

August 2016

Håndbok for *ipsogen*[®] JAK2 MutaQuant[®]-settet

 12 (katalognr. 673522)

 24 (katalognr. 673523)

Version 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostikk

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



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1072501NO



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi og gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og -tjenester sikrer suksess fra prøve til resultat.

QIAGEN setter standardene innen:

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Vårt mål er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Du finner mer informasjon på **www.qiagen.com**.

Innhold

Bruksområde	4
Sammendrag og forklaring	4
Prinsippene for prosedyren	6
Medfølgende materialer	9
Settets innhold	9
Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger	10
Advarsler og forholdsregler	11
Generelle forholdsregler	11
Håndtering og oppbevaring av reagensen	12
Prosedyre	13
Klargjøring av prøve-DNA	13
Protokoller	
■ qPCR på RotorGene Q MDx 5plex HRM eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter med 72-glassrotor	14
■ qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrument	19
■ qPCR på LightCycler 1.2-instrument	25
Tolkning av resultater	30
Feilsøkingsveiledning	34
Kvalitetskontroll	38
Begrensninger	38
Ytelsesegenskaper	39
Ikke-kliniske studier	39
Kliniske studier	40
Referanser	42
Symboler	43
Kontaktinformasjon	43
Bestillingsinformasjon	44

Bruksområde

ipsogen JAK2 MutaQuant-settet er en in vitro kvantitativ test beregnet på påvisning og kvantifisering av JAK2 V617F/G1849T-allele i genomisk DNA ekstrahert fra perifert blod fra pasienter med mistenkt myeloproliferativ neoplasme (MPN).

Fraværet av JAK2 V617F/G1849T-mutasjon ekskluderer ikke forekomsten av andre JAK2-mutasjoner. Testen kan rapportere falskt negative resultater i tilfeller med ytterligere mutasjoner i nukleotid 88504 til 88622 (1).

Merk: Settet skal brukes i samsvar med instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med validerte reagenser og instrumenter. Alt bruk som ikke overholder instruksjonene og/eller modifisering av komponentene fører til at QIAGENs ansvar oppheves.

Sammendrag og forklaring

En tilbakevendende mutasjon, V617F, som påvirker Janus-tyrosinkinase 2 (JAK2)-genet, ble identifisert 2005 (2–5), og førte til et viktig gjennombrudd innen forståelse, klassifisering og diagnostisering av myeloproliferative neoplasmer (MPN). JAK2 er et avgjørende intracellulært signaliseringsmolekyl for en rekke cytokiner, deriblant erythropoietin.

JAK2 V617F-mutasjonen er påvist hos >95 % av pasienter med polycytaemia vera (PV), 50–60 % av pasienter med essensiell trombocytomi (ET) og 50 % av pasienter med primær myelofibrose (PMF). JAK2 V617F er også påvist i enkelte sjeldne tilfeller med kronisk myelomonocytisk leukemi, myelodysplastisk syndrom, systemisk mastocytose og kronisk nøytrofil leukemi, men i 0 % av KMML (6).

Mutasjonen tilsvarer en enkelt nukleoidendring av JAK2-nukleotid 1849 i ekson 14, som fører til en unik substitusjon av valin (V) til fenylalanin (F) i posisjon 617 i proteinet (JH2-domene). Det fører til konstitutiv aktivering av JAK2, hematopoietisk transformasjon in vitro og vekst av erythropoietin-uavhengig koloni (EEC) hos alle pasienter med PV samt en stor andel av ET- og PMF-pasienter (7). JAK2 V617F er en viktig drivkraft i transformasjonen av hematopoietiske celler i MPN, men de nøyaktige patologiske mekanismene som med samme unike mutasjon fører til så ulike kliniske og biologiske enheter, er enda ikke fullstendig kartlagt.

Tradisjonelt er diagnostering av MPN basert på kliniske, benmargshistologiske og cytogene kriterier. Oppdagelsen av en sykdomsspesifikk molekylær markør førte både til en enklere prosess og økt diagnostisk nøyaktighet. Påvisning av JAK2 V617F-mutasjon er nå en del av WHO 2008-referansekriteriene for diagnostisering av BCR-ABL-negativ MPN (tabell 1), og forekomst av denne mutasjonen er et hovedkriterium for diagnostisk bekreftelse.

WHO-kriterier for diagnostisering av MPN (tilpasset fra referanse 8)

Kriterier for diagnostisering av polycythemia vera (PV)	
Store	<ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobin (Hgb) >18,5 g.dl⁻¹ (menn) eller >16,5 g.dl⁻¹ (kvinner) eller Hgb eller hematokrit (Hct) >99. persentil av referanseområde for alder, kjønn, beliggenhet over havet eller Hgb >17 g.dl⁻¹ (menn) eller >15 g.dl⁻¹ (kvinner) hvis forbundet med vedvarende økning på ≥2 g.dl⁻¹ fra baseline som ikke kan tilskrives korrigerende av jernmangel eller Forhøyet cellemasse >25 % over gjennomsnittlig normal forventet verdi
	<ol style="list-style-type: none">2. Forekomst av <i>JAK2V617F</i> eller lignende mutasjon
Mindre	<ol style="list-style-type: none">1. Trilineær myeloproliferasjon av benmarg2. Sub normalt erythropoietinnivå i serum3. Vekst av endogen erytroidkoloni (EEC)
Kriterier for diagnostisering av essensiell trombocytomi (ET)	
Store	<ol style="list-style-type: none">1. Blodplattetelling ≥450 x 10⁹ l⁻¹2. Megakaryocytisk proliferasjon med stor og moden morfologi. Ingen eller liten granulocytisk eller erytroid proliferasjon3. Overholder ikke WHO-kriterier for kronisk myeloid leukemi (PMF), myelodysplastisk syndrom (MDS) eller annen myeloid neoplasme
	<ol style="list-style-type: none">4. Påvist <i>JAK2V617F</i> eller annen klonal markør eller Ingen holdepunkter for reaktiv trombocytose
Mindre	-
Kriterier for diagnostisering av primær myelofibrose (PMF)	
Store	<ol style="list-style-type: none">1. Megakaryocytisk proliferasjon og atypi ledsaget av enten retikulino- og/eller kollagenfibrose eller Ved mangel på retikulinfibrose må megakaryocytendringer ledsages av økt margcellularitet, granulocytisk proliferasjon og ofte redusert erythropoiesis (dvs. prefibrotisk PMF)2. Overholder ikke WHO-kriterier for (KMML), PV, MDS eller annen myeloid neoplasme
	<ol style="list-style-type: none">3. Påvist <i>JAK2V617F</i> eller annen klonal markør eller Ingen holdepunkter for reaktiv margfibrose
Mindre	<ol style="list-style-type: none">1. Leukoerythroblastosis2. Forhøyet serumlaktatdehydrogenase (LDH)3. Anemia4. Palpabel splenomegali

Nylig har internasjonale eksperter foreslått kriterier for terapeutiske studier i PV og ET. Basert på data om allograft, alfa-interferon eller hydroksyurea, er *JAK2V617F*-kvantifisering innført som et potensielt nyttig verktøy for å overvåke behandlingsrespons (9). En reduksjon i *JAK2 V617F*-byrde er observert i

respons på noen av de nye anti-JAK2-rettede legemidlene i klinisk utvikling (10).

Prinsippene for prosedyren

Flere ulike teknikker er foreslått for å kvantitativt bestemme andelen enkle nukleotidpolymorfismer (SNP-er) i DNA-prøvene. Av disse foretrekkes metoder basert på sanntids kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) siden de er mer følsomme og gjør at allelebyrden kan overvåkes longitudinalt. Mange av disse teknikkene har en moderat følsomhet på 1–10 %, for eksempel, TaqMan[®] allelediskriminering, Pyrosequencing[®], smeltekurveanalyse og direkte sekvensiering. Noen av disse, som smeltekurve og sekvensiering, er kun semikvantitative, mens andre, for eksempel Pyrosequencing, krever behandling etter PCR eller instrumentering som ikke er lett tilgjengelig eller har avskrekkende høye oppsett-kostnader for rutinemessig laboratorietesting. En svært følsom metode med en følsomhet på <0,1 % krever bruk av en SNP-spesifikk primer som tillater selektiv forsterkning av det mutante allelet eller villtypeallelet som lett kan påvises på et sanntids qPCR instrument. Ipsogen JAK2 MutaQuant-settet er basert på denne metoden.

