

ipsogen® JAK2 MutaQuant® Kit El Kitabı

Σ 12 (katalog no. 673522)

Σ 24 (katalog no. 673523)

Versiyon 1

IVD

Kantitatif in vitro diagnostik

Rotor-Gene® Q, ABI PRISM® 7900HT SDS, Applied Biosystems®
7500 Real-Time PCR System ve LightCycler® aletleriyle
kullanılmak üzere



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R3

MAT

1072501TR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN herhangi bir biyolojik örneğin içeriğinin izolasyonu ve saptanmasını mümkün kılan yenilikçi örnek ve tahlil teknolojilerinin önde gelen lideridir. Gelişmiş, çok kaliteli ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca başarıyı garanti eder.

QIAGEN şunlarda standartları oluşturur:

- DNA, RNA ve proteinlerin saflaştırılması
- Nükleik asit ve protein tahlilleri
- microRNA araştırmaları ve RNAi
- Örnek ve tahlil teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz olağanüstü başarı elde etmeniz ve yeni buluşlar yapmanızı mümkün kılmaktır. Daha fazla bilgi için www.qiagen.com adresini ziyaret edin.

İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	4
İşlemin Prensibi	6
Sağlanan Materyaller	9
Kit içeriği	9
Gereken ama Sağlanmayan Materyal	10
Uyarılar ve Önlemler	12
Genel önlemler	12
Reaktif Saklama ve Muamele	12
İşlem	14
Örnek DNA hazırlama	14
Protokollerin	
■ Protokol: 72 tüp rotorlu Rotor Gene Q 5plex HRM veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM üzerinde qPCR	15
■ Protokol: ABI PRISM 7900HT SDS'de qPCR, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi ve LightCycler 480 cihazı	20
■ Protokol: LightCycler 1.2 cihazında qPCR	26
Sonuçların Değerlendirilmesi	31
Sorun Giderme kılavuzu	35
Kalite Kontrol	38
Sınırlamalar	39
Performans Özellikleri	40
Klinik olmayan çalışmalar	40
Klinik araştırmalar	41
Referanslar	43
Semboller	44
İrtibat Bilgisi	44
Sipariş Bilgisi	45

Kullanım Amacı

ipsogen JAK2 MutaQuant Kitinin şüphelenilen myeloproliferatif neoplazmi (MPN) olan hastaların periferal kanından ekstrakte edilen genomik DNA'da JAK2 V617F/G1849T allelinin saptanması ve kantifikasyonunda kullanılması amaçlanmıştır.

JAK2 V617F/G1849T mutasyonunun bulunmaması diğer JAK2 mutasyonlarının varlığını ekarte ettirmez. Test nükleotid 88504 to 88622'de yer alan ek mutasyonlar durumunda yalnızca negatif sonuçlar verebilir (1).

Not: Kit bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış reaktifler ve aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır. Bu ürünün etiket dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN'in yükümlülüğünü ortadan kaldırır.

Özet ve Açıklama

2005 yılında Janus tirozin kinaz 2 (JAK2) genini etkileyen bir reküran somatik mutasyon olan V617F tanımlanmış (2–5) ve myeloproliferatif neoplazmların (MPN) anlaşılması, sınıflandırılması ve tanısında önemli bir çığır açmıştır. JAK2, eritropoietin dahil çeşitli sitokinler için kritik bir intraselüler sinyalleme molekülüdür.

JAK2 V617F mutasyonu polisitemi vera (PV) hastaların >%95'inde, esansiyel trombositemi (ET) hastalarının %50–60'ında ve primer myelofibrosis (PMF) hastalarının %50'sinde bulunur. JAK2 V617F bazı nadir kronik myelomonositik lösemi, myelodisplastik sendrom, sistemik mastositoz ve kronik nötrofilik lösemi vakalarında saptanmıştır ama KML vakalarının %0'ında bulunur (6).

Mutasyon ekson 14'te JAK2 nükleotid 1849'da tek bir nükleotid değişikliği ve bunun sonucunda proteinde 617 pozisyonunda valin (V) yerine fenilalanin (F) geçmesine (JH2 bölgesi) karşılık gelir. Tüm PV hastalarında ve ET ve PMF hastalarının büyük oranında JAK2'de yapısal aktivasyona, *in vitro* hematopoietik transformasyona ve eritropoietinden bağımsız eritroid koloni (EEC) büyümesine neden olur (7). JAK2 V617F MPN'de hematopoietik hücrelerin transformasyonunda temel bir sürücüdür ama aynı benzersiz mutasyonla bu kadar farklı klinik ve biyolojik hastalıklara yol açan tam patolojik mekanizmalar daha tam anlaşılmamıştır.

Geleneksel olarak MPN'lerin tanısı klinik, kemik iliği histolojisi ve sitogenetik kriterleri temel alır. Hastalığa spesifik bir moleküler belirtecin keşfedilmesi hem süreci kolaylaştırmış hem tanısız doğruluğu arttırmıştır. JAK2 V617F mutasyonunun saptanması artık BCR-ABL negatif MPN tanısı için referans WHO 2008 kriterlerinin bir parçasıdır (Tablo 1) ve bu mutasyonun varlığı diagnostik doğrulama için majör bir kriterdir.

Tablo 1. MPN tanısı için DSÖ kriterleri (referans 8'den uyarlanmıştır)

Polistemi vera (PV) tanısı kriterleri	
Majör	1. Hemoglobün (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (erkek) veya $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (kadın) veya Hgb veya hematokrit (Hct) yaş, cinsiyet veya oturma yerinin rakımı için referans aralığının $>99.$ persantili veya Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (erkek) veya $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (kadın) eğer başlangıca göre uzun süreli $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ artış ile ilişkiliyse ve bu durum demir eksikliği düzeltmesine bağlanamıyorsa veya Ortalama normal öngörülen değerden $>\%25$ yüksek artmış alyuvar kitlesi 2. JAK2V617F veya benzer mutasyon varlığı
Minör	1. Kemik iliği trilineaj myeloproliferasyonu 2. Subnormal serum eritropoietin düzeyi 3. Endojen eritroid koloni (EEC) büyümesi
Esansiyel trombositemi (ET) tanısı kriterleri	
Majör	1. Trombosit sayımı $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Büyük ve matür morfolojili megakaryosit proliferasyonu. Granülosit veya eritroid proliferasyonunun olmaması veya çok az olması 3. Kronik myeloid lösemi (KML), PV, primer myelofibrosis (PMF), myelodisplastik sendrom (MDS) veya başka myeloid neoplazm için DSÖ kriterlerini karşılamama 4. JAK2V617F veya başka klonal işaret gösterilmesi veya Reaktif trombositoz bulgusu olmaması
Minör	-
Primer myelofibrosis (PMF) tanısı kriterleri	
Majör	1. Retikülin ve/veya kolajen fibrosisiyle birlikte megakaryosit proliferasyonu ve atipisi veya Retikülin fibrosis yokluğunda, megakaryosit değişiklikleriyle birlikte artmış kemik iliği selülaritesi, granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoez (yani prefibrotik PMF) bulunmalıdır 2. KML, PV, MDS veya başka myeloid neoplazm için DSÖ kriterlerini karşılamama 3. JAK2V617F veya başka klonal işaret gösterilmesi veya Reaktif kemik iliği fibrosisi bulgusu olmaması
Minör	1. Lökoeritroblastosis 2. Artmış serum laktat dehidrogenazı (LDH) 3. Anemi 4. Palpe edilebilir splenomegali

Son zamanlarda uluslararası uzmanlar PV ve ET için terapötik çalışmalara kriterler önermişlerdir. Allogreft, alfa interferon veya hidroksiüre verileri

temelinde JAK2V617F kantifikasyonu tedaviye cevabı izlemek üzere faydalı olabilecek bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır (9). JAK2 V617F yükünde bir azalma klinik geliştirme aşamasındaki yeni anti-JAK2 hedefli ilaçlardan bazılarına cevaben gözlenmiştir (10).

