

ipsogen[®] JAK2 MutaScreen RS Kit — Instrukcja obsługi



Wersja 1



Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®],
ABI PRISM[®] i LightCycler[®]



REF 673123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R3 **MAT** 1072513PL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń, które umożliwiają izolację i detekcję zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie — od pobrania próbki do otrzymania wyniku.

Firma QIAGEN wyznacza standardy w:

- procedurach oczyszczania DNA, RNA i białek;
- oznaczeniach kwasów nukleinowych i białek;
- badaniach mikroRNA oraz RNAi;
- automatyzacji technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń.

Naszą misją jest umożliwienie klientom osiągnięcia wybitnych sukcesów i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podsumowanie i objaśnienie	4
Zasada procedury	6
Dostarczone materiały	8
Zawartość zestawu	8
Materiały wymagane, ale niedostarczone	9
Ostrzeżenia i środki ostrożności	10
Ogólne środki ostrożności	10
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami	11
Procedura	12
Przygotowanie DNA próbki	12
Przechowywanie kwasów nukleinowych	12
■ Protokół: reakcja qPCR w aparatach Rotor Gene Q z rotorem na 72 probówki	12
■ Protokół: reakcja qPCR w aparatach Applied Biosystems i ABI PRISM	22
■ Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 480	30
■ Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 2.0	37
Interpretacja wyników	43
Graficzne przedstawienie i kryteria kontroli jakości	43
Obliczenie znormalizowanego stosunku FAM/VIC i genotypowanie	44
Rozwiązywanie problemów	48
Kontrola jakości	50
Ograniczenia	50
Parametry skuteczności	51
Badania niekliniczne	51
Badania kliniczne	53
Literatura	58
Symbole	59
Informacje kontaktowe	59
Dane do zamówienia	60

Przeznaczenie

Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit jest przeznaczony do detekcji mutacji JAK2 V617F/G1849T w genomowym DNA pobranym od pacjentów z podejrzeniem nowotworu mieloproliferacyjnego. Brak mutacji JAK2 V617F/G1849T nie wyklucza obecności innych mutacji genu JAK2.

W przypadku obecności dodatkowych mutacji zlokalizowanych w kodonach od 615 do 619 test może raportować fałszywie negatywne wyniki (1).

Uwaga: Zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanymi odczynnikami i aparatami. Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy QIAGEN.

Podsumowanie i objaśnienie

W 2005 roku zidentyfikowano powtarzającą się mutację somatyczną, V617F, występującą w obrębie genu janusowej kinazy tyrozynowej 2 (Janus tyrosine kinase 2, JAK2) (2–5), co spowodowało znaczący przełom w zrozumieniu, klasyfikacji i rozpoznaniu nowotworów mieloproliferacyjnych (myeloproliferative neoplasms, MPN). Białko JAK2 to wewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnałowa kluczowa dla wielu cytokin, w tym erytropoetyny.

Mutacja JAK2 V617F jest wykrywana u >95% pacjentów z czerwienicą prawdziwą (polycythemia vera, PV), 50–60% pacjentów z nadpłytkowością samoistną (essential thrombocythemia, ET) oraz 50% pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku (primary myelofibrosis, PMF). Mutację JAK2 V617F wykryto również w niektórych rzadkich przypadkach przewlekłej białaczki mielomonocytovej, zespołu mielodysplastycznego, mastocytozy ogólnoustrojowej oraz przewlekłej białaczki neutrofilowej. Nie wykryto jej jednak w żadnym przypadku przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myeloid leukemia, CML) (6).

Mutacja dotyczy zmiany pojedynczego nukleotydu w genie JAK2 — nukleotydu 1849 w eksonie 14 — co powoduje unikalną substytucję waliny (valine, V) przez fenyloalaninę (phenylalanine, F) w pozycji 617 białka (domena JH2). Prowadzi to do konstytutywnej aktywacji białka JAK2, hematopoetycznej transformacji *in vitro* i wzrostu kolonii erytroidalnych niezależnych od erytropoetyny (erythropoietin-independent erythroid colony, EEC) u wszystkich pacjentów z PV oraz u dużej części pacjentów z ET i PMF (7). Mutacja JAK2 V617F jest głównym czynnikiem transformacji komórek hematopoetycznych w MPN, ale dokładne mechanizmy patologiczne prowadzące, przy tej samej unikalnej mutacji, do tak różnych klinicznych i biologicznych jednostek chorobowych nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione.

Zwyczajowo rozpoznanie MPN opierało się na kryteriach klinicznych, cytogenetycznych oraz histologii szpiku kostnego. Odkrycie markera molekularnego swoistego dla choroby doprowadziło do uproszczenia tego procesu oraz zwiększenia dokładności diagnostycznej. Detekcja mutacji JAK2 V617F jest obecnie częścią kryteriów referencyjnych WHO z 2008 roku dotyczących rozpoznawania nowotworów MPN ujemnych względem genu BCR-ABL (Tabela 1), a obecność tej mutacji jest głównym kryterium potwierdzającym rozpoznanie.

Tabela 1. Kryteria rozpoznania MPN wg WHO (zaadaptowano z pozycji 8 literatury)

Kryteria rozpoznania czerwienicy prawdziwej (PV)	
Większe	1. Hemoglobina (Hgb) >18,5 g.dl-1 (mężczyźni) lub >16,5 g.dl-1 (kobiety) lub Hgb lub hematokryt (Hct) >99. percentyla zakresu referencyjnego dla wieku, płci lub wysokości nad poziomem morza miejsca zamieszkania; lub Hgb >17 g.dl-1 (mężczyźni) lub >15 g.dl-1 (kobiety) w przypadku utrzymującego się przyrostu o ≥ 2 g.dl-1 w porównaniu do wartości wyjściowej, którego nie można powiązać z leczeniem niedoboru żelaza; lub Wzrost masy krwinek czerwonych o >25% powyżej średniej prawidłowej wartości przewidywanej 2. Obecność mutacji JAK2V617F lub podobnej mutacji
Mniejsze	1. Trójliniowa mieloproliferacja w szpiku kostnym 2. Stężenie erytropoetyny w surowicy poniżej normy 3. Wzrost endogennych kolonii erytroidalnych (Endogenous Erythroid Colony, EEC)
Kryteria rozpoznania nadpłytkowości samoistnej (Essential Thrombocythemia, ET)	
Większe	1. Liczba płytek krwi $\geq 450 \times 10^9$ l-1 2. Proliferacja dużych, dojrzałych morfologicznie megakariocytów. Brak lub słaba proliferacja w linii granulocytarnej lub erytroidalnej 3. Niespełnienie kryteriów rozpoznania WHO dotyczących przewlekłej białaczki szpikowej (Chronic Myeloid Leukemia, CML), PV, pierwotnego zwłóknienia szpiku (Primary Myelofibrosis, PMF), zespołu mielodysplastycznego (Myelodysplastic Syndrome, MDS) lub innego nowotworu szpiku kostnego 4. Wykazanie obecności mutacji JAK2V617F lub innego markera klonalności lub Brak dowodów na nadpłytkowość reaktywną
Mniejsze	-
Kryteria rozpoznania pierwotnego zwłóknienia szpiku (PMF)	

Większe	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prolifercja i atypia megakariocytów z jednoczesnym występowaniem włóknienia retikulowanego i/lub kolagenowego lub (W przypadku braku włóknienia retikulowanego) Zmiany megakariocytów muszą być powiązane ze zwiększoną komórkowością szpiku kostnego, proliferacją w linii granulocytarnej i często obniżoną erytropoezą (tj. prefibrotyczna faza PMF) 2. Niespełnienie kryteriów rozpoznania WHO dotyczących (CML), PV, MDS lub innego nowotworu szpiku kostnego 3. Wykazanie obecności mutacji <i>JAK2V617F</i> lub innego markera klonalności lub <p>Brak dowodów na reaktywne zwłóknienie szpiku kostnego</p>
Mniejsze	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leukoerytroblastoza 2. Wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (Lactate Dehydrogenase, LDH) w surowicy 3. Anemia 4. Splenomegalia wyczuwalna w badaniu palpacyjnym

W ostatnim czasie międzynarodowi eksperci zaproponowali kryteria dla badań klinicznych produktów leczniczych w chorobach PV i ET. W oparciu o dane dotyczące przeszczepu allogenicznego, alfa-interferonu lub hydroksymocznika, oznaczenie ilościowe mutacji *JAK2V617F* zostało włączone jako narzędzie potencjalnie użyteczne do monitorowania odpowiedzi na leczenie (9). W odpowiedzi na niektóre nowe leki skierowane przeciwko białku *JAK2* stosowane w trakcie badań klinicznych zaobserwowano zmniejszenie obciążenia mutacją *JAK2 V617F* (10).

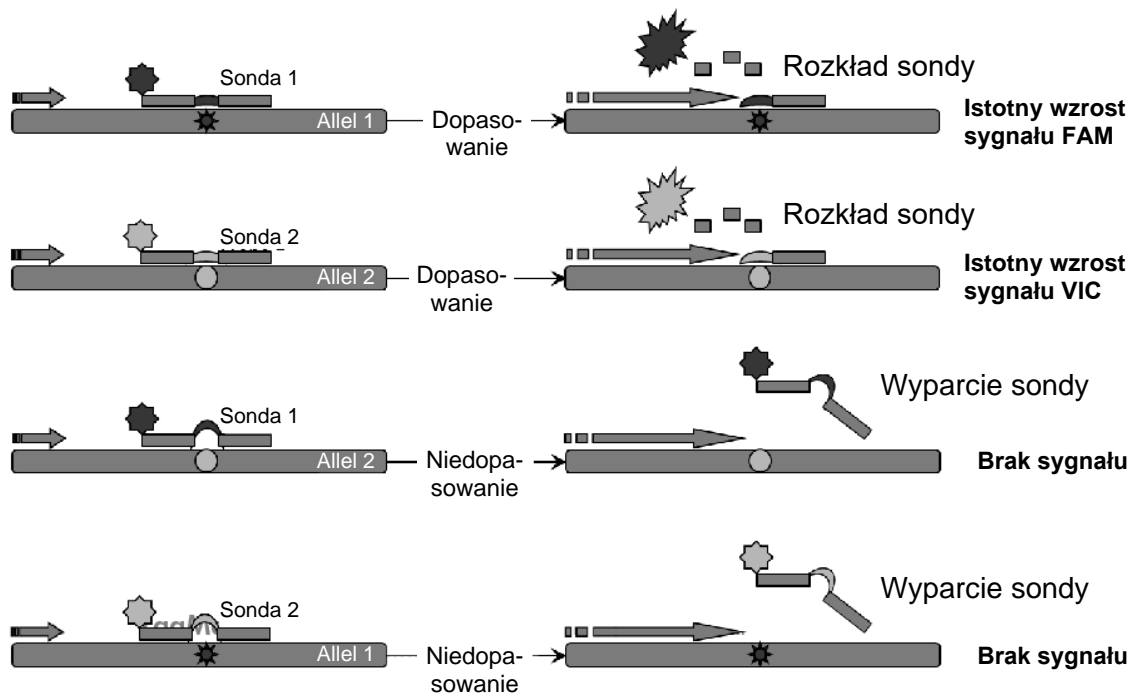
Zasada procedury

W oznaczeniu wykorzystywane są dwie sondy TaqMan[®], dzięki czemu w reakcji multipleks możliwe jest rozróżnienie alleli. Jedna sonda jest idealnie dopasowana do sekwencji 2 allelu (tj. allelu typu dzikiego), a druga do sekwencji 1 allelu (tj. allelu z mutacją). Każda sonda jest wyznakowana na końcu 5' wyróżniającym fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym, takim jak FAM[™] lub VIC[®], a na końcu 3' zawiera niefluorescencyjny wygaszacz. Sondy zawierają również cząsteczkę przyłączającą się do małego rowka DNA (minor groove binder, MGB[™]), co zapewnia większą stabilność podczas korzystania z krótszych sond i, co za tym idzie, bardziej precyzyjne rozróżnienie alleli.

Podczas fazy elongacji w reakcji PCR idealnie dopasowana sonda jest rozcinana przez polimerazę Taq o aktywności egzonukleazy 5'→3', przez co barwnik reporterowy zostaje oddzielony od wygaszacza, a to z kolei powoduje wykrywalną emisję fluorescencji. Sonda, która nie jest idealnie dopasowana, nie zostanie rozcięta przez polimerazę Taq, a zamiast tego ulegnie wyparciu. Z tego względu żaden barwnik reporterowy nie zostanie uwolniony.

Wygenerowany sygnał fluorescencyjny (VIC lub FAM) jest odbierany pod koniec reakcji PCR (punkt końcowy) i bezpośrednio wskazuje na obecność docelowych sekwencji w próbce (allel typu dzikiego, allel zmutowany lub oba) bez konieczności wykonywania długich i pracochłonnych etapów po reakcji PCR, które zwiększają również ryzyko zanieczyszczenia. Rzeczywista ilość docelowej sekwencji nie jest oznaczana.

Technologia opisana powyżej jest wykorzystywana w zestawie *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit w sposób przedstawiony na Ryc.1.



Ryc. 1. Reakcja multipleks z sondą TaqMan. Technologia opisana powyżej jest wykorzystywana w zestawie *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit w celu rozróżnienia alleli.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen RS Kit		(19)
Nr katalogowy		673123
Liczba reakcji		19
V617F Positive Control (Kontrola pozytywna względem mutacji V617F)*	MP-VF	30 μ l
V617F Negative Control (Kontrola negatywna względem mutacji V617F)†	MN-VF	30 μ l
Reference Scale M1 (Skala referencyjna M1)‡	M1-VF	30 μ l
Reference Scale M2 (Skala referencyjna M2)‡	M2-VF	30 μ l
Reference Scale M3 (Skala referencyjna M3)‡	M3-VF	30 μ l
Reference Scale M4 (Skala referencyjna M4)‡	M4-VF	30 μ l
Reference Scale M5 (Skala referencyjna M5)‡	M5-VF	30 μ l
Reference Scale M6 (Skala referencyjna M6)‡	M6-VF	30 μ l
Primers and probes mix JAK2 V617F (Mieszanka starterów i sond JAK2 V617F)§	PPM-VF 10x	145 μ l
Instrukcja obsługi zestawu <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen RS Kit (w języku angielskim)		1

* Kontrola pozytywna: 100% DNA z mutacją V617F.

† Kontrola negatywna: 100% DNA typu dzikiego; 0% DNA z mutacją V617F.

‡ Skala referencyjna (rozcieńczenia genomowego DNA).

§ Mieszanka swoistych starterów „reverse” i „forward” dla genu JAK2, sonda FAM swoista dla allelu z mutacją V617F i sonda VIC swoista dla allelu typu dzikiego.

Uwaga: Przed użyciem krótko odwirować próbki.

Uwaga: W przypadku analizy próbek o nieznanym statusie za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit wymagana jest izolacja genomowego DNA. Odczynniki potrzebne do wykonania izolacji DNA (np. zestaw QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, nr kat. 51304) nie są dostarczane i należy je zwalidować w połączeniu z danym zestawem.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Odczynniki

- Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR
- Bufor TE wolny od nukleaz (stężony 1x), pH 8,0 (np. Thermo Fisher Scientific, nr kat. 12090-015)
- Bufor i polimeraza DNA *Taq*: zwalidowane odczynniki to mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix (mieszanina Master Mix do reakcji PCR, stężona 2x) (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4304437) i mieszanina LightCycler TaqMan Master (mieszanina Master Mix do reakcji PCR, stężona 5x) (Roche, nr kat. 04535286001)
- Odczynniki do przygotowania żelu agarozowego o stężeniu 0,8–1% w buforze TBE do elektroforezy (stężonym 0,5x)

Materiały eksploatacyjne

- Jałowe końcówki do pipet do przygotowywania reakcji PCR, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami hydrofobowymi
- Probówki do reakcji PCR o pojemności 0,5 lub 0,2 ml, wolne od RNaz i DNaz
- Lód

Wyposażenie

- Pipety mikrolitrowe* przeznaczone do przygotowywania reakcji PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 0,2 ml/0,5 ml (umożliwiająca wirowanie przy 10 000 rpm)
- Spektrofotometr* do ilościowego pomiaru DNA
- Aparat do przeprowadzania reakcji real-time PCR*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub inny aparat Rotor-Gene; LightCycler 2.0 lub 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS lub ABI PRISM 7900HT SDS oraz powiązane odpowiednie materiały
- Wyposażenie* do pulsacyjnej elektroforezy żelowej (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)

* Upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyk (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem **www.qiagen.com/safety**. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyk dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

Pozostałości próbek i odczynników należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Ogólne środki ostrożności

Podczas przeprowadzania testów qPCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących przeprowadzania konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.

Ten zestaw jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Odczynniki i instrukcje dostarczone w tym zestawie zostały zwalidowane w celu zapewnienia optymalnej skuteczności. Dalsze rozcieńczanie odczynników lub zmiana okresów i temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub sprzecznych danych. Właściwości odczynnika PPM-VF mogą ulec zmianie pod wpływem światła słonecznego. Wszystkie odczynniki opracowano specjalnie do użycia z tym testem. Aby zapewnić optymalną skuteczność testu, nie należy zastępować żadnych odczynników.

Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec:

- zanieczyszczeniu DNazą, która może spowodować rozkład matrycy DNA;
- zanieczyszczeniu spowodowanemu przeniesieniem DNA lub produktów reakcji PCR, które mogą spowodować otrzymanie fałszywie pozytywnego sygnału.

W związku z tym zalecane jest przestrzeganie poniższych środków ostrożności.

- Podczas wykonywania oznaczenia używać sprzętu laboratoryjnego (np. pipet, końcówek do pipet, fiolek reakcyjnych) wolnych od nukleaz i nosić rękawiczki.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego próbek i odczynników, w każdym kroku pipetowania używać świeżych, odpornych na aerozole końcówek do pipet.

- Mieszaninę Master Mix do użycia przed reakcją PCR przygotować przy użyciu odpowiednich materiałów (pipet, końcówek itp.) w przeznaczonym do tego celu obszarze, do którego nie są wprowadzane żadne matryce DNA (DNA, plazmid). Matrycę dodać w oddzielnej strefie (najlepiej w innym pomieszczeniu), używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.).

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Zestawy są transportowane na suchym lodzie, a po ich dostarczeniu należy je przechowywać w temperaturze od -15°C do -30°C.

- Mieszaniny starterów i sond należy chronić przed ekspozycją na światło (probówka PPM-VF).
- Przed otwarciem delikatnie wymieszać i odwirować probówki.
- Wszystkie składniki zestawu przechowywać w oryginalnych pojemnikach.

Te warunki przechowywania dotyczą zarówno otwartych, jak i nieotwartych składników. Składniki przechowywane w warunkach innych niż określone na etykietach mogą nie działać prawidłowo i negatywnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.

Daty ważności dla każdego odczynnika są określone na etykietach poszczególnych składników. W prawidłowych warunkach przechowywania skuteczność produktu zostanie zachowana do upływu daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

Nie istnieją żadne możliwe do zaobserwowania wyraźne oznaki wskazujące na niestabilność produktu. Wraz z próbką o nieznanym statusie należy jednak analizować kontrole pozytywne i negatywne.

Procedura

Przygotowanie DNA próbki

Genomowy DNA należy uzyskać z krwi pełnej, oczyszczonych limfocytów krwi obwodowej, komórek wielojądrzastych lub granulocytów. Zalecamy zaadaptowanie tej samej frakcji komórkowej i metody izolacji DNA, aby było możliwe porównanie wyników. Izolację DNA należy wykonywać za pomocą dowolnej opracowanej w laboratorium lub komercyjnej metody.

Ilość DNA jest określana poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 260 nm. Jakość DNA należy ocenić spektrofotometrycznie lub wykonując elektroforezę żelową.

Stosunek A_{260}/A_{280} powinien mieścić się w zakresie 1,7–1,9. Mniejsza wartość zwykle wskazuje na zanieczyszczenie białkami lub związkami organicznymi. Po wykonaniu analizy elektroforetycznej w żelu agarozowym o stężeniu 0,8–1% wyizolowany DNA powinien być widoczny jako wyraźny prążek o wielkości około 20 kb. Akceptowalna jest słabo widoczna smuga.

Otrzymany DNA jest rozcieńczany w buforze TE do stężenia 5 ng/ μ l. Reakcja qPCR jest zoptymalizowana dla 25 ng oczyszczonego genomowego DNA.

Przechowywanie kwasów nukleinowych

W przypadku przechowywania krótkoterminowego (do 24 godzin) zalecamy przechowywanie oczyszczonych kwasów nukleinowych w temperaturze 2–8°C. W przypadku przechowywania długoterminowego (powyżej 24 godzin) zalecamy przechowywanie w temperaturze -20°C.

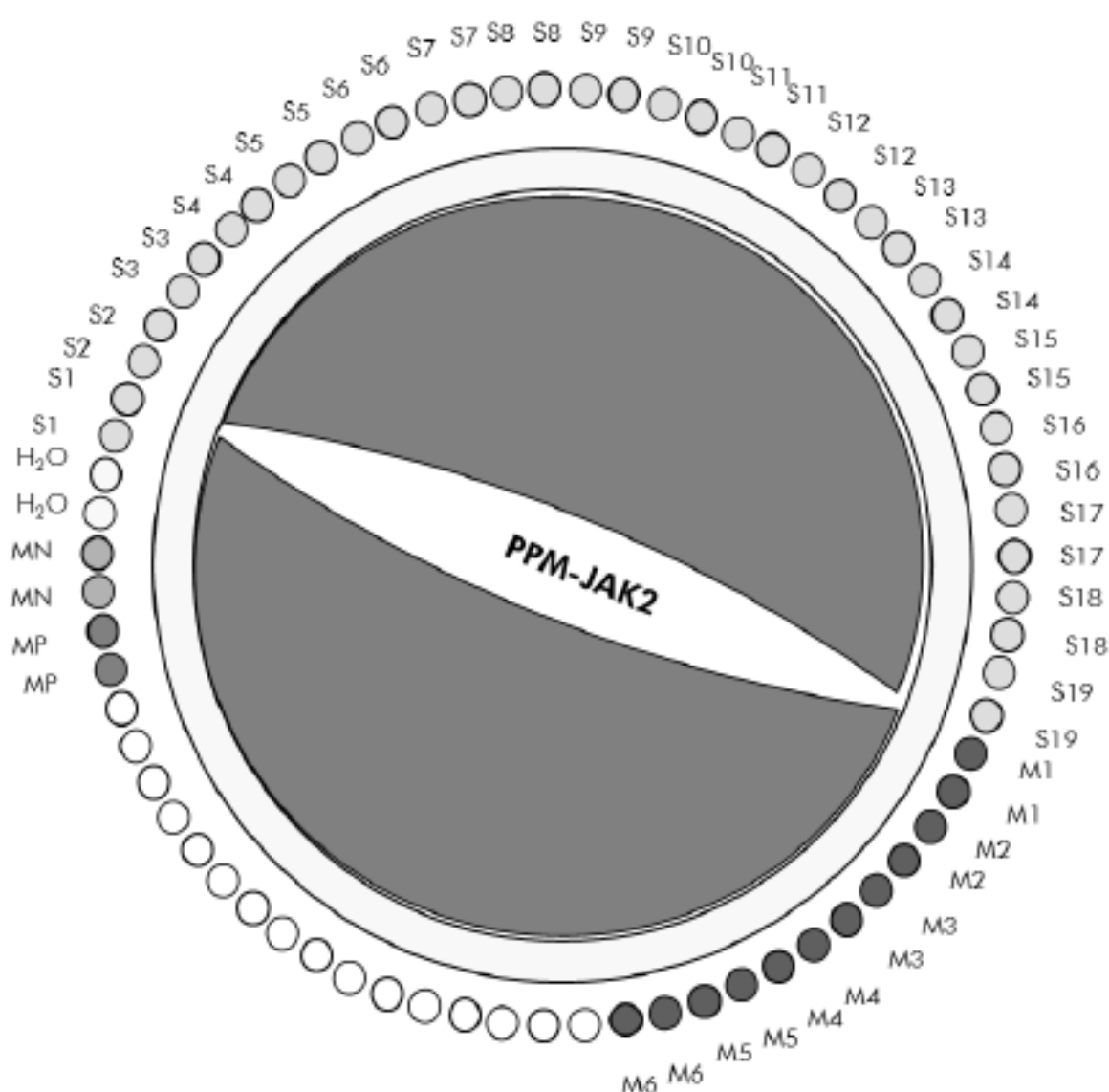
Protokół: reakcja qPCR w aparatach Rotor Gene Q z rotorem na 72 probówki

W przypadku używania tego aparatu zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w dwóch powtórzeniach, zgodnie z Tabelą 2.

Tabela 2. Liczba reakcji w przypadku aparatów Rotor Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 próbówki

Próbki	Reakcje
Mieszanka starterów i sond JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reakcji)	
19 próbek DNA	19 x 2 reakcje
2 kontrole DNA	2 x 2 reakcje (MP-VF, MN-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Skala referencyjna	6 x 2 reakcje (od M1 do M6, każde oznaczane w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparatach Rotor-Gene Q z rotorem na 72 próbówki



Ryc. 2. Sugerowany układ rotora dla eksperymentu przy użyciu zestawu *ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit*. MP-VF: kontrola pozytywna; MN-VF: kontrola negatywna; od M1 do M6: skala referencyjna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Uwaga: Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać badaną próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie podczas kroku kalibracji aparat nie wykona kalibracji i nastąpi akwizycja nieprawidłowych danych fluorescencji.

We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste probówki.

Reakcja qPCR w aparatach Rotor-Gene Q z rotorem na 72 probówki

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmrozić wszystkie niezbędne składniki i umieścić je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząsnąć i krótko odwirować wszystkie probówki (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotować mieszaninę do reakcji qPCR zgodnie z poniższym opisem, w ilości odpowiedniej do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 3 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, której objętość została obliczona w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 25 µl. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sond. Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

W przypadku korzystania z aparatów Rotor-Gene zestawu ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit można używać do analizy 19 próbek w dwóch powtórzeniach w ramach jednego eksperymentu (Ryc. 2).

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny do reakcji qPCR

Składnik	Liczba reakcji (µl)		Stężenie końcowe
	1	56+1*	
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x	2,5	142,5	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	5	285	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5	5 na każdą	–
Całkowita objętość	25	25 na każdą	–

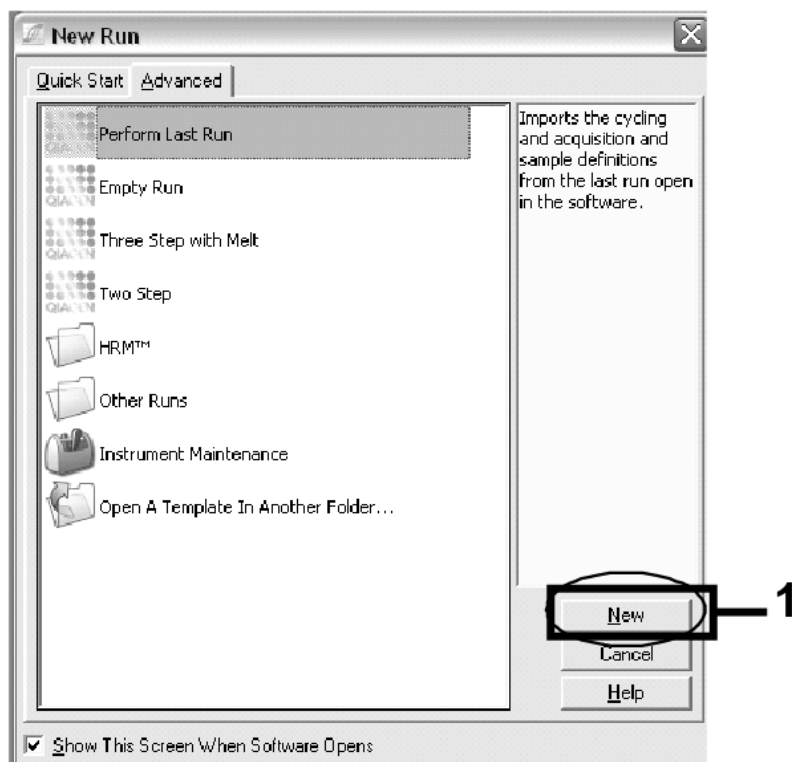
* 19 próbek; jeden eksperyment/zestaw.

4. Wyrząsać i krótko odwirować mieszaninę do reakcji qPCR (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie próbówki).
5. Dodać po 20 μ l wstępnej mieszaniny do reakcji qPCR na próbówkę.
6. Dodać po 5 μ l materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiednich probówek (całkowita objętość to 25 μ l).
7. Delikatnie wymieszać, pipetując w górę i w dół.
8. Zamknąć próbówki do reakcji PCR. Umieścić próbówki w rotorze na 72 próbówki zgodnie z zaleceniami producenta. We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste próbówki.
9. Upewnić się, że pierścień blokujący (akcesorium do aparatu Rotor-Gene) jest umieszczony na górze rotora, aby zapobiec przypadkowemu otwarciu się probówek podczas wirowania. Umieścić rotor w aparacie Rotor-Gene Q zgodnie z zaleceniami producenta.
10. W celu detekcji DNA genu JAK2 utworzyć profil temperaturowy, wykonując poniższe kroki.

Ustawianie ogólnych parametrów oznaczenia	Ryc. 3. i 4.
Amplifikacja DNA	Ryc. 5.
Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego	Ryc. 6.

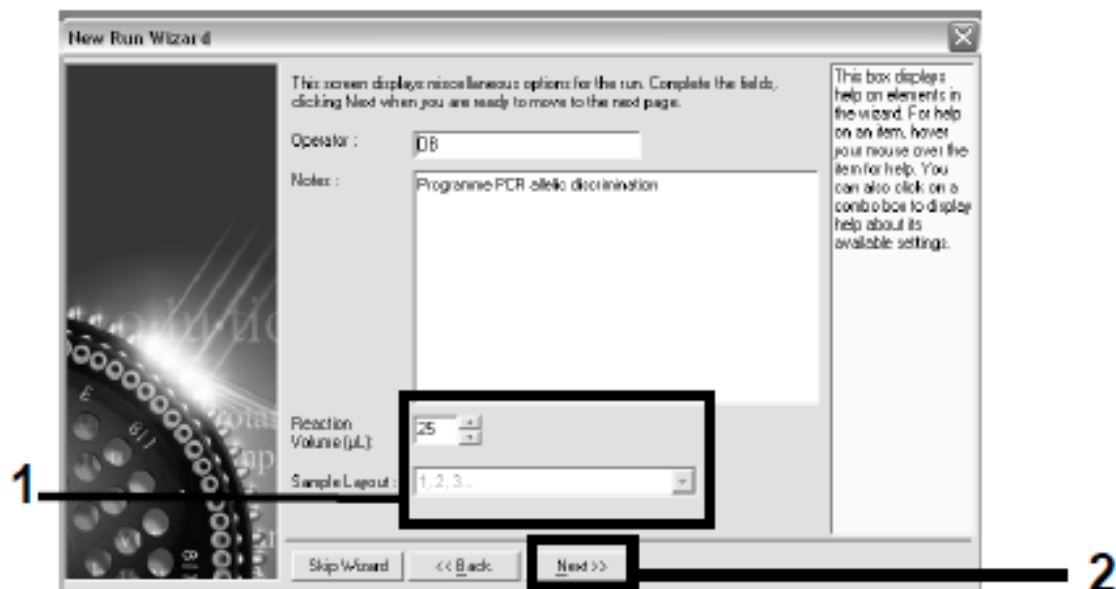
Dalsze informacje na temat programowania aparatów Rotor-Gene można znaleźć w podręcznikach użytkownika aparatów. Na ilustracjach ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną linią. Przedstawione ilustracje dotyczą aparatów Rotor-Gene Q.

11. **Uruchomić oprogramowanie Rotor-Gene. W oknie dialogowym „New run” (Nowy cykl) kliknąć przycisk „New” (Nowy).**



Ryc. 3. Okno dialogowe „New Run” (Nowy cykl).

12. W oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu) ustawić objętość na 25 μ l i kliknąć przycisk „Next” (Dalej).

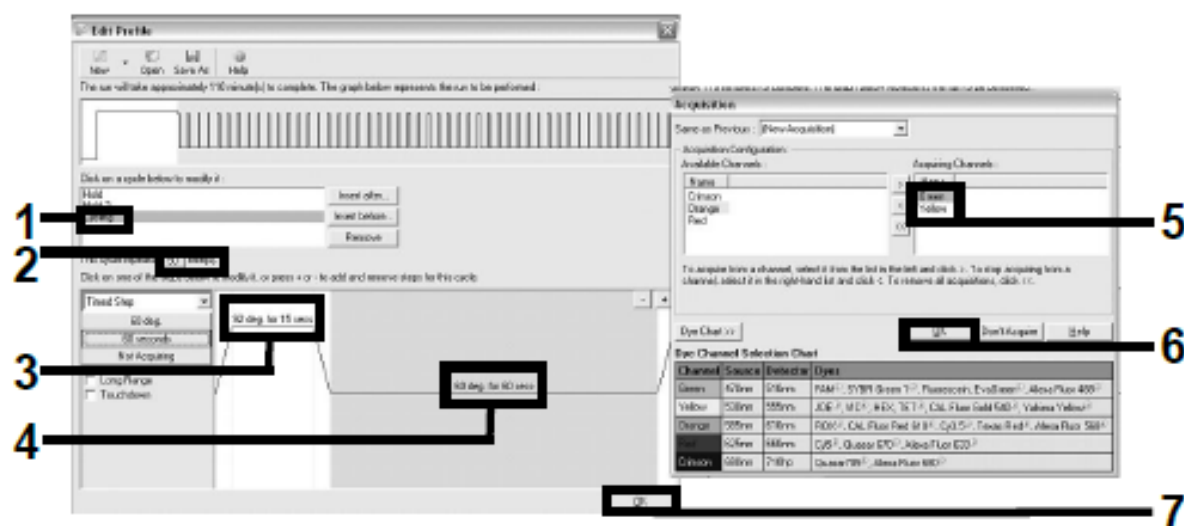


Ryc. 4. Ustawianie ogólnych parametrów oznaczenia.