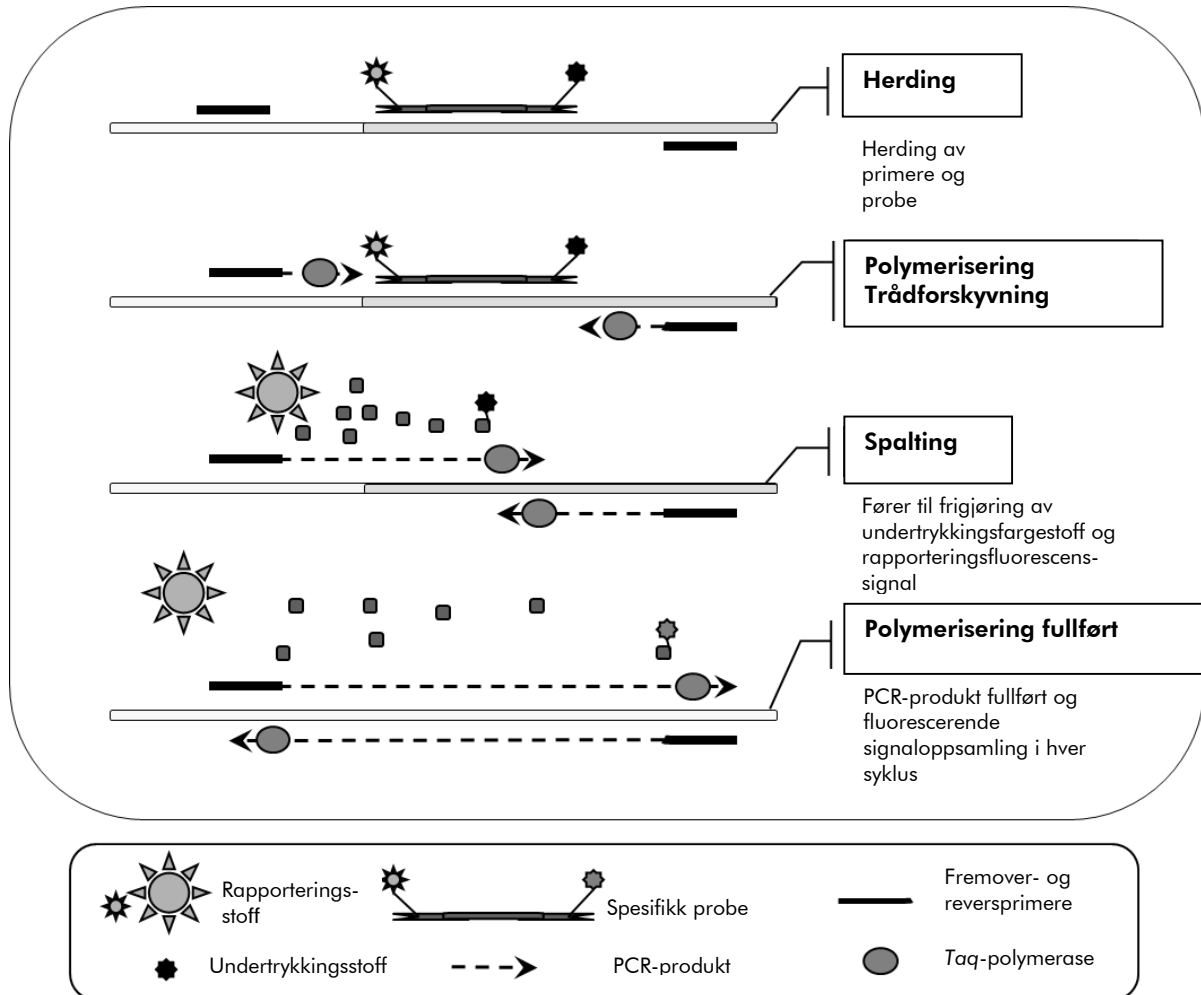
Bruken av qPCR tillater nøyaktig kvantifisering av PCR-produkter under den eksponensielle fasen av PCR-forsterkningsprosessen. Kvantitative PCR-data kan innehenes raskt, uten behandling etter PCR, med sanntids påvisning av fluorescerende signaler under og/eller etter PCR-sykling, hvilket drastisk reduserer faren for kontaminering av PCR-produktet. At present, 3 main types of qPCR techniques are available: qPCR analysis using SYBR[®] Green I Dye, qPCR analysis using hydrolysis probes, and qPCR analysis using hybridization probes.

Denne analysen benytter qPCR-hydrolyseprinsippet med oligonukleotid med dobbelt fargestoff. Under PCR hybridiseres «fremover»- og «revers»-primere til en spesifikk sekvens. Et oligonukleotid med dobbelt fargestoff inngår i samme blanding. Denne proben, som består av et oligonukleotid merket med et 5' rapporteringsfargestoff og et nedstrøms, 3'undertrykkingsfargestoff (quencher), hybridiseres til en målsekvens i PCR-produktet. qPCR-analyse med hydrolyseprober benytter 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til *Thermus aquaticus* (Taq) DNA-polymerase. Når proben er intakt, fører rapporteringsfargestoffets nærhet til undertrykkingsfargestoffet til supprimert rapporteringsfluorescens, hovedsakelig med Förster-energioverføring.

Under PCR tilkobles proben spesifikt mellom fremover- og reversprimerstedene hvis det aktuelle målet er tilstede. 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til DNA-polymerase spalter kun proben mellom rapporteringsstoffet og undertrykkingsstoffet hvis proben hybridiseres til målet. Probefragmentene forskyves deretter fra målet, og polymerisering av tråden fortsetter. 3'-enden av proben er blokkert for å forhindre forlengelse av proben under PCR (figur 1).

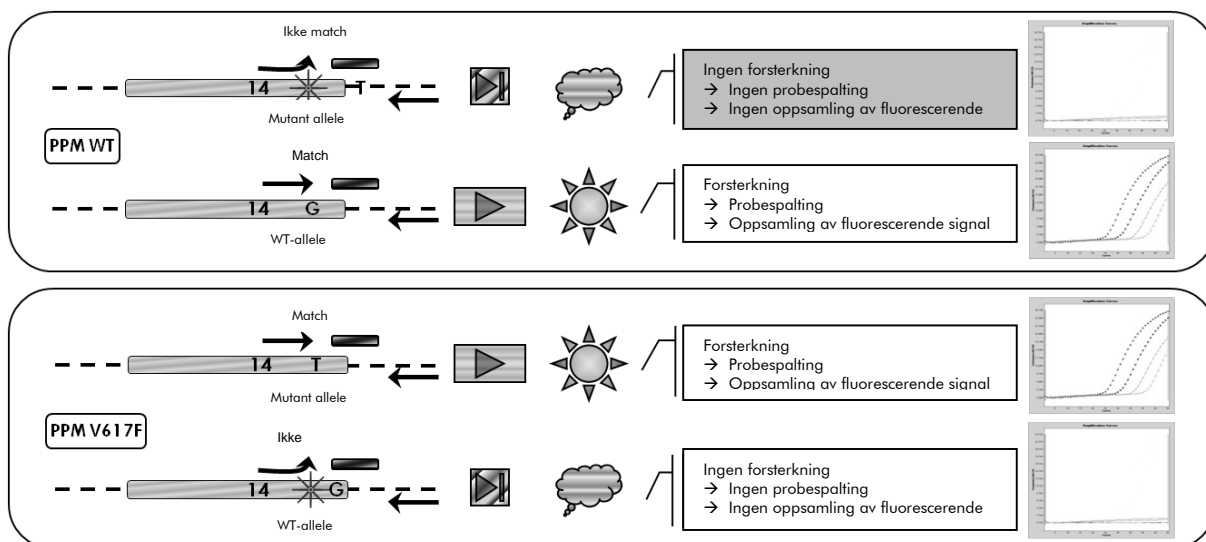
Denne prosessen oppstår i hver syklus og forstyrrer ikke den eksponensielle oppsamlingen av produktet.

Økningen i fluorescenssignal påvises kun hvis målsekvensen komplementerer proben og dermed forsterkes under PCR. På grunn av disse kravene påvises ikke ikke-spesifikk forsterkning. Økningen i fluorescens er derfor direkte proporsjonal med målforsterkningen under PCR.



Figur 1. Reaksjonsprinsipp

Den kvantitative allelespesifikke PCR-teknologien brukt i dette analysesettet muliggjør følsom, nøyaktig og svært reproducerbar påvisning av SNP-er. Denne teknikken er basert på bruk av spesifikke fremover-primere, for villtype- og V617F-allele (11). Overensstemmelsen mellom primer og mål-DNA må være perfekt for å muliggjøre forlengelse og forsterkning i PCR (figur 2).



Figur 2. Allelespesifikk PCR. Bruk av villtype- eller V617F-primere og probeblanding muliggjør spesifikk påvisning av villtype- eller mutert allele i to separate reaksjoner utført ved bruk av samme prøven. Resultater kan uttrykkes som en prosentandel av VF-kopier blant totale JAK2-kopier.

Medfølgende materialer

Settets innhold

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalognr.		673522	673523
Antall reaksjoner		12	24
V617F positive control (V617F positiv kontroll) (100 % V617F-allele)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (V617F negativ kontroll) (100 % villtype-allele)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF standardfortynning, 50 kopier) (5 x 10 ¹ V617F kopier/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (M2-VF standardfortynning, 500 kopier) (5 x 10 ² V617F kopier/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (M3-VF standardfortynning, 5000 kopier) (5 x 10 ³ V617F kopier/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (M4-VF standardfortynning, 50 000 kopier) (5 x 10 ⁴ V617F kopier/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (WT-1 standardfortynning, 50 kopier) (5 x 10 ¹ villtypekopier/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (WT-2 standardfortynning, 500 kopier) (5 x 10 ² villtypekopier/5µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl

WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (WT-3 standardfortynning, 5000 kopier) (5×10^3 villtypekopier/5 μ l)	WT-3 WT-3 Mini	20 μ l	30 μ l
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT-4 standardfortynning, 50 000 kopier) (5×10^4 villtypekopier/5 μ l)	WT-4 WT-4 Mini	20 μ l	30 μ l
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Primere og probeblanding JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 μ l	95 μ l
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (Primere og probeblanding JAK2 V617F†)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 μ l	95 μ l
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (engelsk)		1	1

* Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for villtype JAK2-kontrollgen og en spesifikk FAM™-TAMRA™-probe.

