

# Piručnik za komplet *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 *MutaQuant*<sup>®</sup>

 12 (kataloški br. 673522)

 24 (kataloški br. 673523)

Verzija 1

IVD

Kvantitativna in vitro dijagnostika

Za uporabu s instrumentima Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>  
7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System  
i LightCycler<sup>®</sup>



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

R3

MAT

1072501HR



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je vodeći dobavljač inovativnih tehnologija za uzimanje uzoraka i testiranje koje omogućuju izolaciju i otkrivanje sadržaja bilo kojeg biološkog uzorka. Naši napredni, visoko kvalitetni proizvodi i usluge osiguravaju uspjeh u procesu od uzimanja uzorka do dobivanja rezultata.

### **QIAGEN postavlja standarde za:**

- pročišćavanje DNA, RNA i proteina
- analiziranje nukleinske kiseline i proteina
- istraživanje microRNA i RNAi
- automatiziranje tehnologija za uzimanja uzoraka i testiranje

Naš zadatak je omogućiti vam postizanje izvanrednog uspjeha i novih otkrića. Za više informacija posjetite **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Sadržaj

<b>Namjenska uporaba</b>	<b>4</b>
<b>Pregled i objašnjenje</b>	<b>4</b>
<b>Načelo postupka</b>	<b>7</b>
<b>Priloženi materijali</b>	<b>10</b>
Sadržaj kompleta	10
<b>Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi</b>	<b>11</b>
<b>Upozorenja i mjere opreza</b>	<b>13</b>
Opće mjere opreza	13
<b>Pohranjivanje i rukovanje reagensima</b>	<b>14</b>
<b>Postupak</b>	<b>15</b>
Priprema DNA iz uzorka	15
Protokols	
■ qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete	16
■ qPCR na instrumentu ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480	21
■ qPCR na instrumentu LightCycler 1.2	28
<b>Tumačenje rezultata</b>	<b>33</b>
Vodič za uklanjanje smetnji	37
<b>Kontrola kvalitete</b>	<b>41</b>
<b>Ograničenja</b>	<b>41</b>
<b>Karakteristike izvedbe</b>	<b>42</b>
Nekliničke studije	42
Klinička ispitivanja	43
<b>Reference</b>	<b>45</b>
<b>Simboli</b>	<b>46</b>
<b>Kontakt informacije</b>	<b>46</b>
<b>Informacije za naručivanje</b>	<b>47</b>

## Namjenska uporaba

Komplet *ipsogen JAK2 MutaQuant* je in vitro kvantitativni test koji je namijenjen za detekciju i kvantifikaciju JAK2 V617F/G1849T alele genomske DNA izdvojene iz periferne krvi ispitanika kod kojih se sumnja da imaju mijeloproliferativni tumor (MPN).

Nepostojanje JAK2 V617F/G1849T mutacije ne isključuje mogućnost postojanja drugih JAK2 mutacija. Test može pokazati lažno negativne rezultate u slučaju dodatnih mutacija koje se nalaze u nukleotidima 88504 do 88622 (1).

**Napomena:** Komplet treba koristiti uz slijeđenje uputa koje su navedene u ovom priručniku, u kombinaciji s validiranim reagensima i instrumentima. Svaka uporaba ovog proizvoda koja odstupa od uputa na naljepnici i/ili modificiranje komponenti poništavaju jamstvo tvrtke QIAGEN.

## Pregled i objašnjenje

Rekurentna somatska mutacija, V617F, koja utječe na gen Janus za tirozin-kinazu 2 (JAK2), identificirana je 2005. godine (2–5), što je dovelo do značajnog otkrića koje je važno za razumijevanje, klasifikaciju i dijagnosticiranje mijeloproliferativnih tumora (MPN). JAK2 je kritična unutarstanična signalna molekula za određen broj citokina, uključujući eritropoietin.

Mutacija JAK2 V617F se detektira u >95% bolesnika s primarnom policitemijom (PV), 50-60% bolesnika s esencijalnom trombocitemijom (ET) i u 50% bolesnika s primarnom mijelofibrozom (PMF). Mutacija JAK2 V617F detektirana je i u nekim rijetkim slučajevima kronične mijelomonocitne leukemije, mijelodisplaznog sindroma, sustavne mastocitoze i kronične neutrofilne leukemije, ali u 0% slučajeva s CML (6).