İşlemin Prensibi

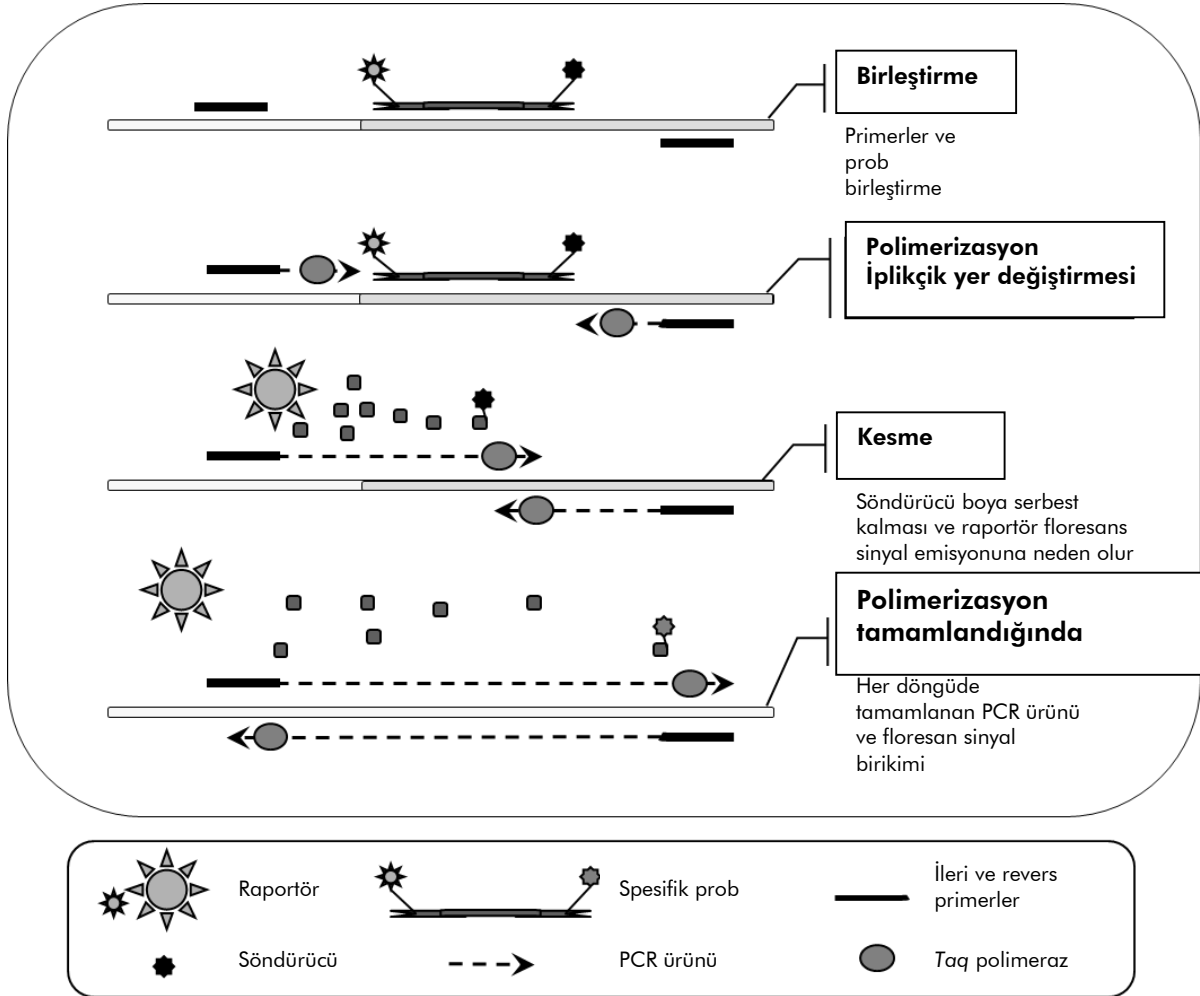
DNA örneklerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) oranını kalitatif olarak belirlemek üzere birkaç farklı teknik önerilmiştir. Bunlar içinde gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) temelli yöntemler allel yükünü longitudinal olarak göstermekte yüksek hassasiyetleri nedeniyle tercih edilir. Bu tekniklerin çoğunun %1–10 şeklinde orta derecede hassasiyeti vardır, TaqMan® allelik diskriminasyonu, Pyrosequencing®, erime eğrisi testi ve doğrudan sekanslama. Erime eğrisi ve sekanslama gibi bazıları sadece semikantitatifken Pyrosequencing gibi diğerleri PCR sonrası işleme gerektirir veya rutin laboratuvar testinde kolayca bulunamayacak ya da kurması çok pahalı olan enstrümantasyon lazımdır. Hassasiyetin < %0,1 olduğu çok hassas bir yaklaşım gerçek zamanlı qPCR aletinde kolayca saptanabilen mutant veya vahşi tip allelin selektif amplifikasyonunu mümkün kılan bir SNP spesifik primer kullanımı gerektirir. *ipsogen JAK2 MutaQuant* Kiti bu tekniği temel alır.

qPCR kullanılması, PCR amplifikasyon sürecinin eksponensiyel fazı sırasında PCR ürünlerinin doğru kantifikasyonunu mümkün kılar. Kantitatif PCR verileri post-PCR işleme olmadan PCR cycling sırasında ve/veya sonrasında floresans sinyallerin gerçek zamanlı saptanmasıyla hızla elde edilebilir ve böylece PCR ürünü kontaminasyonu riski önemli ölçüde azalır. Şu anda 3 ana tipte qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Yeşil I Boya kullanılarak qPCR analizi, hidroliz problemleri kullanılarak qPCR analizi ve hibridizasyon problemleri kullanılarak qPCR analizi.

Bu test qPCR çift boya oligonükleotid hidroliz prensibini kullanır. PCR sırasında, ileri ve revers primerler belirli bir sekansa hibridize olur. Aynı karışımda bir çift boya oligonükleotid bulunur. Bir 5' raportör boya ve bir akış aşağı 3' söndürücü boyayla etiketlenmiş bir oligonükleotidden oluşan bu prob PCR ürünü içinde bir hedef sekansa hibridize olur. Hidroliz problemleriyle qPCR analizi *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraz 5'→3' eksonükleaz aktivitesini kullanır. Prob sağlam olduğunda raportör boyanın söndürücü boyaya yakınlığı raportör floresansın temel olarak Förster tipi enerji transferiyle baskılanmasıyla sonuçlanır.

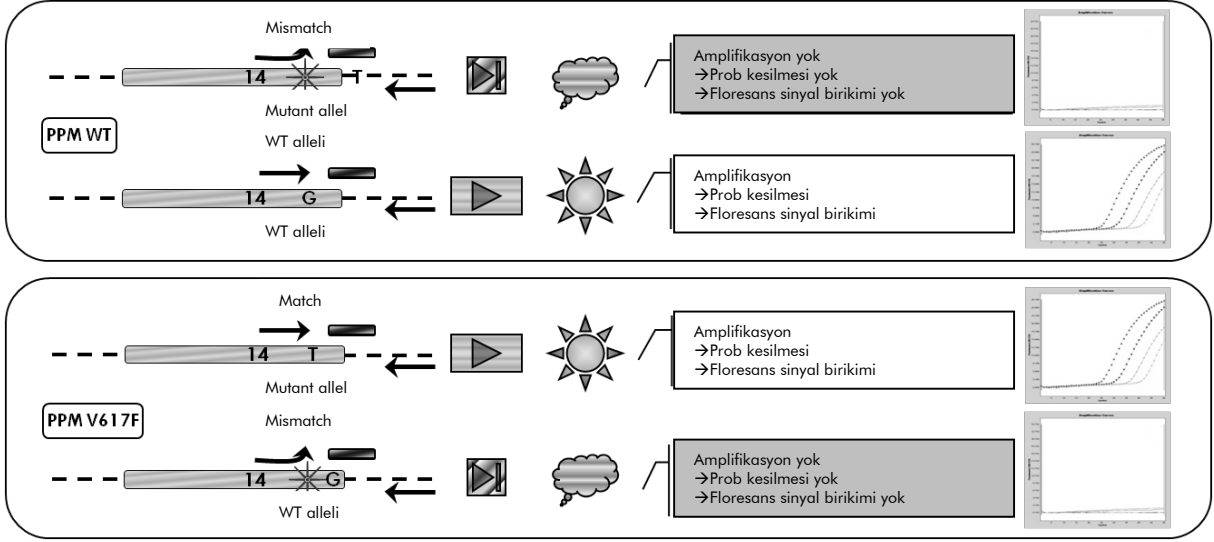
PCR sırasında, ilgilenilen hedef mevcutsa, prob spesifik olarak ileri ve revers primer bölgeleri arasına yapışır. DNA polimerazın 5'→3' eksonükleaz aktivitesi ancak prob hedefe hibridize olursa probu raportör ile söndürücü arasında keser. Prob fragmanları sonra hedeften ayrılır ve iplikçiğin polimerizasyonu devam eder. Probu 3' ucu PCR sırasında probun uzamasını önlemek üzere bloke edilir (Şekil 1). Bu işlem her döngüde oluşur ve ürünün eksponensiyel birikimini olumsuz etkilemez.

Bu floresans sinyali artışı ancak hedef sekans probu tamamlayıcı ise ve böylece PCR sırasında amplifiye oluyorsa saptanır. Bu gereklilikler nedeniyle nonspesifik amplifikasyon saptanmaz. Böylece, floreanstaki artış PCR sırasında hedef amplifikasyonla doğrudan orantılıdır.



Şekil 1. Reaksiyon prensibi.

Bu test kitinde kullanılan kantitatif allele spesifik PCR teknolojisi hassas, doğru ve yüksek ölçüde tekrar üretilebilir SNP saptamasını mümkün kılar. Bu teknik vahşi tip V617F alleli için spesifik ileri primerlerin kullanımını temel alır (11). Sadece primer ve hedef DNA arasında kusursuz bir eşleşme PCR'da uzatma ve amplifikasyonu mümkün kılar (Şekil 2).