† Blanding av spesifikke revers- og fremoverprimere for JAK2 V617F-mutasjon og en spesifikk FAM-TAMRA-probe.

Merk: Roter og sentrifuger raskt standardfortynningene og primerne og probeblandingene før bruk.

Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på det aktuelle sikkerhetsdatabladet (HMS), som kan skaffes fra produktleverandøren.

Reagenser

- Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet
- Buffer og Taq DNA-polymerase: Validerte reagenser er TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. 4304437) og LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat.nr. 04535286001) eller LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (Master Mix 5x) (Roche, kat.nr. 03515567001)

Forbruksvarer

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

Utstyr

- Mikroliterpipette* dedikert til PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Benksentrifuge* med rotor for 0,5 ml/1,5 ml reaksjonsglass og mikroplater (kan oppnå 13 000–14 000 rpm)
- Sanntids PCR-instrument:* Rotor-Gene Q 5plex HRM[®] eller annen Rotor Gene; LightCycler 1.2, eller 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system; og tilknyttet spesifikt materiale
- Biofotometer

Advarsler og forholdsregler

For bruk i forbindelse med in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på det aktuelle sikkerhetsdatabladet (HMS). Disse er tilgjengelige online i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety. Her kan du finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Kast prøve- og analyseavfall i henhold til de lokale sikkerhetsforskriftene.

Generelle forholdsregler

Bruk av qPCR-tester forutsetter god laboratoriepraksis, herunder vedlikehold av utstyr, som er dedikert til molekylær biologi og overholder relevante bestemmelser og standarder.

Dette settet er beregnet på bruk i forbindelse med in vitro-diagnostikk. Reagenser og instruksjoner i dette settet er validert for optimal ytelse. Ytterligere fortykning av reagensene eller endring av inkubasjonstider og temperaturer kan føre til feilaktige eller uoverensstemmende data. PPM-WT- og PPM-VF-

* Pass på at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

reagenser kan endres hvis de eksponeres for lys. Alle reagenser er formulert spesifikt for bruk med denne testen. For å oppnå optimal testytelse må det ikke foretas erstatninger.

Utvis ekstrem forsiktighet for å unngå:

- DNase-kontaminering som kan forårsake nedbrytning av templat-DNA.
- DNA- eller PCR-overføringskontaminering som fører til falskt positive signaler

Vi anbefaler derfor følgende.

- Bruk nukleasefritt laboratoriestyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonshetteglass) og hansker når du utfører analysen.
- Bruk nye aerosolresistente pipettespisser for alle pipetteringstrinn for å unngå krysskontaminering av prøvene og reagensene.
- Klargjør en forhånds-PCR-masterblanding med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.) i et dedikert område der ingen DNA-matriser (SNA, plasmid eller PCR-produkter) innføres. Tilsett templat i en separat sone (helst i et eget rom) med spesifikke materialer (pipetter, spisser osv.).

Håndtering og oppbevaring av reagensen

Settene transporteres på tørris og må oppbevares ved $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ved mottak.

- Minimer eksponering for lys for primere og probeblandinger (PPM-WT- og PPM-VF-glass).
- Bland og sentrifuger glassene varsomt før anbrudd.
- Oppbevar alle settkomponenter i originalbeholderne.

Disse oppbevaringsforholdene gjelder både åpnede og uåpnede komponenter. Komponenter som oppbevares under andre forhold enn de angitt på etikettene vil kanskje ikke fungere riktig og kan ha en negativ innvirkning på analyseresultatene.

Utløpsdatoer for hver reagens er angitt på de enkelte komponentetikettene. Under riktige oppbevaringsforhold ivaretas produktets ytelse frem til utløpsdatoen trykt på etiketten.

Det er ingenting som tyder på at dette produktet er ustabil. Positive og negative kontroller skal imidlertid kjøres samtidig med ukjente prøver.

Prosedyre

Klargjøring av prøve-DNA

Genomisk DNA skal hentes enten fra fullblod, rensede lymfocytter fra perifert blod i fullblod, polynukleære celler eller granulocytter. For sammenlignbare resultater anbefales det at samme cellefraksjons- og DNA-ekstraksjonssmetode anvendes. DNA-ekstraksjon kan utføres med en hjemmelaget metode eller med et kommersielt tilgjengelig sett.

DNA-mengde skal bestemmes ved å måle prøvens optiske tetthet (Optic Density – OD) ved 260 nm, og DNA-kvalitet kan bestemmes enten ved bruk av spektrofotometri eller gel*-elektroforese.

- OD_{260}/OD_{280} -forholdet skal være 1,7–1,9. Mindre forhold enn dette kan indikere proteinkontaminering eller forekomst av organiske kjemikalier.
- Elektroforetisk analyse på en 0,8–1,0 % agarosegel* skal muliggjøre visualisering av isolert DNA samt et tydelig bånd på ca. 20 kb (en lett utstryksprøve vil gi akseptable resultater).

Resulterende DNA må fortynnes til en konsentrasjon på 5 ng/ μ l i 1x TE-bufferen* ved pH 8,0 og deretter oppbevares ved +4 til +8 °C i 1 uke eller ved –20 °C hvis langvarig oppbevaring er påkrevd.

qPCR-reaksjonen er optimert for DNA-prøver som inneholder 25 ng rensset genomisk DNA.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på det aktuelle sikkerhetsdatabladet (HMS), som kan skaffes fra produktleverandøren.

Protokoll: qPCR på RotorGene Q MDx 5plex HRM eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter med 72-glassrotor

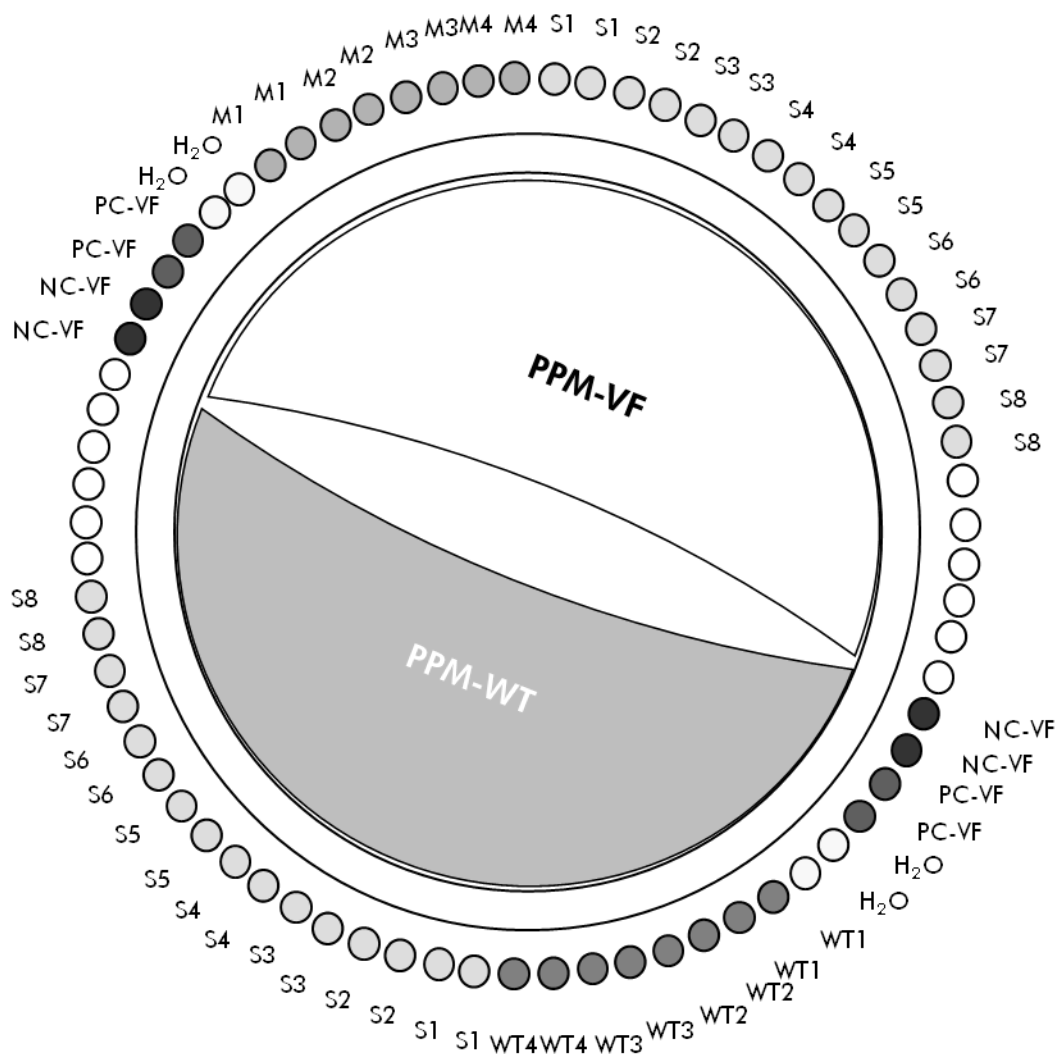
Ved bruk av dette instrumentet anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 2.