13. Kliknąć przycisk „Edit Profile” (Edytuj profil) w kolejnym oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu), a następnie zaprogramować profil temperaturowy zgodnie z opisem w Tabeli 4 i na Ryc. 5. Upewnić się, że dla każdego cyklu dodano ostatni etap akwizycji przy 60°C dla kanału zielonego (FAM) i żółtego (VIC).

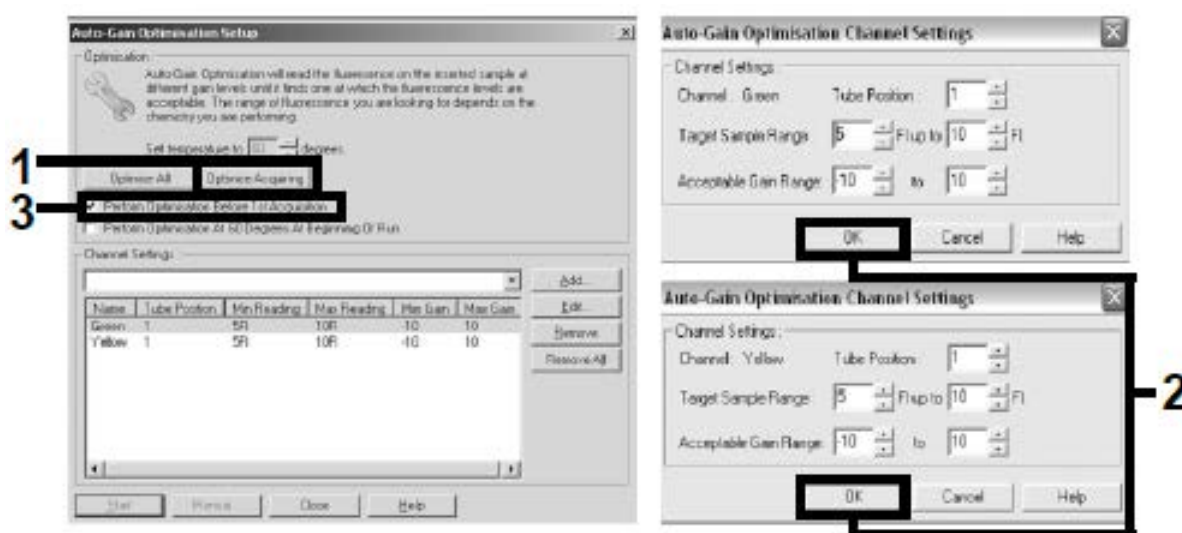
Tabela 4. Profil temperaturowy

Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 92°C przez 15 s 60°C przez 1 min; pojedynczy Akwizycja fluorescencji barwnika FAM w kanale Cycling A. Green Akwizycja fluorescencji barwnika VIC w kanale Cycling A. Yellow



Ryc. 5. Amplifikacja DNA.

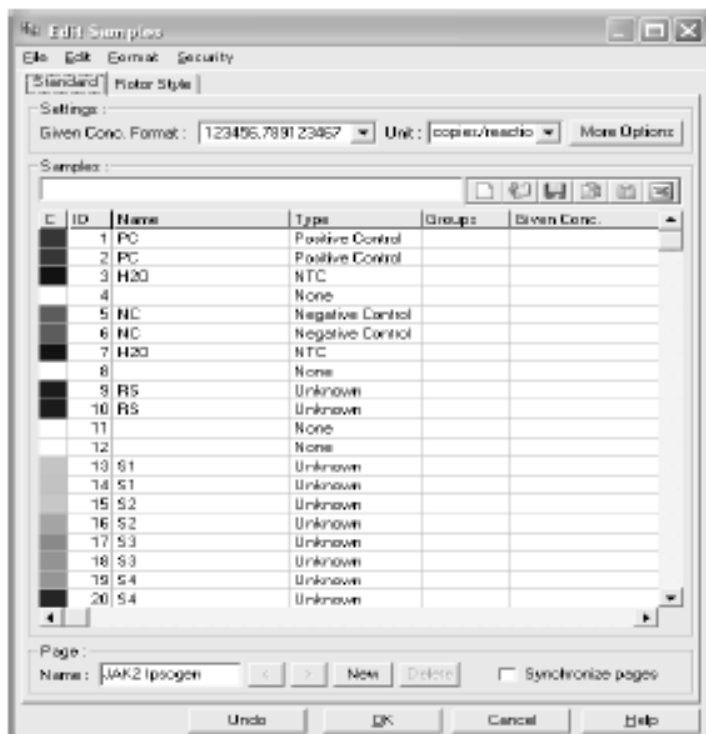
14. Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych należy określić na podstawie natężenia fluorescencji w probówkach PCR. Kliknąć przycisk „Gain Optimisation” (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu), aby otworzyć okno dialogowe „Auto-Gain Optimisation Setup” (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego). Kliknąć przycisk „Optimise Acquiring” (Optymalizuj akwizycję) (Ryc. 6), a następnie kliknąć przycisk „OK” w oknach dialogowych „Auto-Gain Optimisation Channel Settings” (Ustawienia optymalizacji wzmocnienia automatycznego dla kanału) dla każdego kanału (zielonego i żółtego, Ryc. 6). Upewnić się, że dla każdego kanału zaznaczono pole wyboru „Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Wykonaj optymalizację przed pierwszą akwizycją) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego.

15. Wartości wzmocnienia określone podczas kalibracji kanału są zapisywane automatycznie i wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania. Kliknąć przycisk „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby uruchomić program.

16. Wprowadzić konfigurację rotora w oprogramowaniu Rotor-Gene (Ryc. 7).



Ryc. 7. Konfiguracja aparatu Rotor-Gene: okno „Edit Samples” (Edytuj próbki).

Procedura analizy punktu końcowego dla ustawień aparatu Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. Po zakończeniu programu PCR kliknąć przycisk „Analysis” (Analiza) na pasku narzędzi (Ryc. 8).



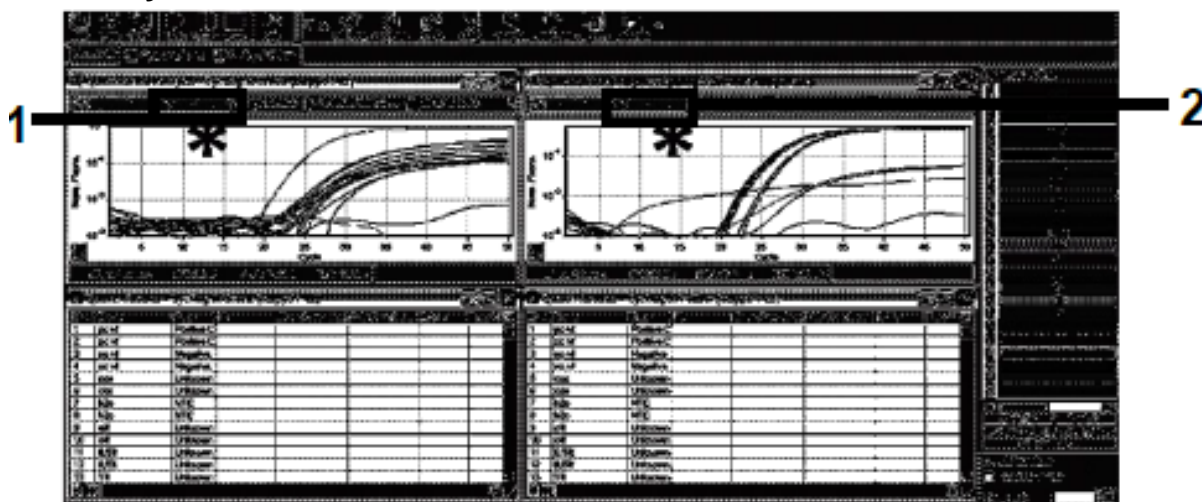
Ryc. 8. Analysis (Analiza).

18. W oknie dialogowym „Analysis” (Analiza) (Ryc. 9) kliknąć dwukrotnie opcję „Cycling A. Green” (Zielony kanał akwizycji), a następnie przycisk „OK”. Powtórzyć dla kanału Cycling A Yellow.



Ryc. 9. Quantitation (Oznaczenie ilościowe): „Cycling A. Green” (Zielony kanał akwizycji).

19. Zostanie wyświetlone nowe okno (Ryc. 10). Kliknąć opcję „Slope Correct” (Korekcja nachylenia) na obu panelach, jak przedstawiono na Ryc. 10.



Ryc. 10. Ustawianie opcji „Slope Correct” (Korekcja nachylenia).

20. Aby wyeksportować dane, zapisać je jako arkusz danych programu Excel®. Kliknąć przycisk „OK”, nadać nazwę wyeksportowanemu plikowi, a następnie zapisać plik tekstowy (*.txt).

21. Otworzyć plik tekstowy w programie Excel i wybrać kolumnę A. Kliknąć opcję „Data” (Dane), następnie opcję „Convert” (Przekształć) i „Next” (Dalej). Wybrać opcję „Comma” (Przecinek), a następnie kliknąć przycisk „End” (Zakończ). Wyniki będą wyświetlane w sposób przedstawiony na Ryc. 11.

Dane surowe

Dane standaryzowane

50. cykl reakcji PCR

Nazwa próbki

Kolumna FAM

Kolumna VIC

Ryc. 11. Przykładowe wyniki przedstawione w pliku programu Excel.

Uwaga: Plik zawiera dane surowe oraz dane standaryzowane. Należy brać pod uwagę wyłącznie dane standaryzowane.

Dane te są podane w częściach tabeli dotyczących analizy ilościowej kanału Cycling A Green i analizy ilościowej kanału Cycling A Yellow.

Dane przeznaczone do interpretacji to dane, których akwizycja nastąpiła w 50. cyklu PCR (zaznaczone okręgami po prawej stronie).

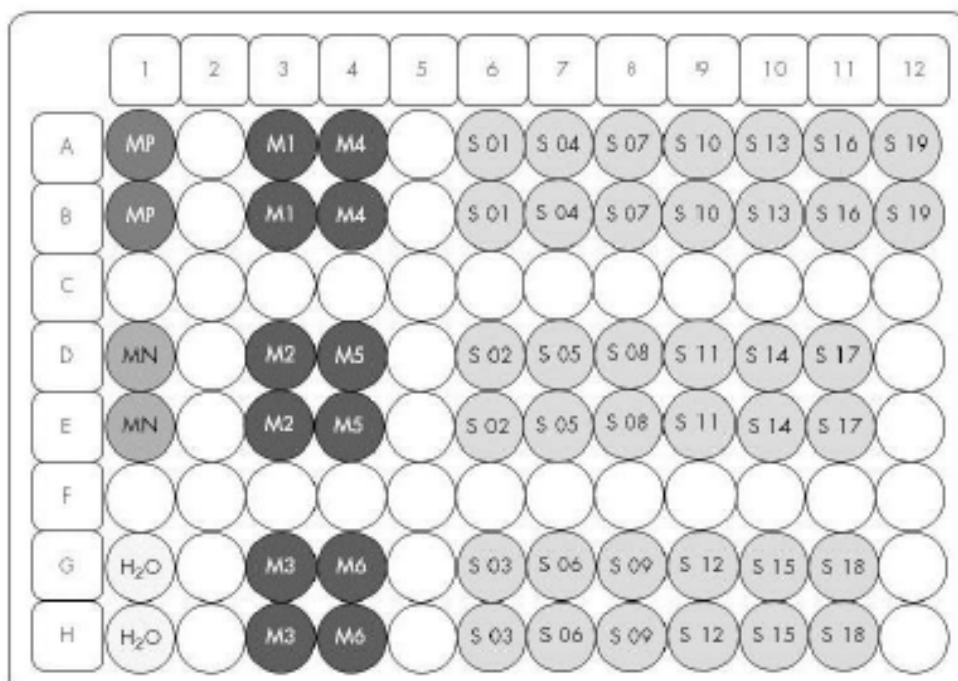
Protokół: reakcja qPCR w aparatach Applied Biosystems i ABI PRISM

W przypadku używania urządzenia do qPCR przeznaczonego na płytkę 96-dołkową zalecamy wykonanie powtórzeń wszystkich pomiarów, zgodnie z Tabelą 5.

Tabela 5. Liczba reakcji w przypadku aparatów Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT

Próbki	Reakcje
Mieszanka starterów i sond JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reakcji)	
19 próbek DNA	19 x 2 reakcje
2 kontrole DNA	2 x 2 reakcje (MP-VF, MN-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Skala referencyjna	6 x 2 reakcje (od M1 do M6, każde oznaczane w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparatach Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000 i 7700 lub ABI PRISM 7900HT



Ryc. 12. Sugerowane ustawienie płytki dla eksperymentu przy użyciu zestawu ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit. MP: kontrola pozytywna; MN: kontrola negatywna; od M1 do M6: skala referencyjna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparatach Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmrozić wszystkie niezbędne składniki i umieścić je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząsnąć i krótko odwirować wszystkie probówki (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotować mieszaninę do reakcji qPCR zgodnie z poniższym opisem, w ilości odpowiedniej do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 6 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, której objętość została obliczona w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 25 μ l. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sond. Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

W przypadku aparatów Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit można używać do analizy 19 próbek w dwóch powtórzeniach w ramach jednego eksperymentu (Ryc. 12).

Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny do reakcji qPCR

Składnik	Liczba reakcji (μ l)		Stężenie końcowe
	1	56+1*	
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x	2,5	142,5	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	5	285	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5	5 na każdą	–
Całkowita objętość	25	25 na każdą	–

* 19 próbek; jeden eksperyment/zestaw.

4. Wytrząsać i krótko odwirować mieszaninę do reakcji qPCR (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie próbówki).
5. Dodać po 20 μ l wstępnej mieszaniny do reakcji qPCR na dołek.
6. Dodać po 5 μ l materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiednich dołków (całkowita objętość 25 μ l).
7. Delikatnie wymieszać, pipetując w górę i w dół.
8. Zamknąć płytkę i krótko ją odwirować (300 x g, około 10 s).
9. Umieścić płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Zaprogramować termocykler na program cykli termicznych zgodnie z Tabelą 7 i rozpocząć cykl.

Tabela 7. Profil temperaturowy dla aparatów Applied Biosystems i ABI PRISM

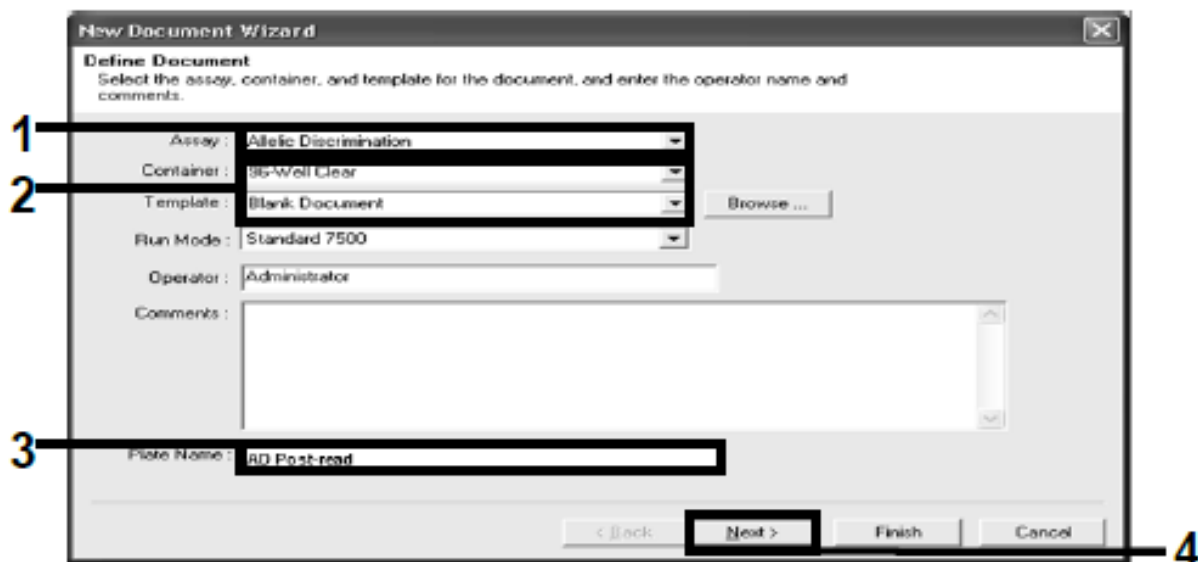
Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 92°C przez 15 s 60°C przez 1 min

Procedura analizy cyklu po odczycie dla aparatów Applied Biosystems i ABI PRISM

Szczegółowe informacje dotyczące programowania aparatów Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT zamieszczono w podręczniku użytkownika aparatu. Aby zwiększyć przejrzystość rycin, ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną linią.