Şekil 2. Allele spesifik PCR. Vahşi tip veya V617F primerleri ve prob karışımının kullanılması aynı örnek kullanılarak yürütülen iki ayrı reaksiyonda vahşi tip veya mutasyon geçirmiş allelin spesifik olarak saptanmasını mümkün kılar. Sonuçlar toplam JAK2 kopyaları içinde VF kopyaları yüzdesi olarak ifade edilebilir.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalog no.		673522	673523
Reaksiyon sayısı		12	24
V617F positive control (100% V617F allele) (V617F pozitif kontrol) (%100 V617F allel)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (100% wild-type allele) (V617F negatif kontrol) (%100 vahşi tip allel)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF Standart Dilüsyon, 50 kopya) (5 x 10 ¹ V617F copies/5 µl) (5 x 10 ¹ V617F kopya/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (5 x 10 ² V617F copies/5 µl) (M2-VF Standart Dilüsyon, 500 kopya) (5 x 10 ² V617F kopya/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (5 x 10 ³ V617F copies/5 µl) (M3-VF Standart Dilüsyon, 5000 kopya) (5 x 10 ³ V617F kopya/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (5 x 10 ⁴ V617F copies/5 µl) (M4-VF Standart Dilüsyon, 50.000 kopya) (5 x 10 ⁴ V617F kopya/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (5 x 10 ¹ wild-type copies/5 µl) (WT-1 Standart Dilüsyon, 50 kopya) (5 x 10 ¹ vahşi tip kopya/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (5 x 10 ² wild-type copies/5 µl) (WT-2 Standart Dilüsyon, 500 kopya) (5 x 10 ² vahşi tip kopya/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalog no.		673522	673523
Reaksiyon sayısı		12	24
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (5 x 10 ³ wild-type copies/5 µl) (WT-3 Standart Dilüsyon, 5000 kopya) (5 x 10 ³ vahşi tip kopya/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (5 x 10 ⁴ wild-type copies/5 µl) (WT-4 Standart Dilüsyon, 50.000 kopya) (5 x 10 ⁴ vahşi tip kopya/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Primerler ve Prob Karışımı JAK2 WT)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (Primerler ve Prob Karışımı JAK2 V617F)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (Türkçe)		1	1

* Vahşi tip JAK2 kontrol geni artı spesifik FAM™–TAMRA™ probu için spesifik revers ve ileri primerlerin karışımı.

† JAK2 V617F mutasyon artı spesifik FAM–TAMRA probu için spesifik revers ve ileri primerlerin karışımı.

Not: Standart dilüsyonları ve primerler ile prob karışımlarını kullanımdan önce kısa bir süre vorteksleyin ve santrifüje edin.

Gereken ama Sağlanmayan Materyal

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Reaktifler

- Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su
- Tampon ve Taq DNA polimeraz: Onaylanmış reaktifler TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, kat. no. 4304437) ve LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat.

no. 04535286001) veya LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, kat. No. 03515567001) şeklindedir.

Sarf Malzemesi

- Hidrofobik filtreli nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril PCR pipet uçları
- 0,5 ml veya 1,5 ml nükleaz içermeyen PCR tüpleri
- Buz

Ekipman

- PCR için ayrılmış mikrolitre pipet* (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- 0,5 ml/1,5 ml reaksiyon tüpleri ve mikrolakalar için rotorlu masaüstü santrifüj* (13.000–14.000 rpm değerine ulaşabilen)
- Gerçek zamanlı PCR cihazı:* Rotor-Gene Q 5plex HRM[®] veya diğer RotorGene; LightCycler 1.2 veya 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi; ve ilgili spesifik materyal
- Biyofotometre

* Aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edilip kalibre edildiğinden emin olun.

Uyarılar ve Önlemler

In vitro diagnostik kullanım için

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrim içi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve kullanıcılar burada her QIAGEN kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilir.

Örnek ve tahlil atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize göre atın.

Genel önlemler

qPCR testleri kullanımı geçerli düzenlemeler ve ilgili standartlarla uyumlu ve moleküler biyolojiye özel ekipman bakımı dahil iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Bu kitin in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. Bu kitte sağlanan reaktifler ve talimat optimum performans için doğrulanmıştır. Reaktiflerin daha fazla seyreltilmesi veya inkübasyon süreleri ve sıcaklıklarının değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilerle sonuçlanabilir. PPM-WT ve PPM-VF reaktifleri ışığa maruz kalırlarsa değişebilir. Tüm reaktifler özellikle bu test için formüle edilmiştir. Testin optimum performansı için yerine başka bir şey kullanılmamalıdır.

Aşağıdakileri önlemek için çok dikkatli olun:

- Şablon DNA'nın degradasyonuna neden olabilecek DNaz kontaminasyonu
- Yalancı pozitif sinyalle sonuçlanan DNA veya PCR bulaşma kontaminasyonu

Bu nedenle şunları öneririz.

- Testi yaparken nükleaz içermeyen laboratuvar gereçleri (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve eldiven takın.
- Örnekler ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek üzere tüm pipetleme adımları için taze aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- Ön PCR ana karışımını belirlenmiş materyalle (pipetler, uçlar, vs.) DNA matrikslerinin (DNA, plasmid veya PCR ürünleri) giremeyeceği belirlenmiş bir bölgede hazırlayın. Şablonu belirli materyalle (pipetler, uçlar, vs.) ayrı bir bölgede (tercihen ayrı bir odada) ekleyin.

Reaktif Saklama ve Muamele

Kitler kuru buzda gönderilir ve alındığında -15°C ila -30°C 'de saklanmalıdır.

- Primerler ve prob karışımlarının (PPM-WT ve PPM-VF tüpleri) ışığa maruz kalmasını minimuma indirin.
- Açmadan önce tüpleri yavaşça karıştırın ve santrifüje edin.
- Tüm kit bileşenlerini orijinal kaplarda saklayın.

Bu saklama koşulları hem açılmış hem açılmamış bileşenler için geçerlidir. Etiketlerde belirtilenlerden farklı koşullar altında saklanan bileşenler uygun performans göstermeyebilir ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.

Her reaktif için son kullanma tarihleri ayrı bileşen etiketlerinde belirtilmiştir. Doğru saklama koşulları altında ürün performansını etikette yazılı son kullanma tarihine kadar korur.

Bu ürünün stabil olmamasını belirtecek bariz bir işaret yoktur. Ancak, bilinmeyen örneklerle aynı anda pozitif ve negatif kontroller çalışılmalıdır.

İşlem

Örnek DNA hazırlama

Genomik DNA tam kan, tam kanda saflaştırılmış periferik kan lenfositleri, polinükleer hücreler veya granülositlerden elde edilmelidir. Karşılaştırılabilir sonuçlar için aynı hücresel fraksiyon ve DNA ekstraksiyonu yöntemi kullanılması önerilir. DNA ekstraksiyonu bir tesiste hazırlanan yöntem veya ticari olarak sağlanan bir kit kullanılarak yapılabilir.

DNA miktarı örneğin 260 nm'de optik dansitesi (OD) ölçülerek belirlenmelidir ve DNA kalitesi spektrofotometri veya jel* elektroforezi ile belirlenebilir.

- OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı 1,7–1,9 olmalıdır ve bundan daha küçük oranlar protein kontaminasyonu veya organik kimyasalların varlığına işaret edebilir.
- Bir %0,8–1,0 agarose jel* üzerine elektroforetik analiz için izole edilmiş DNA'nın yaklaşık 20 kb ayrı bir bant olarak görülmesini mümkün kılması gerekir (hafif bir dağınıklık kabul edilebilir sonuçlar verir).

Oluşan DNA'nın pH 8,0'da 1x TE tampon* içinde 5 ng/μl konsantrasyona seyreltilmesi ve sonra 1 haftaya kadar +4 - +8°C'de saklanması veya daha uzun dönemli saklanma gerekiyorsa -20°C'de saklanması gerekir.

qPCR reaksiyonu 25 ng saflaştırılmış genomik DNA içeren DNA örnekleri için optimize edilmiştir.

* Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Protokol: 72 tüp rotorlu Rotor Gene Q 5plex HRM veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM üzerinde qPCR

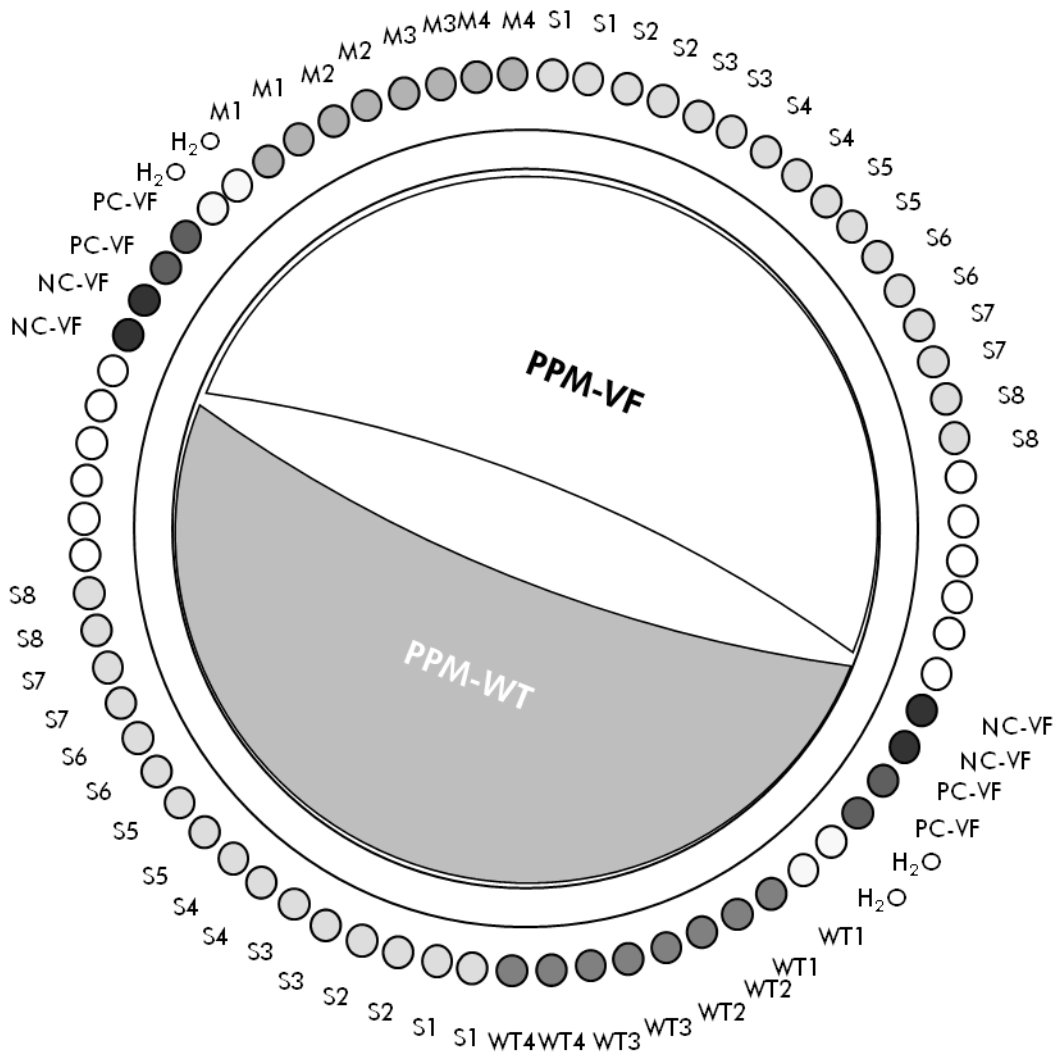
Bu aleti kullanarak Tablo 2'te gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tablo 2. 72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
JAK2 primerler ve prob karışımıyla (PPM-VF)	
4 M-VF standartları	8 reaktif, her biri ikili olarak test edilir
n DNA örneği	n x 2 reaksiyon
2 DNA kontrolü	4 reaksiyon: pozitif kontrol (PC-VF) ve negatif kontrol (NC-VF), her biri ikili olarak test edilir
Su kontrol	2 reaksiyon
JAK2 vahşi tip primerler ve prob karışımıyla (PPM-WT)	
4 vahşi tip standart	8 reaktif, her biri ikili olarak test edilir
n DNA örneği	n x 2 reaksiyon
2 DNA kontrolü	4 reaksiyon: PC-VF ve NC-VF, her biri ikili olarak test edilir
Su kontrol	2 reaksiyon