Tabell 2. Antall reaksjoner for Rotor-Gene Q-instrumenter med 72-glassrotor

Prøver	Reaksjoner
Med JAK2 V617F primere og probeblanding (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	8 reaksjoner, hver testet i duplikat
n DNA-prøver	n x 2 reaksjoner
2 DNA-kontroller	4 reaksjoner: 4 reaksjoner: positiv kontroll (PC-VF) og negativ kontroll (NC-VF), hver testet i duplikat
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med JAK2-villtypeprimere og probeblanding (PPM-WT)	
4 villtypestandarder	8 reaksjoner, hver testet i duplikat
n DNA-prøver	n x 2 reaksjoner
2 DNA-kontroller	4 reaksjoner: PC-VF og NC-VF, hver testet i duplikat
Vannkontroll	2 reaksjoner

Prøvebehandling på Rotor-Gene Q-instrumenter med 72-glassrotor

Vi anbefaler testing av minst 8 DNA-prøver med 24-reaksjonssettet (katalognr. 673523) og minst 6 DNA-prøver med 12-reaksjonssettet (katalognr. 673522) i samme eksperiment for å optimere bruken av standarder og primere og probeblandinger.



Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med ipsogen 24-prøvers JAK2

MutaQuant-sett. PC-VF: V617F positiv kontroll; NC-VF: V617F negativ kontroll; M-VF: V617F standards; M-WT: wild-type standards; S: DNA sample; H₂O: water control.

Merk: Pass på at prøver som skal testes alltid plasseres i posisjon 1 i rotoren. Ellers utfører ikke instrumentet kalibrering under kalibreringstrinnet, og feilaktige fluorescensdata innhentes.

Fyll alle andre posisjoner med tomme glass.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrumenter med 72-glassrotor

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.
2. Klargjør følgende qPCR-blanding i henhold til antallet prøver som skal behandles.

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 3 og 4 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet på å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 μl . En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antallet reaksjoner, ved bruk av samme primer og probeblanding (enten PPM-VF eller PPM-WT). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 3. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (μl)	V617F-forhåndsblending 30 + 1 reaksjoner (μl)	Sluttkonsentrasjon
TaqMan Universal PCR masterblanding, 2x	12,5	387,5	1x
Primere og probeblanding, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	201,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	–
Totalvolum	25,0	25 hver	–

Table 4. Preparation of qPCR mix

Komponent	1 reaksjon (μl)	WT- forhåndsblending 30 + 1 reaksjoner (μl)	Sluttkonsentrasjon
TaqMan Universal PCR masterblending, 2x	12,5	387,5	1x
Primere og probeblending, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Nukleasefritt vann av PCR- kvalitet	6,5	201,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5.0	5 hver	–
Totalvolum	25.0	25 hver	–

- 3. Dispenser 20 μ l av qPCR-forhåndsblendingen (VF eller WT) pr. glass.**
- 4. Tilsett 5 μ l av materialet som skal kvantifiseres (25 ng genomisk DNA eller kontroll) i riktig glass (totalvolum 25 μ l).**
- 5. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.**
- 6. Plasser glassene i den termiske sykleren i samsvar med produsentens anbefalinger.**
- 7. Programmer Rotor-Gene Q-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som indikert i tabell 5.**

Tabell 5. Temperaturprofil

Analysemodus	Kvantifisering
Holding	Temperatur: 50 grader Tid: 2 min.
Holding 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min.
Sykling	50 ganger 95 °C i 15 sek. 62 °C i 1 min. med innhenting av FAM-fluorescens i grønn kanal: Enkel

- 8. For Rotor-Gene Q-instrumenter, velg "Slope Correct" (Helningskorreksjon) for analysen. Vi anbefaler å stille inn terskelen ved 0,03. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 5.**

Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrument

Ved bruk av 96-brønn-plate qPCR-utstyr, anbefaler vi å utføre alle målinger i duplikat, som indikert i tabell 6.

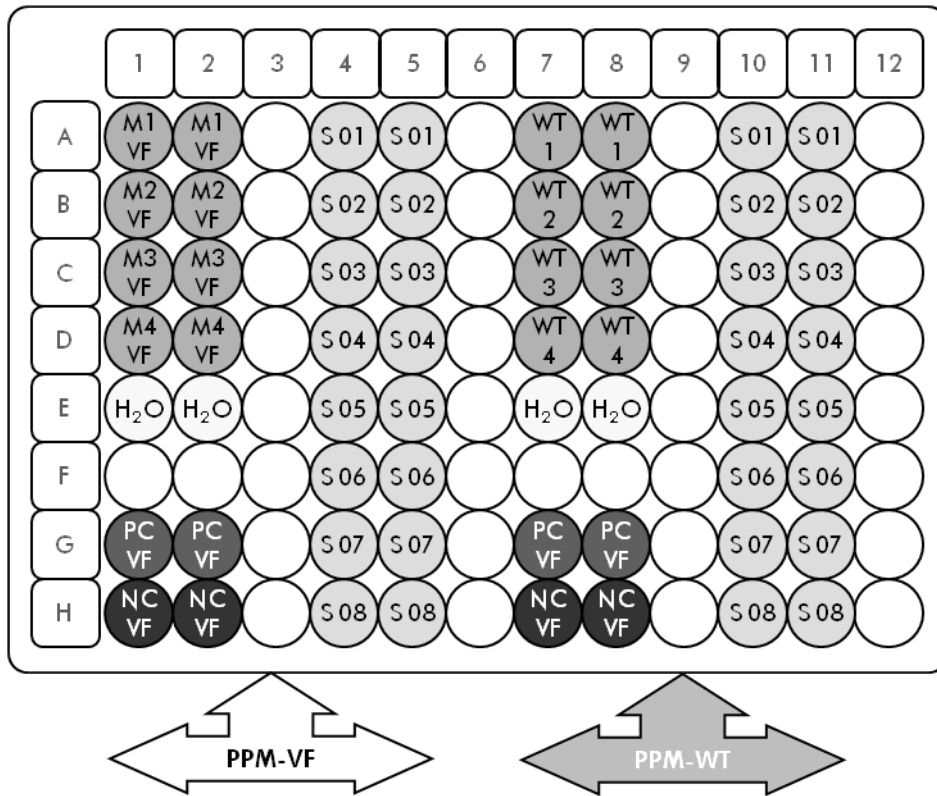
Antall reaksjoner som bruker 96-brønn-plate qPCR-utstyr

Prøver	Reaksjoner
Med JAK2 V617F primere og probeblanding (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	8 reaksjoner, hver testet i duplikat
n DNA-prøver	n x 2 reaksjoner
2 DNA-kontroller	4 reaksjoner: PC-VF og NC-VF, hver testet i duplikat
Vannkontroll	2 reaksjoner
Med JAK2-villtypeprimere og probeblanding (PPM-WT)	
4 villtypestandarder	8 reaksjoner, hver testet i duplikat
n DNA-prøver	n x 2 reaksjoner
2 DNA-kontroller	4 reaksjoner: PC-VF og NC-VF, hver testet i duplikat
Vannkontroll	2 reaksjoner

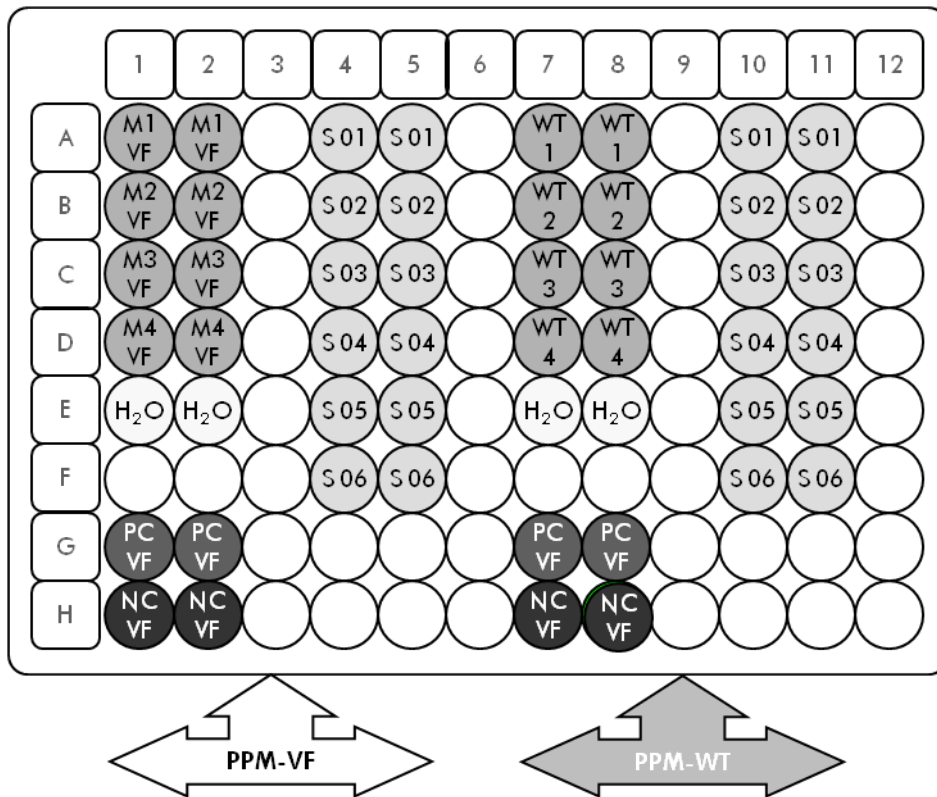
Prøvebehandling på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrument

Vi anbefaler testing av 8 DNA-prøver med 24-reaksjonssettet (katalognr. 673523) og minst 6 DNA-prøver med 12-reaksjonssettet (katalognr. 673522) i samme eksperiment for å optimere bruken av standarder og primere og probeblandinger.

