

Czerwiec 2016 r.

ipsogen[®] JAK2 MutaScreen Kit — Instrukcja obsługi



10 (nr katalogowy 673022)



24 (nr katalogowy 673023)

Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

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



REF

673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R3

MAT

1072500PL



Sample & Assay Technologies

Technologie postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń firmy QIAGEN

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 microRNA 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
Materiały dostarczone w zestawie	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 próbki	12
Protokół: reakcja qPCR w aparatach Applied Biosystems i ABI PRISM	22
Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 480	31
Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 2.0	39
Interpretacja wyników	44
Graficzne przedstawienie i kryteria kontroli jakości	44
Obliczenie znormalizowanego stosunku FAM/VIC i genotypowanie	45
Rozwiązywanie problemów	48
Kontrola jakości	50
Ograniczenia	50
Charakterystyka działania testu	51
Badania niekliniczne	51
Badania kliniczne	52
Literatura	57
Symbole	58
Informacje kontaktowe	58
Informacje dotyczące zamawiania	59

Przeznaczenie

Zestawy *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit są przeznaczone do wykrywania 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 (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% spośród pacjentów z czerwienicą prawdziwą (polycythemia vera, PV), 50–60% spośród pacjentów z nadpłytkowością samoistną (essential thrombocythemia, ET) oraz 50% spośród pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku (primary myelofibrosis, PMF). Mutację JAK2 V617F wykryto również w niektórych rzadkich przypadkach przewlekłej białaczki mielomonocytowej, zespołu mielodysplastycznego, mastocytozy ogólnoustrojowej oraz przewlekłej białaczki neutrofilowej. Nie wykryto jej jednak w żadnym przypadku (0%) przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myeloid leukemia, CML) (6).

Mutacja dotyczy zmiany pojedynczego nukleotydu w genie JAK2 — nukleotydu 1849 w egzonie 14 — co powoduje unikalną substytucję waliny (V) przez fenyloalaninę (F) w pozycji 617 białka (domena JH2). Prowadzi to do konstytutywnej aktywacji białka JAK2, hematopoetycznej transformacji *in vitro* i wzrostu kolonii erytroidalnych niezależny 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. Wykrycie mutacji JAK2 V617F jest teraz częścią kryteriów referencyjnych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO) rozpoznania nowotworów mieloproliferacyjnych BCR-ABL-ujemnych (Tabela 1) z 2008 roku, a obecność tej mutacji jest większym kryterium potwierdzającym rozpoznanie.

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

Kryteria rozpoznania czerwienicy prawdziwej (PV)	
Większe	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stężenie hemoglobiny (Hgb) $>18,5 \text{ g/dl}^{-1}$ (mężczyźni) lub $>16,5 \text{ g/dl}^{-1}$ (kobiety) lub Hgb lub hematokryt (Hct) $>99.$ percentyla zakresu referencyjnego dla wieku, płci lub wysokości miejsca zamieszkania nad poziomem morza lub Hgb $>17 \text{ g/dl}^{-1}$ (mężczyźni) lub $>15 \text{ g/dl}^{-1}$ (kobiety) w przypadku utrzymującego przyrostu o $\geq 2 \text{ g/dl}^{-1}$ w porównaniu do wartości wyjściowej, którego nie można powiązać z leczeniem niedoboru żelaza lub wzrost masy krwinek czerwonych $>25\%$ powyżej średniej przewidzianej wartości prawidłowej 2. Obecność mutacji <i>JAK2 V617F</i> lub podobnej mutacji
Mniejsze	<ol style="list-style-type: none"> 1. Trójukładowa mieloproliferacja w szpiku kostnym 2. Stężenie erytropoetyny w surowicy poniżej normy 3. Endogeny wzrost kolonii erytroidalnych (endogenous erythroid colony, EEC)
Kryteria rozpoznania nadpłytkowości samoistnej (ET)	
Większe	<ol style="list-style-type: none"> 1. Liczba płytek krwi $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Proliferacja w linii megakariocytarnej, z dużymi megakariocytami o dojrzałej morfologii. Brak lub słaba proliferacja w linii granulocytarnej lub erytroidalnej 3. Niespełnienie kryteriów WHO rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej (CML), PV, pierwotnego zwłóknienia szpiku (PMF), zespołu mielodysplastycznego (myelodysplastic syndrome, MDS) lub innego nowotworu szpiku kostnego 4. Wykazanie obecności mutacji <i>JAK2 V617F</i> 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. Proliferacja i atypia w linii megakariocytarnej z jednoczesnym występowaniem włóknienia retikulinowego i/lub kolagenowego lub (w przypadku nieobecności włóknienia retikulinowego) zmiany w linii megakariocytarnej, które muszą być powiązane ze zwiększoną komórkowością szpiku kostnego, proliferacją w linii granulocytarnej i często obniżoną erytropoezą (tj. prefibrotyczna faza PMF) 2. Niespełnienie kryteriów WHO rozpoznania (CML), PV, MDS lub innego nowotworu szpiku kostnego 3. Wykazanie obecności mutacji <i>JAK2 V617F</i> lub innego markera klonalności lub Brak dowodów na reaktywne zwłóknienie szpiku kostnego
Mniejsze	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leukoerytoblastoza 2. Wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (lactate dehydrogenase, LDH) w surowicy 3. Anemia 4. Splenomegalia wyczuwalna w badaniu palpacyjnym

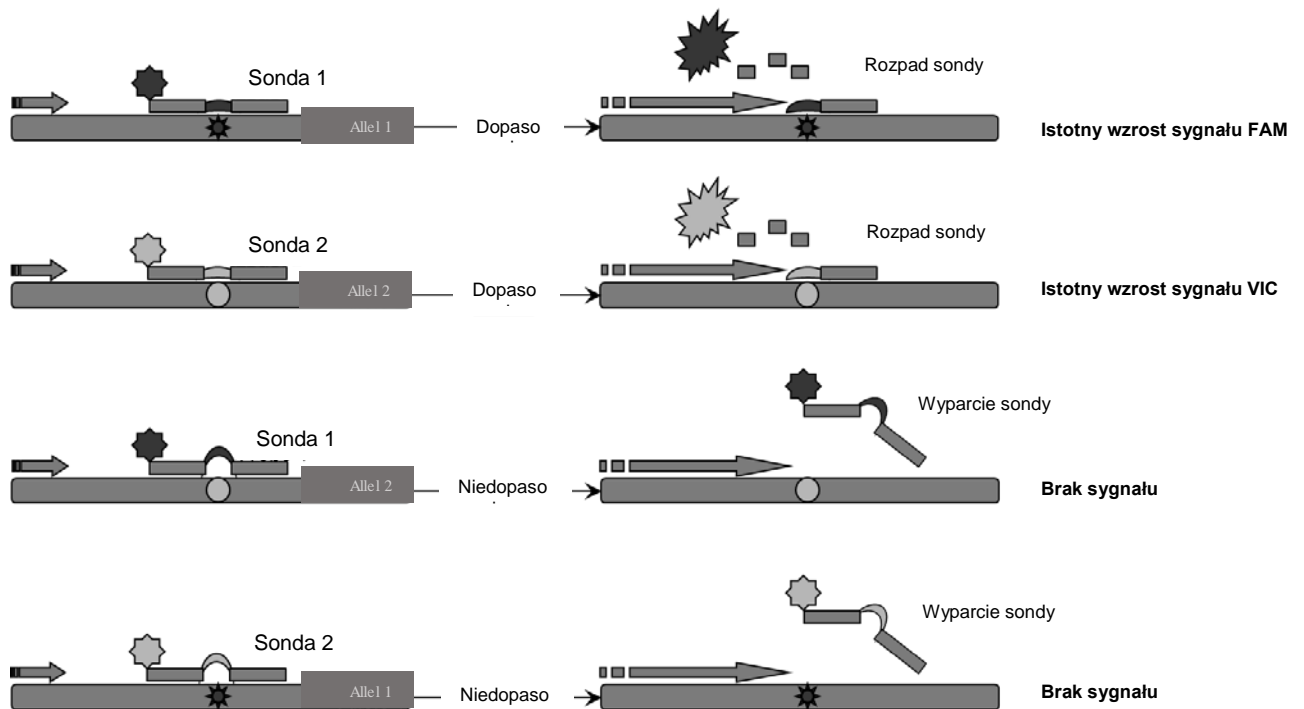
W ostatnim czasie międzynarodowi eksperci zaproponowali kryteria dla badań klinicznych produktów leczniczych w chorobach PV i ET. W oparciu o dane dotyczące przeszczepu allogenicznego, alfa-interferonu lub hydroksymocznika, oznaczenie ilościowe mutacji JAK2 V617F zostało włączone jako narzędzie potencjalnie 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 umożliwiającym rozróżnienie alleli używane są dwie sondy TaqMan® w reakcji multipleks. Jedna sonda pasuje idealnie 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' odróżniającym fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym (ang. reporter), takim jak FAM™ lub VIC®, a na końcu 3' zawiera niefluorescencyjny barwnik pełniący rolę wygaszacza (ang. quencher). Sondy zawierają również grupę przyłączającą się do małego rowka DNA (MGB™), co zapewnia większą stabilność podczas korzystania z krótszych sond i, co za tym idzie, bardziej precyzyjne rozróżnienie alleli.

W fazie wydłużania reakcji PCR idealnie dopasowana sonda jest rozcinana przez polimerazę DNA *Taq*, która ma aktywność 5'→3' egzonukleazy, uwalniając barwnik reporterowy od barwnika wygaszającego, co powoduje wykrywalną emisję fluorescencji. Sonda, która nie została idealnie dopasowana, nie zostanie rozcięta przez polimerazę DNA *Taq*, tylko wyparta. 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 skażenia. Rzeczywista ilość docelowej sekwencji nie jest oznaczana.

Opisana powyżej technologia jest wykorzystywana w zestawie *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit w przedstawiony sposób (patrz Ryc. 1).



Ryc. 1. Reakcja multipleks z sondą TaqMan. Opisana powyżej technologia jest wykorzystywana w zestawie *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit do rozróżniania alleli.

Materiały dostarczone w zestawie

Zawartość zestawu

<i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i>		(10)	(24)
Nr katalogowy		673022	673023
Liczba reakcji		24	10
V617F Positive Control (Kontrola pozytywna V617F)*	PC-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control (Kontrola negatywna V617F)†	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample (Próbka graniczna)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix			
JAK2 V617F (Mieszanka starterów i sond JAK2 V617F)‡	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
ipsogen JAK2 MutaScreen Kit Handbook (English) (ipsogen <i>JAK2 MutaScreen Kit</i> — Instrukcja obsługi (w języku angielskim))		1	1

* Kontrola pozytywna: 100% V617F DNA.

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

‡ 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 nieznanego DNA 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 używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. 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
- 1x stężony bufor TE wolny od nukleaz, pH 8,0 (np. firmy Thermo Fisher Scientific Inc., nr kat. 12090015)
- Bufor i polimeraza DNA *Taq*: zwalidowane odczynniki to mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix (2x stężona mieszanina Master Mix do reakcji PCR) (Thermo Fisher Scientific Inc., nr kat. 4304437) i mieszanina LightCycler TaqMan Master (5x stężona mieszanina Master Mix do reakcji PCR) (Roche, nr kat. 04535286001)
- Odczynniki do przygotowania żelu agarozowego o stężeniu 0,8–1% w 0,5x stężonym buforze TBE do elektroforezy

Materiały eksploatacyjne

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

Wyposażenie

- Pipety* przeznaczone do przygotowywania reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- 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 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 elektroforezy pulsacyjnej (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 używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS). Są one dostępne w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem **www.qiagen.com/safety**. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki 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 wydajności. 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 wydajność testu, nie należy zastępować żadnych odczynników.

Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec:

- zanieczyszczeniu DNazą, która może spowodować rozkład matrycy DNA;
- przenoszeniu zanieczyszczeń DNA lub 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, na każdym etapie pipetowania używać świeżych, odpornych na areozole końcówek do pipet.

- Przygotowywać mieszaninę master mix przed wykonaniem reakcji PCR, używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.) w odrębnym obszarze, do którego nie są wprowadzane żadne matryce DNA (DNA, plazmid). Dodawać matrycę 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 -30°C do -15°C .

- Zminimalizować ekspozycję na światło mieszanin starterów i sond (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 wydajność produktu zostanie zachowana do upływu daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

Nie istnieją żadne możliwe do zaobserwowania wyraźne oznaki wskazujące na niestabilność produktu. Jednakże wraz z próbką o nieznanym charakterze należy analizować kontrole pozytywne i negatywne.

