal distributör.

Denna produkt är avsedd för in vitro-diagnostisk användning. *ipsogen*-produkter får inte återförsäljas, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan skriftligt tillstånd från QIAGEN.

Information i detta dokument kan ändras utan föregående meddelande. QIAGEN tar inget ansvar för fel som kan finnas i detta dokument. Detta dokument anses vara komplett och korrekt vid tiden för publicering. Under inga omständigheter är QIAGEN ansvarigt för tillfälliga, speciella eller multipla skador, eller följskador, i samband med eller på grund av användningen av detta dokument.

ipsogen-produkter är garanterade att motsvara deras angivna specifikationer. QIAGENS enda åtagande och kundens enda gottgörelse är begränsad till ersättning av produkter utan kostnad om produkter inte skulle fungera enligt garantin.

JAK2 V617F-mutation och användningar av den är skyddad av patenträttigheter, inklusive europapatent EP1692281, USA-patent 7 429 456 och 7 781 199, USA-patentansökning US20090162849 och US20120066776, samt utländska motsvarigheter.

Köpet av denna produkt innebär inte att den får användas i kliniska prövningar av JAK2V617F-riktade läkemedel. QIAGEN utvecklar specifika licensprogram för sådana användningar. Kontakta vår juridiska avdelning på jak2licenses@qiagen.com.

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

Begränsat licensavtal

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet godkänner följande villkor:

1. *ipsogen* JAK2 MutaQuant-kitet får endast användas i enlighet med *Handboken till ipsogen JAK2 MutaQuant-kitet* och endast i samband med komponenter som ingår i kitet. QIAGEN beviljar ingen licens under någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i kitet, förutom så som beskrivs i *Handboken till ipsogen JAK2 MutaQuant-kitet* och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN frånsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några handlingar som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuella rättsliga åtgärder för att hävda detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, alla rättigheter förbehållna.

www.qiagen.com