Plateskjemaet i figur 4 viser et eksempel på et slikt eksperiment ved bruk av 24-reaksjonssettet (katalognr. 673523), og figur 5 viser et eksempel på et slikt eksperiment ved bruk av 12-reaksjonssettet (katalognr. 673522).



Figur 4. Anbefalt plateoppsett for ett eksperiment ved bruk av 24-reaksjonssettet (katalognr. 673523). PC-VF: V617F positiv kontroll; NC-VF: V617F negativ kontroll; M-VF: V617F standarder; M-WT: villtypestandarder; Merk: DNA-prøve; H₂O: vannkontroll



Figur 5. Anbefalt plateoppsett for ett eksperiment ved bruk av 12-reaksjonssettet (katalognr. 673522). PC-VF: V617F positiv kontroll; NC-VF: V617F negativ kontroll; M-VF: V617F-standarder; M-WT: villtypestandarder; S: DNA-prøve; H₂O: vannkontroll

qPCR på ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system og LightCycler 480-instrument

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. **Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.**
2. **Klargjør følgende qPCR-blanding i henhold til antallet prøver som skal behandles.**

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 7 og 8 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet på å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 25 μ l. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antallet reaksjoner, ved bruk av samme primer og probeblanding (enten PPM-VF eller PPM-WT). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 7. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	V617F-forhåndsblending			Slutt-konsentrasjon
	1 reaksjon (μ l)	26 + 1 reaksjoner (μ l)	30 + 1 reaksjoner (μ l)	
TaqMan Universal PCR master-blanding, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primere og probe-blanding, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Nuklease-fritt vann av PCR-kvalitet	6,5	175,5	201,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25,0	25 hver	25 hver	–

Tabell 8. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	WT-forhåndsblending			Slutt-konsentrasjon
	1 reaksjon (μ l)	26 + 1 reaksjoner (μ l)	30 + 1 reaksjoner (μ l)	
TaqMan Universal PCR master-blanding, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primere og probe-blanding, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	6,5	175,5	201,5	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	5 hver	–
Totalvolum	25,0	25 hver	25 hver	–

3. Dispenser 20 μ l qPCR-forhåndsblending (VF eller WT) pr. brønn.
4. Tilsett 5 μ l av materialet som skal kvantifiseres (25 ng prøvegenomisk DNA eller kontroll) i tilsvarende brønn (totalvolum 25 μ l).
5. Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.
6. Lukk platen og sentrifuger raskt (300 x g, ca. 10 seconds).
7. Plasser platen i den termiske syklere i samsvar med produsentens anbefalinger.
8. Programmer den termiske syklere med det termiske syklingsprogrammet og still inn instrumentet for innhenting av dobbeltmerket FAM-fluorescerende probe som angitt i tabell 9 for ABI PRISM 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, eller tabell 10 for LightCycler 480-instrumentet.

Tabell 9. Temperaturprofil for ABI PRISM 7900HT SDS og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system

Analysemodus	Standardkurve - absolutt kvantifisering
Holding	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
Holding 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
Sykling	50 ganger 95 °C i 15 sekunder 63 °C i 1 minutt 30 sekunder med innhenting av FAM-fluorescerens; undertrykkingsstoff: TAMRA

Tabell 10. Temperaturprofil for LightCycler 480-instrument

Analysemodus	Absolutt kvantifisering ("Abs Quant")
Påvisningsformater	Velg «Simple Probe» (Enkeltprobe) i vinduet for påvisningsformat
Holding	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minutter
Holding 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter
Sykling	50 ganger 95 °C i 15 sekunder 63 °C for 1 minutt 30 sekunder med innhenting av FAM-fluorescens tilsvarende (483–533 nm) for LC-versjon 01 og (465–510 nm) for LC-versjon 02

- 9. For ABI PRISM 7900HT og Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system, følg trinn 8a. For LightCycler 480-instrumentet, følg trinn 8b.**
- 9a. ABI PRISM 7900HT and Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: We recommend a threshold set at 0.1. Start the cycling program, as indicated in Table 9.**

9b. LightCycler 480: We recommend a Fit point analysis mode with background at 2.0 and threshold at 2.0. Start the thermal cycling program, as indicated in Table 10.

Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2-instrument

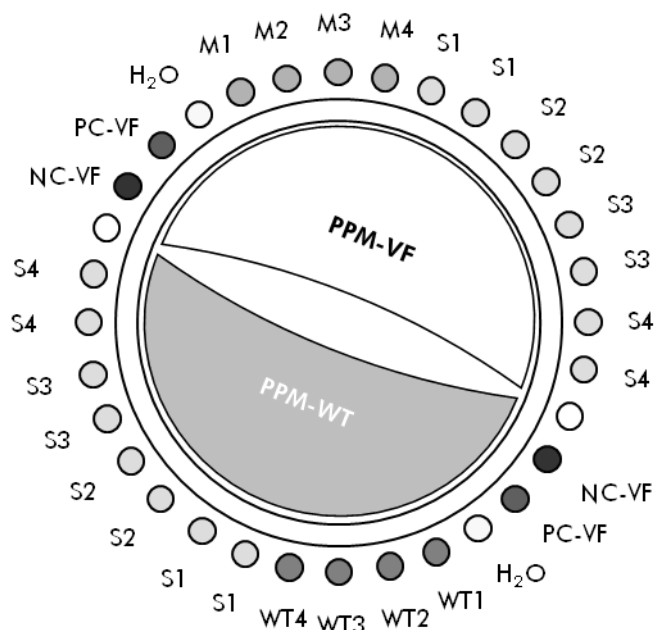
Vi anbefaler å måle prøver i duplikat og kontroller kun én gang med kapillære instrumenter, som angitt i tabell 11.

Tabell 11. Antall reaksjoner for LightCycler 1.2-instrument

Prøver	Reaksjoner
Med JAK2 V617F primere og probeblanding (PPM-VF)	
4 M-VF-standarder	4 reaksjoner, testet én gang hver
n DNA-prøver	n x 2 reaksjoner
2 DNA-kontroller	2 reaksjoner: PC-VF og NC-VF, testet én gang hver
Vannkontroll	1 reaksjon
Med JAK2-villtypeprimere og probeblanding (PPM-WT)	
4 villtypestandarder	4 reaksjoner, testet én gang hver
n DNA-prøver	n x 2 reaksjoner
2 DNA-kontroller	2 reaksjoner: PC-VF og NC-VF, testet én gang hver
Vannkontroll	1 reaksjon

Prøvebehandling på LightCycler 1.2-instrument

Vi anbefaler å teste 4 DNA-prøver i samme eksperiment for å optimere bruken av standarder og primere og probeblandinger. Kapillærplanen i figur 6 viser et eksempel på et eksperiment.



Figur 6. Anbefalt rotoroppsett for hvert eksperiment med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-sett. PC-VF: V617F positiv kontroll; NC-VF: V617F negativ kontroll; M-VF: V617F standarder; M-WT: villtypestandarder; S: DNA-prøve; H₂O: vannkontroll

qPCR on LightCycler 1.2 instrument

Merk: På grunn av bestemte teknologiske krav, må LightCycler-eksperimenter utføres ved bruk av spesifikke reagenser. Vi anbefaler å bruke LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe og følge produsentens instruksjoner for klargjøring av Master Mix 5x.

Merk: Utfør alle trinn på is.

Prosedyre

1. **Tin opp alle nødvendige komponenter og legg dem på is.**
2. **Klargjør følgende qPCR-blanding i henhold til antallet prøver som skal behandles.**

Alle konsentrasjoner er for sluttreaksjonsvolum.

Tabell 12 og 13 beskriver pipetteringsplanen for klargjøring av én reagensblanding, beregnet på å oppnå et sluttreaksjonsvolum på 20 µl. En forhåndsblending kan klargjøres i samsvar med antallet reaksjoner, ved bruk av samme primer og probeblanding (enten PPM-VF eller PPM-WT). Andre volum inkluderes for å kompensere for pipetteringsfeil.

Tabell 12. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (μl)	V617F- forhåndsblending 15 + 1 reaksjoner (μl)	Slutt- konsentrasjon
Nylig klargjort LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe- blending, 5x	4,0	64,0	1x
Primere og probeblending, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	10,2	163,2	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	–
Totalvolum	20,0	20 hver	–

Tabell 13. Klargjøring av qPCR-blanding

Komponent	1 reaksjon (μl)	WT- forhåndsblending 15 + 1 reaksjoner (μl)	Slutt- konsentrasjon
Nylig klargjort LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe- blending, 5x	4,0	64,0	1x
Primere og probeblending, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasefritt vann av PCR-kvalitet	10,2	163,2	–
Prøve (skal tilsettes i trinn 4)	5,0	5 hver	–
Totalvolum	20,0	20 hver	–

3. **Dispenser 15 μ l qPCR-forhåndsblending (VF eller WT) pr. kapillær.**
4. **Tilsett 5 μ l av materialet som skal kvantifiseres (25 ng genomisk DNA eller kontroll) i riktig glass (totalvolum 20 μ l).**
5. **Bland varsomt ved å pipettere opp og ned.**
6. **Plasser kapillærene i adapterne som følger med apparatet, og sentrifuger raskt (700 x g, ca. 10 sekunder).**
7. **Last kapillærene inn i den termiske syklere i henhold til produsentens anbefalinger.**
8. **Programmer LightCycler 1.2-instrumentet med det termiske syklingsprogrammet som angitt i tabell 14.**

Tabell 14. Temperaturprofil

Analysemodus	Kvantifisering
 Holding 1	Temperatur: 55 °C Tid: 2 minutter Stigning: 20
 Holding 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minutter Stigning: 20
Sykling	50 ganger 95 °C i 15 sekunder; stigning: 20 66 °C i 1 minutt; stigning: 20; med innhenting av FAM-fluorescence: Enkel

9. For LightCycler 1.2 er F1/F2 og modusen «2nd derivative analysis» (2. derivative analyse) anbefalt. Start det termiske syklingsprogrammet, som angitt i tabell 14.