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 24 reaksiyon kitiyle 8 DNA örneği (katalog no. 673523) ve en az 12 reaksiyon kitiyle 6 DNA örneği (katalog no. 673522) test edilmesini öneririz.



Şekil 3. ipsogen 24 örnek JAK2 MutaQuant Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. **PC-VF:** V617F pozitif kontrol; **NC-VF:** V617F negatif kontrol; **M-VF:** V617F standartlar; **M-WT:** vahşi tip standartları; **S:** DNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

Not: Daima test edilecek bir örneği rotorda pozisyon 1'e koyduğunuzdan emin olun. Aksi halde kalibrasyon adımı sırasında alet kalibrasyon yapmaz ve hatalı floresans verileri alınır.

Tüm diğer pozisyonları boş tüplerle doldurun.

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 3 ve 4 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primer ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPM-VF veya PPM-WT). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 3. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	V617F ön karışım 30 + 1 reaksiyonlar (µl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primerler ve prob karışımı, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	201,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25,0	Her birinden 25	–

Tablo 4. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	WT ön karışım 30 + 1 reaksiyonlar (μl)	Son konsantrasyon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primerler ve prob karışımı, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	201,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25,0	Her birinden 25	–

- 3. Tüp başına 20 μ l qPCR ana karışımı (VF veya WT) verin.**
- 4. Kantifiye edilecek materyalden (25 ng örnek genomik DNA veya kontrol) 5 μ l miktarını karşılık gelen tüpe ekleyin (toplam hacim 25 μ l).**
- 5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.**
- 6. Tüpleri üretici önerilerine göre termal cykler'a koyun.**
- 7. Rotor-Gene Q aletini Tablo 5'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.**

Tablo 5. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 50 derece Süre: 2 dk
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dk
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C 1 dk için 62°C ve Yeşil kanalında FAM floresans alınması: Tek

- 8. Rotor-Gene Q aletleri için analizde "Slope Correct" (Eğim Düzelt) seçin. Eşiği 0,03 olarak ayarlamanızı öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 5'te belirtildiği şekilde başlatın.**

Protokol: ABI PRISM 7900HT SDS'de qPCR, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi ve LightCycler 480 cihazı

96 kuyulu plakalı qPCR aletini kullanarak Tablo 6'da gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

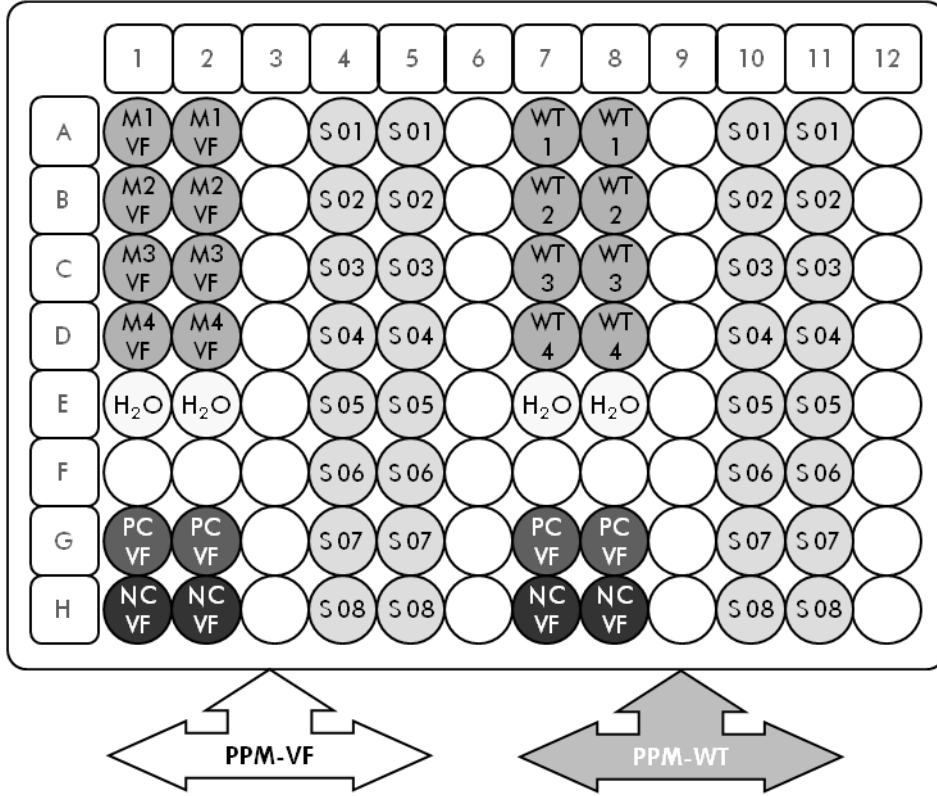
Tablo 6. 96 kuyulu plakalı qPCR ekipmanında reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
JAK2 primerler ve prob karışımıyla (PPM-VF)	
4 M-VF standartları	8 reaktif, her biri ikili olarak test edilir
n DNA örneği	n x 2 reaksiyon
2 DNA kontrolü	4 reaksiyon: PC-VF ve NC-VF, her biri ikili olarak test edilir
Su kontrol	2 reaksiyon
JAK2 vahşi tip primerler ve prob karışımıyla (PPM-WT)	
4 vahşi tip standart	8 reaktif, her biri ikili olarak test edilir
n DNA örneği	n x 2 reaksiyon
2 DNA kontrolü	4 reaksiyon: PC-VF ve NC-VF, her biri ikili olarak test edilir
Su kontrol	2 reaksiyon

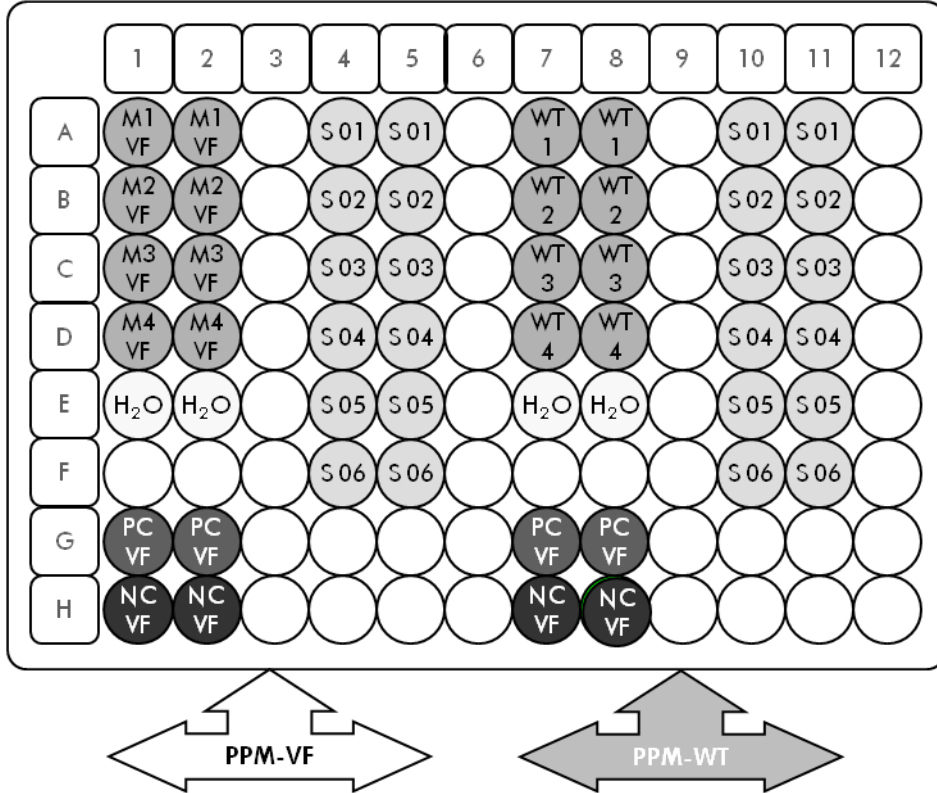
ABI PRISM 7900HT SDS'de örnek işleme, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi ve LightCycler 480 cihazı

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde 24 reaksiyon kitiyle 8 DNA örneği (katalog no. 673523) ve en az 12 reaksiyon kitiyle 6 DNA örneği (katalog no. 673522) test edilmesini öneririz.