Procedura

Przygotowanie DNA próbki

Genomowe 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 własnej 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. Mniejszy stosunek zwykle wskazuje na zanieczyszczenie białkami lub związkami organicznymi. Po wykonaniu analizy elektroforetycznej w żelu agarozowym o stężeniu 0,8–1% wyizolowane DNA powinno być widoczne jako wyraźny prążek o wielkości około 20 kb. Akceptowalna jest słabo widoczna smuga.

Otrzymane DNA jest rozcieńczane do stężenia 5 ng/μl w buforze TE. 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.

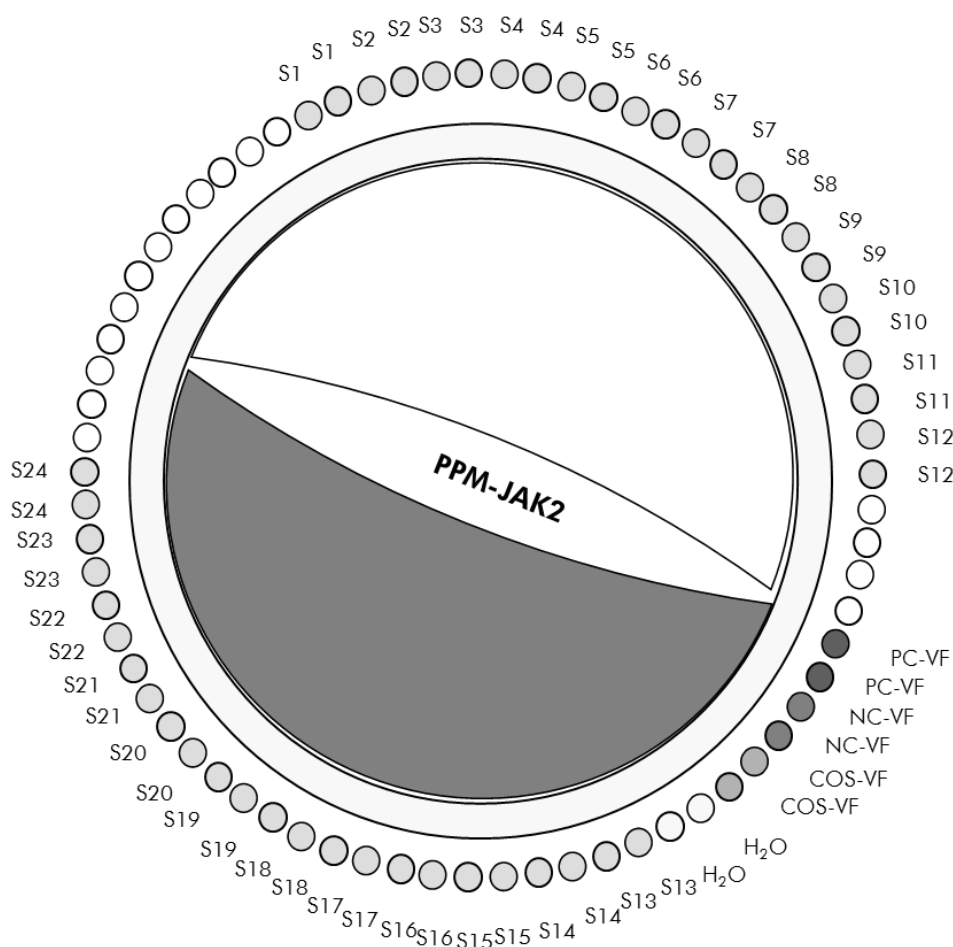
Protokół: reakcja qPCR w aparatach Rotor Gene Q z rotorem na 72 probówki

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 próbki

Próbki	Reakcje
Mieszananina starterów i sond JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reakcji)	
24 próbki DNA	24 x 2 reakcje
3 kontrole DNA	3 x 2 reakcje (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

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



Ryc. 2. Sugerowane ustawienie rotora dla eksperymentu z zestawem *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC-VF: kontrola pozytywna; NC-VF: kontrola negatywna; COS-VF: próbka graniczna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Uwaga: Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać badaną próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie podczas etapu kalibracji aparat nie wykona kalibracji i zostaną zarejestrowane nieprawidłowe dane 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. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząśnij i krótko odwiruj wszystkie probówki (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 3 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość 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 aparatów Rotor-Gene zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit można użyć do analizy 24 próbek w dwóch powtórzeniach w jednym eksperymencie (Ryc. 2), 20 próbek w dwóch powtórzeniach w dwóch eksperymentach lub 15 próbek w dwóch powtórzeniach w trzech eksperymentach.

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	Liczba reakcji (μl)				Objętość końcowa
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x stężona	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x stężona	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	5	285	145	95	–
Próbka (dodawana w kroku 5)	5	5 na każdą	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25	25 na każdą	25 na każdą	25 na każdą	–

* 24 próbki; jeden eksperyment/zestaw.

† 10 próbek; dwa eksperymenty/zestaw.

‡ 5 próbek; trzy eksperymenty/zestaw.

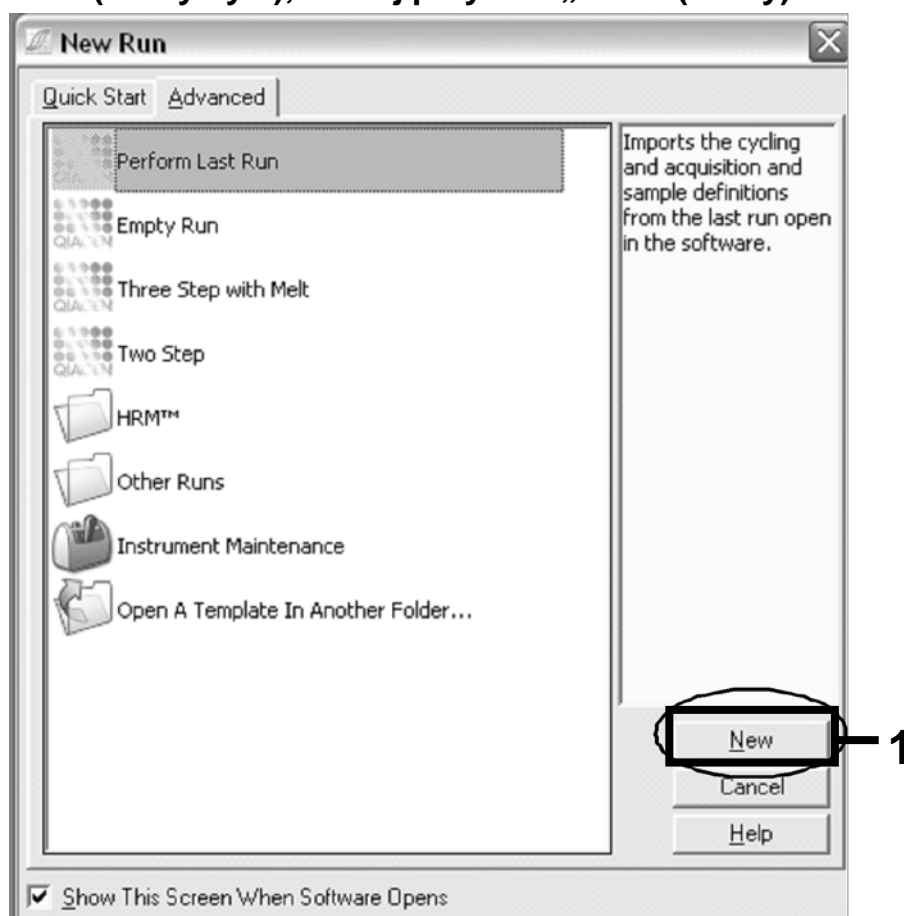
4. **Wytrząśnij i krótko odwiruj mieszaninę qPCR (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
5. **Dodaj po 20 μl wstępnej mieszaniny qPCR na probówkę.**
6. **Dodaj po 5 μl materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiednich probówek (całkowita objętość 25 μl).**
7. **Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.**
8. **Zamknij probówki PCR. Umieść probówki w rotorze na 72 probówki zgodnie z zaleceniami producenta. We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste probówki.**

- Upewnij się, że pierścień blokujący (akcesorium do aparatu Rotor-Gene) jest umieszczony na górze rotora, aby zapobiec przypadkowemu otwarciu się próbek podczas wirowania. Umieść rotor w aparacie RotorGene Q zgodnie z zaleceniami producenta.
- W celu detekcji DNA genu JAK2 utwórz profil temperaturowy, wykonując poniższe kroki.

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

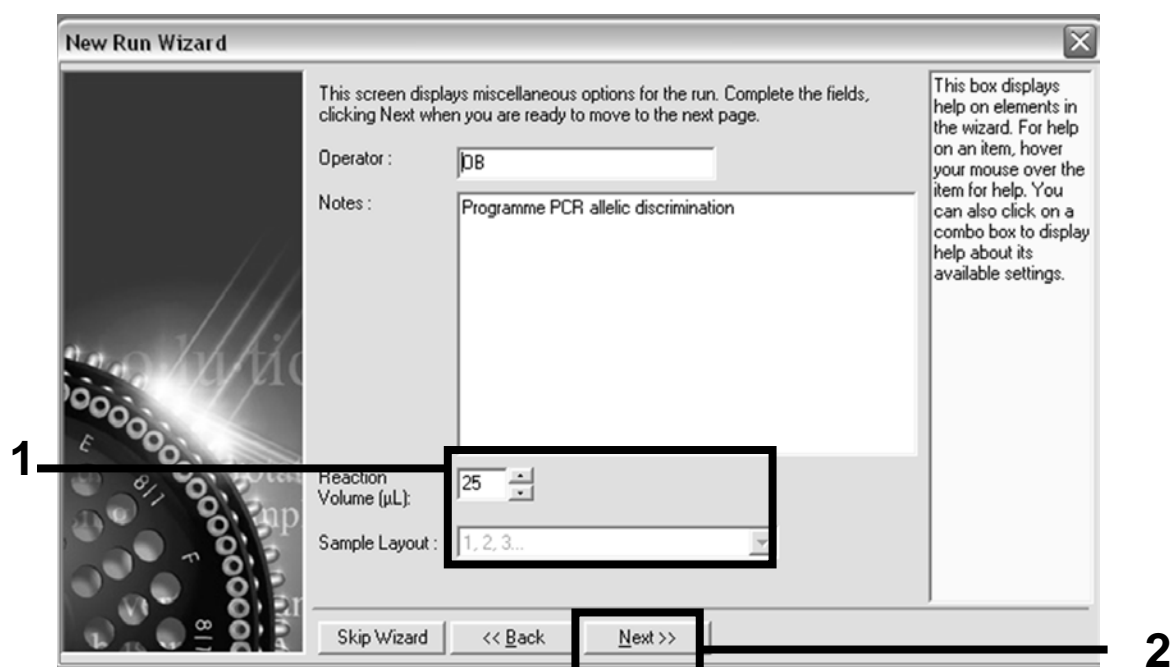
Dalsze informacje na temat programowania aparatów Rotor-Gene można znaleźć w instrukcji obsługi aparatu. Na ilustracjach ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną ramką. Przedstawione ilustracje dotyczą aparatów Rotor-Gene Q.

- Uruchom oprogramowanie Rotor-Gene. W oknie dialogowym „New run” (Nowy cykl), kliknij przycisk „New” (Nowy).



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

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

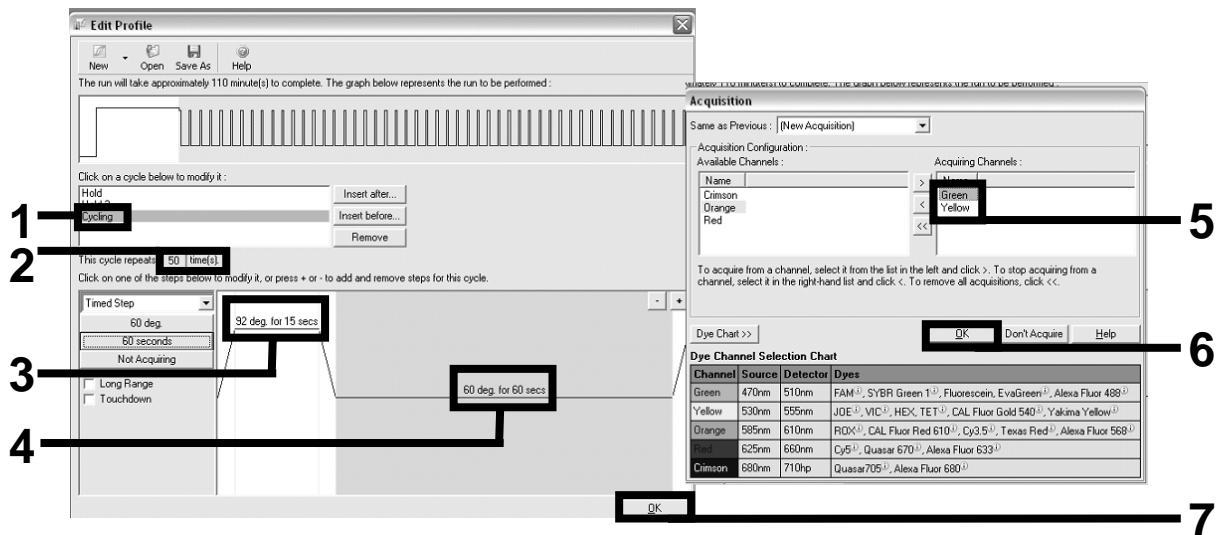


Ryc. 4. Ustawianie ogólnych parametrów badania.