Mutacija odgovara jednonukleotidnoj promjeni JAK2 nukleotida 1849 u exon 14, što za rezultat ima jedinstvenu zamjenu valina (V) fenilalaninom (F) u poziciji proteina 617 (područje JH2). Do dovodi do konstitutivne aktivacije JAK2, hematopoietske transformacije in vitro i rasta eritroidne kolonije neovisne o eritropoietinu (EEC) u svih bolesnika s PV i u velikoj mjeri bolesnika s ET i PMF (7). JAK2 V617F je ključni pokretač u transformaciji hematopoietskih stanica u MPN, ali točan patološki mehanizam koji, s istom jedinstvenom mutacijom, dovodi do tako različitih kliničkih i bioloških prikaza tek treba protumačiti.

Tradicionalno se dijagnoza MPN temeljila na kliničkim kriterijima, kriterijima histologije koštane srži i citogenetičkim kriterijima. Otkriće molekularnog markera specifičnog za bolest dovelo je do pojednostavljivanja procesa i povećavanja dijagnostičke točnosti. Detektiranje mutacije JAK2 V617F sad je dio referentnih WHO 2008 kriterija za uspostavljanje dijagnoze BCR-ABL

negativne MPN (tablica 1), a prisutnost ove mutacije je glavni kriterij za potvrdu dijagnoze.

**Tablica 1. WHO kriteriji za uspostavljanje dijagnoze MPN (prilagođeno iz reference 8)**

Kriteriji za uspostavljanje dijagnoze primarne policitemije (PV)	
Glavni	<p>1. hemoglobin (Hgb) <math>&gt;18,5 \text{ g.dl}^{-1}</math> (muškarci) ili <math>&gt;16,5 \text{ g.dl}^{-1}</math> (žene) ili  Hgb ili hematokrit (Hct) <math>&gt;99\%</math> referentnog raspona za starosnu dob, spol ili nadmorsku visinu stanovanja ili  Hgb <math>&gt;17 \text{ g.dl}^{-1}</math> (muškarci) ili <math>&gt;15 \text{ g.dl}^{-1}</math> (žene) ako je povezano s dokazanim povećanjem od <math>\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}</math> od početne točke koja se ne može pripisati korekciji u slučaju manjka željeza ili povećan broj crvenih krvnih stanica <math>&gt;25\%</math> iznad normalne prosječne predviđene vrijednosti</p> <p>2. prisutnost <i>JAK2V617F</i> ili slične mutacije</p>
Sporedni	<p>1. trostruka mijeloproliferacija koštane srži  2. razina seruma eritropoietina ispod normalne  3. rast endogene eritroidne kolonije (EEC)</p>
Kriteriji za uspostavljanje dijagnoze esencijalne trombocitemije (ET)	
Glavni	<p>1. broj pločica <math>\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}</math>  2. Megakariocitna proliferacija s velikom i zreloom morfologijom. Bez ili s malo granulocitne ili eritroidne proliferacije  3. Ne zadovoljava kriterije WHO za kroničnu mijeloidnu leukemiju (CML), PV, primarnu mijelofibrozu (PMF), mijelodisplazni sindrom (MDS) ili druge vrste mijeloidnih tumora</p> <p>4. demonstracija <i>JAK2V617F</i> ili drugog klonskog markera ili  Nema dokaza za reaktivnu trombocitozu</p>
Sporedni	-
Kriteriji za uspostavljanje dijagnoze primarne mijelofibroze (PMF)	
Glavni	<p>1. Megakariocitna proliferacija i atipija praćene ili retikulinskom i/ili kolagenskom fibrozom ili  U slučaju nepostojanja retikulinske fibroze, megakariocitne promjene moraju biti popraćene povećanjem staničnosti koštane srži, granulocitnom proliferacijom i često smanjenjem eritropoieze (tj. predfibrotični PMF)  2. Ne zadovoljava kriterije WHO za (CML), PV, MDS ili druge vrste mijeloidnih tumora</p> <p>3. demonstracija <i>JAK2V617F</i> ili drugog klonskog markera ili  Nema dokaza za reaktivnu fibrozu koštane srži</p>
Sporedni	<p>1. leukoeritroblastoza  2. povećan serum laktat dehidrogenaze (LDH)  3. anemija  4. očigledna splenomegalija</p>

Nedavno su međunarodni stručnjaci predložili kriterije za terapijska ispitivanja slučajeva PV i ET. Utemeljena na podacima o alograftu, alfa-interferonu ili hidoksiurei, kvantifikacija JAK2V617F je uključena kao potencijalno korisno sredstvo za praćenje odgovora na liječenje (9). Smanjenje težine JAK2 V617F promatrano je u odgovoru na neke od novih anti-JAK2 lijekova u kliničkom razvoju (10).