11. Po zakończeniu cyklu wybrać opcję „Start/Program” (Uruchom/Program), a następnie wybrać opcję „File/New” (Plik/Nowy).
12. W oknie dialogowym „New Document Wizard” (Kreator nowego dokumentu) kliknąć listę rozwijaną „Assay” (Oznaczenie) i wybrać opcję „Allelic Discrimination” (Rozróżnianie alleli) (Ryc. 13).

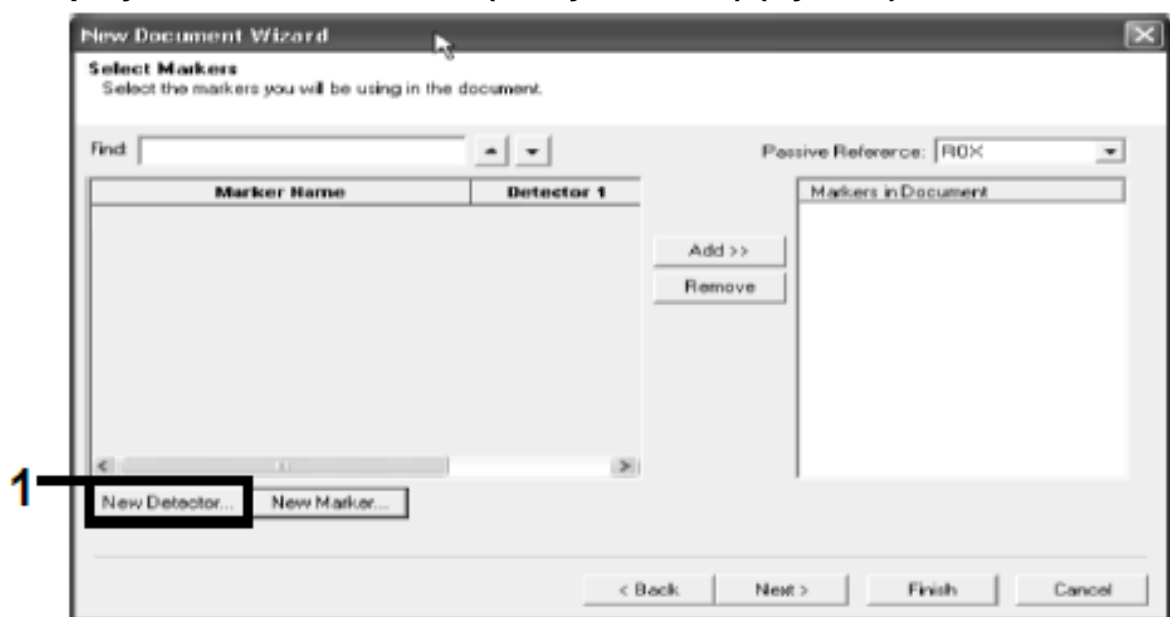
13. Zaakceptować domyślne ustawienia dla pól „Container” (Pojemnik) i „Template” (Matryca) („96-Well Clear” (Przezroczysty, 96-dołkowy) i „Blank Document” (Pusty dokument), Ryc. 13). W polu „Plate Name” (Nazwa płytki) wpisać nazwę *AD Post-read* (Ryc. 13), a następnie kliknąć przycisk „Next>” (Dalej>), aby uzyskać dostęp do okna dialogowego „Select Markers” (Wybierz markery).



Ryc. 13. Ustawienia wstępne do utworzenia nowego cyklu po odczycie (New Document Wizard (Kreator nowego dokumentu)).

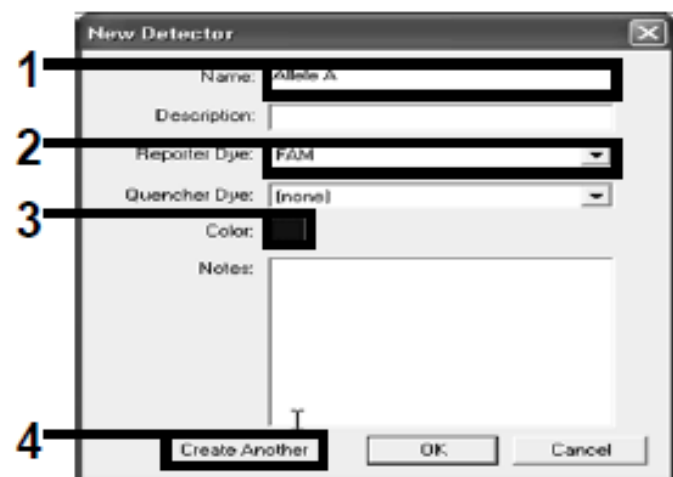
14. Jeśli panel „Markers in Document” (Markery w dokumencie) w oknie dialogowym „Select Markers” (Wybierz markery) zawiera marker odpowiedni dla danego zastosowania, przejść do kroku 18. Jeśli nie, przejść do kroku 15.

15. Utworzyć detektory i markery w następujący sposób. Kliknąć przycisk „New Detector” (Nowy detektor) (Ryc. 14).



Ryc. 14. Panel „Markers in Document” (Markery w dokumencie) nie zawiera markera odpowiedniego dla danego zastosowania.

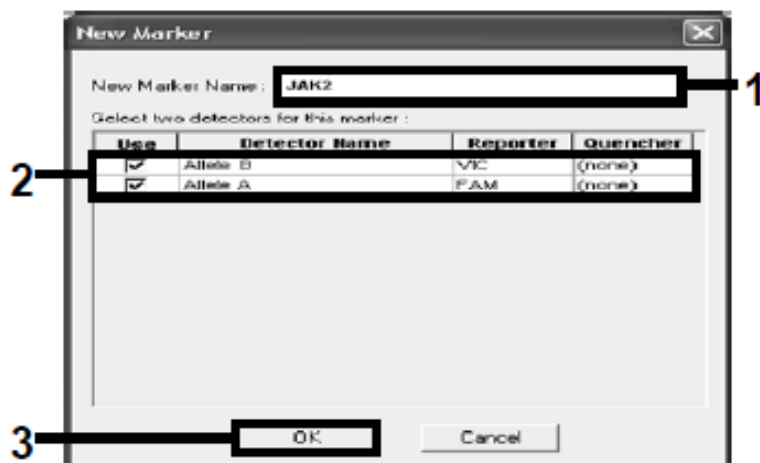
16. W oknie dialogowym „New Detector” (Nowy detektor) wpisać nazwę *Allele A* (Allel A) w polu „Name” (Nazwa) (Ryc. 15). Pozostawić opcję „Reporter Dye” (Barwnik reporterowy) ustawioną na „FAM”. Kliknąć przycisk „Color” (Kolor), wybrać kolor, a następnie kliknąć przycisk „OK” (Ryc. 15). Kliknąć przycisk „Create Another” (Utwórz kolejny) (Ryc. 15).



Ryc. 15. Tworzenie detektorów.

17. W kolejnym oknie dialogowym „New Detector” (Nowy detektor) wpisać nazwę *Allele B* (Allel B) w polu „Name” (Nazwa). Wybrać opcję „VIC” w polu „Reporter Dye” (Barwnik reporterowy). Kliknąć przycisk „Color” (Kolor), wybrać kolor, a następnie kliknąć przycisk „OK”.

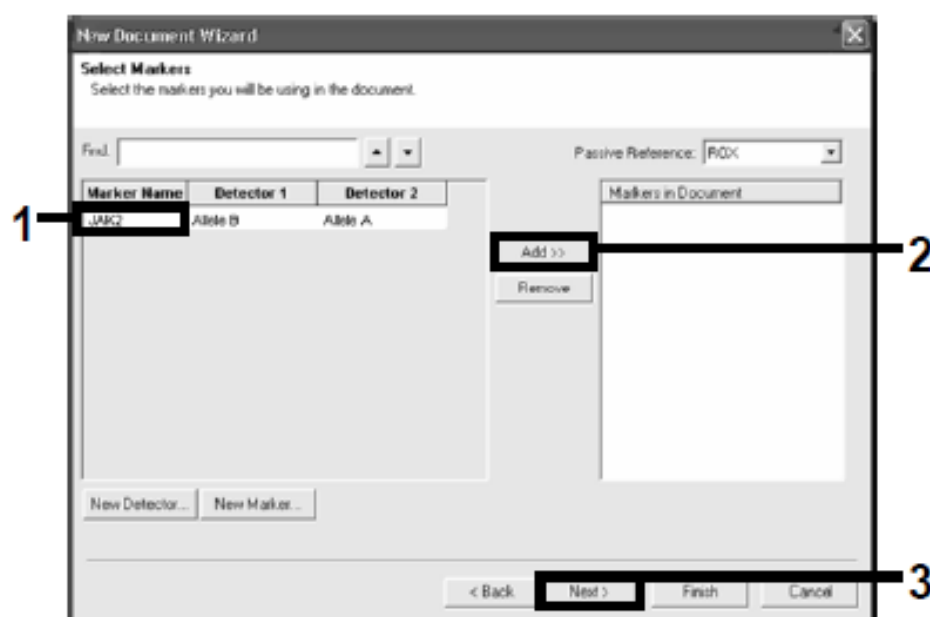
18. Kliknąć opcję „New Marker” (Nowy marker) w oknie dialogowym „Select Markers” (Wybierz markery) (patrz Ryc. 14).
19. W oknie dialogowym „New Marker” (Nowy marker) wpisać nazwę JAK2 w polu „New Marker Name” (Nazwa nowego markera) (Ryc. 16). Wybrać detektory „Allele A” (Allel A) i „Allele B” (Allel B) utworzone w kroku 16 i 17 (lub już zdefiniowane) i kliknąć przycisk „OK” (Ryc. 16).



Ryc. 16. Tworzenie markerów.

20. W oknie dialogowym „Select Markers” (Wybierz markery) wybrać marker „JAK2” (utworzony w powyższych etapach) lub odpowiedni wstępnie zdefiniowany marker, a następnie kliknąć przycisk „Add>>” (Dodaj>>) (Ryc. 17).

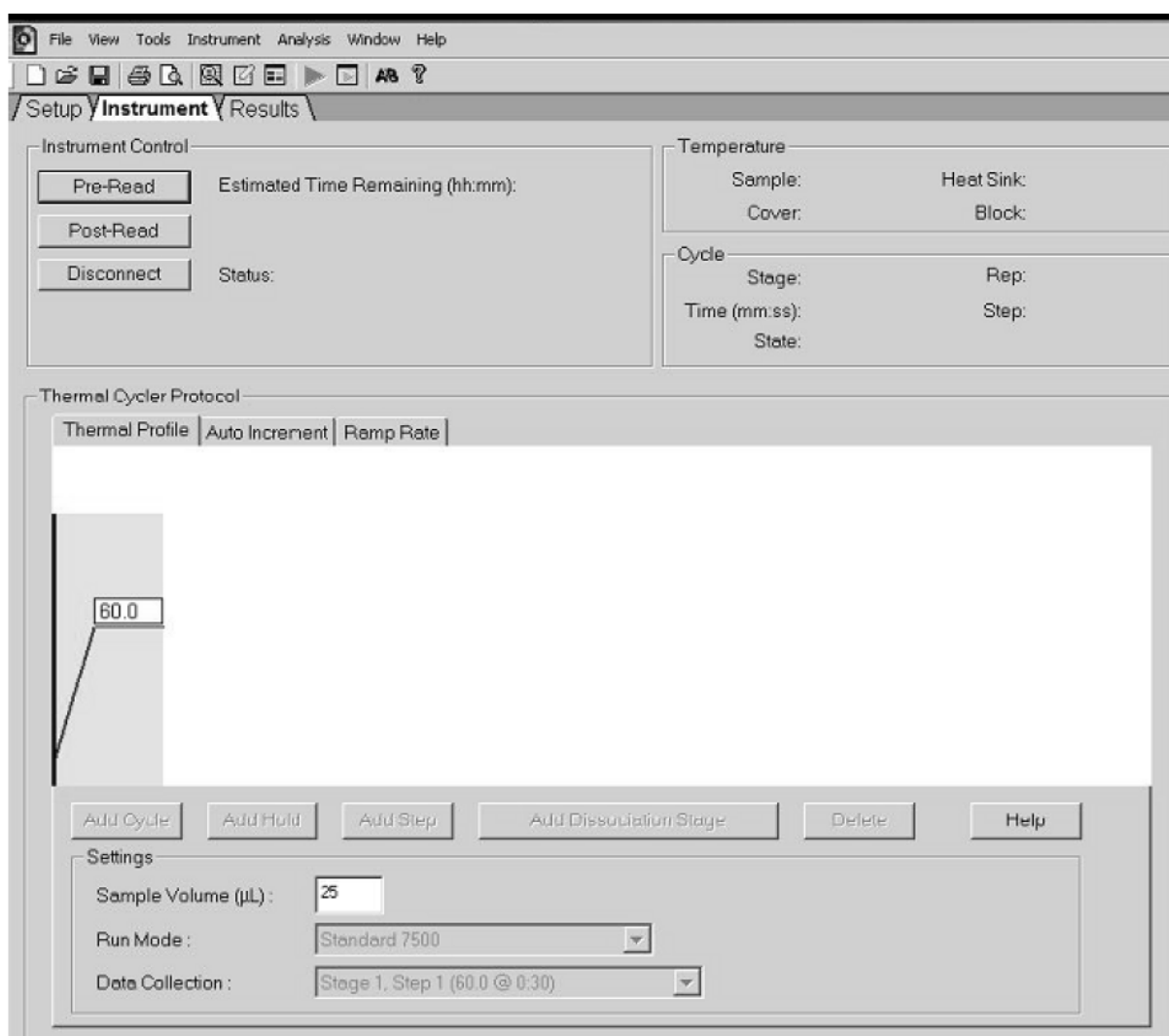
Uwaga: Aby usunąć marker, należy go wybrać, a następnie kliknąć przycisk „Remove” (Usuń).



Ryc. 17. Wybieranie markerów.

21. Kliknąć przycisk „Next>” (Dalej>).
22. W oknie dialogowym „Setup Sample Plate” (Konfiguracja płytki z próbkami) kliknąć i przeciągnąć marker, aby wybrać go dla dołków, które zawierają próbki. Kliknąć przycisk „Finish” (Zakończ).
23. Wybrać kartę „Instrument” (Aparat), a następnie zmienić objętość próbki na 25 μL .
24. Wybrać opcję „File/Save” (Plik/Zapisz), a następnie kliknąć przycisk „Save” (Zapisz), aby zachować nazwę przypisaną podczas tworzenia płytki.
25. Załadować płytkę reakcyjną do aparatu zgodnie z zaleceniami producenta.
26. Rozpocząć cykl po odczycie. Kliknąć przycisk „Post-Read” (Po odczycie).

Aparat wykona 1 cykl o długości 60 s przy temperaturze 60°C. Podczas tego cyklu aparat rejestruje fluorescencję FAM i VIC w każdym dołku (Ryc. 18).



Ryc. 18. Cykl po odczycie.

27. Wybrać opcję „File/Export” (Plik/Eksportuj), a następnie kliknąć przycisk „Results” (Wyniki), aby wyeksportować wyniki do pliku programu Excel. Wyniki będą wyświetlane w sposób przedstawiony na Ryc. 19.

12 Comments:		VIC Sample 1							FAM Sample 1			
13 SDS v1.2												
14												
15 Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method	
16 A1	sample 1	VIC	Unknown	247.897	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.184	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call	
17 A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call	
18 A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call	
19 A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call	
20 A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call	
21 A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.806	5.278	Undetermined	100.00	Manual Call	
22 A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.948	Undetermined	100.00	Manual Call	
23 A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call	
24 A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call	
25 A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call	
26 A11	C-	VIC	Unknown	269.500	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call	
27 A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call	
28 B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call	
29 B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call	
30 B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call	
31 B4	ER	VIC	Unknown	404.145	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call	
32 B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call	
33 B6	H2O	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.346	Undetermined	100.00	Manual Call	
34 B7	H2O	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call	
35 B8	H2O	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call	

Ryc. 19. Przykładowe wyniki przedstawione w pliku programu Excel.