13. Kliknij przycisk „Edit Profile” (Edytuj profil) w kolejnym oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu), a następnie zaprogramuj profil temperaturowy w sposób przedstawiony w Tabeli 4 i na Ryc. 5. Upewnij się, że dla każdego cyklu dodano ostatni etap rejestracji przy 60°C dla kanału zielonego (FAM) i żółtego (VIC).

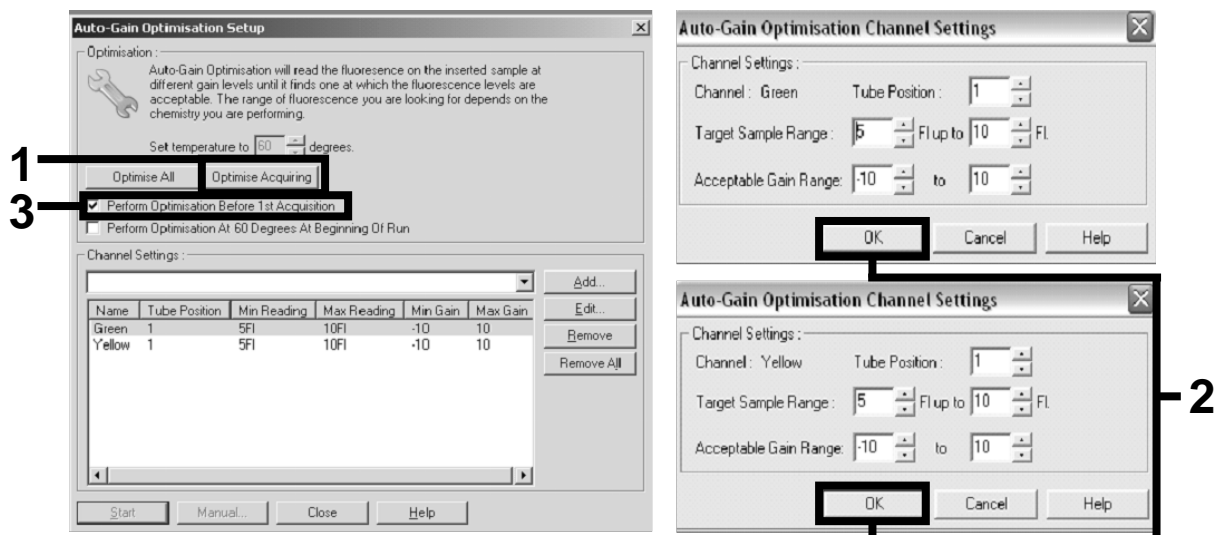
Tabela 4. Profil temperaturowy

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 FAM w zielonym kanale rejestracji Akwizycja fluorescencji VIC w żółtym kanale rejestracji



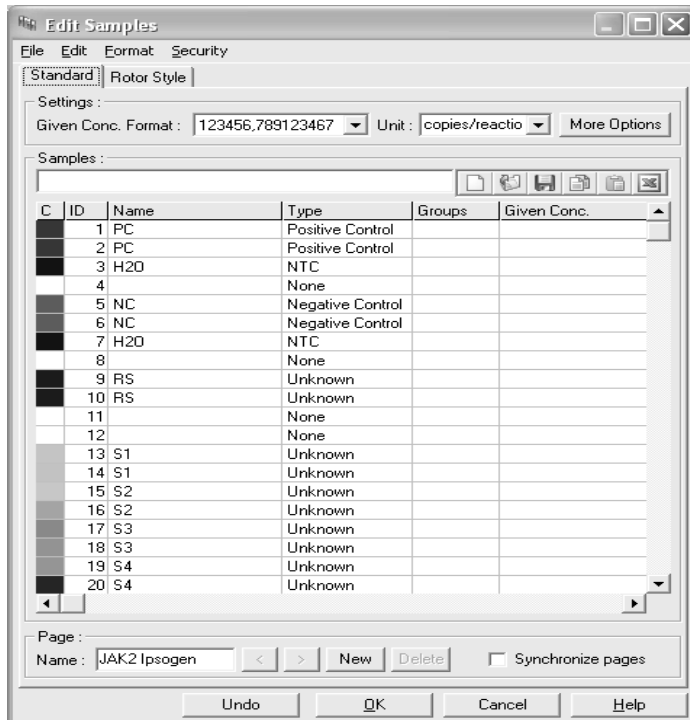
Ryc. 5. Amplifikacja DNA.

14. Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych należy określić na podstawie natężenia fluorescencji w probówkach PCR. Kliknij 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). Kliknij przycisk „Optimise Acquiring” (Optymalizuj rejestrację) (Ryc. 6), a następnie kliknij przycisk „OK” w oknach dialogowych „Auto-Gain Optimisation Channel Settings” (Ustawienia optymalizacji wzmocnienia automatycznego kanału) dla każdego kanału (zielonego i żółtego, Ryc. 6). Upewnij się, że dla każdego kanału zaznaczono pole wyboru „Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Wykonaj optymalizację przed pierwszą rejestracją) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego.

15. Wartości wzmacnienia określone podczas kalibracji kanału są zapisywane automatycznie i wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania. Kliknij przycisk „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby uruchomić program.
16. Wprowadź konfigurację rotora w oprogramowaniu Rotor-Gene (Ryc. 7).



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

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

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



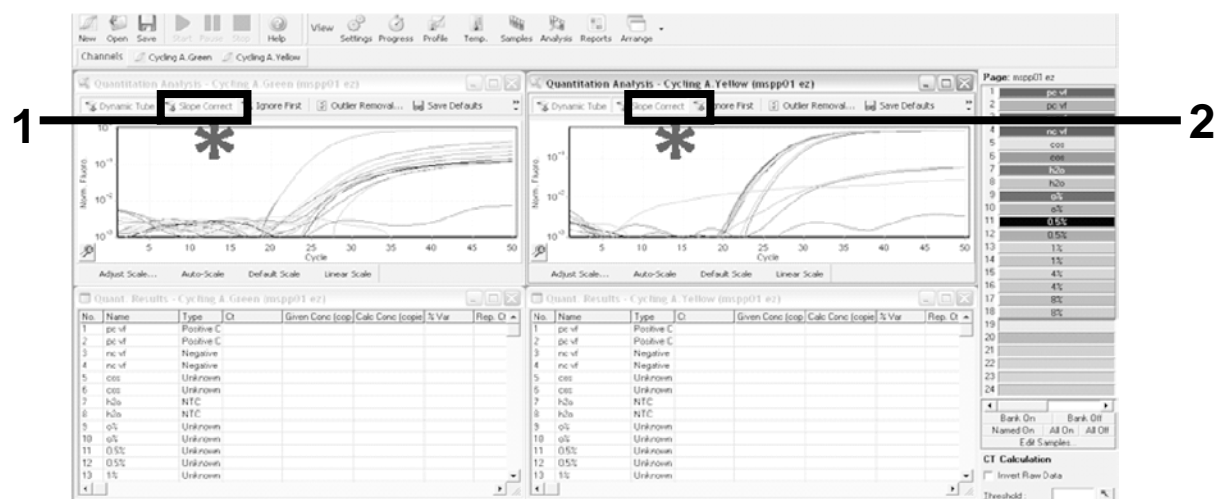
Ryc. 8. Analysis (Analiza).

18. W oknie dialogowym „Analysis” (Analiza) (Ryc. 9) kliknij dwukrotnie opcję „Cycling A Green” (Zielony kanał rejestracji), a następnie przycisk „OK”. Powtórz dla żółtego kanału rejestracji.



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

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



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

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

21. Otwórz plik tekstowy w programie Excel i wybierz kolumnę A. Kliknij opcję „Data” (Dane), następnie opcję „Convert” (Przekształć) i „Next” (Dalej). Wybierz opcję „Comma” (Przecinek), a następnie kliknij przycisk „End” (Zakończ).

Wyniki będą wyświetlane w sposób przedstawiony na Ryc. 11.

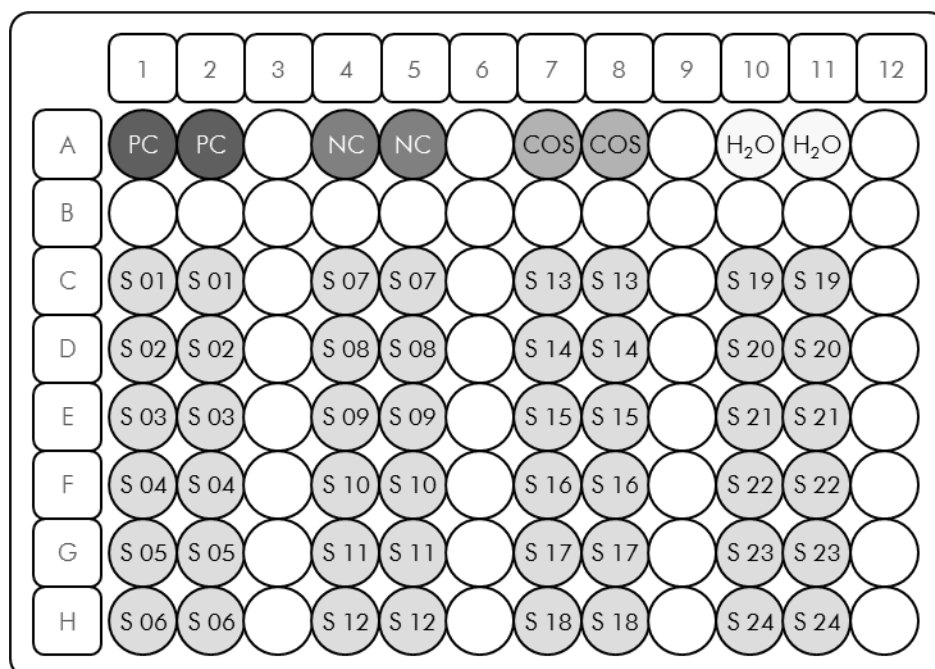
Protokół: reakcja qPCR w aparatach Applied Biosystems i ABI PRISM

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)	
24 próbki DNA	24 x 2 reakcje
3 kontrole DNA	3 x 2 reakcje (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

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



Ryc. 12. Sugerowane ustawienie płytki dla eksperymentu z zestawem *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC: kontrola pozytywna; NC: kontrola negatywna; COS: próbka graniczna; 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. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząśnij i krótko odwiruj wszystkie próbki (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie próbki).**
- 3. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 6 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość 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 aparatów Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit można użyć do analizy 24 próbek w dwóch powtórzeniach w jednym eksperymencie (Ryc. 12), 20 próbek w dwóch powtórzeniach w dwóch eksperymentach lub 15 próbek w dwóch powtórzeniach w trzech eksperymentach.

Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	Liczba reakcji (µl)				Objętość końcowa
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x stężona	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x stężona	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	5	285	145	95	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5	5 na każdą	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25	25 na każdą	25 na każdą	25 na każdą	–

* 24 próbki; jeden eksperyment/zestaw.

† 10 próbek; dwa eksperymenty/zestaw.

‡ 5 próbek; trzy eksperymenty/zestaw.

4. Wytrząśnij i krótko odwiruj mieszaninę qPCR (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).
5. Dodaj po 20 µl wstępnej mieszaniny qPCR na studzienkę.
6. Dodaj po 5 µl materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiednich studzienek (całkowita objętość 25 µl).
7. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
8. Zamknij płytkę i krótko odwiruj (300 x g, około 10 s).
9. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Zaprogramuj termocykler na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 7 i rozpocznij cykl.