Tolkning av resultater

Prinsipp for dataanalyse

Data om verdier for terskelsyklus (C_T) og krysningspunkt (C_P) kan eksporteres fra qPCR-instrumentet og inn i en Excel[®]-fil for analyse. Disse verdiene kan brukes til å beregne gjennomsnittsverdien for C_P og C_T , og standard C_T -gjennomsnittsverdier kan legges inn for å oppnå en standardkurve for både villtype- og V617F-standarder ved bruk av følgende ligning og tabell 15.

$y = \text{gj.sn. } C_P; x = \log_{10} \text{ CN}$ der CN = genkopinummer i prøven på 5 μl

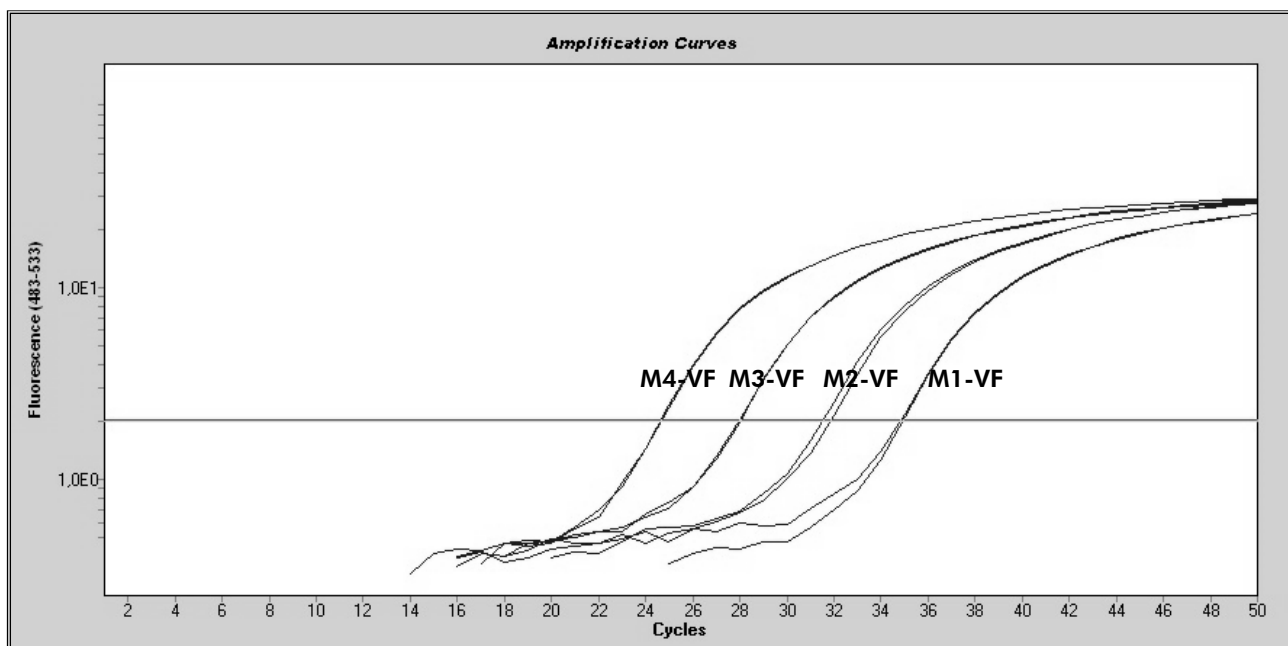
Tabell 15. Kvantitative data for villtype- og V617F-standardene

Standard	Kopinummer (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

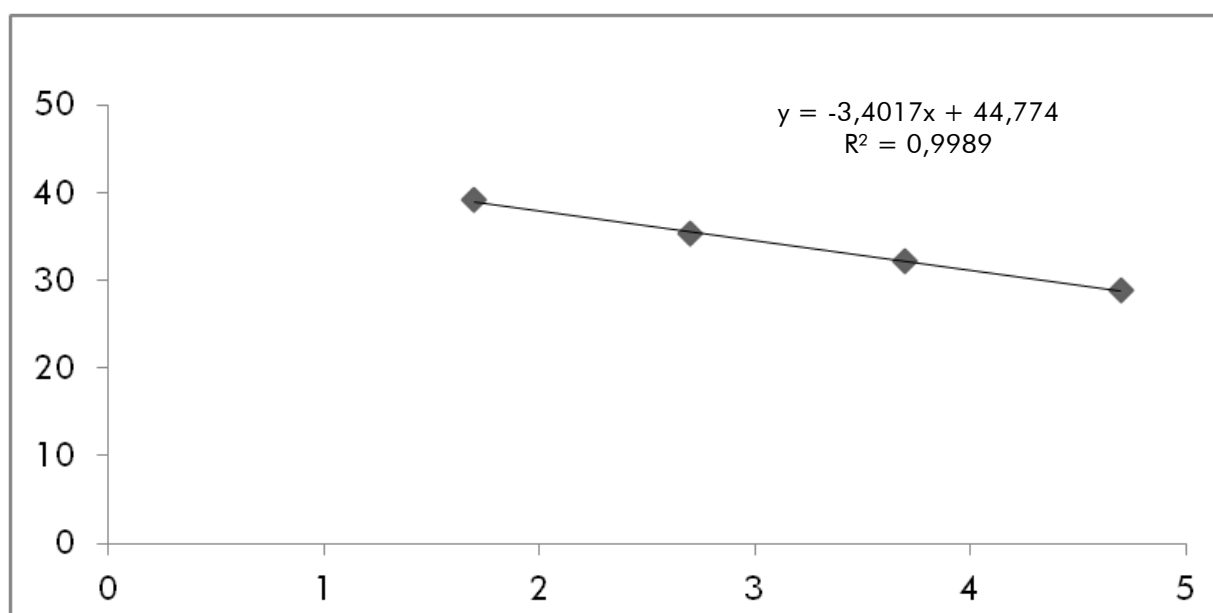
Merk: Hver bruker bør måle sin egen reproduserbarhet i laboratoriet sitt.

Standardkurve og kvalitetskriterier

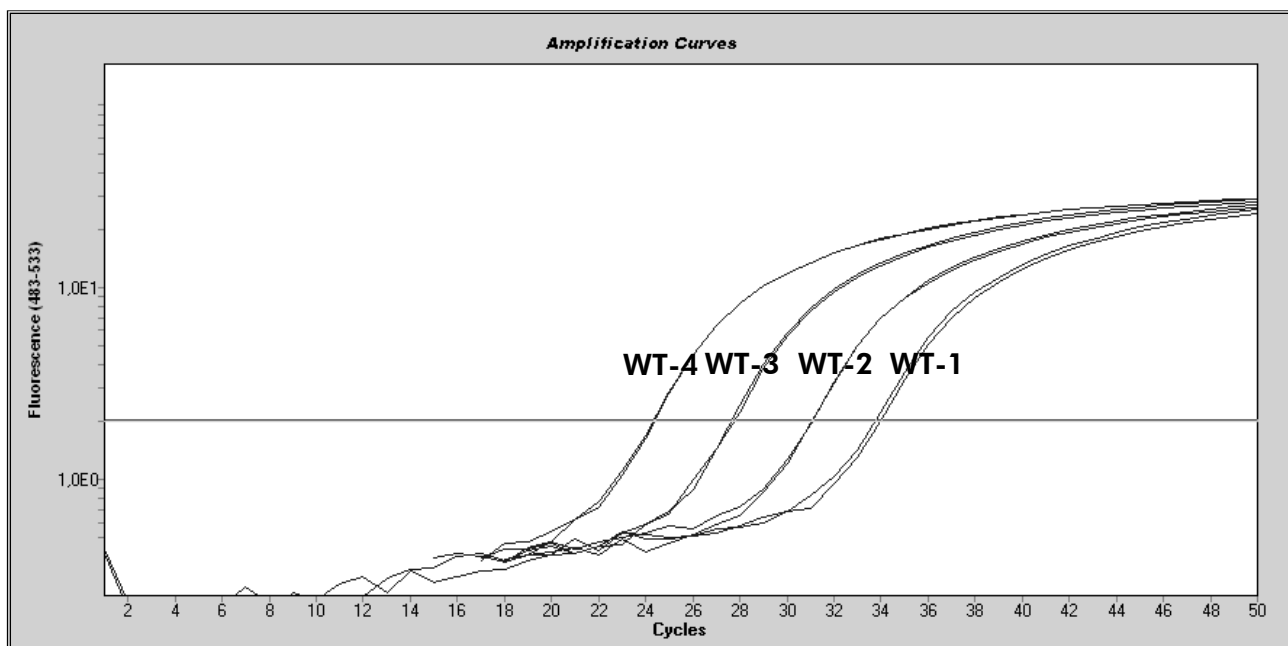
Figure 7 og 9 viser eksempler på resultater oppnådd med *ipsogen JAK2 MutaQuant*-settet, og figur 8 og 10 viser et eksempel på den teoretiske kurven beregnet ut fra 4 standardfortynninger.