## Načelo postupka

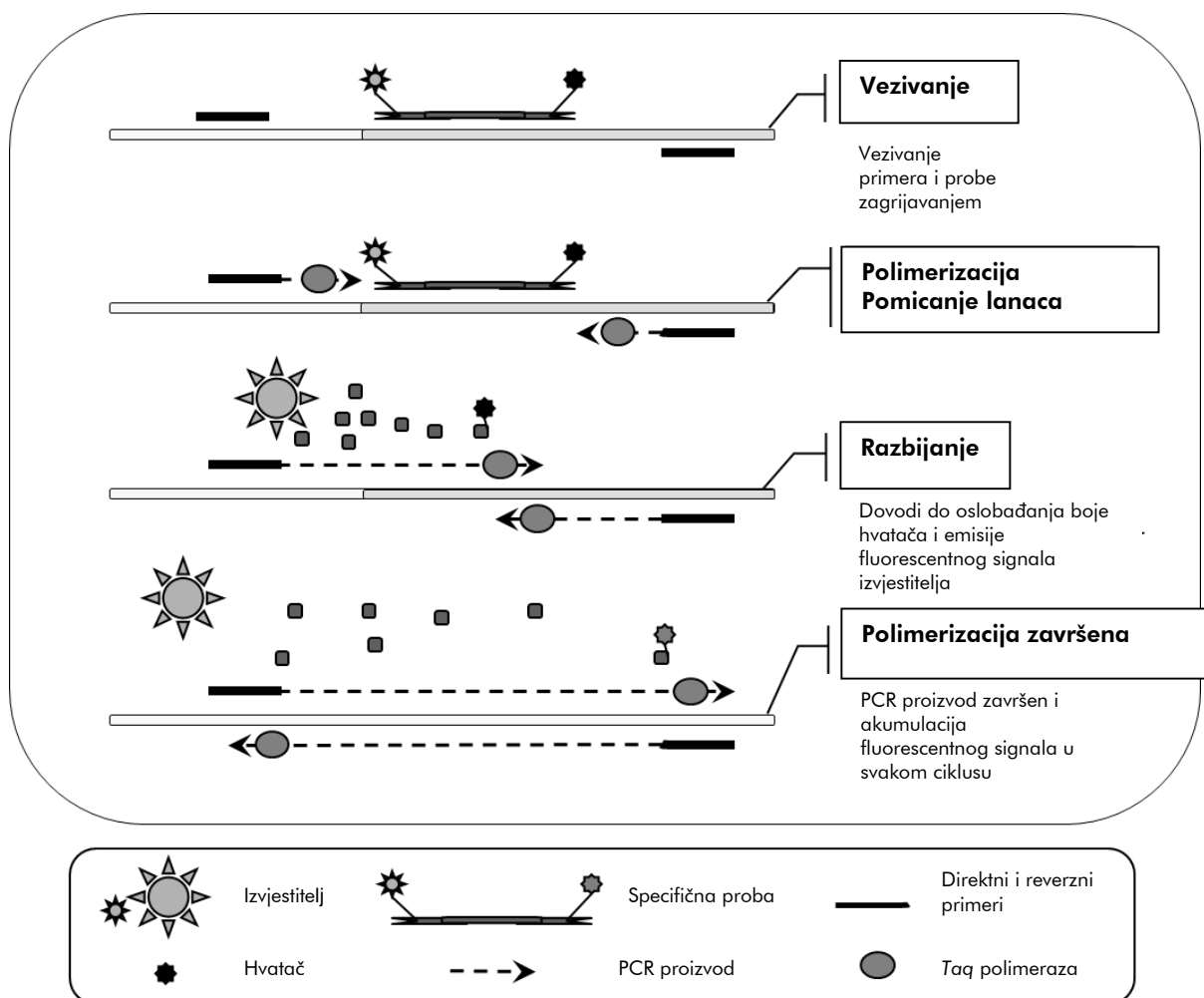
Nekoliko različitih tehnika je predloženo za kvantitativno određivanje udjela polimorfizma pojedinačnog nukleotida (SNPs) u DNA uzorcima. Među njima je prednost data metodama koje se temelje na kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u realnom vremenu (qPCR) zbog njihove veće osjetljivosti koja omogućuje praćenje težine alele na način uzdužnog posmatranja. Mnoge od ovih tehnika imaju umjerenu osjetljivost od 1–10%, na primjer, TaqMan<sup>®</sup> alelna diskriminacija, Pyrosequencing<sup>®</sup>, testiranje krivulje taljenja i izravnog sekvenciranja. Neke od njih, kao što su krivulja taljenja i sekvenciranje, samo su semikvantitativne, dok je za ostale, poput Pyrosequencing, potrebna obrada nakon PCR ili instrumenti koji nisu odmah dostupni ili imaju iznimno visoke troškove instaliranja za rutinska laboratorijska testiranja. Za pristup visoke osjetljivosti s osjetljivošću <0,1% potrebna je uporaba SNP specifičnih primera koji omogućuju selektivnu amplifikaciju mutantne alele ili divljeg tipa alele koja se lako detektira na instrumentu za qPCR u realnom vremenu. Komplet *ipsogen JAK2 MutaQuant* temelji se na ovoj tehnici.