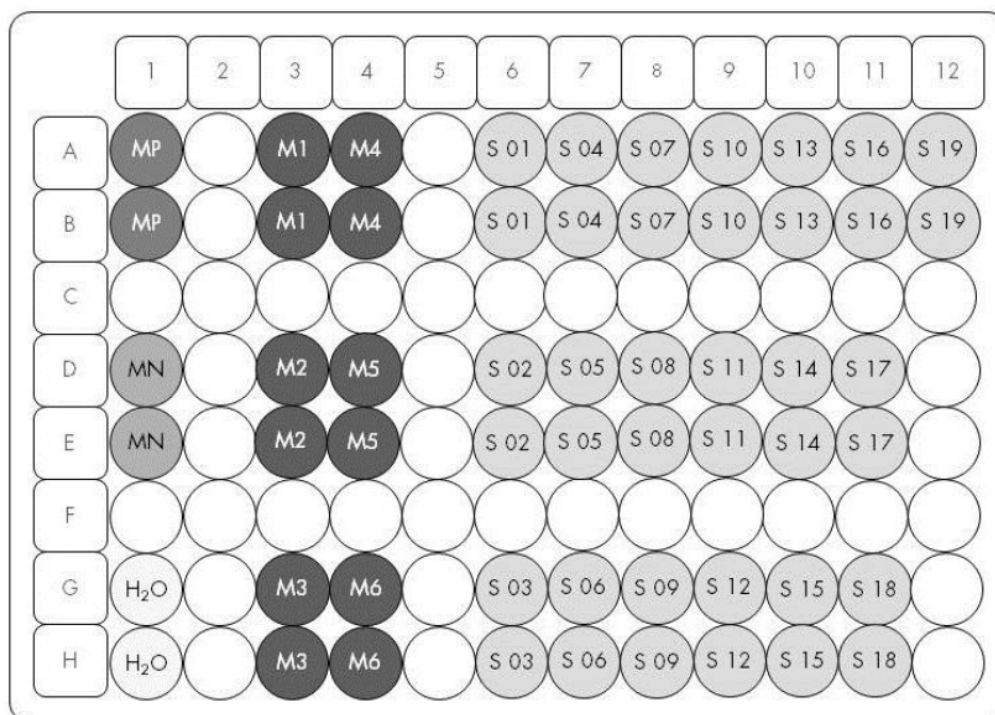
Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 480

W przypadku używania urządzenia do qPCR przeznaczonego na płytkę 96-dołkową zalecamy wykonanie powtórzeń wszystkich pomiarów, zgodnie z Tabelą 8.

Tabela 8. Liczba reakcji w przypadku aparatu LightCycler 480

Próbki	Reakcje
Mieszanka starterów i sond JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reakcji)	
19 próbek DNA	19 x 2 reakcje
2 kontrole DNA	2 x 2 reakcje (MP-VF, MN-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Skala referencyjna	6 x 2 reakcje (od M1 do M6, każde oznaczane w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparacie LightCycler 480



Ryc. 20. Sugerowane ustawienie płytki dla eksperymentu przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit. MP: kontrola pozytywna; MN: kontrola negatywna; od M1 do M6: skala referencyjna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparacie LightCycler 480

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmrozić wszystkie niezbędne składniki i umieścić je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząsnąć i krótko odwirować wszystkie próbki (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotować mieszaninę do reakcji qPCR zgodnie z poniższym opisem, w ilości odpowiedniej do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 9 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, której objętość została obliczona w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 25 μ l. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sond. Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

W przypadku aparatów Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT zestawu ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit można używać do analizy 19 próbek w dwóch powtórzeniach w ramach jednego eksperymentu (Ryc. 20).

Tabela 9. Przygotowanie mieszaniny do reakcji qPCR

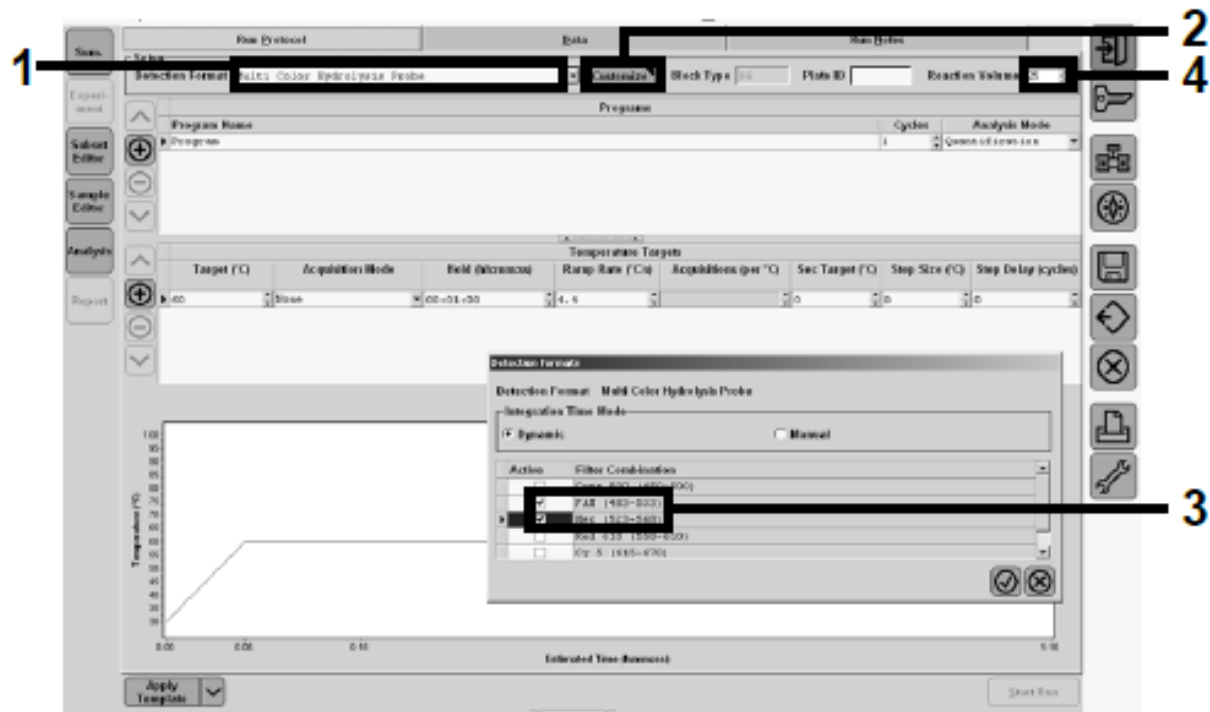
Składnik	Liczba reakcji (μ l)		Stężenie końcowe
	1	56+1*	
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x	2,5	142,5	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	5	285	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5	5 na każdą	–
Całkowita objętość	25	25 na każdą	–

* 19 próbek; jeden eksperyment/zestaw.

4. Wytrząsać i krótko odwirować mieszaninę do reakcji qPCR (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).
5. Dodać po 20 μ l wstępnej mieszaniny do reakcji qPCR na dołek.
6. Dodać po 5 μ l materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiednich dołków (całkowita objętość 25 μ l).
7. Delikatnie wymieszać, pipetując w górę i w dół.
8. Zamknąć płytkę i krótko ją odwirować (300 x g, około 10 s).
9. Umieścić płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Na stronie głównej wybrać opcję „New Experiment” (Nowy eksperyment).
11. W przypadku aparatu LightCycler 480 I przejść do kroku 11a.
W przypadku aparatu LightCycler 480 II przejść do kroku 11b.

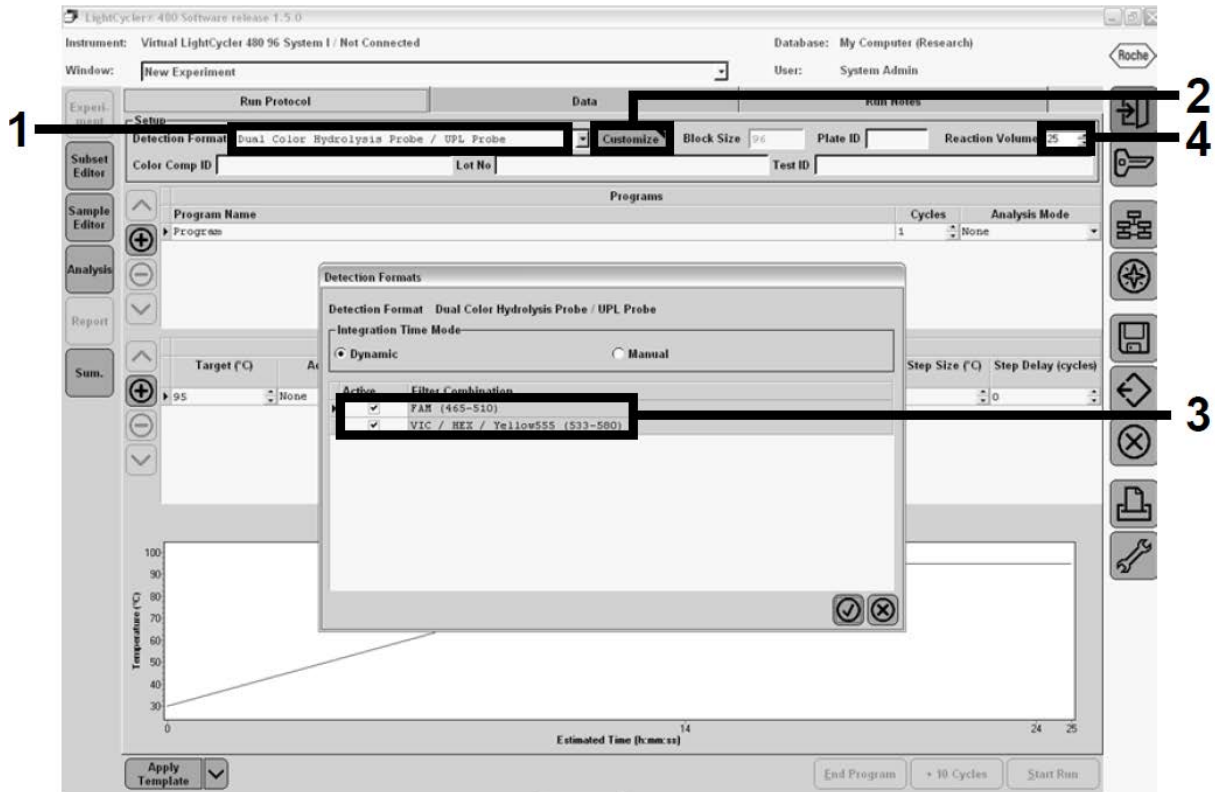
Szczegółowe informacje dotyczące programowania aparatu LightCycler 480 zamieszczono w podręczniku użytkownika aparatu. Aby zwiększyć przejrzystość rycin, ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną linią.

- 11a. LightCycler 480 I: Wybrać opcję „Multi Color Hydrolysis Probe” (Wielokolorowa sonda hydrolytyczna), kliknąć przycisk „Customize” (Dostosuj), a następnie sprawdzić, czy wybrane są kanały „FAM (483–533)” i „Hex (533–568)” (tj. VIC) (Ryc. 21). Ustawić objętość reakcyjną na „25” μ l (Ryc. 21) i przejść do kroku 12.



Ryc. 21. LightCycler 480 I: Ustawianie formatu detekcji.

11b. LightCycler 480 II: Wybrać opcję „Dual Color Hydrolysis Probe” (Dwukolorowa sonda hydrolityczna), kliknąć przycisk „Customize” (Dostosuj), a następnie sprawdzić, czy wybrane są kanały „FAM (465–510)” i „VIC / HEX / (533–580)” (Ryc. 22). Ustawić objętość reakcyjną na „25” μ l (Ryc. 22) i przejść do kroku 12.



Ryc. 22. LightCycler 480 II: Ustawianie formatu detekcji.

12. Zaprogramować termocykler na program cykli termicznych zgodnie z Tabelą 10 i rozpocząć cykl.

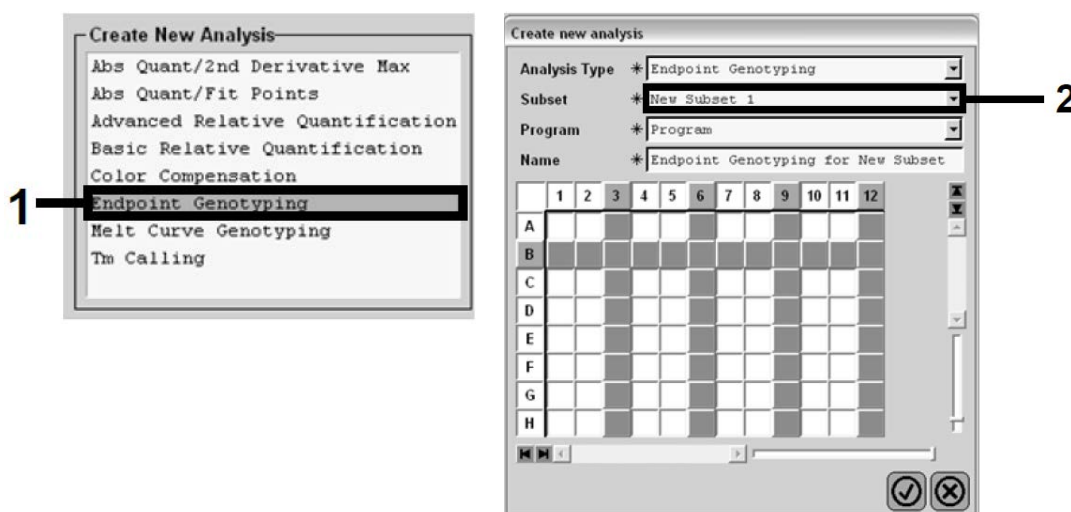
Uwaga: Podczas opisywania konfiguracji płytki w aparacie wybrać opcję „Endpt Geno” (Genotypowanie w punkcie końcowym) w części „Step 1: select workflow” (Krok 1 — wybierz przebieg pracy).

Tabela 10. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 480

Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 50°C Czas: 2 min
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 min
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 92°C przez 15 s; pojedynczy 60°C przez 1 min; pojedynczy
Hold 3 (Wstrzymanie 3)	60°C przez 1 min; pojedynczy

Procedura analizy punktu końcowego w przypadku aparatu LightCycler 480

- 13. Po zakończeniu cyklu kliknąć przycisk „Analysis” (Analiza).**
14. W oknie dialogowym „Create New Analysis” (Utwórz nową analizę) wybrać opcję „Endpoint Genotyping” (Genotypowanie w punkcie końcowym), a następnie w menu „Subset” (Podzbiór) wybrać podzbiór do analizy (Ryc. 23).



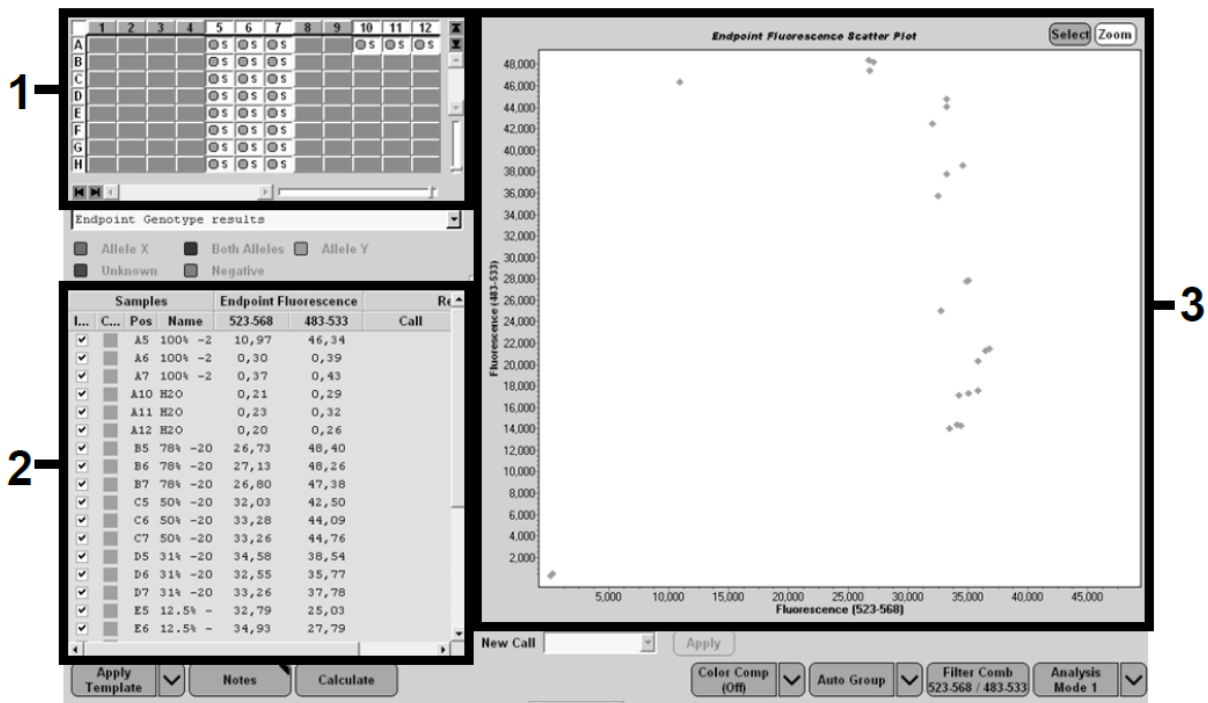
Ryc. 23. Wybór typu analizy i podzbioru do analizy.

15. W kolejnym oknie wybrać fluorescencję „Hex” (tj. VIC) dla opcji „Allele X” (Allel X) i fluorescencję „FAM” dla opcji „Allele Y” (Allel Y) (Ryc. 24).



Ryc. 24. Wybór fluorescencji dla opcji „Allele X” (Allel X) i „Allele Y” (Allel Y).

16. Kolejne okno (Ryc. 25) przedstawia konfigurację płytki (1, lewy górny róg), wyniki fluorescencji dla każdej próbki (2, lewy dolny róg) oraz wykres punktowy z rozróżnieniem alleli (3, po prawej; wartości fluorescencji FAM i VIC zmierzone przy 50. cyklu PCR).



Ryc. 25. Podsumowanie danych.