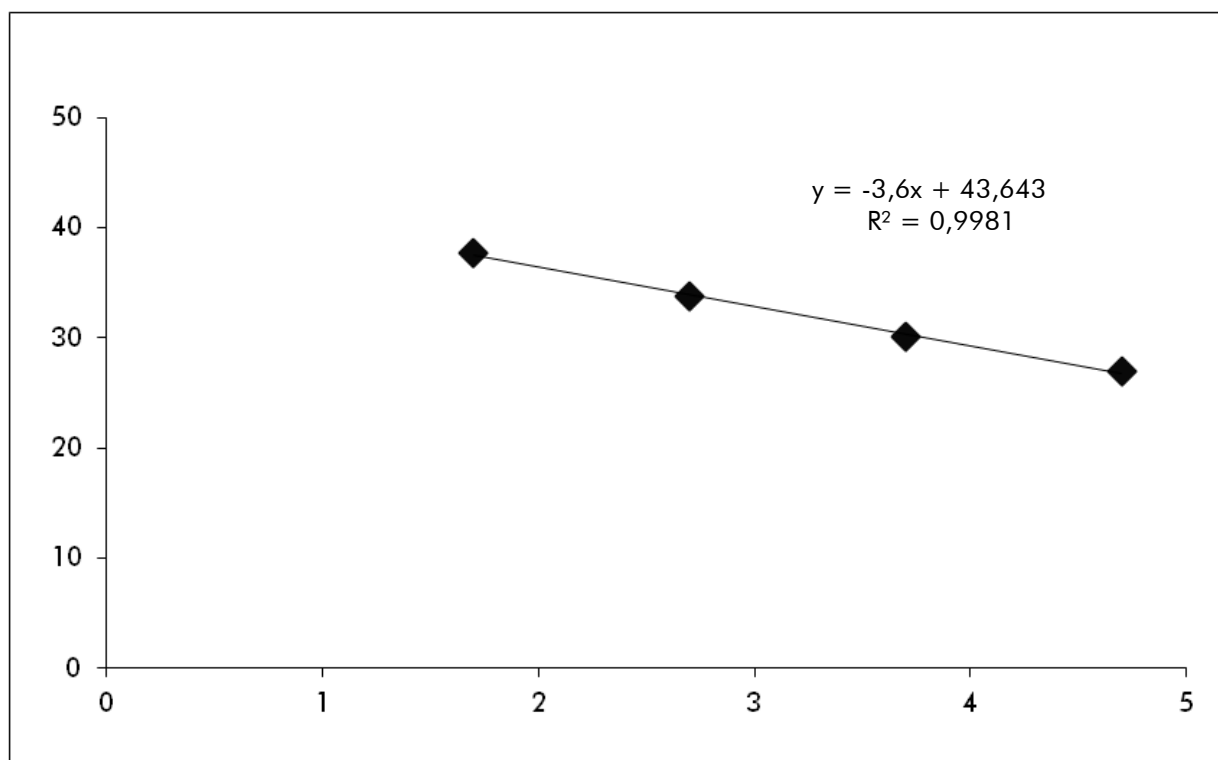
Figur 7. Forsterkningsdiagram for 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 og 5×10^4 kopier av JAK2 V617F-plasmidet (henholdsvis kontroll M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF).



Figur 8. Standardkurve for JAK2 V617F.



Figur 9. Forsterkningsdiagram for 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 og 5×10^4 kopier av JAK2-villtypeplasmidet (henholdsvis kontroll WT-1, WT-2, WT-3 og WT-4).



Figur 10. Standardkurve for JAK2-villtype.

Siden standarder er 10-gangers fortyninger, er den teoretiske helningen av kurven $-3,32$. En helning mellom $-3,0$ og $-3,9$ er akseptabelt så lenge R^2 er

>0,95 (12). En verdi for $R^2 > 0,98$ er imidlertid ønskelig for å oppnå nøyaktige resultater (13).

Standardkurveligningene kan deretter brukes til å beregne V617F- og WT- \log_{10} -kopinumre i de ukjente prøvene.

V617F-standardkurveligningen skal brukes til å forvandle gjennomsnittlig C_P/C_T -råverdi (oppnådd med PPM-VF) for ukjente prøver og kontrollprøver til JAK2 V617F-kopinumre (CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Gj.sn. } C_{pV617F} - \text{skjæringspunkt for standardkurve}_{V617F})}{\text{Helning for standardkurve}_{V617F}}$$

Ligningen for villtype-standardkurve skal brukes til å forvandle gjennomsnittlig C_P/C_T -råverdi (oppnådd med PPM-WT) for ukjente prøver og kontrollprøver til JAK2-villtypekopinumre (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Gj.sn. } C_{pWT} - \text{skjæringspunkt for standardkurve}_{WT})}{\text{Helning for standardkurve}_{WT}}$$

Uttrykking av resultatene

Resultater er relative til 25 ng av totalt genomisk DNA, og skal uttrykkes som prosentandelen av JAK2 V617F som følger.

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

Reproduserbarhet mellom replikater

Innhentede data skal være konsekvente mellom duplikatene.

Positive og negative kontroller

Den positive kontrollen eller PC-VF skal gi en JAK2 V617F prosent på over 99,9 %.

Den negative kontrollen eller NC-VF skal gi en JAK2 V617F-prosent på under 0,1 %.

Hvis disse kontrollene ikke fungerer riktig, må du se «Feilsøkningsveiledning», side 34, for å finne en løsning.

Vannkontroller

Negative kontroller skal gi null CN for påvisning av både JAK2 V617F- og JAK2-villtype.

En positiv vannkontroll skyldes krysskontaminering. Se «Feilsøkningsveiledning» nedenfor for å finne en løsning.

Feilsøkningsveiledning

Denne feilsøkningsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. For mer informasjon, se også siden med vanlige spørsmål og svar på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og protokollen i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, se «Kontaktinformasjon», side 43).

Kommentarer og forslag

Standardkurven for villtype eller V617F er ikke lineær

Inversjon av hetteglass, inversjon under distribusjon, krysskontaminering, delvis nedbrytning av standarden, RQPCR-reagens, ikke-spesifikk forsterkning eller PCR-programvfeil

Kontroller pipetteringsplanen og oppsettet av reaksjonen.

Oppbevar *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet ved –15 til –30 °C og oppbevar primere og probeblandinger beskyttet mot lys. Se «Håndtering og oppbevaring av reagensen», side 12.

Unngå gjentatt frysing og tining.

Manglende eller lavt signal for én standard

Standard ikke distribuert, eller bruk av samme PPM-blanding

Kontroller pipetteringsplanen og oppsettet av reaksjonen.

Gjenta PCR-kjøringen.

Kommentarer og forslag

Negativ (H₂O) kontroll er positiv

Krysskontaminering, reagenskontaminering, instrumentfeil, brønn- eller kapillærinversjon eller probeforringelse.

Skift ut alle essensielle reagenser.

Prøver, settkomponenter og forbruksvarer må alltid håndteres i samsvar med normalt godkjent praksis for å forhindre at det overføres kontaminering.

Oppbevar primere og probeblandinger beskyttet mot lys.

Se etter falskt positive prøver på fluorescenskurver.

Manglende signal, selv i standardkontroll

a) Feil påvisningskanal er valgt

Still kanal til F1/F2 eller 530 nm/640 nm.

b) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser

Kontroller pipetteringsplanen og oppsettet av reaksjonen.

Gjenta PCR-kjøringen.

c) Ingen datainnhentingsprogrammer

Kontroller syklusprogrammet.

Velg innhentingsmodus «Single» (Enkel) på slutten av hvert herdingssegment i PCR-programmet.

Manglende eller lavt signal i prøver, men ok standardkontroller

Hemmende effekter på prøvemateriale forårsaket av utilstrekkelig rensing

Kontroller alltid DNA-kvaliteten og (OD₂₆₀/OD₂₈₀) og konsentrasjonen før du starter.

Gjenta DNA-klargjøring.

Fluorescensintensiteten er for lav

a) Uegnet oppbevaring av settkomponenter

Alikvoter reagenser for oppbevaring.

Oppbevar *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet ved –15 til –30 °C og oppbevar primere og probeblandinger beskyttet mot lys. Se «Håndtering og oppbevaring av reagensen», side 12.

Unngå gjentatt frysing og tining.

Kommentarer og forslag

- b) Svært lav initiell mengde av mål-DNA

Kontroller mengden prøve-DNA.

Merk: Avhengig av valgt metode for DNA-klargjøring, kan det oppstå hemmende effekter.

Negative kontroller er positive

Overføring av kontaminering

Skift ut alle essensielle reagenser.

Gjenta eksperimentet med nye alikvoter av alle reagenser.

Håndter alltid prøver, settkomponenter og forbruksvarer i samsvar med normalt akseptert praksis for å forhindre overføring av kontaminering.

Fluorescensintensiteten varierer

- a) Pipetteringsfeil

Roter og sentrifuger alle reagenser etter tining.