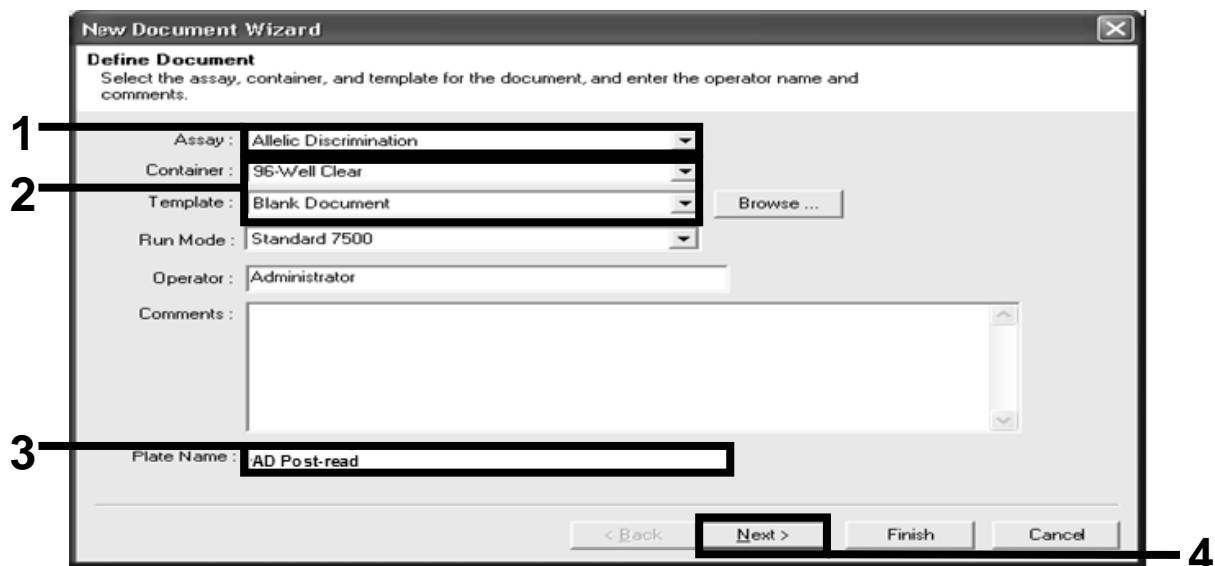
Tabela 7. Profil temperaturowy dla aparatów Applied Biosystems i ABI PRISM

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

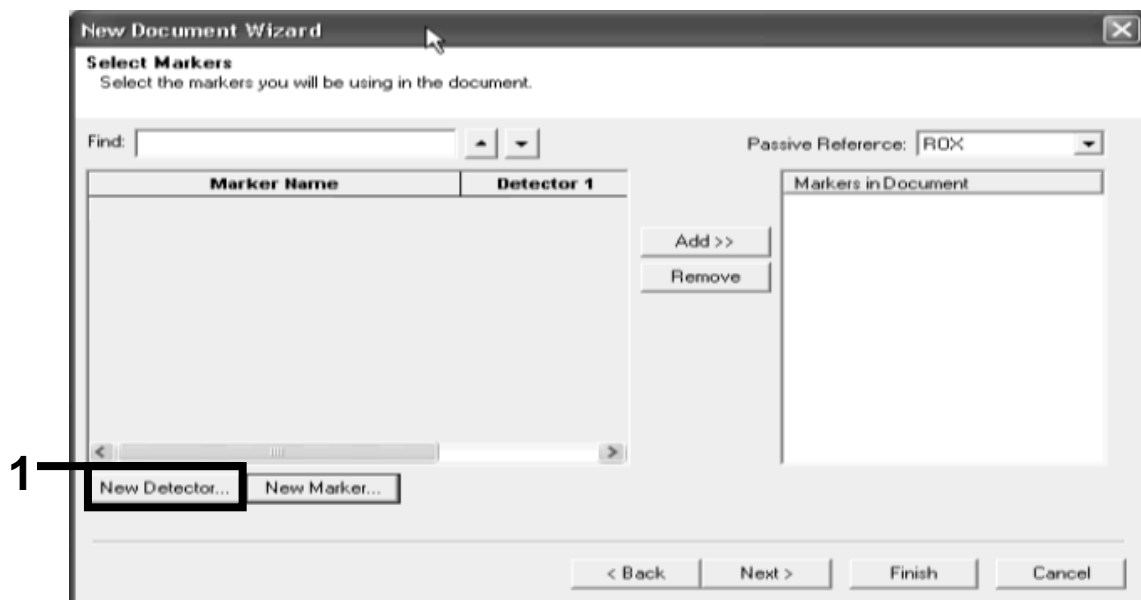
Szczegóły programowania aparatów Applied Biosystems 7300 i 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 lub ABI PRISM 7900HT znajdują się w instrukcji obsługi aparatu. Aby zwiększyć przejrzystość rycin, ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną ramką.

- 11. Po zakończeniu cyklu wybierz opcję „Start/Program” (Uruchom/Program), a następnie wybierz opcję „File/New” (Plik/Nowy).**
- 12. W oknie dialogowym „New Document Wizard” (Kreator nowego dokumentu) kliknij listę rozwijaną „Assay” (Oznaczenie) i wybierz opcję „Allelic Discrimination” (Rozróżnianie alleli) (Ryc. 13).**
- 13. Zaakceptuj domyślne ustawienia dla pól „Container” (Pojemnik) i „Template” (Szablon) („96-Well Clear” (Przezroczysty, 96-dołkowy) i „Blank Document” (Pusty dokument), Ryc. 13). W polu „Plate Name” (Nazwa płytki) wpisz nazwę *AD Post-read* (Ryc. 13), a następnie kliknij przycisk „Next>” (Dalej>), aby uzyskać dostęp do okna dialogowego „Select Markers” (Wybierz znaczniki).**



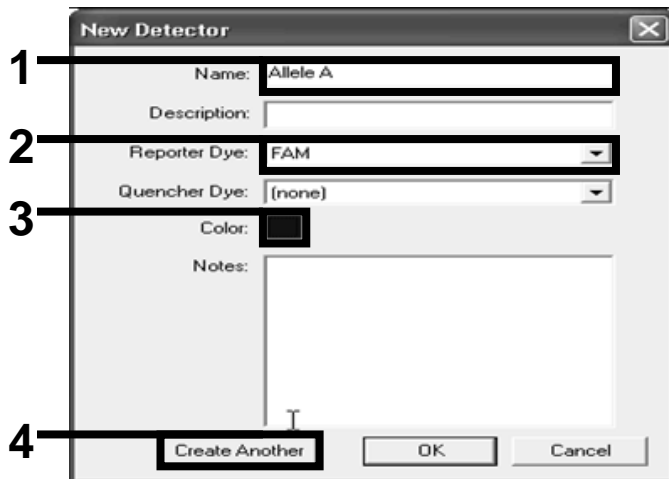
Ryc. 13. Ustawienia wstępne do utworzenia nowego cyklu po odczycie (New Document Wizard (Kreator nowego dokumentu)).

14. Jeśli panel „Markers in Document” (Znaczniki w dokumencie) w oknie dialogowym „Select Markers” (Wybierz znaczniki) zawiera znacznik odpowiedni dla danego zastosowania, przejdź do kroku 18. Jeśli nie, przejdź do kroku 15.
15. Utwórz detektory i znaczniki w następujący sposób. Kliknij przycisk „New Detector” (Nowy detektor) (Ryc. 14).



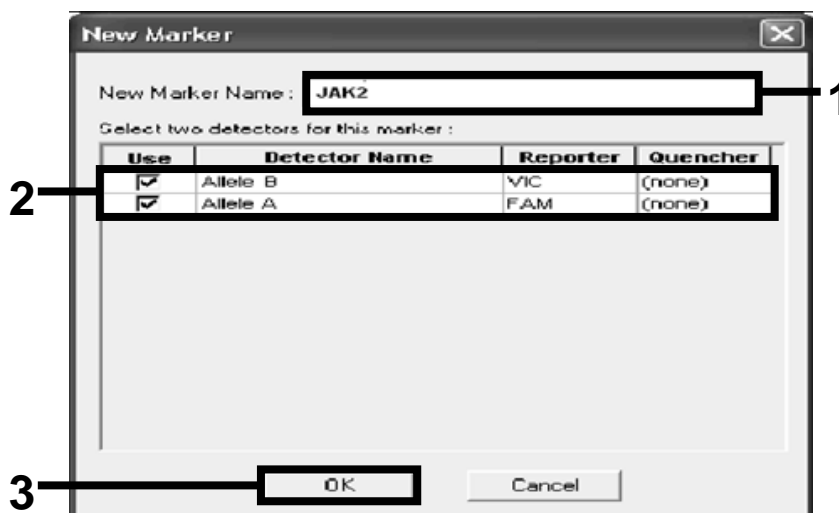
Ryc. 14. Panel „Markers in Document” (Znaczniki w dokumencie) nie zawiera znacznika odpowiedniego dla danego zastosowania.

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



Ryc. 15. Tworzenie detektorów.

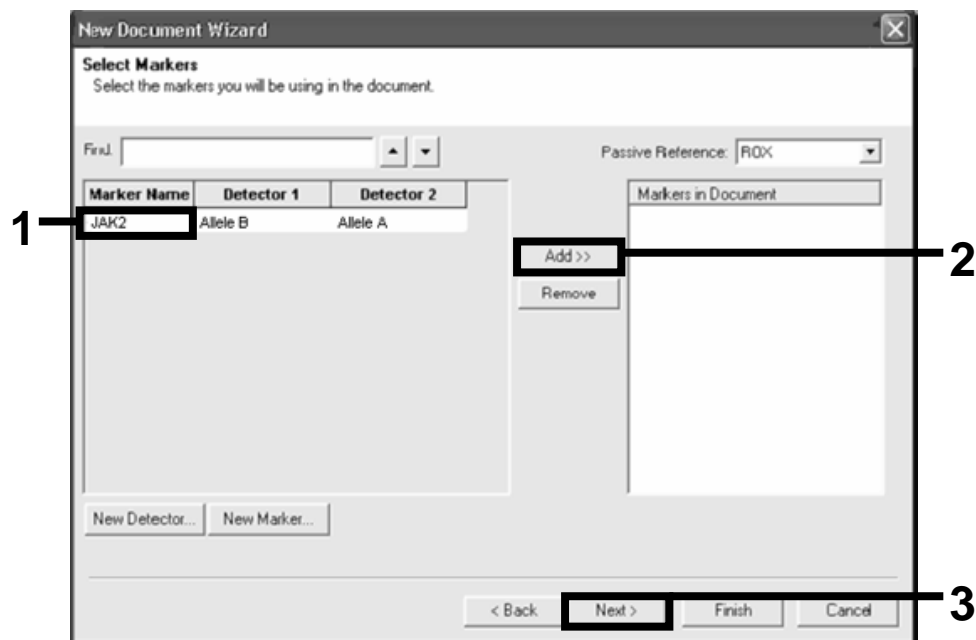
17. W kolejnym oknie dialogowym „New Detector” (Nowy detektor) wpisz nazwę *Allele B* (Allel B) w polu „Name” (Nazwa). Wybierz opcję „VIC” w polu „Reporter Dye” (Barwnik reporterowy). Kliknij przycisk „Color” (Kolor), wybierz kolor, a następnie kliknij przycisk „OK”.
18. Kliknij opcję „New Marker” (Nowy znacznik) w oknie dialogowym „Select Markers” (Wybierz znaczniki) (patrz Ryc. 14).
19. W oknie dialogowym „New Marker” (Nowy znacznik) wpisz nazwę *JAK2* w polu „New Marker Name” (Nazwa nowego znacznika) (Ryc. 16). Wybierz detektory „Allele A” (Allel A) i „Allele B” (Allel B) utworzone w kroku 16 i 17 (lub już zdefiniowane) i kliknij przycisk „OK” (Ryc. 16).



Ryc. 16. Tworzenie znaczników.

20. W oknie dialogowym „Select Markers” (Wybierz znaczniki) wybierz znacznik „JAK2” (utworzony w powyższych etapach) lub odpowiedni wstępnie zdefiniowany znacznik, a następnie kliknij przycisk „Add>>” (Dodaj>>) (Ryc. 17).

Uwaga: Aby usunąć znacznik, wybierz go, a następnie kliknij przycisk „Remove” (Usuń).