Şekil 4'teki plaka şeması 24 reaksiyon kiti (katalog no. 673523) kullanılarak böyle bir deneyin örneğini vermektedir ve Şekil 5 12 reaksiyon kiti (katalog no. 673522) kullanılarak böyle bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 4. 24 reaksiyon kiti (katalog no. 673523) kullanılarak bir deney için önerilen rotor kurulumu. PC-VF: V617F pozitif kontrol; NC-VF: V617F negatif kontrol; M-VF: V617F standartlar; M-WT: vahşi tip standartları; S: DNA örneği; H₂O: su kontrol



Şekil 5. 12 reaksiyon kiti (katalog no. 673522) kullanılarak bir deney için önerilen rotor kurulumu. PC-VF: V617F pozitif kontrol; NC-VF: V617F negatif kontrol; M-VF: V617F standartlar; M-WT: vahşi tip standartları; S: DNA örneği; H₂O: su kontrol

ABI PRISM 7900HT SDS'de qPCR, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi ve LightCycler 480 cihazı

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 7 ve 8 25 μ l son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primer ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPM-VF veya PPM-WT). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 7. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	V617F ön karışım			Son konsantrasyon
	1 reaksiyon (μ l)	26 + 1 reaksiyon (μ l)	30 + 1 reaksiyon (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primerler ve prob karışımı, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	175,5	201,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25,0	Her birinden 25	Her birinden 25	–

Tablo 8. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	WT ön karışım			Son konsantrasyon
	1 reaksiyon (μ l)	26 + 1 reaksiyon (μ l)	30 + 1 reaksiyon (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primerler ve prob karışımı, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	175,5	201,5	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25,0	Her birinden 25	Her birinden 25	–

3. Kuyucuk başına 20 μ l qPCR ana karışımı (VF veya WT) verin.
4. Kantifiye edilecek materyalden (25 ng örnek genomik DNA veya kontrol) 5 μ l miktarını karşılık gelen kuyucuğa ekleyin (toplam hacim 25 μ l).
5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. Plakayı kapatın ve kısa süre santrifüje edin (300 x g, yaklaşık 10 saniye).
7. Plakayı üretici önerilerine göre termal cycler'a koyun.
8. Termal cycler'ı termal cycling programıyla programlayın ve aleti ABI PRISM 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System Tablo 9'da belirtildiği gibi veya LightCycler 480 cihazı için Tablo 10'da belirtildiği gibi çift etiketli FAM floresan probunun alınması için ayarlayın.

Table 9. ABI PRISM 7900HT SDS ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi için Sıcaklık profili

Analiz modu	Standart Eğri - Mutlak Kantifikasyon
Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C FAM floresansı almayla 1 dakika 30 saniye için 63°C; söndürücü: TAMRA

Tablo 10. LightCycler 480 cihazı için Sıcaklık profili

Analiz modu	Mutlak Kantifikasyon ("Abs Quant")
Format saptama	Detection formats (Saptama formatları) penceresinde "Simple Probe" (Basit Prob) seçin
Tutma	Sıcaklık: 50°C Süre: 2 dakika
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C LC versiyon 01 için 483–533 nm, LC versiyon 02 için 465–510 nm'ye karşılık gelen FAM floresansı almayla 1 dakika 30 saniye 63°C

9. ABI PRISM 7900HT ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi için adım 9a'yı izleyin. LightCycler 480 aleti için adım 9b'yi izleyin.

9a. ABI PRISM 7900HT ve Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi: Eşiği 0,1 olarak ayarlamanızı öneriyoruz. Cycling programını Tablo 9'da belirtildiği şekilde başlatın.

9b. LightCycler 480: Zemin 2,0 ve eşik 2,0 olarak bir Uyum noktası analiz modu öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 10'te belirtildiği şekilde başlatın.

Protokol: LightCycler 1.2 cihazında qPCR

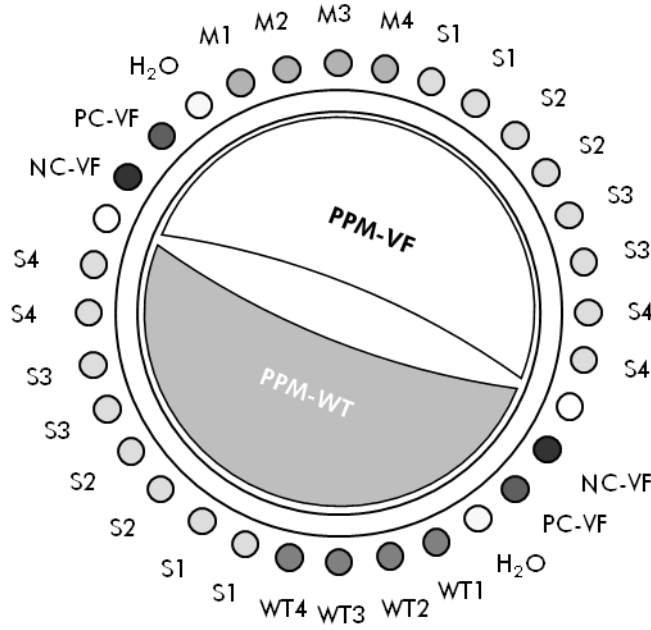
Kapiller aletler kullanarak Tablo 11'da gösterildiği gibi örnekleri ikili ve kontrolleri bir kez ölçmeyi öneriyoruz.

Tablo 11. LightCycler 1.2 aleti için reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
JAK2 primerler ve prob karışımıyla (PPM-VF)	
4 M-VF standartları	4 reaksiyon, her biri bir kez test edilir
n DNA örneği	n x 2 reaksiyon
2 DNA kontrolü	2 reaksiyon: PC-VF ve NC-VF, her biri bir kez test edilir
Su kontrol	1 reaksiyon
JAK2 vahşi tip primerler ve prob karışımıyla (PPM-WT)	
4 vahşi tip standart	4 reaksiyon, her biri bir kez test edilir
n DNA örneği	n x 2 reaksiyon
2 DNA kontrolü	2 reaksiyon: PC-VF ve NC-VF, her biri bir kez test edilir
Su kontrol	1 reaksiyon

LightCycler 1.2 aletinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde 4 DNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 6'daki kapiller şeması bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 6. ipsogen JAK2 MutaQuant Kitiyle her deneyde önerilen rotor kurulumu. **PC-VF:** V617F pozitif kontrol; **NC-VF:** V617F negatif kontrol; **M-VF:** V617F standartlar; **M-WT:** vahşi tip standartları; **S:** DNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

LightCycler 1.2 aletinde qPCR

Not: Belirli teknolojik gereklilikler nedeniyle LightCycler deneylerinin belirli reaktifler kullanılarak yapılması gerekir. LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe kullanılmasını ve Master Mix 5x hazırlamak için üreticinin talimatının izlenmesini öneriyoruz.

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

- 1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.**
- 2. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.**

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 12 ve 13 20 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primer ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPM-VF veya PPM-WT). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 12. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	V617F ön karışım 15 + 1 reaksiyonlar (μl)	Son konsantrasyon
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x yeni hazırlanır	4,0	64,0	1x
Primerler ve prob karışımı, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	10,2	163,2	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	–
Toplam hacim	20,0	Her birinden 20	–

Tablo 13. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	WT ön karışım 15 + 1 reaksiyonlar (μl)	Son konsantrasyon
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x yeni hazırlanır	4,0	64,0	1x
Primerler ve prob karışımı, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	10,2	163,2	–
Örnek (adım 4'te eklenecek)	5,0	Her birinden 5	–
Toplam hacim	20,0	Her birinden 20	–

- 3. Kapiller başına 15 μ l qPCR ana karışımı (VF veya WT) verin.**
- 4. Kantifiye edilecek materyalden (25 ng örnek genomik DNA veya kontrol) 5 μ l miktarını karşılık gelen tüpe ekleyin (toplam hacim 20 μ l).**
- 5. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.**
- 6. Kapillerleri aparat ile sağlanan adaptörlere yerleştirin ve kısa süre santrifüje edin (700 x g, yaklaşık 10 saniye).**
- 7. Kapillerleri üreticinin önerilerine göre termal cycler'a yükleyin.**
- 8. LightCycler 1.2 aletini Tablo 14'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.**

Tablo 14. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma 1	Sıcaklık: 55°C Süre: 2 dakika Rampa: 20
Tutma 2	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 dakika Rampa: 20
Cycling	50 kez 15 saniye için 95°C; rampa: 20 1 dakika için 66°C; rampa: 20; FAM floresansı almayla: Tek

- 9. LightCycler 1.2 için F1/F2 ve "2nd derivative analysis" (2. derivatif analiz) modu önerilir. Termal cycling programını Tablo 14'te belirtildiği şekilde başlatın.**

Sonuçların Değerlendirilmesi

Veri analizi prensibi

Eşik döngüsü (C_T) ve çapraz geçiş noktası (C_P) değerleri verileri qPCR aletinden dışa aktarılabilir ve analiz için bir Excel® dosyasına yapıştırılabilir. Bu değerler sonra C_P ve C_T için ortalama değeri hesaplamak üzere kullanılabilir ve standart ortalama C_T değerleri aşağıdaki denklem ve Tablo 15 kullanılarak hem vahşi tip hem V617F standartları için bir standart eğrisi elde etmek üzere plotlanabilir.