Uporaba qPCR omogućuje točnu kvantifikaciju PCR proizvoda tijekom eksponencijalne faze procesa amplifikacije PCR. Podaci za kvantitativni PCR mogu se brzo dobiti, bez obrade nakon PCR, detekcijom fluorescentnih signala u realnom vremenu tijekom i/ili odmah nakon PCR ciklusa i time smanjiti rizik od kontaminacije PCR proizvoda. Trenutačno su na raspolaganju 3 osnovne vrste qPCR tehnika: qPCR analiza uz uporabu SYBR<sup>®</sup> zelene I boje, qPCR analiza uz uporabu probi hidrolize i qPCR analiza uz uporabu hibridizacijskih proba.

Za ovo testiranje koristi se načelo qPCR s hidrolizom dvostruko obojanog oligonukleotida. Tijekom PCR, direktni i reverzni primeri hibridiziraju se u specifičnu sekvencu. Dvostruko obojani oligonukleotid je sadržan u istoj mješavini. Ova proba, koja se sastoji od oligonukleotida označenog na 5' kraju bojom izvjestitelja i na 3' kraju bojom hvatača, hibridizira se do ciljne sekvence unutar PCR proizvoda. qPCR analiza s probama hidrolize koristi egzonukleaznu aktivnost 5'→3' *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraze. Kad je proba intaktna, blizina boje izvjestitelja boji hvatača za rezultat ima supresiju izvjestiteljske fluorescencije primarno zbog prijenosa energije fluorescentnom rezonancom.

Tijekom PCR, ako je cilj od interesa prisutan, proba se posebice vezuje zagrijavanjem između lokacija direktnog i reverznog primera. Egzonukleazna aktivnost 5'→3' DNA polimeraze razbija probu između izvjestitelja i hvatača samo ako se proba hibridizira do cilja. Fragmenti probe se potom udaljavaju od cilja i polimerizacija lanca se nastavlja. 3' kraj probe je blokiran kako bi se spriječilo širenje probe tijekom PCR (slika 1). Ovaj proces se obavlja u svakom ciklusu i ne utječe na eksponencijalnu akumulaciju proizvoda.

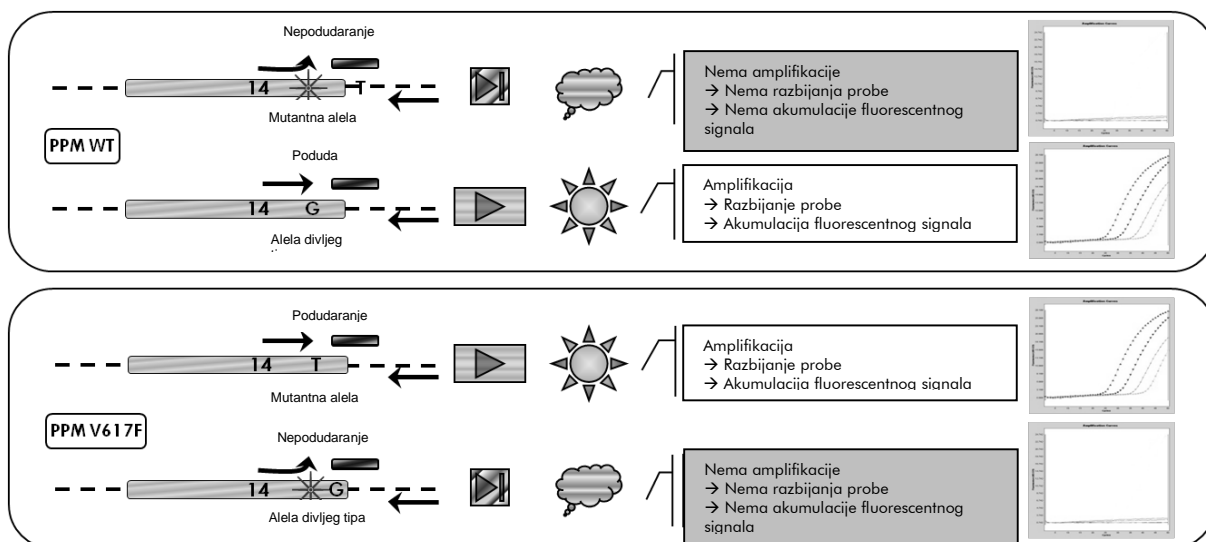
Povećanje fluorescentnog signala detektira se samo ako je ciljna sekvenca komplementarna s probom i prema tome se pojačava tijekom PCR. Zbog ovih zahtjeva nespecifična amplifikacija se ne detektira. Prema tome, povećavanje fluorescencije je izravno proporcionalno ciljnoj amplifikaciji tijekom PCR.