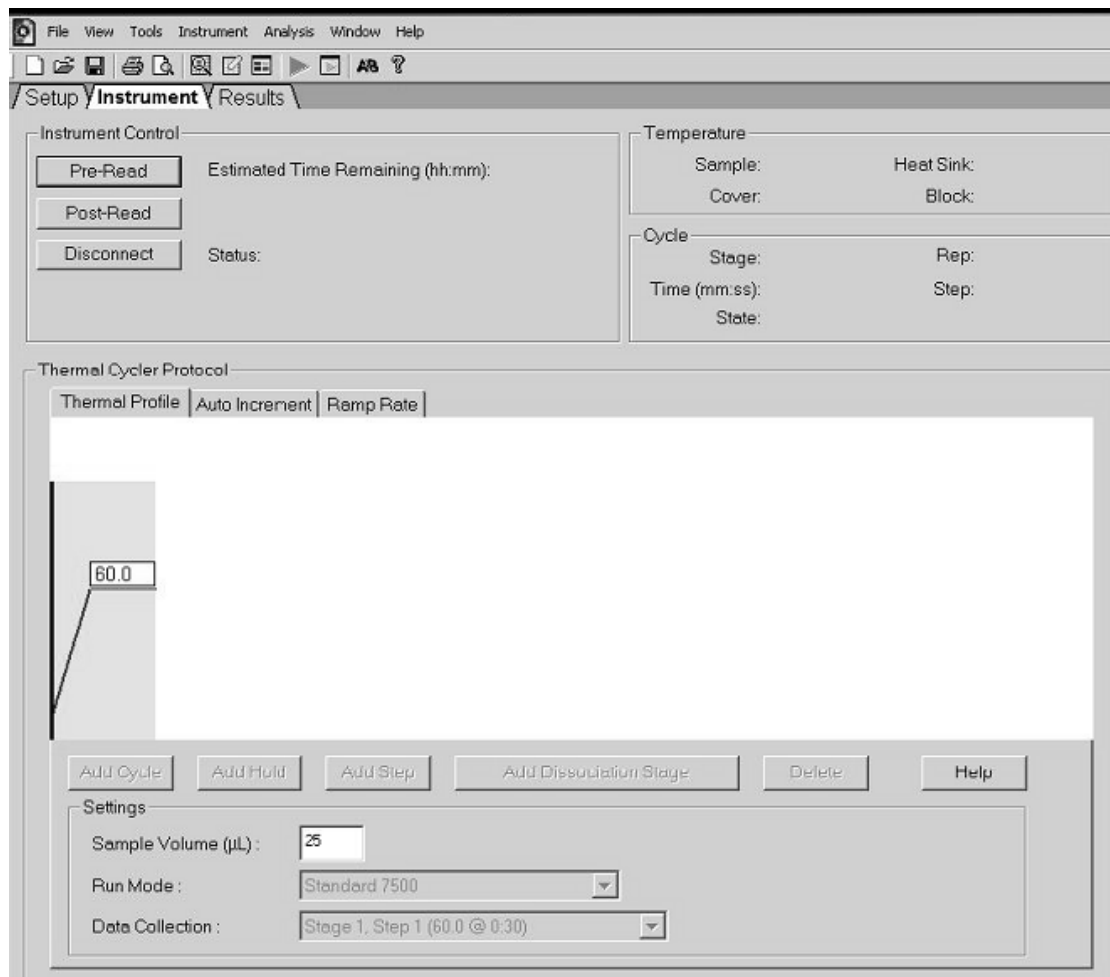


Ryc. 17. Wybieranie znaczników.

21. Kliknij przycisk „Next>” (Dalej>).
22. W oknie dialogowym „Setup Sample Plate” (Konfiguracja płytki próbek) kliknij i przeciągnij znacznik, aby go wybrać dla studzienek, które zawierają próbki. Kliknij przycisk „Finish” (Zakończ).
23. Wybierz kartę „Instrument” (Aparat), a następnie zmień objętość próbki na 25 µl.
24. Wybierz opcję „File/Save” (Plik/Zapisz), a następnie kliknij przycisk „Save” (Zapisz), aby zachować nazwę przypisaną podczas tworzenia płytki.
25. Załaduj płytkę reakcyjną do aparatu zgodnie z zaleceniami producenta.

26. Rozpocznij cykl po odczycie. Kliknij 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 każdej studzience (Ryc. 18).



Ryc. 18. Cykl po odczycie.

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

12 Comments:		1. próbka VIC							1. próbka FAM			
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.

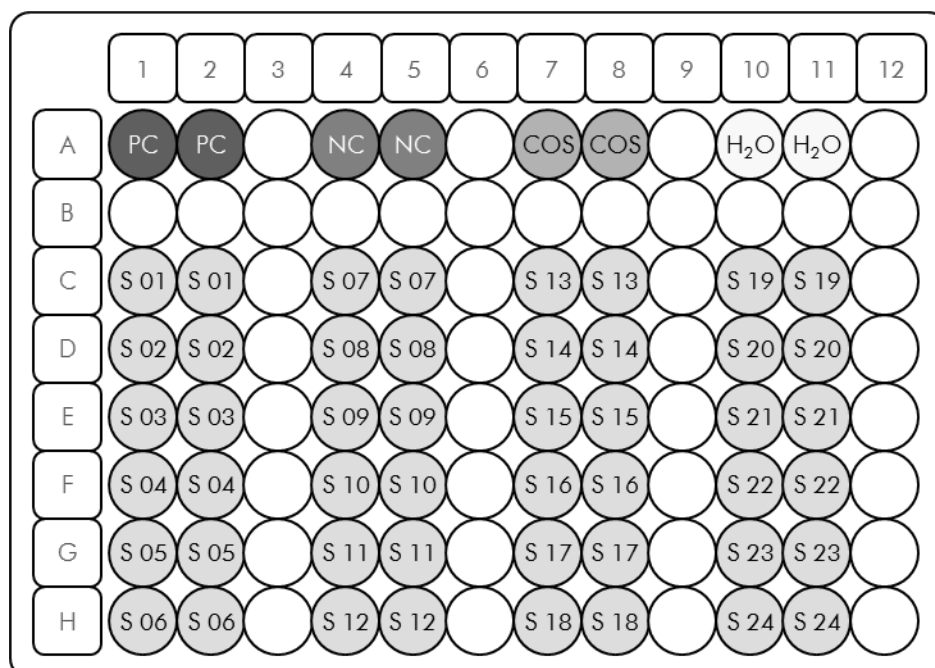
Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 480

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
Z mieszaniną starterów i sond JAK2 V617F (PPM-JAK2)	
24 próbki DNA	24 x 2 reakcje
3 kontrole DNA	3 x 2 reakcje (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparacie LightCycler 480



Ryc. 20. Sugerowane ustawienie płytki dla eksperymentu z zestawem *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC: kontrola pozytywna; NC: kontrola negatywna; COS: próbka graniczna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparacie LightCycler 480

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząśnij i krótko odwiruj wszystkie probówki (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W Tabeli 9 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość 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 aparatu LightCycler 480 zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit można użyć do analizy 24 próbek w dwóch powtórzeniach w jednym eksperymencie (Ryc. 20), 20 próbek w dwóch powtórzeniach w dwóch eksperymentach lub 15 próbek w dwóch powtórzeniach w trzech eksperymentach.

Tabela 9. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	Liczba reakcji (μl)				Objętość końcowa
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x stężona	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mieszanina starterów i sond, 10x stężona	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	5	285	145	95	–
Próbka (dodawana w kroku 6)	5	5 na każdą	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25	25 na każdą	25 na każdą	25 na każdą	–

* 24 próbki; jeden eksperyment/zestaw.

† 10 próbek; dwa eksperymenty/zestaw.

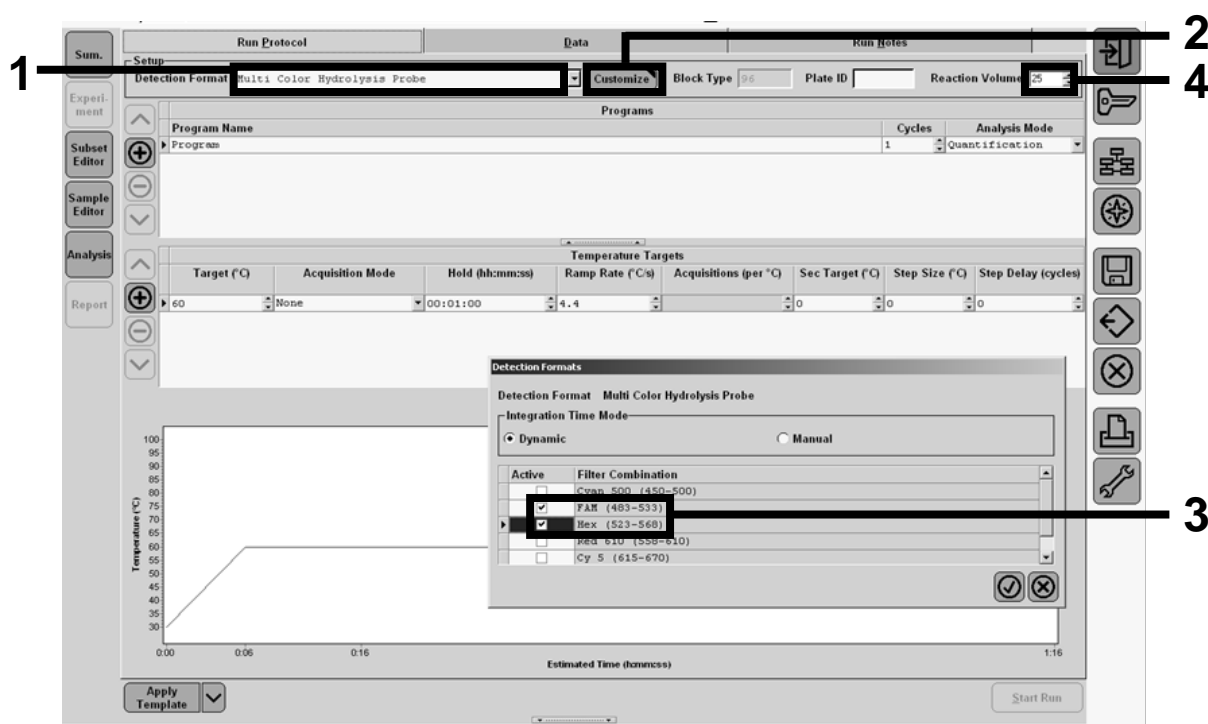
‡ 5 próbek; trzy eksperymenty/zestaw.

4. Wytrząśnij i krótko odwiruj mieszaninę qPCR (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).
5. Dodaj po 20 μl wstępnej mieszaniny qPCR na studzienkę.
6. Dodaj po 5 μl materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiednich studzienek (całkowita objętość 25 μl).
7. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
8. Zamknij płytkę i krótko odwiruj (300 x g, około 10 s).
9. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Na stronie głównej wybierz opcję „New Experiment” (Nowy eksperyment).

11. W przypadku aparatu LightCycler 480 I przejdź do kroku 11a.
W przypadku aparatu LightCycler 480 II przejdź do kroku 11b.

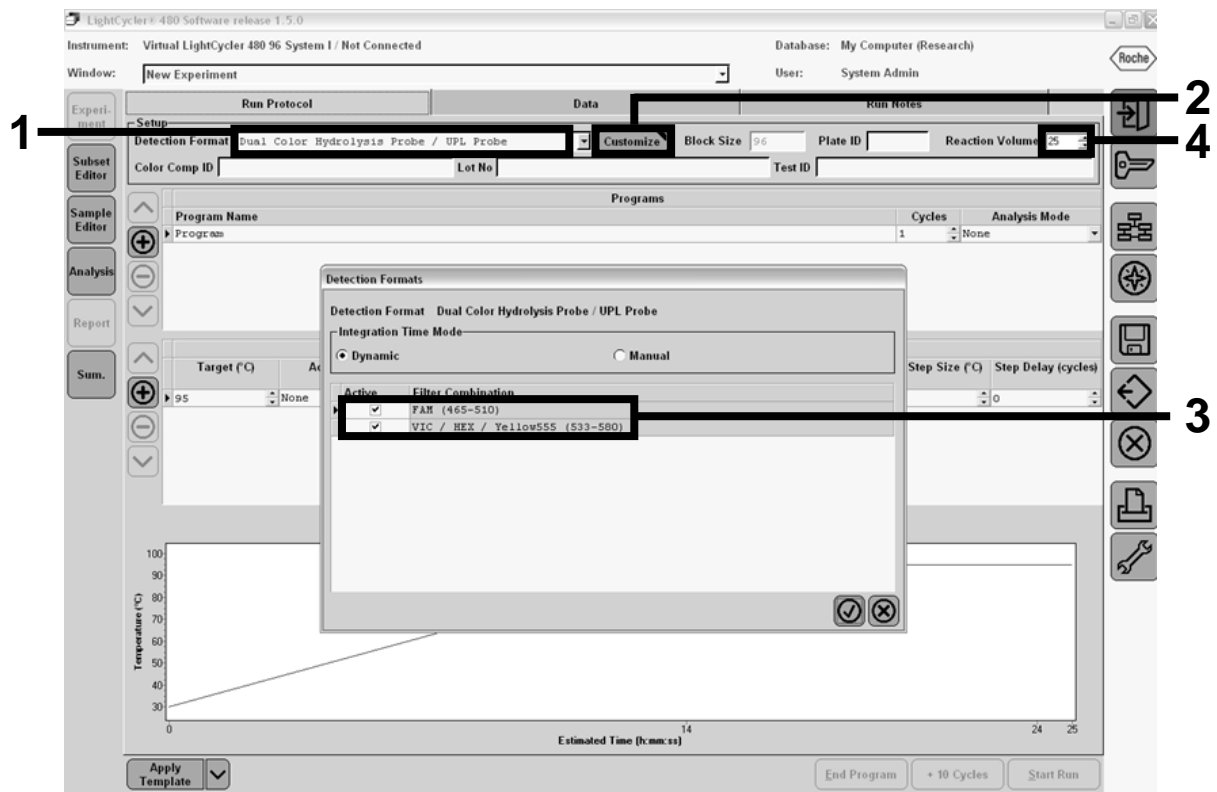
Szczegóły programowania aparatu LightCycler 480 znajdują się w instrukcji obsługi aparatu. Aby zwiększyć przejrzystość rycin, ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną ramką.