$y =$ Ortalama C_P ; $x = \log_{10} CN$ burada $CN = 5 \mu l$ örnekte gen kopyası sayısı

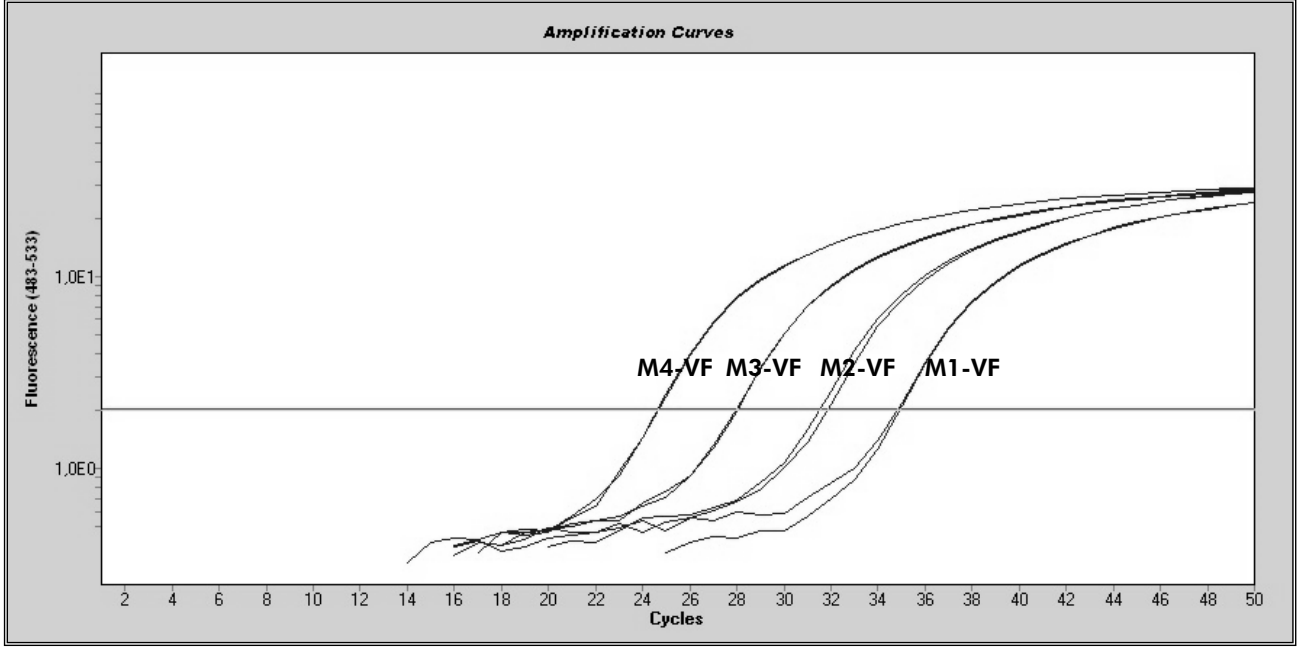
Tablo 15. Vahşi tip ve V617F standartları için kantitatif veriler

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

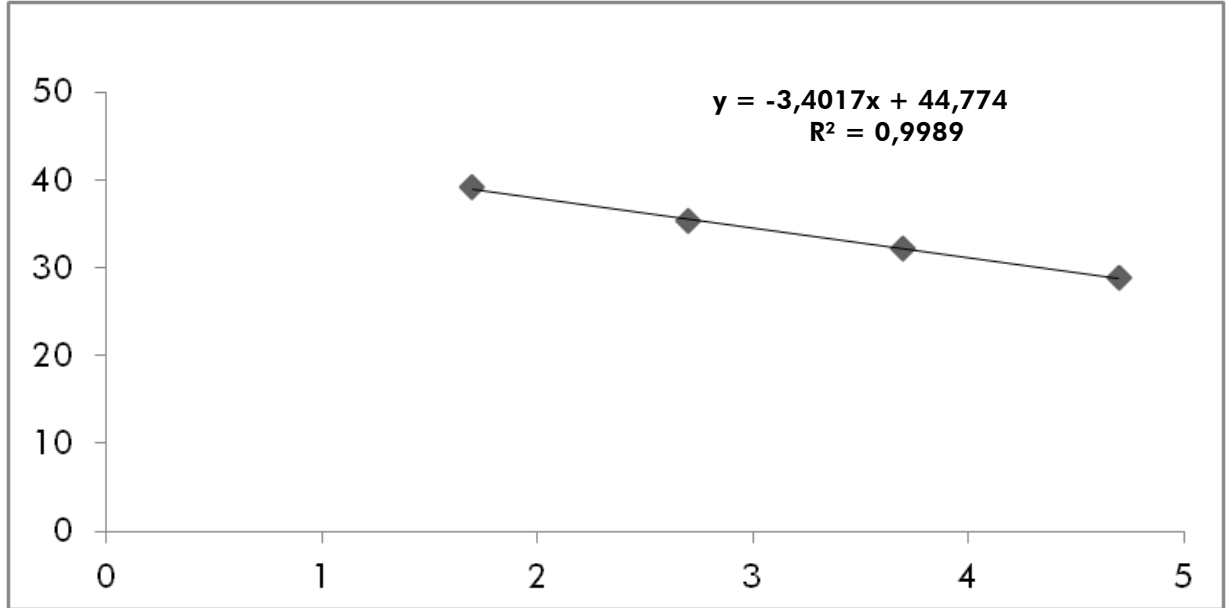
Not: Her kullanıcı laboratuvarında kendi tekrar üretilebilirliğini ölçmelidir.

Standart eğri ve kalite kriterleri

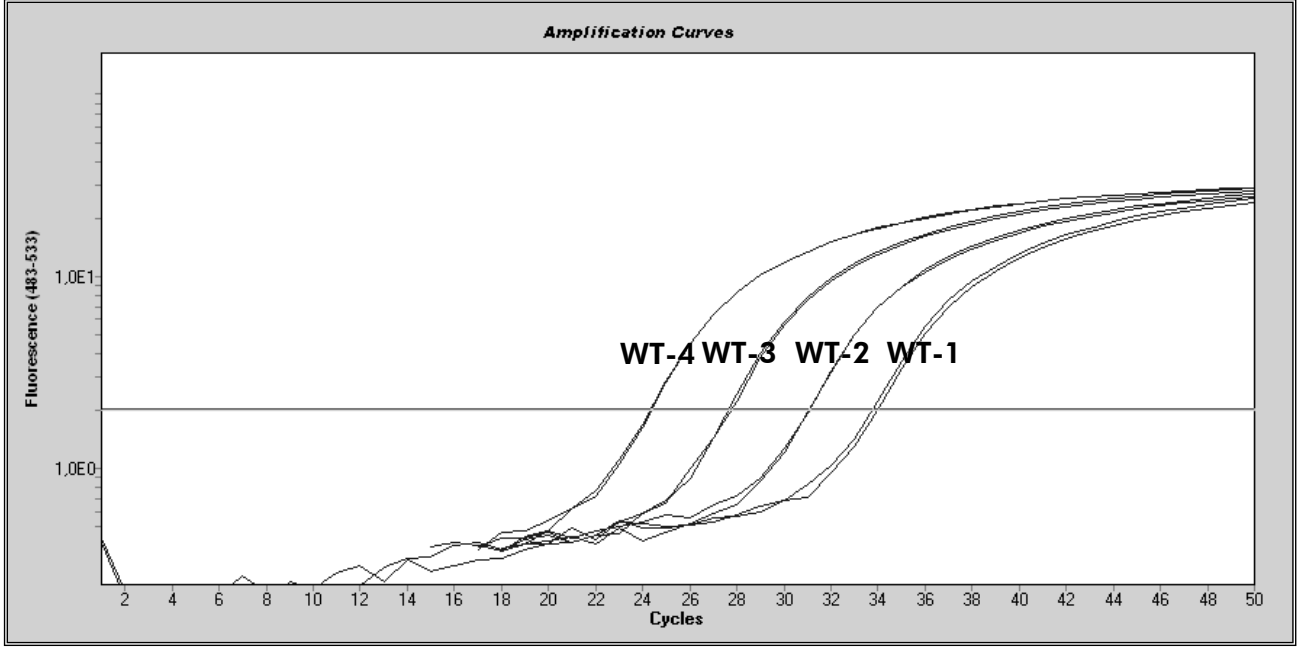
Şekil 7 ve 9 bir *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kitiyle elde edilen sonuçların örneklerini gösterir ve Şekil 8 ve 10 4 standart dilüsyonda hesaplanan teorik eğri örneğini gösterir.