17. Aby wyeksportować dane, kliknąć prawym przyciskiem myszy szablon wyników próbek, a następnie wybrać opcję „Export Table” (Eksportuj tabelę). Plik zostanie zapisany w formacie tekstowym (.txt).

18. Aby przejrzeć i analizować wyniki, należy otworzyć plik w programie Excel. Wyniki będą wyświetlane w sposób przedstawiony na Ryc. 26.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)						
2	Include	Color	Pos	Name	523-568	483-533	Call
3	True	10789024	A5	100%-20	10,971	46,335	0,00
4	True	10789024	A6	100%-20	0,302	0,392	0,00
5	True	10789024	A7	100%-20	0,369	0,425	0,00
6	True	10789024	A10	H2O	0,207	0,290	0,00
7	True	10789024	A11	H2O	0,233	0,319	0,00
8	True	10789024	A12	H2O	0,203	0,261	0,00
9	True	10789024	B5	78%-20	26,731	48,396	0,00
10	True	10789024	B6	78%-20	27,125	48,262	0,00
11	True	10789024	B7	78%-20	26,803	47,383	0,00
12	True	10789024	C5	50%-20	32,035	42,495	0,00
13	True	10789024	C6	50%-20	33,278	44,086	0,00
14	True	10789024	C7	50%-20	33,261	44,760	0,00
15	True	10789024	D5	31%-20	34,584	38,536	0,00
16	True	10789024	D6	31%-20	32,549	35,766	0,00
17	True	10789024	D7	31%-20	33,262	37,780	0,00
18	True	10789024	E5	12.5%-20	32,794	25,028	0,00
19	True	10789024	E6	12.5%-20	34,932	27,788	0,00
20	True	10789024	E7	12.5%-20	35,089	27,848	0,00
21	True	10789024	F5	5%-20	35,838	20,289	0,00
22	True	10789024	F6	5%-20	36,786	21,487	0,00
23	True	10789024	F7	5%-20	36,546	21,319	0,00
24	True	10789024	G5	2%-20	35,082	17,334	0,00
25	True	10789024	G6	2%-20	35,834	17,589	0,00
26	True	10789024	G7	2%-20	34,299	17,124	0,00
27	True	10789024	H5	0%-20	34,449	14,315	0,00
28	True	10789024	H6	0%-20	33,520	14,012	0,00
29	True	10789024	H7	0%-20	34,125	14,335	0,00
30							

Ryc. 26. Przykładowe wyniki przedstawione w pliku programu Excel.

Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 2.0

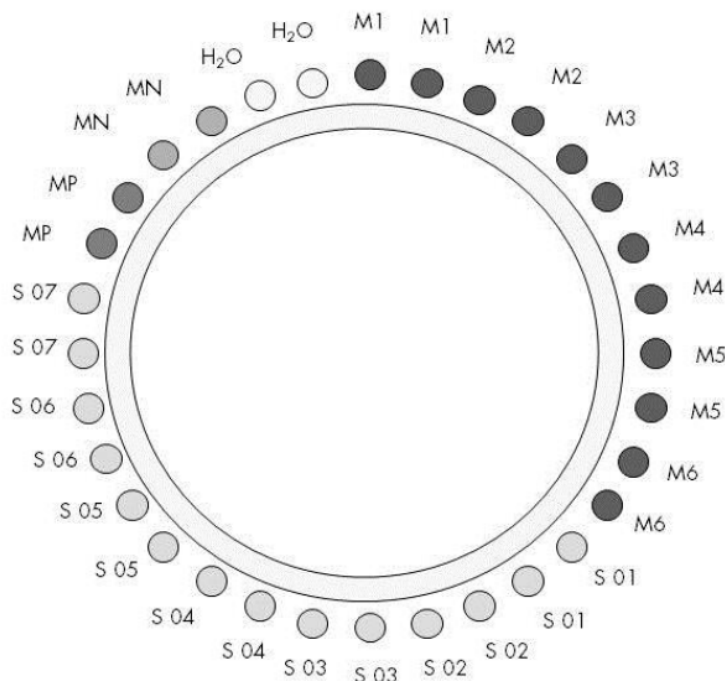
Uwaga: Ze względu na szczególne wymagania technologiczne podczas wykonywania eksperymentów w aparacie LightCycler 2.0 należy używać określonych odczynników. Zalecamy używanie mieszaniny LightCycler TaqMan Master. Mieszaninę Master Mix (stężoną 5x) należy przygotować zgodnie z wytycznymi producenta.

W przypadku używania rotora na 32 kapilary zalecamy wykonanie powtórzeń wszystkich pomiarów, zgodnie z Tabelą 11.

Tabela 11. Liczba reakcji w przypadku aparatu LightCycler 2.0

Próbki	Reakcje
Mieszanina starterów i sond JAK2 V617F (PPM-VF) (32 reakcje)	
7 próbek DNA	7 x 2 reakcje
2 kontrole DNA	2 x 2 reakcje (MP-VF, MN-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Skala referencyjna	6 x 2 reakcje (od M1 do M6, każde oznaczane w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparacie LightCycler 2.0



Ryc. 27. Sugerowany układ rotora dla eksperymentu przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit. MP: kontrola pozytywna; MN: kontrola negatywna; od M1 do M6: skala referencyjna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparacie LightCycler 2.0

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmrozić wszystkie niezbędne składniki i umieścić je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząsnąć i krótko odwirować wszystkie probówki (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotować mieszaninę do reakcji qPCR zgodnie z poniższym opisem, w ilości odpowiedniej do liczby przetwarzanych próbek.**
Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 12 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, której objętość została obliczona w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 20 μ l. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sond. Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

W przypadku aparatu LightCycler 2.0 zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit można używać do analizy 7 próbek w dwóch powtórzeniach w ramach jednego eksperymentu (Ryc. 27).

Tabela 12. Przygotowanie mieszaniny qPCR dla aparatu LightCycler 2.0

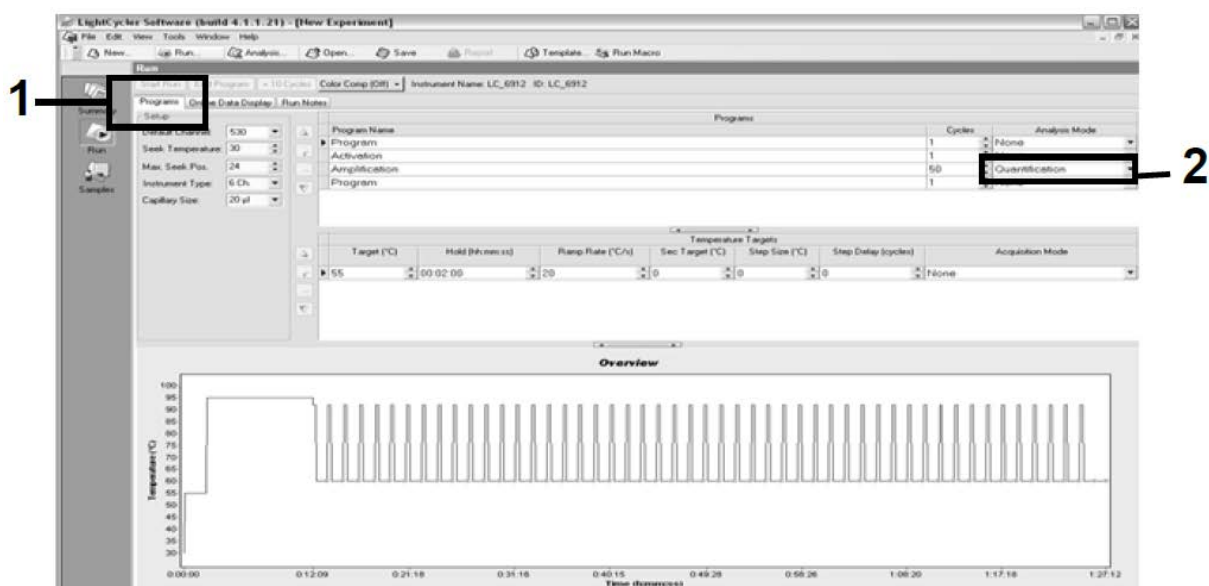
Składnik	Liczba reakcji (μ l)		Stężenie końcowe
	1	32+1*	
Mieszanina LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x	2	66	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	9	297	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5	5 na każdą	–
Całkowita objętość	20	20 na każdą	–

* 14 próbek; jeden eksperyment/zestaw.

4. Wytrząsać i krótko odwirować mieszaninę do reakcji qPCR (około 10 s przy 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie próbówki).
5. Dodać po 15 μ l wstępnej mieszaniny do reakcji qPCR na kapilarę.
6. Dodać po 5 μ l materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiedniej kapilary (całkowita objętość 20 μ l).
7. Delikatnie wymieszać, pipetując w górę i w dół.
8. Umieścić kapilary w adapterze dostarczonym z aparatem i krótko odwirować (700 x g, około 10 s).
9. Załadować próbki do termocyklera zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Zaprogramować termocyklerek (Ryc. 28) zgodnie z Tabelą 13.

Szczegółowe informacje dotyczące programowania aparatu LightCycler 2.0 zamieszczono w podręczniku użytkownika aparatu. Aby zwiększyć przejrzystość rycin, ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną linią.

Uwaga: Należy upewnić się, że zarówno dla etapu amplifikacji/powtarzania cyklu, jak i dla końcowego wstrzymania przy temperaturze 60°C, wybrano ustawienie Quantification (Oznaczenie ilościowe) oraz pojedynczą akwizycję fluorescencji FAM i VIC.



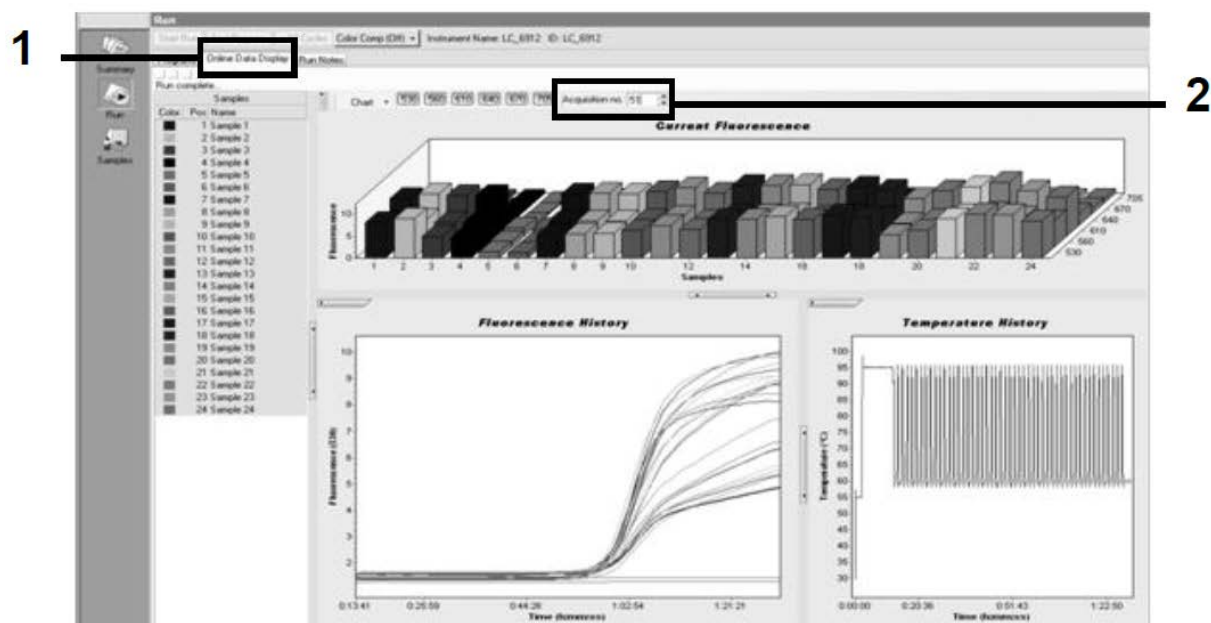
Ryc. 28. Ekran programowania dla aparatu LightCycler 2.0.

Tabela 13. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 2.0

Hold (Wstrzymanie)	Temperatura: 55°C Czas: 2 min Tempo zmiany: 20
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperatura: 95°C Czas: 10 min Tempo zmiany: 20
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 92°C przez 15 s; tempo zmiany: 20 60°C przez 1 min; tempo zmiany: 20
Hold 3 (Wstrzymanie 3)	60°C przez 1 min; tempo zmiany: 20

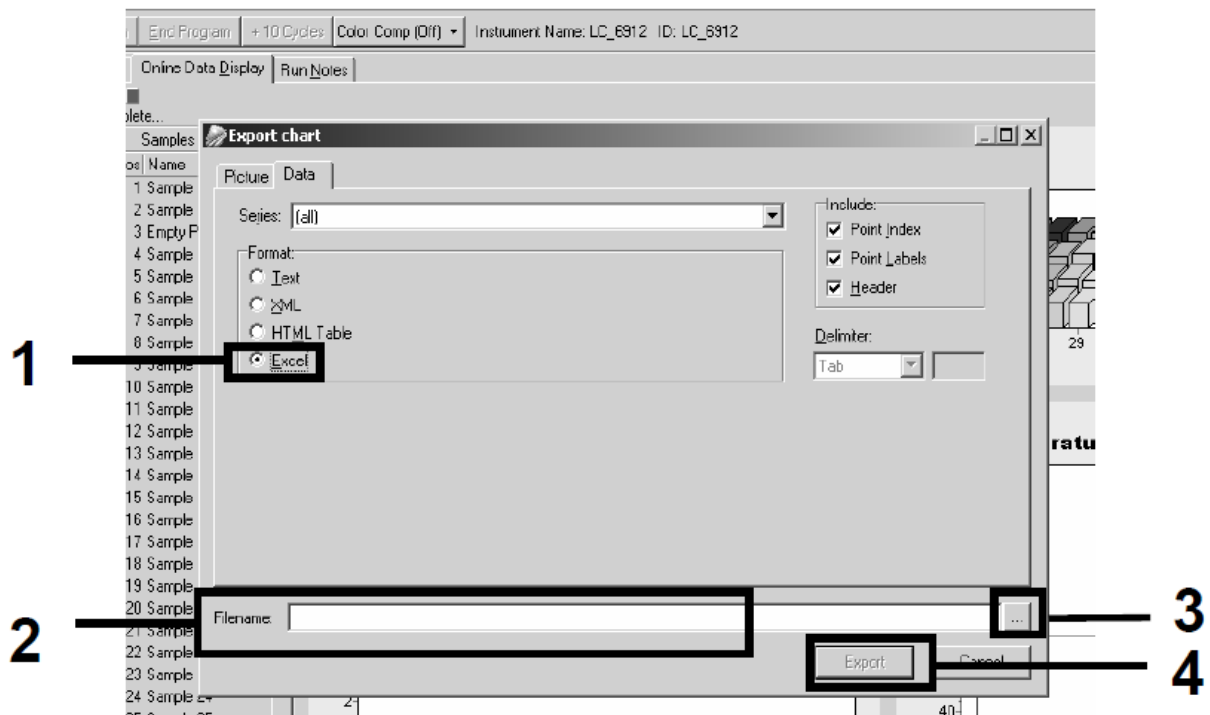
Procedura analizy punktu końcowego w przypadku aparatu LightCycler 2.0

11. Po zakończeniu cyklu amplifikacji kliknąć kartę „Online Data Display” (Widok danych w trybie online) (Ryc. 29). Otworzyć menu widoku w lewej górnej części okna „Current Fluorescence” (Bieżąca fluorescencja), a następnie wpisać wartość 51 w polu „Acquisition no.” (Nr akwizycji).



Ryc. 29. Wyniki i historia na karcie Online Data Display (Widok danych w trybie online).

12. Kliknąć prawym przyciskiem myszy obok wykresu „Current Fluorescence” (Bieżąca fluorescencja), a następnie wybrać opcję „Export” (Eksportuj).
13. Kliknąć pole „Excel” w oknie dialogowym „Export chart” (Eksportuj wykres) (Ryc. 30). Wprowadzić nazwę w polu dialogowym „Filename” (Nazwa pliku). Wybrać miejsce docelowe, do którego ma zostać wyeksportowany plik wynikowy, używając przycisku Kliknąć przycisk „Export” (Eksportuj).



Ryc. 30. Wybieranie formatu eksportowania oraz miejsca docelowego dla pliku wynikowego.

14. Aby przejrzeć i analizować wyniki, należy otworzyć plik w programie Excel. Wyniki dla aparatu LightCycler 2.0 będą wyświetlane w przedstawiony sposób.