- 11a. LightCycler 480 I: Wybierz opcję „Multi Color Hydrolysis Probe” (Wielokolorowa sonda hydrolytyczna), kliknij przycisk „Customize” (Dostosuj), a następnie sprawdź, czy wybrane są kanały „FAM (483–533)” i „Hex (533–568)” (tj. VIC) (Ryc. 21). Ustaw objętość reakcji na „25” µl (Ryc. 21) i przejdź do kroku 12.



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

11b. LightCycler 480 II: Wybierz opcję „Dual Color Hydrolysis Probe” (Dwukolorowa sonda hydrolityczna), kliknij przycisk „Customize” (Dostosuj), a następnie sprawdź, czy wybrane są kanały „FAM (465-510)” i „VIC / HEX / (533-580)” (Ryc. 22). Ustaw objętość reakcji na „25” µl (Ryc. 22) i przejdź do kroku 12.



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

12. Zaprogramuj termocykler na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 10 i rozpocznij cykl.

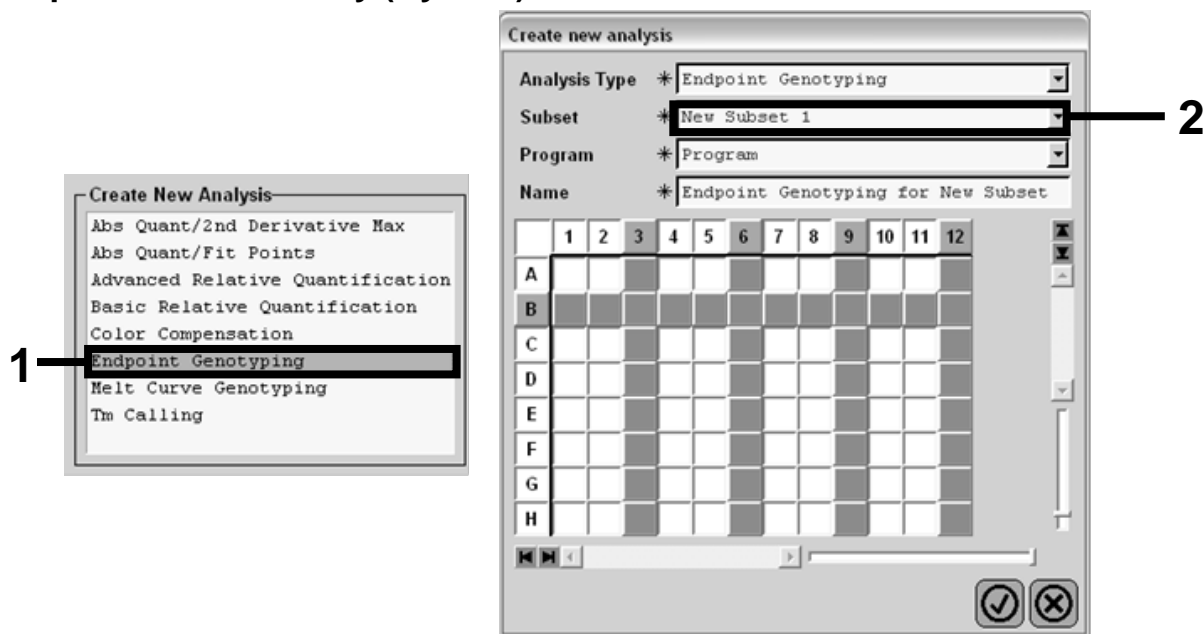
Uwaga: Podczas opisywania konfiguracji płytki w aparacie wybierz opcję „Endpt Geno” (Genotypowanie w punkcie końcowym) w części „Step 1: select workflow” (Krok 1 — wybierz przebieg pracy).

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



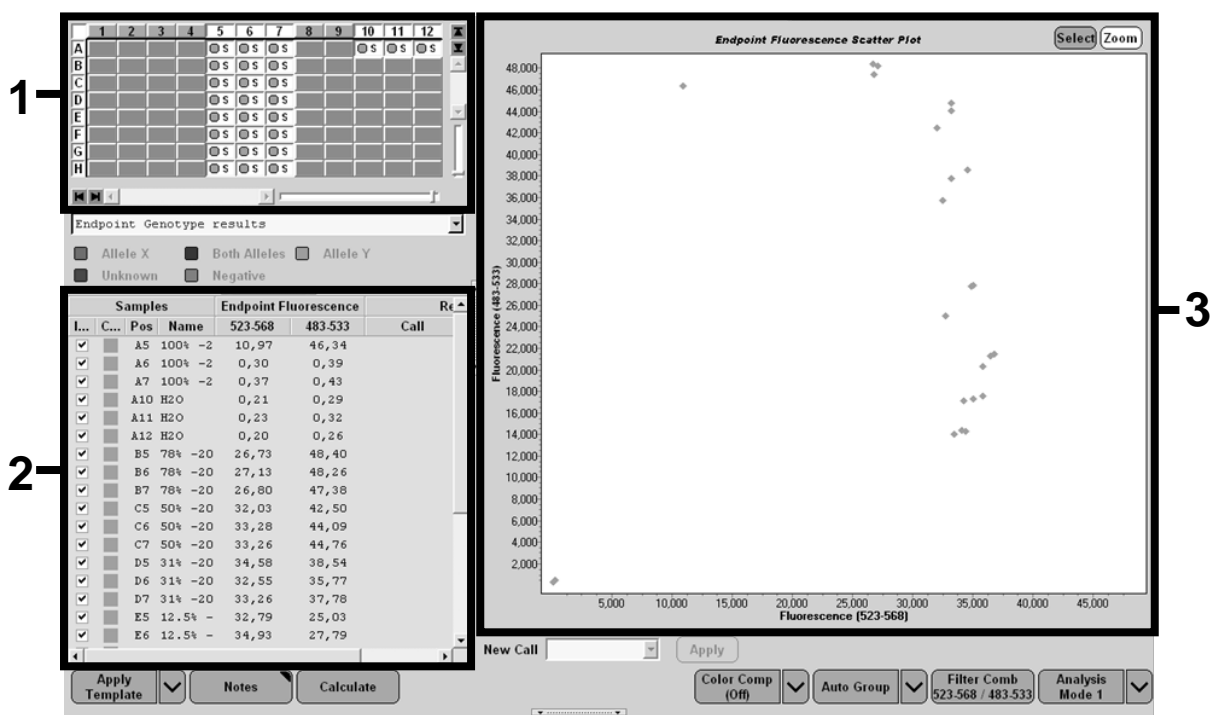
Ryc. 23. Wybór typu analizy i podzbioru do analizy.

15. W kolejnym oknie wybierz 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, kliknij prawym przyciskiem myszy szablon wyników próbek, a następnie wybierz opcję „Export Table” (Eksportuj tabelę). Plik zostanie zapisany w formacie tekstowym (.txt).

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

Microsoft Excel - test

Fichier Edition Affichage Insertion Format Outils Données Fenêtre ?

Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)

	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							

VIC
FAM

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

Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 2.0

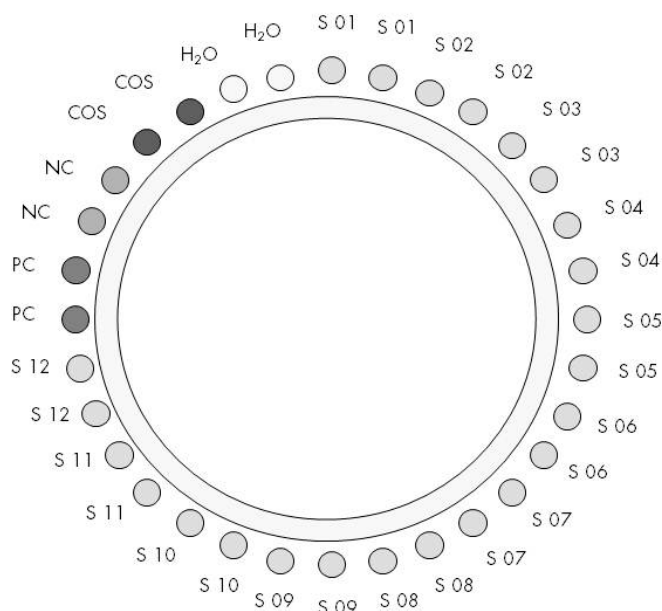
Uwaga: Ze względu na szczególne wymagania technologiczne podczas wykonywania eksperymentów w aparacie LightCycler 2.0 należy używać określonych odczynników. Zalecamy używanie mieszanki LightCycler TaqMan Master. 5x stężoną mieszaninę Master Mix należy przygotować zgodnie z wytycznymi producenta.

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

Tabela 11. Liczba reakcji w przypadku aparatu LightCycler 2.0

Próbki	Reakcje
Mieszanka starterów i sond JAK2 V617F (PPM-VF) (32 reakcje)	
12 próbek DNA	12 x 2 reakcje
3 kontrole DNA	3 x 2 reakcje (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach)
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparacie LightCycler 2.0



Ryc. 27. Sugerowane ustawienie rotora dla eksperymentu z zestawem *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC: kontrola pozytywna; **NC:** kontrola negatywna; **COS:** próbka graniczna; **S:** próbka DNA; **H₂O:** kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparacie LightCycler 2.0

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.**
Składniki należy wyciągnąć z zamrażarki około 10 min przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Wytrząśnij i krótko odwiruj wszystkie probówki (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie probówki).**
- 3. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.**

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

W tabeli 12 opisano schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość 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 Kit można użyć do analizy 12 próbek w dwóch powtórzeniach w jednym eksperymencie (Ryc. 27).

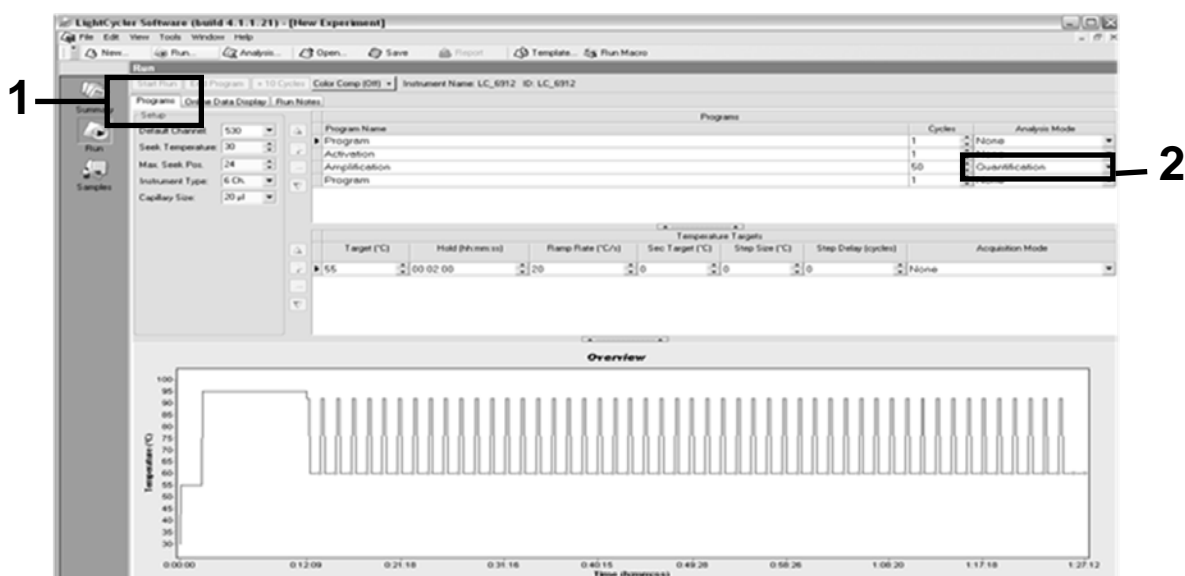
Tabela 12. Przygotowanie mieszaniny qPCR dla aparatu LightCycler 2.0

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

4. Wytrząśnij i krótko odwiruj mieszaninę qPCR (około 10 s, 10 000 rpm, aby zebrać płyn na dnie próbówki).
5. Dodaj po 15 µl wstępnej mieszaniny qPCR na próbówkę kapilarną.
6. Dodaj po 5 µl materiału DNA próbki lub kontroli do odpowiedniej próbówki kapilarnej (całkowita objętość 20 µl).
7. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
8. Umieść próbówki kapilarne w adapterze dostarczonym z aparatem i krótko odwiruj (700 x g, około 10 s).
9. Załaduj próbki do termocyklera zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Zaprogramuj termocyklerek (Ryc. 28) w sposób opisany w Tabeli 13.