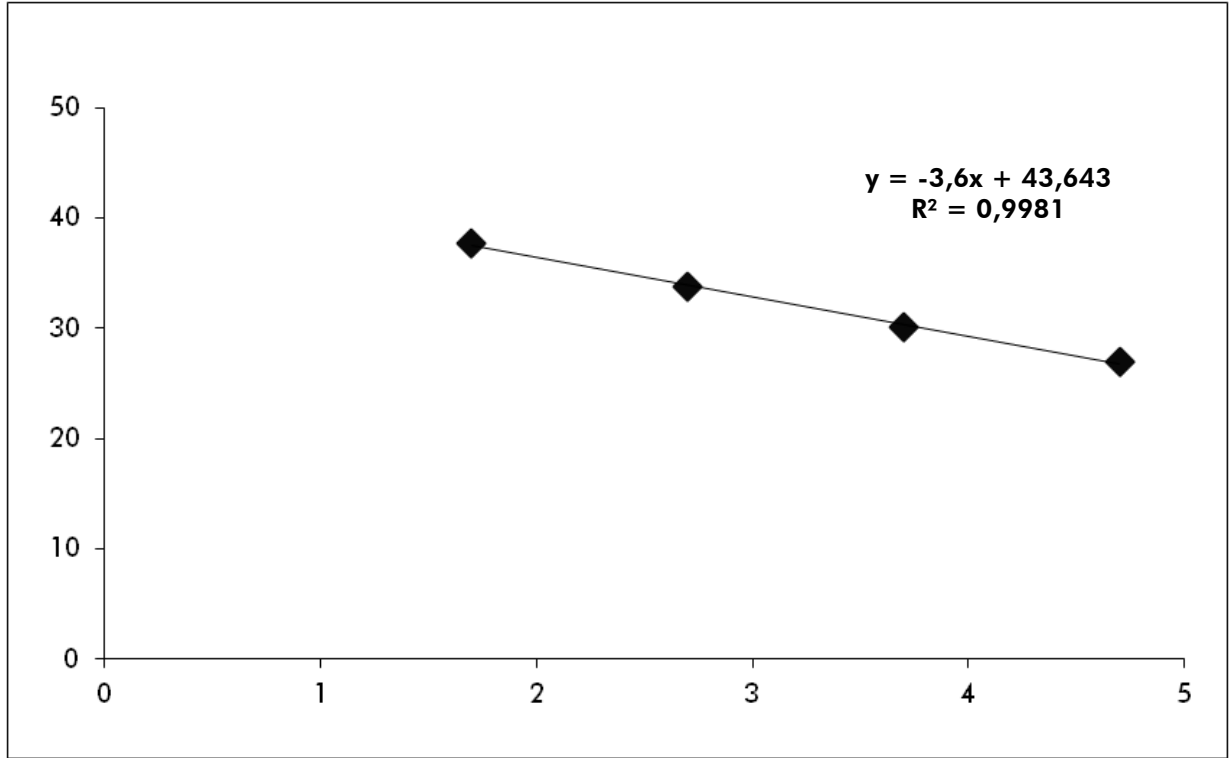
Şekil 7. JAK2 V617F plasmidinin 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 ve 5×10^4 kopyalarının amplifikasyon plotu (sırasıyla kontrol M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF).



Şekil 8. JAK2 V617F için standart eğri.



Şekil 9. JAK2 vahşi tip plasmid 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 ve 5×10^4 kopyalarının amplifikasyon plotu (sırasıyla kontrol WT-1, WT-2, WT-3, and WT-4).



Şekil 10. JAK2 vahşi tip için standart eğri.

Standartlar 10 kat dilüsyon olduğundan eğrinin teorik eğimi $-3,32$ 'dir. $-3,0$ ile $-3,9$ arasında bir eğim $R^2 > 0,95$ olduğu sürece kabul edilebilir (12). Ancak hassas sonuçlar için $R^2 > 0,98$ istenir (13).

Standart eğri denklemleri sonra bilinmeyen örneklerde V617F ve WT log₁₀ kopya numaralarını hesaplamak için kullanılabilir.

V617F standart eğri denklemi ham C_P/C_T değer ortalamalarını (PPM-VF ile elde edilmiş) bilinmeyen ve kontrol örnekleri için, JAK2 V617F kopya numaralarına (CN_{V617F}) dönüştürmek için kullanılmalıdır.

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Ortalama } C_{pV617F} - \text{Standart eğri kesişimi}_{V617F})}{\text{Standart eğri eğimi}_{V617F}}$$

Vahşi tip standart eğri denklemi ham ortalama C_P/C_T değer ortalamalarını (PPM-WT ile elde edilmiş) bilinmeyen ve kontrol örnekleri için, JAK2 vahşi tip kopya numaralarına (CN_{WT}) dönüştürmek için kullanılmalıdır.

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Ortalama } C_{pWT} - \text{Standart eğri kesişimi}_{WT})}{\text{Standart eğri eğimi}_{WT}}$$

Sonuçların ifadesi

Sonuçlar 25 ng total genomik DNA'ya relatiftir ve aşağıdaki şekilde JAK2 V617F yüzdesi olarak ifade edilmelidir.

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

Replikatlar arasında tekrar üretilebilirlik

Elde edilen veriler duplikatlar arasında tutarlı olmalıdır.

Pozitif ve negatif kontroller

Pozitif kontrol veya PC-VF %99,9 yüksek bir JAK2 V617F yüzdesi vermelidir.

Negatif kontrol veya NC-VF %0,1'den düşük bir JAK2 V617F yüzdesi vermelidir.

Bu kontroller doğru çalışmazsa lütfen çözüm bulmak için "Sorun Giderme kılavuzu", sayfa 35 kısmına bakınız.

Su kontrolleri

Negatif kontroller hem JAK2 V617F hem JAK2 vahşi tip saptama için sıfır CN vermelidir.

Pozitif su kontrol çapraz kontaminasyon nedeniyle oluşur. Bir çözüm bulmak için aşağıda "Sorun Giderme kılavuzu" kısmına bakınız.

Sorun Giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu oluşabilecek herhangi bir problemi çözmekte faydalı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizde Sık Sorulan Sorular sayfasına bakınız: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgiler ve protokol veya tahlil ve örnek teknolojileri ile ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplamaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgisi için bakınız "İrtibat Bilgisi", sayfa 44).

Açıklama ve öneriler

Vahşi tip veya V617F için standart eğri lineer değil

Flakon inversiyonu, dağıtım sırasında inversiyon, çapraz kontaminasyon, standardın kısmi degradasyonu, RQPCR reaktifi, non-spesifik amplifikasyon veya PCR program hatası

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

ipsogen JAK2 MutaQuant Kitini -15 ila -30°C'de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını ışıktan koruyun. Bakınız "Reaktif Saklama ve Muamele", sayfa 12.

Tekrarlanan dondurma ve çözmelerden kaçınınız.

Bir standart için sinyal yok veya düşük

Standart dağılmamış veya aynı PPM karışımı kullanılması

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

PCR çalışmasını tekrarlayınız.

Açıklama ve öneriler

Negatif (H₂O) kontrol pozitif

Çapraz kontaminasyon, reaktif kontaminasyon, alet hatası, kuyucuk veya kapiller inversiyon veya prob degradasyonu

Tüm kritik reaksiyonları değiştirin.

Örnekler, kit bileşenleri ve sarf malzemesini bulaşma kontaminasyonunu önlemek için daima yaygın olarak kabul edilen uygulamalara göre kullanın.

Primerler ve prob karışımlarını ışıktan korunmuş olarak tutun.

Floresans eğrilerinde yalancı pozitif açısından kontrol yapın.

Standart kontrolde bile sinyal yok

a) Yanlış saptama kanalı seçilmiş

Kanalı F1/F2 veya 530 nm/640 nm olarak ayarlayın.

b) Pipetleme hatası veya atlanmış reaktifler

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

PCR çalışmasını tekrarlayın.

c) Veri alma programı yok

Döngü programını kontrol edin.

PCR programında her birleştirme segmentinin sonunda "Single" (Tek) çekim modunu seçin.

Örneklerde sinyal yok veya düşük ama standart kontrolleri iyi

Yetersiz saflaştırma nedeniyle örnek materyalinin inhibe edici etkileri

Başlamadan önce daima DNA kalitesi (OD₂₆₀/OD₂₈₀) ve konsantrasyonunu kontrol edin.

DNA hazırlığını tekrarlayın.

Floresans şiddeti fazla düşük

a) Kit bileşenlerinin uygun olmayan saklanması

Reaktifleri saklama için alikotlayın.

ipsogen JAK2 MutaQuant Kitini -15 ila -30°C'de saklayın ve primerler ve prob karışımlarını ışıktan koruyun. Bakınız "Reaktif Saklama ve Muamele", sayfa 12.

Tekrarlanan dondurma ve çözmelerden kaçının.

Açıklama ve öneriler

b) Çok düşük başlangıç hedef DNA miktarı

Örnek DNA miktarını kontrol edin.

Not: Seçilen DNA hazırlama yöntemine bağlı olarak inhibe edici etkiler oluşabilir.

Negatif kontroller pozitifdir

Bulaşma kontaminasyonu

Tüm kritik reaksiyonları değiştirin.

Deneyi tüm reaktiflerin yeni alikotlarıyla tekrarlayın.

Örnekler, kit bileşenleri ve sarf malzemesini bulaşma kontaminasyonunu önlemek için daima yaygın olarak kabul edilen uygulamalara göre kullanın.

Floresans şiddeti değişkenlik gösterir

a) Pipetleme hatası

Çözmeden sonra tüm reaktifleri vorteksleyin ve döndürün.

“Pipetting error” (pipetleme hatası) denilen durumun yarattığı LightCycler değişkenlik verileri F1/F2 veya 530 nm/640 nm modunda analiz ederek azaltabilir.

b) Plaka, tüpler veya kapillerde yetersiz santrifügasyon hazırlanan PCR karışımı halen kapillerin üst kısmında olabilir veya kapiller ucunda bir hava kabarcığı sıkışmış olabilir.