LightCycler-variabilitet forårsaket av en såkalt «pipetteringsfeil» kan reduseres ved å analysere data i F1/F2 eller 530 nm/640 nm-modus.

- b) Utilstrekkelig sentrifugering av platen, glassene eller kapillærene, eller den klargjorte PCR-blandingen kan fremdeles befinner seg i det øvre karet i kapillæren, eller en luftboble kan sitte fast i kapillærspissen.

Sentrifuger alltid kapillærer med reaksjonsblandingen, som beskrevet i brukerhåndboken for det relevante apparatet.

- c) Utsiden av kapillærspissen er skitten

Bruk alltid hansker ved håndtering av kapillærene.

Kommentarer og forslag

Villtype eller V617F positive kontroller signaliserer ved bruk av resiprok PPM

Krysskontaminering,
reagenskontaminering eller
brønn- eller kapillærinversjon

Skift ut alle essensielle reagenser.

Gjenta eksperimentet med nye
aliquoter av alle reagenser.

Håndter alltid prøver,
settkomponenter og forbruksvarer i
samsvar med normalt akseptert
praksis for å forhindre overføring av
kontaminering.

Kontroller pipetteringsplanen og
oppsettet til reaksjonen.

Invertert påvisning av positiv kontroll

Distribuert inversjon av PPM i
brønn eller kapillær eller i
forhåndsblandingen

Kontroller pipetteringsplanen og
oppsettet til reaksjonen.

Manglende signal for én positiv kontroll eller begge

PPM eller kontroll-DNA utelatt

Kontroller pipetteringsplanen og
oppsettet til reaksjonen.

Høy bakgrunn

Fluoroforbleking

Oppbevar og håndter proben
beskyttet mot lys.

Dårlig reproduserbarhet for duplikatprøvene

Pipetteringsfeil eller
krysskontaminering

Kontroller pipetteringsplanen og
oppsettet av reaksjonen.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet. Analysesertifikater er tilgjengelige på forespørsel på www.qiagen.com/support.

Begrensninger

Brukerne må ha opplæring og kjennskap til denne teknologien før bruk av denne enheten. Dette settet skal brukes i samsvar med instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med et validert instrument nevnt i "Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger", side 10.

Alle diagnostiske resultater som genereres må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn. Det er brukerens ansvar å validere systemtelsen for alle prosedyrer anvendt i laboratoriet som ikke er dekt av QIAGENs ytelsesstudier.

Det er viktig å være oppmerksom på utløpsdatoer som er trykket på boksen og etikettene på alle komponenter. Bruk ikke komponenter med utløpt dato.

Ytelseegenskaper

Ikke-kliniske studier

Presisjon

En presisjonsstudie ble utført ved bruk av 12 DNA-prøver ekstrahert fra cellelinjer som tilsvarte ulike JAK2 V617F-allelebyrder. Totalt 80 målinger ble utført på hver prøve ved bruk av 3 ulike partier av *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet. Denne presisjonsstudien brukte et Applied Biosystems 7500 sanntids PCR-system.

Analytiske data er oppsummert i 15.

Table 15. Kvantitative data for villtype- og V617F-standardene

Prøve	Teoretisk JAK2 V617F (%)		Gjennomsnitt (%)	CV (%)	Persentil	
	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

* Avvikende verdier ble ekskludert. Disse ble definert som verdier mindre enn det nedre kvartilet minus 3 ganger interkvartilområdet eller større enn det øvre kvartilet pluss 3 ganger interkvartilområdet på et boksdiagram.

n = antall validerte prøver; CV = global variasjonskoeffisient.

Blankgrense og påvisningsgrense

Bakgrunnsnivå eller blanknivå (Level of Blank – LOB) ble bestemt på negative prøver (8 prøver, 76 målinger). Dette ble påvist å være 0,014 %.

Påvisningsgrense (Limit of Detection – LOD) ble bestemt ved bruk av prøver som var påvist positive men hadde lav ekspresjon (7 prøver, 68 målinger). Dette ble påvist å være 0,061 %, med et 90 % konfidensintervall og øvre grense ved 0,091 %.

Denne optimale følsomheten kan oppnås på prøver som inneholder minst 10 000 kopier av JAK2-genet (villtype eller V617F-mutasjon).

Kvantifiseringsdata skal rapporteres som følger.

- JAK2 V617F $\leq 0,014$ % kan tolkes som at JAK2 V617F-mutasjonen ikke ble påvist.
- JAK2 V617F er $>0,014$ % men $<0,091$ % kan tolkes som et ubestemmelig resultat.
- JAK2 V617F $\geq 0,091$ % kan tolkes som et positivt resultat og at JAK2 V617F-mutasjonen er påvist.

Linearitet

Linearitetsstudier ble utført på 12 prøver, hver fra en ulik DNA-blanding ekstrahert fra cellelinjer som var positive og negative for JAK2 V617F-mutasjon. Hver prøve ble testet 5 ganger. Data fra denne studien viste at *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet ga lineære resultater på tvers av det dynamiske området.

Kliniske studier

DNA fra blod eller benmarg ble ekstrahert fra 87 pasientprøver og analysert med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet. I tillegg ble prosentandelen av JAK2 V617F-mutasjoner kvantifisert og sammenlignet med screeningtestresultater oppnådd med *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ-settet (katalognr. 673223). Innhentede data vises i tabell 16.

Tabell 16. Kontingenstabell som viser overensstemmelsen mellom resultater oppnådd med *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet og *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ-settet

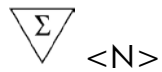
		Resultater fra <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ-settet			n
		Mutasjon påvist	Ubestemmelig resultat	Mutasjon ikke påvist	
Resultater fra <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant-settet	Mutasjon påvist	40	2	7	49
	Ubestemmelig resultat	0	0	21	21
	Mutasjon ikke påvist	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Positiv overensstemmelse	100% (95 % konfidensintervall: 91%, 100%)				
Negativ overensstemmelse	71% (95 % konfidensintervall: 51%, 85%)				
Generell overensstemmelse	89 % (95 % konfidensintervall: 79%, 95%)				

Referanser

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413..
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R. L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:



Inneholder nok reagens til <N> reaksjoner



Brukes innen



Medisinsk utstyr til in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer



Materialnummer



Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensning



Produsent



Se bruksanvisningen

Kontaktinformasjon

For teknisk hjelp og mer informasjon, se vårt tekniske supportsenter på www.qiagen.com/Support, ring 00800-22-44-6000 eller kontakt en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller besøk www.qiagen.com).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	For 12 reaksjoner: Villtype JAK2- genkontroll, JAK2 V617F-kontrollgen, primere og probeblanding PPM-WT, primere og probeblanding PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	For 24 reaksjoner: Villtype JAK2- genkontroll, JAK2 V617F-kontrollgen, primere og probeblanding PPM-WT, primere og probeblanding PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx — for IVD-validert sanntids PCR-analyse i kliniske bruksområder		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Sanntids PCR-sykler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Sanntids PCR-sykler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring	9002033

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, se den respektive håndboken eller brukerhåndboken for QIAGEN-settet. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller på forespørsel fra QIAGENS tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

Dette produktet er beregnet på bruk i in vitro-diagnostikk. *ipsogen*-produkter kan ikke videreselges, modifiseres for videresalg eller brukes til å produsere kommersielle produkter uten skriftlig godkjenning fra QIAGEN.

Informasjon i dette dokumentet kan endres uten forvarsel. QIAGEN tar ikke ansvar for noen feil som vises i dette dokumentet. Dette dokumentet anses å være fullstendig og nøyaktig på utgivelsestidspunktet. QIAGEN skal ikke under noen omstendigheter være ansvarlige for utilsiktede, spesielle, multipliserte eller følgeskader i forbindelse med eller som følge av bruk av dette produktet.

ipsogen-produkter er garantert å oppfylle sine angitte spesifikasjoner. QIAGENS eneste ansvar og kundens eneste godtgjørelse er begrenset til kostnadsfri erstatning av produkter hvis produktene ikke fungerer i samsvar med garantien.

JAK2 V617F-mutasjon og bruk av denne er patentbeskyttet, herunder europeisk patent EP1692281, amerikansk patent 7,429,456 og 7,781,199, amerikansk patentsøknad US20090162849 og US20120066776 og utenlandske motparter.

Innkjøp av dette produktet overfører ikke noen rettigheter for bruk i kliniske studier for JAK2V617F-rettede legemidler. QIAGEN utvikler spesifikke lisensprogrammer for slike bruksområder. Ta kontakt med vår juridiske avdeling på jak2licenses@qiagen.com.

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

Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet bekrefter at kjøperen eller brukeren av *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet samtykker i følgende betingelser:

1. *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet kan kun brukes i samsvar med håndboken for *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet, og kun med komponentene i settet. QIAGEN gir ingen lisens under noe av deres immateriale rettigheter for å bruke eller implementere de vedlagte komponentene i dette settet med komponenter som ikke inngår i dette settet, bortsett fra det som er beskrevet i håndboken for *ipsogen* JAK2 MutaQuant-settet samt andre protokoller på www.qiagen.com.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at denne pakken og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN fraskriver seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, med unntak av de som er tydelig uttrykt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i å ikke la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine undersøkelses- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

For oppdaterte lisensvilkår, se www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, alle rettigheter forbeholdt.

www.qiagen.com