Szczegóły programowania aparatu LightCycler 2.0 znajdują się w instrukcji obsługi aparatu. Aby zwiększyć przejrzystość rycin, ustawienia oprogramowania otoczono grubą, czarną ramką.

Uwaga: Upewnij 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.



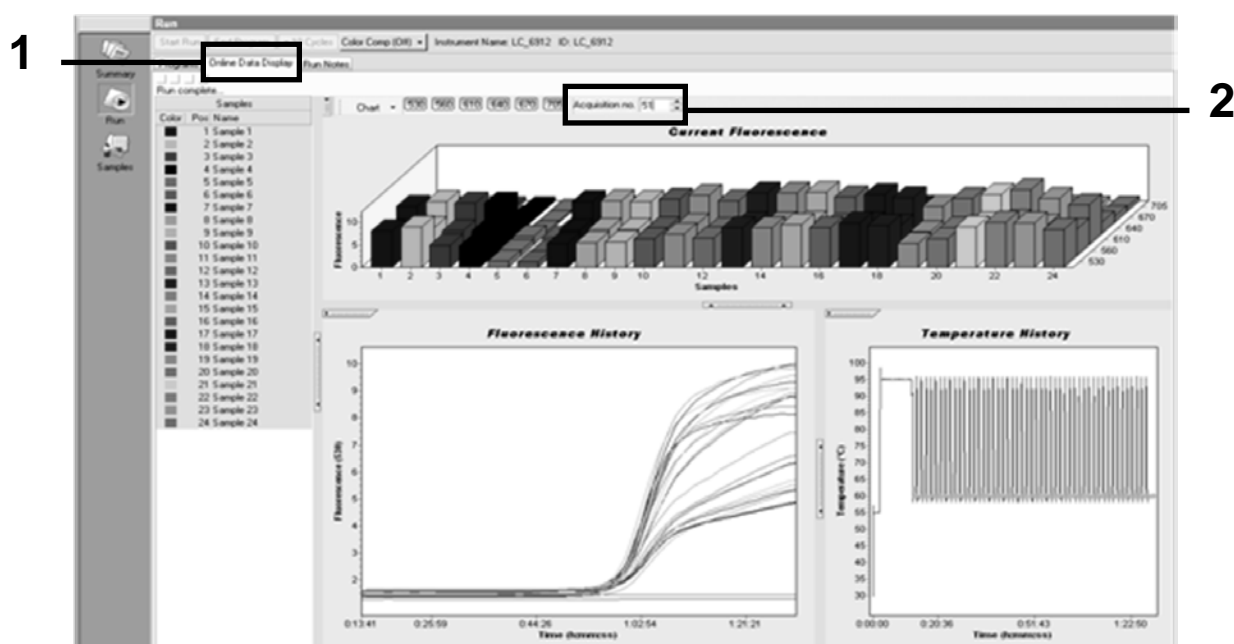
Ryc. 28. Ekran programowania dla aparatu LightCycler 2.0.

Tabela 13. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 2.0


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

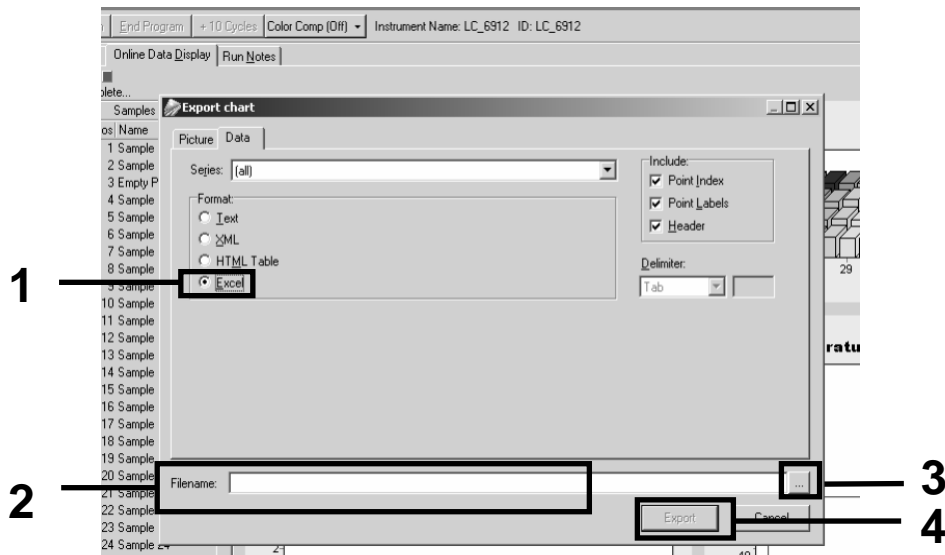
Procedura analizy punktu końcowego w przypadku aparatu LightCycler 2.0

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



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

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



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

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

		Pozycja															
I	J	K		L	M	N		O	P	Q		R	S	T	U		
X	Bar	Text 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				

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

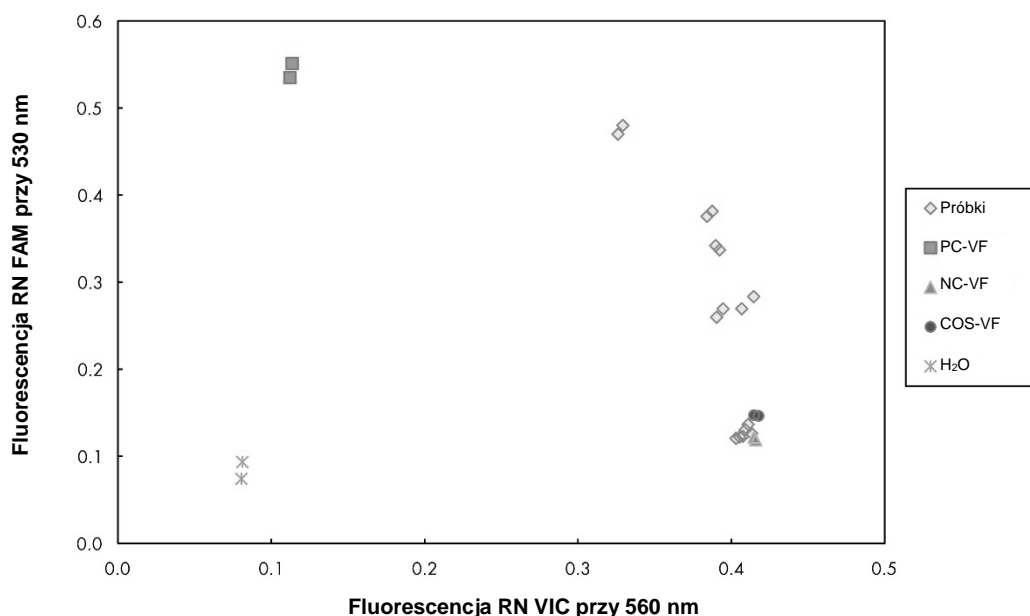
Interpretacja wyników

Uzyskać plik odpowiedni do pozyskania wyeksportowanych danych dla wszystkich aparatów: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub inny aparat 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 fluorescencyjnych. 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.

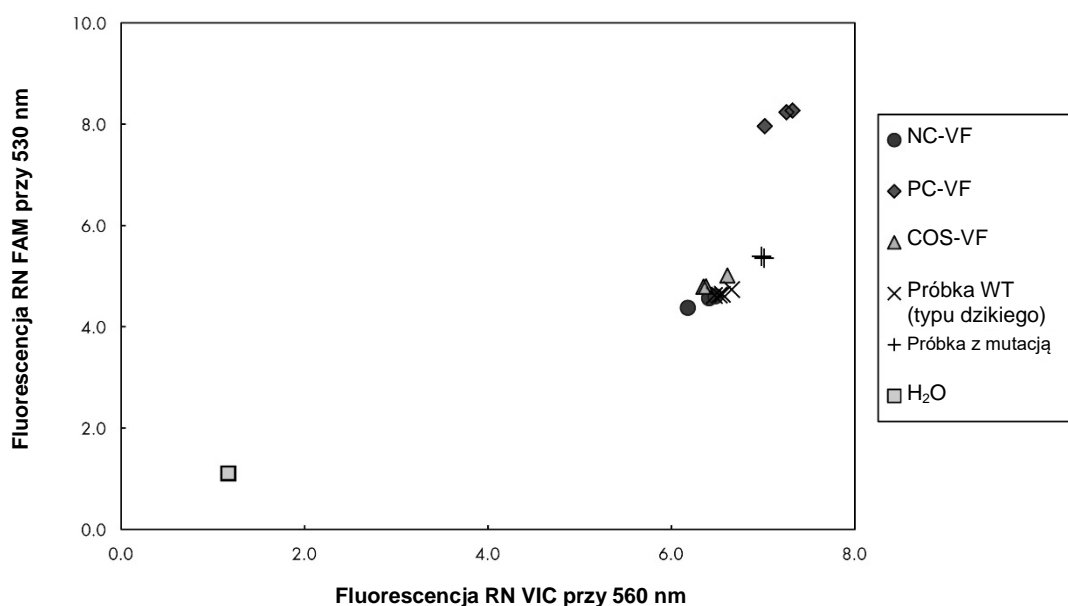
Próbki powinny znajdować się na łuku łączącym kontrole negatywne (NC) z kontrolami pozytywnymi (PC).

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 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 NC lub wyżej niż pomiar VIC dla próbki PC) może wskazywać na zanieczyszczenie.

Uwaga: Położenie kontroli może być inne w przypadku analizy danych uzyskanych za pomocą aparatu LightCycler 2.0 (patrz 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

Obliczyć stosunki FAM/VIC dla wszystkie próbek. Obliczyć stosunki FAM/VIC dla kontroli pozytywnej (PC), próbki granicznej (COS) i kontroli negatywnej (NC). Stosunki muszą być spójne między dwoma powtórzeniami. Obliczyć średni stosunek dla wszystkich powtórzeń.

Obliczyć znormalizowany stosunek (NRatio) dla próbki granicznej (COS) i wszystkich próbek:

$$\text{NRatio}_{\text{próbki}} = \frac{\text{Stosunek}_{\text{próbki}}}{\text{Stosunek}_{\text{NC}}}$$

Uwaga: Szara strefa (gray zone, GZ) testu jest definiowana jako obszar wartości, w którym wydajność rozróżnienia jest niewystarczająco dokładna. Wartość w szarej strefie oznacza, że nie udało się ocenić, czy znacznik docelowy jest obecny, czy nieobecny. Szarą strefę należy obliczyć dla każdego eksperymentu.

Obliczyć szarą strefę (obszar niepewności) dookoła znormalizowanego stosunku COS (NRatio_{COS}):

$$\text{GZ: } [(NRatio_{\text{COS}} \times 0,94); (NRatio_{\text{COS}} \times 1,06)]$$

Porównać znormalizowany stosunek każdej próbki do wartości NRatio_{COS} GZ. Interpretację wyników przedstawiono w Tabeli 14, a przykład obliczenia i interpretacji danych podano w Tabeli 15.