Kapillerleri daima cihazın spesifik çalıştırma el kitabında tanımlanan şekilde reaksiyon karışımıyla yüklenmiş olarak santrifüje edin.

c) Kapiller ucunun dış yüzeyi kirlidir

Kapillerleri kullanırken daima eldiven takın.

Açıklama ve öneriler

Resiprokal PPM kullanan vahşi tip veya V617F pozitif kontroller sinyali

Çapraz kontaminasyon, reaktif kontaminasyon veya kuyucuk veya kapiller inversiyon

Tüm kritik reaksiyonları değiştirin.

Deneyi tüm reaktiflerin yeni alikotlarıyla tekrarlayın.

Örnekler, kit bileşenleri ve sarf malzemesini bulaşma kontaminasyonunu önlemek için daima yaygın olarak kabul edilen uygulamalara göre kullanın.

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

Pozitif kontrolün tersten saptanması

PPM'nin kuyu ve kapiller veya ön karışımında dağıtılmış inversiyonu

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

Bir pozitif kontrol veya her ikisi için sinyal yok

PPM veya kontrol DNA atlanmış

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

Yüksek arka plan sinyali

Florofor beyazlatma

Probu ışıktan korunmuş olarak saklayın ve kullanın.

İkili örnekler için zayıf tekrar edilebilirlik

Pipetleme hatası veya çapraz kontaminasyon

Pipetleme şeması ve reaksiyonun kurulumunu kontrol edin.

Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kitinin her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir. Analiz sertifikaları talep üzerine www.qiagen.com/support/ adresinde alınabilir.

Sınırlamalar

Kullanıcılar bu cihazın kullanılmasından önce bu teknoloji konusunda eğitimli ve aşina olmalıdır. Bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır (bakınız "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 10).

Oluşan herhangi bir diagnostik sonuç diğer klinik veya laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır. Laboratuvarlarında QIAGEN performans çalışmalarının kapsamında olmadan kullanılan herhangi bir işlem için sistem performansını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm bileşenlerin kutu ve etiketlerinde basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Performans Özellikleri

Klinik olmayan çalışmalar

Kesinlik

Farklı JAK2 V617F allel yüklerine karşılık gelen hücre hatlarından ekstrakte edilen 12 DNA örneği kullanılarak bir kesinlik çalışması yapılmıştır. Her örnekte 3 farklı seri *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kiti kullanılarak toplam 80 ölçüm yapılmıştır. Kesinlik çalışması bir Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi kullanmıştır.

Analitik veriler Tablo 15'te özetlenmiştir.

Tablo 15. Kesinlik verileri DNA örnekleri

Örnek	Teorik JAK2 V617F (%)	n*	Ortalama (%)	CV (%)	Persantil	
					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

* Dışarıda kalan değerler hariç bırakılmıştır. Bunlar bir Kutu plotunda düşük quartil eksi 3 kez interkuartil aralıktan küçük veya üst kuartil artı 3 kez interkuartil aralıktan büyük değerler olarak tanımlanmıştır.

n = doğrulanmış örnek sayısı; CV = global varyasyon katsayısı.

Kör limiti ve saptama limiti

Zemin düzeyi veya kör limiti (LOB) negatif örneklerde belirlenmiştir (8 örnek, 76 ölçüm). Bu %0,014 olarak bulunmuştur.

Saptama limiti (LOD) pozitif olduğu bilinen ama ekspresyonu düşük olan örnekler kullanılarak belirlenmiştir (7 örnek, 68 ölçüm). Bu %0,061 olarak bulunmuştur ve %90 güven aralığı üst sınırı %0,091 olarak bulunmuştur.

Bu optimum hassasiyet en az 10.000 kopya JAK2 geni (vahşi tip veya V617F mutasyonu) içeren örneklerden elde edilebilir.

Kantifikasyon verileri şu şekilde bildirilmelidir.

- JAK2 V617F \leq %0,014 JAK2 V617F mutasyonunun saptanmaması olarak yorumlanabilir.
- JAK2 V617F $>$ %0,014 ama $<$ %0,091 şeklindedir ve kesin olmayan bir sonuç olarak yorumlanabilir.
- JAK2 V617F \geq %0,091 pozitif bir sonuç ve AK2 V617F mutasyonunun saptanması olarak yorumlanabilir.

Linearite

Linearite çalışmaları her biri JAK2 V617F mutasyonu için pozitif ve negatif hücre hatlarından ekstrakte edilen DNA'nın farklı bir karışımından elde edilen 12 örnekte çalışılmıştır. Her örnek 5 kez test edilmiştir. Bu çalışmadan veriler *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kitinin dinamik aralık boyunca lineer sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Klinik araştırmalar

87 hasta örneğinden kan veya kemik iliğinden DNA ekstraksiyonu yapılmış ve *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kiti kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca JAK2 V617F mutasyonlarının yüzdesi kantifiye edilip *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (katalog no. 673223) ile elde edilen tarama testi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kiti ile *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit arasında elde edilen sonuçların anlaşmasını gösteren ihtimal tablosu

		<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit Sonuçları			n
		Mutasyon saptandı	Kesin olmayan sonuç	Mutasyon saptanmadı	
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit Sonuçları	Mutasyon saptandı	40	2	7	49
	Kesin olmayan sonuç	0	0	21	21
	Mutasyon saptanmadı	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Pozitif anlaşma		%100 (%95 güven aralığı: 91%, 100%)			
Negatif anlaşma		%71 (%95 güven aralığı: 51%, 85%)			
Genel anlaşma		%89 (%95 güven aralığı: 79%, 95%)			

Referanslar

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.

Semboller

Aşağıdaki semboller paketler ve etiketlerde belirebilir:



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son Kullanma Tarihi



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Küresel Ticaret Parça Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatına başvurun

İrtibat Bilgisi

Teknik yardım ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezimize gidin, 00800-22-44-6000 numarasından arayın veya QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden veya yerel distribütörlerden birini arayın (arka kapağa bakınız veya www.qiagen.com adresine gidiniz).

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	12 reaksiyon için: Wild-type JAK2 Gene Control, JAK2 V617F Control Gene, Primers ve Probe Mix PPM-WT, Primers ve Probe Mix PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	24 reaksiyon için: Wild-type JAK2 Gene Control, JAK2 V617F Control Gene, Primers ve Probe Mix PPM-WT, Primers ve Probe Mix PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx - Klinik uygulamalarda IVD ile doğrulanmış gerçek zamanlı PCR analizi için		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cyclers ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cyclers ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakınız. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı el kitapları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu ürünün in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. *ipsogen* ürünleri önceden QIAGEN'in yazılı onayı olmadan tekrar satılamaz, tekrar satış için modifiye edilemez veya ticari ürünler üretmek için kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgi haber verilmeden değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilen herhangi bir hata için sorumluluk almaz. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. QIAGEN, hiçbir şekilde bu belgenin kullanımından doğrudan veya dolaylı olarak kaynaklanan her türlü özel, arızı veya çoklu veya sonuçsal kayıplardan sorumlu değildir.

ipsogen ürünlerinin belirtilen spesifikasyonları karşılayacağı garanti edilir. Ürünler garanti edildiği şekilde performans göstermezse QIAGEN'in tek yükümlülüğü ve müşterinin tek çözümü ürünlerin ücretsiz değiştirilmesiyle sınırlıdır.

JAK2 V617F mutasyonu ve kullanımı Avrupa patenti EP1692281, ABD patentleri 7,429,456 ve 7,781,199, ABD patent başvuruları US20090162849 and US20120066776 ve yabancı karşılıkları dahil patent haklarıyla korunmaktadır.

Bu ürünün satın alınması JAK2V617F hedefli ilaçlar için klinik çalışmalarda kullanılması açısından herhangi bir hak vermez. QIAGEN bu tür kullanımlar için spesifik lisans programları geliştirir. Lütfen hukuk bölümümüzle irtibat kurun: jak2licenses@qiagen.com.

Ticari markalar: 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).

Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kitini satın alan veya kullanıcının şu şartları kabul ettiğini belirler:

- ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kiti sadece *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit El Kitabı uyarınca ve sadece bu Kite bulunan bileşenlerle kullanılabilir. QIAGEN fikri mülkiyeti altında bu Kite sağlanan bileşenleri bu Kite sağlanmayan herhangi bir bileşenle, *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit El Kitabı ve www.qiagen.com adresinde bulunan ek protokoller içinde tanımlanan durumlar haricinde kullanma veya birlikte işleme sokma açısından bir lisans vermez.
- Açık olarak ifade edilmiş lisanslar dışında, QIAGEN bu Kit ve/veya kullanımının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceği konusunda herhangi bir garanti vermez.
- Bu Kit ve bileşenleri sadece tek kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, tekrar işlemiden geçirilemez veya tekrar satılamaz.
- QIAGEN spesifik olarak açık olarak belirtilen dışında ister açık ister zımnî olsun her türlü başka lisansı reddeder.
- Kitin satın alanı ve kullanıcı yukarıda yasaklanan işlemlerden herhangi birine yol açabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı ve başkasının da atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir Mahkemede yürürlüğe sokabilir ve Avukat ücretleri dışında tüm araştırma ve mahkeme masraflarını bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini veya Kit ve/veya bileşenleriyle ilgili herhangi bir fikri mülkiyet haklarını yürürlüğe sokmak için yapılan bir davada geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bakınız www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

www.qiagen.com