																	Position	
I	J	K		L	M	N		O	P		Q	R		S	T	U		
X	Bar	Text		X	Bar	Text		X	Bar	Text		X	Bar					
1	2,9709	1: Sample 1 (610)		1	8,2734	1: Sample 1 (560)		1	6,6361	1: Sample 1 (530)		1	4,9943					
2	3,0182	2: Sample 2 (610)		2	8,4428	2: Sample 2 (560)		2	6,7659	2: Sample 2 (530)		2	5,0767					
3	2,9496	3: Sample 3 (610)				3: Sample 3 (560)		3	6,5568	3: Sample 3 (530)		3	4,9699					
4	2,9526	4: Sample 4 (610)		4	8,2887	4: Sample 4 (560)		4	6,6163	4: Sample 4 (530)		4	4,9119					
5	2,9450	5: Sample 5 (610)		5	8,2689	5: Sample 5 (560)		5	6,6209	5: Sample 5 (530)		5	4,9638					
6	2,9969	6: Sample 6 (610)		6	8,4184	6: Sample 6 (560)		6	6,7674	6: Sample 6 (530)		6	5,1209					
7	3,0045	7: Sample 7 (610)		7	8,4520	7: Sample 7 (560)		7	6,7506	7: Sample 7 (530)		7	5,0507					
8	3,2822	8: Sample 8 (610)		8	9,1936	8: Sample 8 (560)		8	7,3960	8: Sample 8 (530)		8	5,5314					
9	3,0274	9: Sample 9 (610)		9	8,5557	9: Sample 9 (560)		9	6,8437	9: Sample 9 (530)		9	5,0843					
10	2,8336	10: Sample 10 (610)		10	7,9713	10: Sample 10 (560)		10	6,3905	10: Sample 10 (530)		10	4,7883					
11	2,8275	11: Sample 11 (610)		11	7,9774	11: Sample 11 (560)		11	6,3874	11: Sample 11 (530)		11	4,7669					
12	2,8351	12: Sample 12 (610)		12	8,0171	12: Sample 12 (560)		12	6,4118	12: Sample 12 (530)		12	4,7944					
13	2,9511	13: Sample 13 (610)		13	8,3726	13: Sample 13 (560)		13	6,6957	13: Sample 13 (530)		13	4,9699					
14	2,8367	14: Sample 14 (610)		14	8,0217	14: Sample 14 (560)		14	6,4439	14: Sample 14 (530)		14	4,7654					
15	2,9908	15: Sample 15 (610)		15	8,4337	15: Sample 15 (560)		15	6,7445	15: Sample 15 (530)		15	5,0523					
16	2,8885	16: Sample 16 (610)		16	8,1498	16: Sample 16 (560)		16	6,5568	16: Sample 16 (530)		16	4,9577					
17	3,0152	17: Sample 17 (610)		17	8,4901	17: Sample 17 (560)		17	6,8193	17: Sample 17 (530)		17	5,1225					
									VIC				FAM					

Ryc. 31. Przykładowe wyniki dla aparatu LightCycler 2.0 przedstawione w pliku programu Excel.

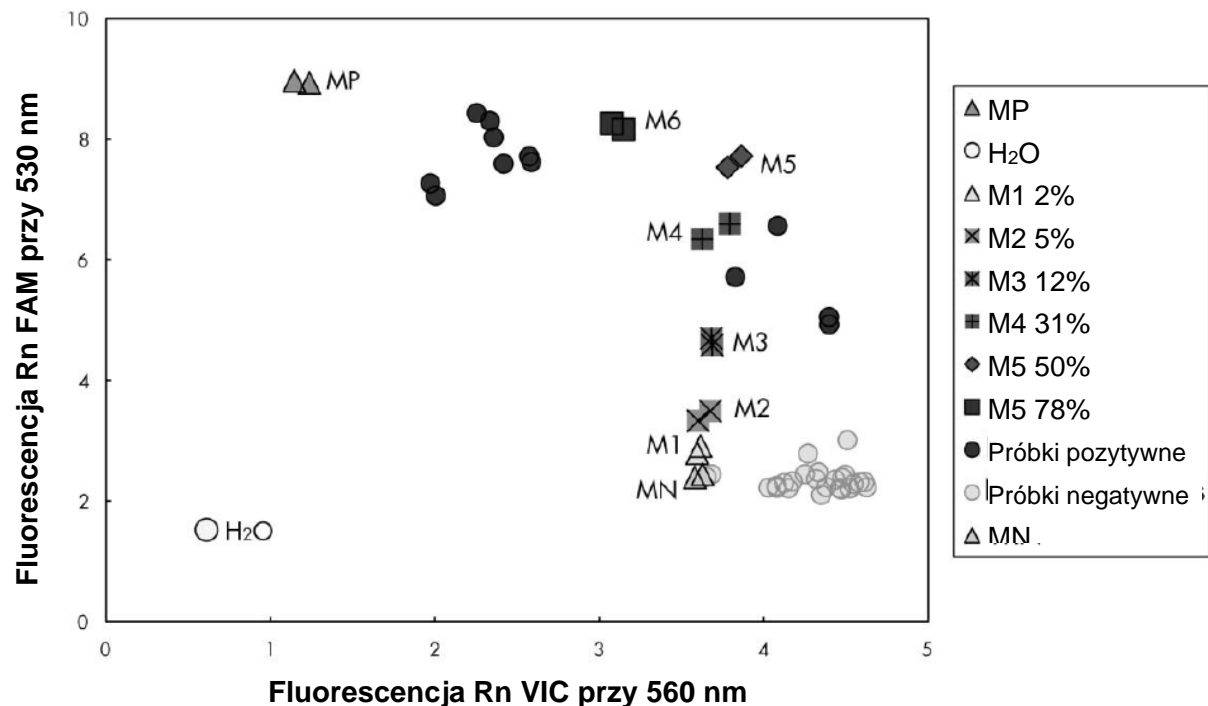
Interpretacja wyników

Należy uzyskać plik odpowiedni do pozyskania wyeksportowanych danych dla wszystkich aparatów: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub innych aparatów Rotor-Gene, LightCycler 2.0 lub 480, Applied Biosystems 7300 lub 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS lub 7900HT SDS oraz sprawdzić poziomy fluorescencji (muszą być one spójne między dwoma powtórzeniami).

Przygotować graficzne przedstawienie (wykres punktowy) danych fluorescencji. Na osi x jest przedstawiona fluorescencja VIC; na osi y fluorescencja FAM.

Graficzne przedstawienie i kryteria kontroli jakości

Przykładowy wykres punktowy przedstawiono na Ryc. 32.



Ryc. 32. Wykres punktowy reprezentatywnego eksperymentu rozróżniania alleli.
Aparaty: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM i LightCycler 480.

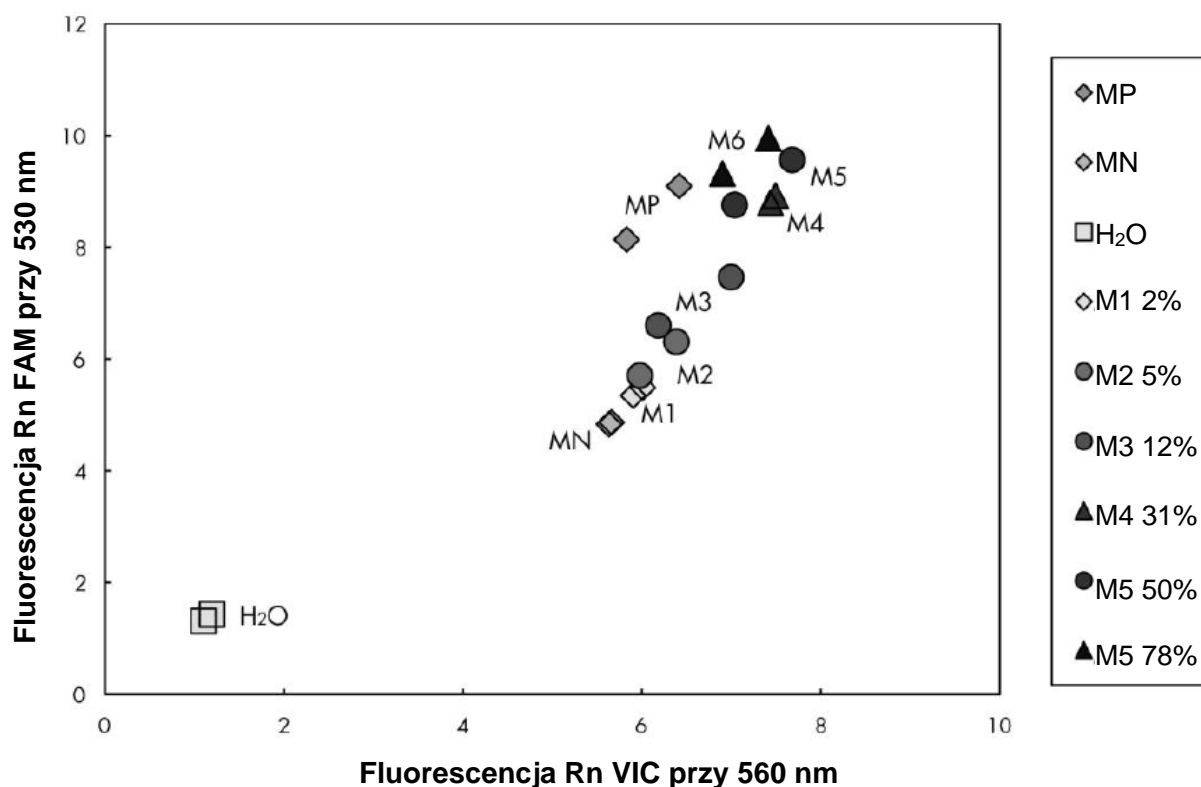
Próbki powinny znajdować się na łuku łączącym kontrole negatywne (MN) z kontrolami pozytywnymi (MP).

Nieprawidłowe położenie którejkolwiek z kontroli może wskazywać na błąd doświadczalny.

- Kontrole pozytywne powinny znajdować się w lewej, górnej części wykresu.
- Kontrole negatywne powinny znajdować się w prawej, dolnej części wykresu.
- Nieprawidłowe położenie kontroli negatywnej może wskazywać na zanieczyszczenie.

- Próbką graniczną (M1 ze skali referencyjnej) powinna być widoczna nad kontrolami negatywnymi.
- Kontrole zawierające wodę powinny znajdować się w lewej, dolnej części wykresu.
- Nieprawidłowe położenie kontroli zawierającej wodę (wyżej niż pomiar FAM dla próbki MN lub wyżej niż pomiar VIC dla próbki MP) może wskazywać na zanieczyszczenie.

Uwaga: Położenie kontroli może być odmienne w przypadku analizy danych uzyskanych za pomocą aparatu LightCycler 2.0 (Ryc. 33). Kontrole zawierające wodę powinny jednak wciąż znajdować się w lewej, dolnej części wykresu.



Ryc. 33. Wykres punktowy reprezentatywnego eksperymentu rozróżniania alleli.
Aparat: LightCycler 2.0.

Obliczenie znormalizowanego stosunku FAM/VIC i genotypowanie

Należy obliczyć stosunki FAM/VIC dla wszystkich próbek. Należy również obliczyć stosunki FAM/VIC dla kontroli pozytywnej (MP), próbki granicznej (M1), kontroli negatywnej (MN) i skali referencyjnej (od M2 do M6). Stosunki muszą być spójne między dwoma powtórzeniami. Następnie obliczyć średni stosunek dla wszystkich powtórzeń.

Obliczyć stosunek znormalizowany (Stosunek znor.) dla próbki granicznej (M1) i dla wszystkich próbek:

$$\text{Stosunek znor.}_{\text{próbki}} = \frac{\text{Stosunek}_{\text{próbki}}}{\text{Stosunek}_{\text{MN}}}$$

Uwaga: Szara strefa (Gray Zone, GZ) testu jest definiowana jako obszar wartości, w którym skuteczność rozróżniania jest niewystarczająco dokładna. Wartość w szarej strefie oznacza, że nie jest możliwe określenie tego, czy marker docelowy jest obecny, czy nieobecny. Szarą strefę należy obliczyć dla każdego eksperymentu.

Obliczyć szarą strefę (obszar niepewności) dookoła znormalizowanego stosunku dla próbki granicznej (M1) (Stosunek znor._{M1}):

$$\text{GZ: } [(\text{Stosunek znor.}_{\text{M1}} \times 0,94); (\text{Stosunek znor.}_{\text{M1}} \times 1,06)]$$

Następnie porównać znormalizowany stosunek każdej próbki do zakresu GZ dla wartości Stosunek znor._{M1}. W Tabeli 14 opisano sposób interpretacji wyników.

Tabela 14. Interpretacja wyników genotypowania za pomocą stosunków znormalizowanych

Wyniki	Interpretacja
Stosunek znor. _{próbki} > Stosunek znor. _{M1} x 1,06	Wykryto mutację JAK2 V617F
Stosunek znor. _{próbki} < Stosunek znor. _{M1} x 0,94	Nie wykryto mutacji JAK2 V617F
Stosunek znor. _{próbki} w zakresie GZ dla wartości Stosunek znor. _{M1}	Wynik niejednoznaczny

Wyniki półilościowe dotyczące obciążenia mutacją można uzyskać poprzez porównanie wartości stosunku dla poszczególnych próbek o nieznanym statusie (Stosunek_{próbki}) ze średnią wartością stosunku obliczonego dla skali referencyjnej (Stosunek_{M1-6}) (Tabela 15).

Tabela 15. Półościowe wartości obciążenia mutacją JAK2 V617F uzyskane przy użyciu skali referencyjnej

Wyniki	Obciążenie mutacją
$\text{Stosunek}_{M1} < \text{Stosunek}_{\text{próbki}} < \text{Stosunek}_{M2}$	2–5% mutacji JAK2 V617F
$\text{Stosunek}_{M2} < \text{Stosunek}_{\text{próbki}} < \text{Stosunek}_{M3}$	5–12,5% mutacji JAK2 V617F
$\text{Stosunek}_{M3} < \text{Stosunek}_{\text{próbki}} < \text{Stosunek}_{M4}$	12,5–31% mutacji JAK2 V617F
$\text{Stosunek}_{M4} < \text{Stosunek}_{\text{próbki}} < \text{Stosunek}_{M5}$	31–50% mutacji JAK2 V617F
$\text{Stosunek}_{M5} < \text{Stosunek}_{\text{próbki}} < \text{Stosunek}_{M6}$	50–78% mutacji JAK2 V617F
$\text{Stosunek}_{M6} < \text{Stosunek}_{\text{próbki}}$	78–100% mutacji JAK2 V617F

W Tabeli 16 przedstawiono przykładowe obliczenia i interpretację danych.

Tabela 16. Przykładowe obliczenia na podstawie danych fluorescencji oraz ich interpretacja za pomocą skali referencyjnej

Próbka	VIC	FAM	Stosunek	Średni stosunek	Stosunek znor.	Interpretacja
MN	49,613	3,8	0,077	0,078	1,000	Nie wykryto mutacji
MN	49,797	3,396	0,08			
MP	12,516	37,037	2,959	2,951	37,722	Wykryto mutację
MP	12,958	38,121	2,942			
M1	54,394	6,39	0,117	0,119	1,516	Próbka graniczna
M1	58,266	6,973	0,12			
M2	61,798	10,882	0,176	0,172	2,202	Wykryto mutację
M2	54,814	9,231	0,168			
M3	57,364	16,604	0,289	0,297	3,797	Wykryto mutację
M3	59,742	18,192	0,305			
M4	56,965	28,99	0,509	0,505	6,462	Wykryto mutację
M4	58,077	29,158	0,502			
M5	54,251	37,221	0,686	0,672	8,586	Wykryto mutację
M5	54,979	36,125	0,657			
M6	46,185	44,498	0,963	0,954	12,2	Wykryto mutację
M6	45,077	42,598	0,945			
S 1	13,47	37,409	2,777	2,852	36,464	Mutacja (78–100%)
S 1	14,559	42,616	2,927			
S 2	50,432	24,958	0,495	0,505	6,46	Mutacja (12,5–31%)
S 2	53,797	27,746	0,516			
S 3	52,038	5,995	0,115	0,117	1,49	Wynik niejednoznaczny
S 3	54,01	6,364	0,118			
S 4	50,811	4,842	0,095	0,048	0,609	Wynik niejednoznaczny
S 4	0,01	–	0			
GZ	1,425	1,607				

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań (frequently asked questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące danych i/lub protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń (informacje kontaktowe — patrz „Informacje kontaktowe”, strona 59).

Komentarze i wskazówki

Negatywny sygnał w kontroli pozytywnej

- | | |
|--|---|
| a) Błąd pipetowania | Należy sprawdzić schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórzyć reakcję PCR. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Zestaw ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit należy przechowywać w temperaturze od -15 do -30°C, a mieszaninę starterów i sond (PPM) należy chronić przed światłem. Patrz część „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami” na stronie 11.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

W celu przechowywania należy podzielić odczynniki na porcje. |

Pozytywny sygnał w kontrolach negatywnych

- | | |
|---------------------------|--|
| Zanieczyszczenie krzyżowe | Należy wymienić wszystkie kluczowe odczynniki.

Powtórzyć eksperyment, używając nowych porcji wszystkich odczynników.

Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze należy postępować z próbkami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami. |
|---------------------------|--|

Komentarze i wskazówki

Brak sygnału, nawet w kontrolach pozytywnych

- | | |
|--|---|
| a) Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników | Należy sprawdzić schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
Powtórzyć reakcję PCR. |
| b) Efekt hamujący materiału próbki spowodowany niewystarczającym oczyszczeniem | Należy ponownie przygotować DNA. |
| c) LightCycler: Wybrano nieprawidłowy kanał detekcji | Należy zmienić ustawienie kanału na F1/F2 lub 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Nie zaprogramowano akwizycji danych | Sprawdzić programy cykli.
Wybrać „pojedynczy” tryb akwizycji przy końcu każdego segmentu hybrydyzacji w programie reakcji PCR. |

Brak sygnału lub słaby sygnał w próbkach, ale prawidłowy sygnał w kontrolach pozytywnych

- | | |
|--------------------------------------|---|
| Słaba jakość lub niskie stężenie DNA | Przed rozpoczęciem należy zawsze sprawdzić jakość i stężenie DNA. |
|--------------------------------------|---|

LightCycler: Zbyt niskie natężenie fluorescencji

- | | |
|--|---|
| a) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Zestaw ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit należy przechowywać w temperaturze od -15 do -30°C, a mieszaninę starterów i sond (PPM) należy chronić przed światłem. Patrz część „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami” na stronie 11.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

W celu przechowywania należy podzielić odczynniki na porcje. |
| b) Bardzo niska początkowa ilość docelowego DNA | Należy zwiększyć ilość DNA próbki.
Uwaga: W zależności od wybranej metody przygotowania DNA może wystąpić efekt hamujący. |

LightCycler: Zmienne natężenie fluorescencji

- | | |
|--|--|
| a) Błąd pipetowania | Zmienność spowodowaną tzw. „błędem pipetowania” można zredukować poprzez analizę danych przy ustawieniu F1/F2 lub 530 nm/640 nm. |
| b) Niewystarczające odwirowanie kapilar | Przygotowana mieszanina do reakcji PCR może wciąż znajdować się w górnym naczyniu kapilary lub pęcherzyk powietrza może być zaklinowany na końcu kapilary.

Kapilary, do których załadowana jest mieszanina reakcyjna, należy zawsze odwirowywać w sposób opisany w instrukcji obsługi danego aparatu. |
| c) Zewnętrzna powierzchnia końcówki kapilary jest zabrudzona | Podczas postępowania z kapilarami należy zawsze nosić rękawiczki. |

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu. Certyfikaty analiz są dostępne na żądanie pod adresem www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Przed użyciem wyrobu użytkownicy muszą przejść szkolenie i zaznajomić się z tą technologią. Niniejszego zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanym aparatem wymienionym w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone” na stronie 9.

Wszelkie uzyskane wyniki diagnostyczne należy interpretować w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych. Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację działania systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami skuteczności wykonanymi przez firmę QIAGEN.

Należy zwracać uwagę na daty przydatności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.

Parametry skuteczności

Badania niekliniczne

W celu ustalenia skuteczności analitycznej zestawu ipsogen JAK2 MutaScreen Kit przeprowadzono badania niekliniczne.

Precyzja

Do testów wykorzystano trzy poziomy rozcieńczeń genomowego DNA uzyskanego z linii komórkowych z mutacją JAK2 V617F w DNA typu dzikiego. Rozcieńczenia odpowiadały obciążeniu mutacją w wysokości 1%, 2% i 3%. Dla każdego poziomu wykonano niezależne partie rozcieńczeń, a powtórzenia tych rozcieńczeń przetestowano w 3 osobnych eksperymentach. Stosunki uzyskane dla każdej próbki DNA ($\text{Stosunek}_{\text{próbki}}$) porównano ze stosunkiem dla kontroli negatywnej (JAK2 100% DNA typu dzikiego, $\text{Stosunek}_{\text{NC}}$). Podsumowanie wyników przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Dane precyzji uzyskane w badaniach nieklinicznych

Poziom mutacji	$\text{Stosunek}_{\text{próbki}} > \text{Stosunek}_{\text{NC}}$	%CV (stosunek)
1% V617F DNA	100% (n = 183)	6,8
2% V617F DNA	100% (n = 72)	4,5
3% V617F DNA	100% (n = 135)	5,1

Międzylaboratoryjne dane analityczne

Przeprowadzono wielośrodkowe badanie, w którym brało udział 13 laboratoriów. Zebrano dane analityczne dotyczące rozcieńczeń genomowego DNA z mutacją JAK2 V617F w DNA typu dzikiego. W każdym laboratorium przeprowadzono trzy eksperymenty. W każdym eksperymencie testowano następujące próbki DNA uzyskane z linii komórkowych:

- 1 kontrola negatywna (NC) 0% V617F
- 1 kontrola pozytywna (PC) 100% V617F
- 1 próbka graniczna (COS) 2% V617F
- 3 próbki o średnim obciążeniu mutacją (20%, 50% i 80%)

Eksperymenty przeprowadzono na siedmiu różnych modelach aparatów:

- ABI PRISM 7000 SDS
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
- ABI PRISM 7700 SDS
- ABI PRISM 7900 SDS
- LightCycler 2.0
- iCycler®

Podsumowanie wyników przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Międzylaboratoryjne dane analityczne uzyskane z rozcieńczeń genomowego DNA uzyskanego z linii komórkowych z mutacją JAK2 V617F w DNA typu dzikiego

Detekcja próbki	Próbki pozytywne	Próbki negatywne
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 typu dzikiego	0	36

* Próbki pozytywne obejmowały 36 kontroli pozytywnych (PC), 36 próbek granicznych (COS; 2% V617F), 34 próbki z 20-procentowym obciążeniem mutacją JAK2 V617F, 35 próbek z 50-procentowym obciążeniem mutacją JAK2 V617F i 36 próbek z 80-procentowym obciążeniem mutacją JAK2 V617F.

Badania kliniczne

Porównanie zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i metody ARMS®

Próbki DNA pobrane od 141 pacjentów z podejrzeniem MPN testowano równolegle przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i oznaczenia qPCR opartego na metodzie wykrywania mutacji w układzie opornym na amplifikację (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) (11). Wyniki porównania przedstawiono w Tabeli 19 (tabela kontyngencji 2 x 3) i Tabeli 20 (zgodność procentowa).

Tabela 19. Porównanie metod: zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i metoda ARMS

		Wyniki metody badawczej ARMS		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 V617F <2%	Łącznie
Wyniki metody badawczej <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	Wykryto mutację JAK2 V617F	91	0	91
	Wynik niejednoznaczny	1	2	3
	Nie wykryto mutacji JAK2 typu dzikiego	1	46	47
Łącznie		93	48	n = 141

Tabela 20. Porównanie metod: zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i metoda ARMS

	Zgodność (%)	95-procentowy CI* (%)
Zgodność danych pozytywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit i metodą ARMS	98,9	94,1–99,8
Zgodność danych negatywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit i metodą ARMS	100	92,3–100
Zgodność danych ogółem	99,3	96,0–99,9

* Przedziały ufności (CI) obliczono zgodnie z wytyczną EP12-A instytutu CLSI „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline”.

Porównanie działania zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i sekwencjonowania

Próbki DNA pobrane od 51 pacjentów z podejrzeniem MPN testowano równolegle przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i techniki odniesienia („złoty standard”) — sekwencjonowania bezpośredniego. Wyników dla jednej próbki nie można było zinterpretować z powodu błędu sekwencjonowania. Porównanie wyników uzyskanych z 50 próbek, które można było zinterpretować, przedstawiono w Tabeli 21 (tabela kontyngencji 2 x 3) i Tabeli 22 (zgodność procentowa).

Tabela 21. Porównanie metod: zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i sekwencjonowanie

		Wyniki sekwencjonowania bezpośredniego		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 V617F <2%	Łącznie
Wyniki metody badawczej <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	Wykryto mutację JAK2 V617F	26	1	27
	Wynik niejednoznaczny	0	1	1
	Nie wykryto mutacji JAK2 typu dzikiego	2	20	22
Łącznie		28	22	n = 50

Tabela 22. Porównanie metod: zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i sekwencjonowanie

	Zgodność (%)	95-procentowy CI* (%)
Zgodność danych pozytywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit i sekwencjonowaniem	92,9	77,4–98,0
Zgodność danych negatywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit i metodą ARMS	95,2	77,3–99,2
Zgodność danych ogółem	93,9	83,5–97,9

* Przedziały ufności (Confidence Intervals, CI) obliczono zgodnie z wytyczną EP12-A instytutu CLSI „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline”.

Badanie wielośrodkowe przy użyciu 228 próbek pacjentów

W ramach badania międzylaboratoryjnego próbki DNA pacjentów przeanalizowano w 13 laboratoriach za pomocą technik opracowanych w tych laboratoriach. W każdym laboratorium wykonano trzy eksperymenty, używając DNA z linii komórkowych, zgodnie z opisem w części dotyczącej nieklinicznego badania precyzji (patrz część powyżej), i DNA pobranego od 10 pacjentów, którzy zgłosili się do laboratorium.

228 próbek o znanym genotypie JAK2 testowano równolegle za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit oraz metod opracowanych w laboratoriach, w tym jakościowej reakcji PCR, reakcji PCR ASA (allele specific PCR), metod opartych o fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (FRET), sekwencjonowania, reakcji PCR z oligonukleotydem swoistym względem allelu, metody RFLP i rozróżniania alleli. Wyniki porównań przedstawiono w Tabeli 23 (tabela kontyngencji 2 x 3) i Tabeli 24 (zgodność procentowa).

Tabela 23. Porównanie metod: zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i metody opracowane w laboratorium

		Wyniki testów opracowanych w laboratorium		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 V617F <2%	Łącznie
Wyniki metody badawczej <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	Wykryto mutację JAK2 V617F	139	3	142
	Wynik niejednoznaczny	5	17	22
	Nie wykryto mutacji JAK2 typu dzikiego	3	61	64
Łącznie		147	81	n = 228

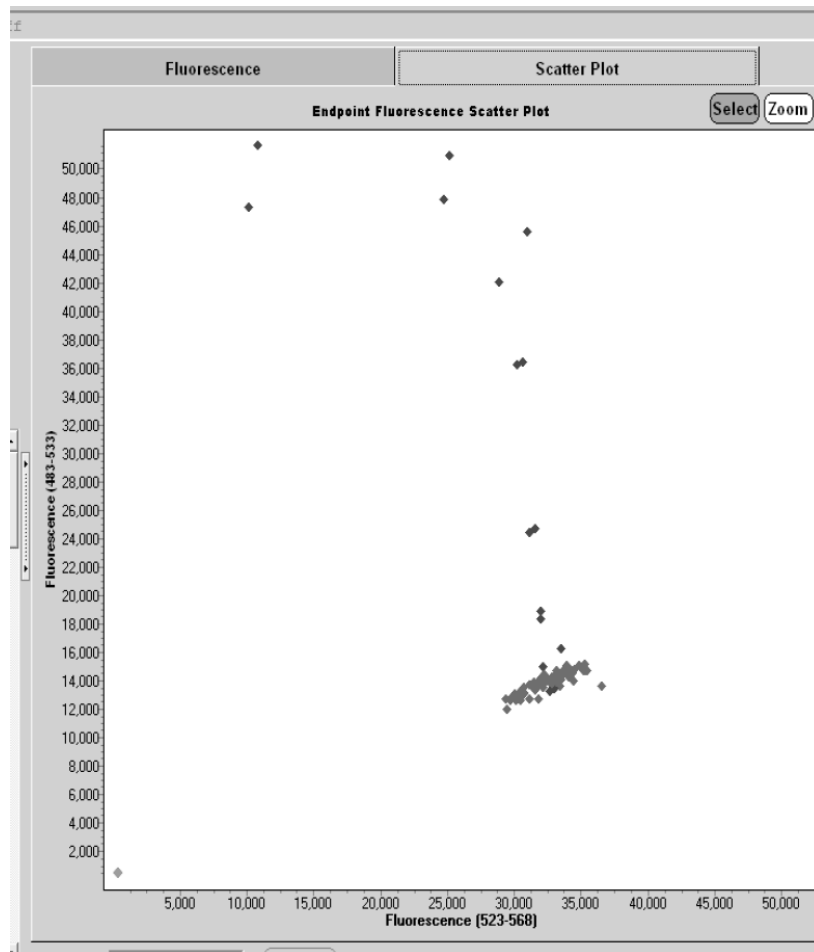
Tabela 24. Porównanie metod: zestaw JAK2 MutaScreen Kit i metody opracowane w laboratorium

	Zgodność (%)	95-procentowy CI* (%)
Zgodność danych pozytywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit i testami opracowanymi w laboratorium	97,9	94,0–99,3
Zgodność danych negatywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit i testami opracowanymi w laboratorium	95,3	87,1–98,4
Zgodność danych ogółem	97,1	93,8–98,7

* Przedziały ufności (Confidence Intervals, CI) obliczono zgodnie z wytyczną EP12-A instytutu CLSI „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline”.

Odporność: testowanie próbek od zdrowych dawców

Próbki DNA pobrane od 103 zdrowych dawców krwi przeanalizowano za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit. Wszystkie próbki zidentyfikowano jako JAK2 typu dzikiego. Wyniki analizy 38 próbek za pomocą aparatu LightCycler 480 przedstawiono na Ryc. 34.



Ryc. 34. Analiza próbek pobranych od zdrowych dawców. Analiza 38 próbek pobranych od zdrowych dawców wykonywana za pomocą aparatu LightCycler 480 (◆) przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit (nr kat. 673123). Wyniki pozytywne w powtórzeniach (◆) odpowiadają skali odniesienia dostarczonej z zestawem. Wartości fluorescencji VIC są wykreślone na osi x, a wartości FAM na osi y.

Literatura

1. Ma, W., et al. (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diagn.* **11**, 49.
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.

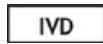
Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji



Data ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii



Numer materiału



Globalny numer jednostki handlowej



Zakres temperatury



Producent



Zapoznać się z instrukcją użycia

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego centrum pomocy technicznej pod adresem **www.qiagen.com/Support**, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona **www.qiagen.com**).

Dane do zamówienia

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen RS Kit (19)	Na 19 reakcji: kontrola pozytywna V617F, kontrola negatywna V617F, skala referencyjna V617F, mieszanina starterów i sond JAK2 typu dzikiego i JAK2 V617F	673123
Rotor-Gene Q MDx — do analizy real-time PCR w zastosowaniach klinicznych, zwalidowany do użytku w diagnostyce in vitro (IVD)		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robocizną, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robocizną; obejmuje instalację i przeszkolenie	9002033

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów można znaleźć w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Strona celowo pozostawiona pusta

Strona celowo pozostawiona pusta

Ten produkt jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Produkty *ipsogen* nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży ani wykorzystywane do produkcji komercyjnych produktów bez pisemnej zgody firmy QIAGEN.

Informacje zawarte w niniejszym dokumencie mogą ulec zmianie bez powiadomienia. Firma QIAGEN nie ponosi żadnej odpowiedzialności za ewentualne błędy, które mogą być obecne w niniejszym dokumencie. Dokument ten uważa się za zawierający kompletne i poprawne informacje w momencie jego opublikowania. Firma QIAGEN nie ponosi w żadnym wypadku odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody uboczne, specjalne lub wynikowe ani z tytułu odszkodowania wielokrotnego w związku z niniejszym dokumentem lub jego użyciem.

Produkty *ipsogen* są objęte gwarancją w odniesieniu do podanych specyfikacji. Wyłącznym obowiązkiem firmy QIAGEN i jedynym zadośćuczynieniem przysługującym klientowi jest bezpłatna wymiana produktów w przypadku, gdy ich działanie nie będzie zgodne z zapisami gwarancji.

Produkt ten jest sprzedawany na podstawie umowy licencyjnej z firmą Epoch Biosciences do użytku wyłącznie w diagnostyce in vitro i nie może być używany do jakichkolwiek innych zastosowań badawczych, komercyjnych lub klinicznych ani innych zastosowań poza obszarem diagnostyki in vitro.

Mutacja JAK2 V617F i jej zastosowania są chronione prawami patentowymi, w tym patentem europejskim EP1692281, patentami amerykańskimi 7,429,456 i 7,781,199, amerykańskimi zgłoszeniami patentowymi US20090162849 i US20120066776 i zagranicznymi odpowiednikami.

Zakup tego produktu nie przenosi żadnych praw do jego wykorzystania w badaniach klinicznych leków ukierunkowanych na JAK2 V617F. Firma QIAGEN opracowuje specjalne programy licencyjne dla takich zastosowań. W tej sprawie należy kontaktować się z naszym działem prawnym pod adresem jak2licenses@qiagen.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, VIC® (Thermo Fisher Scientific Inc.); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); Excel® (Microsoft Corporation); iCycle® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); MGB™ (Epoch Biosciences).

Umowa ograniczonej licencji

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody przez nabywcę lub użytkownika zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit na następujące warunki:

1. Zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit można używać wyłącznie razem ze składnikami zawartymi w zestawie oraz zgodnie z instrukcją obsługi zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania składników niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w instrukcji obsługi zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie naruszają praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji, wyrażonych ani dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.qiagen.com.

HB-1372-003 © 2013–2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com