Tabela 14. Interpretacja wyników genotypowania za pomocą stosunków znormalizowanych

Wyniki	Interpretacja
$NRatio_{\text{próbka}} > NRatio_{\text{COS}} \times 1,06$	Wykryto mutację JAK2 V617F
$NRatio_{\text{próbka}} < NRatio_{\text{COS}} \times 0,94$	Nie wykryto mutacji JAK2 V617F
$NRatio_{\text{próbka}}$ w zakresie NRatio _{COS} GZ	Wynik niejednoznaczny

Tabela 15. Przykład obliczenia i interpretacji wyników fluorescencji

Próbka	VIC	FAM	Stosunek	Średni stosunek	NRatio	Interpretacja
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Nie wykryto mutacji
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Wykryto mutację
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Próbka graniczna
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Nie wykryto mutacji
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Wykryto mutację
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Wynik niejednoznaczny
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Wynik niejednoznaczny
S 4	2,322	2,191	0,944			
GZ	1,205	1,359				

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 w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na 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 58).

Komentarze i wskazówki

Negatywny sygnał w pozytywnej kontroli

- | | |
|--|--|
| a) Błąd pipetowania | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórz reakcję PCR. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit w temperaturze od –30 do –15°C i chroń mieszaninę starterów i sond (PPM) przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 11.

Unikaj wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

W celu przechowywania podziel odczynniki na porcje. |

Pozytywny sygnał w kontrolach negatywnych

- | | |
|---------------------------|--|
| Zanieczyszczenie krzyżowe | Wymień wszystkie kluczowe odczynniki.
Powtórz eksperyment, używając nowych porcji wszystkich odczynników.

Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze postępuj z odczynnikami, 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 | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
Powtórz reakcję PCR. |
| b) Efekt inhibicji materiału próbki spowodowany niewystarczającym oczyszczeniem | Powtórz przygotowanie DNA. |
| c) LightCycler: Wybrano nieprawidłowy kanał detekcji | Zmień ustawienie kanału na F1/F2 lub 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Nie zaprogramowano rejestracji danych | Sprawdź programy cykli.
Wybierz „pojedynczy” tryb rejestracji przy końcu każdego segmentu hybrydyzacji w programie reakcji PCR. |

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

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

LightCycler: Zbyt niskie natężenie fluorescencji

- | | |
|--|--|
| a) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit w temperaturze od -30 do -15°C i chroń mieszaninę starterów i sond (PPM) przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 11.

Unikaj wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

W celu przechowywania podziel odczynniki na porcje. |
| b) Bardzo niska początkowa ilość docelowego DNA | Zwiększ ilość DNA próbki.
Uwaga: W zależności od wybranej metody przygotowania DNA może wystąpić efekt inhibicji. |

Komentarze i wskazówki

LightCycler: Zmienne natężenie fluorescencji

- a) Błąd pipetowania Zmienność spowodowaną tak zwanym „błędem pipetowania” można zmniejszyć, analizując dane w trybie F1/F2 lub 530 nm/640 nm.
- b) Niewystarczające odwirowanie probówek kapilarnych Przygotowana mieszanina do reakcji PCR może wciąż znajdować się w górnym naczyniu probówki kapilarnej lub pęcherzyk powietrza może być zaklinowany na końcu probówki kapilarnej.
Zawsze wiruj probówki kapilarne, do których załadowana jest mieszanina reakcyjna, w sposób opisany w instrukcji danego obsługi aparatu.
- c) Zewnętrzna powierzchnia końcówki probówki kapilarnej jest zabrudzona Podczas postępowania z probówkami kapilarnymi zawsze noś rękawiczki.

Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością zgodnym z normą ISO firmy QIAGEN każda seria zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit jest testowana z wykorzystaniem wstępnie określonych specyfikacji, aby zapewnić stałą jakość produktu. Certyfikaty analizy są dostępne na żądanie pod adresem www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Przed użyciem wyrobu użytkownicy muszą być przeszkoleni i zaznajomieni z tą technologią. Niniejszego zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanymi aparatami wymienionymi w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 9.

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

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

Charakterystyka działania testu

Badania niekliniczne

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

Precyzja

Trzy poziomy rozcieńczeń genomowego DNA uzyskanego z linii komórkowych z mutacją JAK2 V617F w DNA typu dzikiego testowano za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. 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 ($\text{Stosunek}_{\text{próbka}}$) porównano ze stosunkiem kontroli negatywnej (JAK2 100% DNA typu dzikiego, $\text{Stosunek}_{\text{NC}}$). Wyniki przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Dane precyzji uzyskane w badaniach nieklinicznych

Poziom mutacji	$\text{Stosunek}_{\text{próbka}} > \text{Stosunek}_{\text{NC}}$	%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 stężeń 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®

Wyniki przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Międzylaboratoryjne dane analityczne uzyskane z rozcieńczeń DNA genomowego 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-VF), 36 próbek granicznych (COS-VF; 2% V617F), 34 próbki z 20-procentowym obciążeniem mutacją JAK2 V617F, 35 próbek 50-procentowym obciążeniem mutacją JAK2 V617F i 36 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 zestawem *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* i oznaczeniem qPCR opartym na metodzie ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11). Wyniki porównania przedstawiono w Tabeli 18 (tabela kontyngencji 2 x 3) i Tabeli 19 (zgodność procentowa).

Tabela 18. Porównanie metod: Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i metoda ARMS

		Wyniki metody badawczej ARMS		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 typu dzikiego (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 WT	1	46	47
Łącznie		93	48	n=141

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

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

* Przedziały ufności obliczono zgodnie z wytyczną EP12-A instytutu CLSI „Protokół użytkownika do oceny wydajności testu jakościowego; zatwierdzona wytyczna”.

Porównanie zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i sekwencjonowania

Próbki DNA pobrane od 51 pacjentów z podejrzeniem MPN testowano równolegle zestawem *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i techniką odniesienia („złotym standardem”) — sekwencjonowaniem bezpośrednim. 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 20 (tabela kontyngencji 2 x 3) i Tabeli 21 (zgodność procentowa).

Tabela 20. Porównanie metod: Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i sekwencjonowanie

		Wyniki sekwencjonowania bezpośredniego		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 typu dzikiego (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 WT	2	20	22
Łącznie		28	22	n=50

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

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

* Przedziały ufności obliczono zgodnie z wytyczną EP12-A instytutu CLSI „Protokół użytkownika do oceny wydajności testu jakościowego; zatwierdzona wytyczna”.

Badanie wielośrodkowe 228 próbek pacjentów

W ramach badania międzylaboratoryjnego próbki DNA pacjentów przeanalizowano w 13 laboratoriach za pomocą technik obowiązujących w poszczególnych laboratoriach. W każdym laboratorium wykonywano 3 eksperymenty, używając DNA z linii komórkowych, takich samych jak w przypadku danych precyzji uzyskanych podczas badania nieklinicznego (patrz wyżej), 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 wykorzystując własne metody laboratorium, takie jak PCR jakościowy, PCR ASA, proces FRET, sekwencjonowanie, PCR ASO, RFLP i rozróżnianie alleli. Wyniki porównań przedstawiono w Tabeli 22 (tabela kontyngencji 2 x 3) i Tabeli 23 (zgodność procentowa).

Tabela 22. Porównanie metod: Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i własne metody laboratoriów

		Wyniki testowania własnymi metodami laboratoriów		
		Wykryto mutację JAK2 V617F	Nie wykryto mutacji JAK2 typu dzikiego	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 WT	3	61	64
Łącznie		147	81	n=228

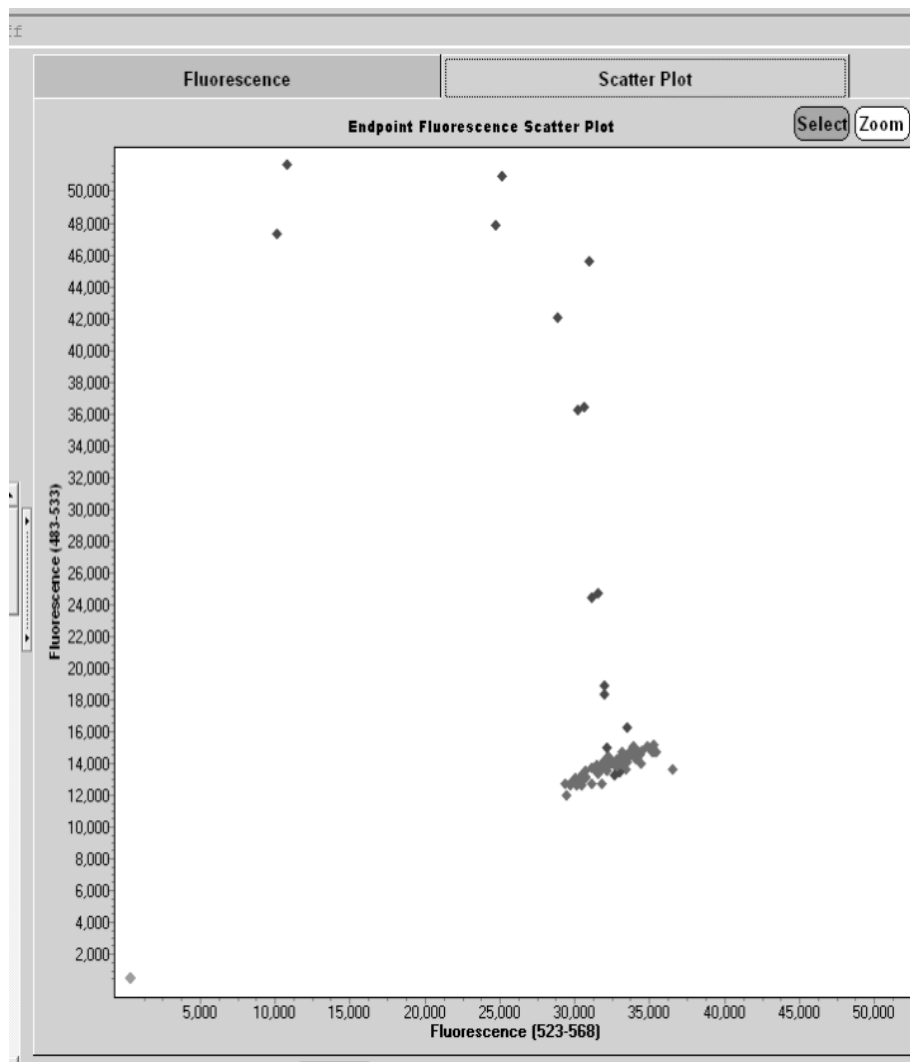
Tabela 23. Porównanie metod: Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit i własne metody laboratoriów

	Zgodność (%)	95% CI* (%)
Zgodność danych pozytywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit a własnymi metodami laboratoriów	97,9	94,0-99,3
Zgodność danych negatywnych między zestawem <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit a własnymi metodami laboratoriów	95,3	87,1-98,4
Zgodność ogółem	97,1	93,8-98,7

* Przedziały ufności obliczono zgodnie z wytyczną EP12-A instytutu CLSI „Protokół użytkownika do oceny wydajności testu jakościowego; zatwierdzona wytyczna”.

Odporność: testowanie próbek od zdrowych dawców

Próbki DNA pobrane od 103 zdrowych dawców krwi przeanalizowano za pomocą testu *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 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

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji



Termin 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 pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona **www.qiagen.com**).

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Spis treści	Nr kat.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (10)	Na 10 reakcji: kontrola pozytywna V617F, kontrola negatywna V617F, próbka graniczna V617F, mieszanina starterów i sond JAK2 typu dzikiego i JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (24)	Na 24 reakcje: kontrola pozytywna V617F, kontrola negatywna V617F, próbka graniczna V617F, mieszanina starterów i sond JAK2 typu dzikiego i JAK2 V617F	673023
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 robociznę; 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 robociznę; obejmuje instalację i przeszkolenie	9002033

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie **www.qiagen.com**. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Strona celowo pozostawiona pusta

Ten produkt jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Produkty *ipsogen* nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży lub 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 błędy, które mogą wystąpić w niniejszym dokumencie. Dokument ten uważa się za kompletny i dokładny w momencie jego opublikowania. Firma QIAGEN nie ponosi w żadnym wypadku odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody przypadkowe, specjalne lub wynikowe ani z tytułu odszkodowań wielokrotnych 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 badań, komercyjnych, badań klinicznych lub 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 patentowym 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. Z naszym działem prawnym można skontaktować się pod adresem jak2licenses@qiagen.com.

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

Ograniczona umowa licencyjna

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

1. Zestawu *ipsogen*JAK2 MutaScreen Kit można używać wyłącznie zgodnie z dokumentem Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit — Instrukcja obsługi i tylko razem ze składnikami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w dokumencie Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit — Instrukcja obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Ten zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji, wyrażonych ani dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodjęcie ani niepozwolenie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych określonych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, w tym wynagrodzeń prawników, w odniesieniu do wszelkich działań, które będą miały na celu wykonanie postanowień niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

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

HB-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com



1072500 PL 154011606

Sample & Assay Technologies