**Slika 1. Načelo reakcije.**

Tehnologija PCR specifična za kvantitativnu alelu koja se koristi u ovom kompletu za testiranje omogućuje osjetljivu, točnu i visoko ponovljivu detekciju SNPs. Ova tehnika je utemeljena na uporavi specifičnih direktnih primera, za alele divljeg tipa i V617F alele (11). Samo savršeno podudaranje između primera i ciljne DNA omogućuje proširenje i amplifikaciju u PCR (vidjeti sliku 2).





**Slika 2. PCR specifična za alelu.** Uporaba mješavina primera i proba divljeg tipa ili tipa V617F omogućuje specifičnu detekciju alela divljeg tipa ili mutiranih alela u dvije zasebne reakcije koje se provode uz uporabu istog uzorka. Rezultati se mogu izraziti i kao postotci VF kopija među ukupnim kopijama JAK2.

# Priloženi materijali

## Sadržaj kompleta

<b>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit</b>		<b>(12)</b>	<b>(24)</b>
<b>Kataloški br.</b>		<b>673522</b>	<b>673523</b>
<b>Broj reakcija</b>		<b>12</b>	<b>24</b>
V617F positive control (V617F pozitivna kontrola) (100% V617F allele) [100% V617F alela]	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 $\mu$ l	60 $\mu$ l
V617F negative control (V617F negativna kontrola) (100% wild-type allele) [100% alela divljeg tipa]	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 $\mu$ l	60 $\mu$ l
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF standardna otopina, 50 kopija) ( $5 \times 10^1$ V617F copies/5 $\mu$ l) [ $5 \times 10^1$ V617F kopija/5 $\mu$ l]	M1-VF M1-VF Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
M2-VF Standard Dilution, 500 copies ( $5 \times 10^2$ V617F copies/5 $\mu$ l) [ $5 \times 10^2$ V617F kopija/5 $\mu$ l]	M2-VF M2-VF Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (M3-VF standardna otopina, 5000 kopija) ( $5 \times 10^3$ V617F copies/5 $\mu$ l) [ $5 \times 10^3$ V617F kopija/5 $\mu$ l]	M3-VF M3-VF Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (M4-VF standardna otopina, 50.000 kopija) [ $5 \times 10^4$ V617F kopija/5 $\mu$ l]	M4-VF M4-VF Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (WT-1 standardna otopina, 50 kopija) ( $5 \times 10^1$ wild-type copies/5 $\mu$ l) [ $5 \times 10^1$ kopije divljeg tipa/5 $\mu$ l]	WT-1 WT-1 Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (WT- 2 standardna otopina, 500 kopija) ( $5 \times 10^2$ wild-type copies/5 $\mu$ l) [ $5 \times 10^2$ kopije divljeg tipa/5 $\mu$ l]	WT- 2 WT- 2 Mini	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l

<b>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit</b>		<b>(12)</b>	<b>(24)</b>
<b>Kataloški br.</b>		<b>673522</b>	<b>673523</b>
<b>Broj reakcija</b>		<b>12</b>	<b>24</b>
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (WT-3 standardna otopina, 5000 kopija) (5 x 10 <sup>3</sup> wild-type copies/5 µl) [5 x 10 <sup>3</sup> kopije divljeg tipa/5 µl]	WT- 3 WT- 3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT- 4 standardna otopina, 50.000 kopija) (5 x 10 <sup>4</sup> wild-type copies/5 µl) [5 x 10 <sup>4</sup> kopije divljeg tipa/5 µl]	WT- 4 WT- 4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (mješavina primera i probe za JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (mješavina primera i probe za JAK2 V617F)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (engleski)		1	1

\* Mješavina specifičnih reverznih i direktnih primera za JAK2 kontrolni gen divljeg tipa plus specifična FAM™–TAMRA™ proba.

† Mješavina specifičnih reverznih i direktnih primera za JAK2 V617F mutaciju plus specifična FAM–TAMRA proba.

**Napomena:** Miješajte uz vrtnju i kratko centrifugirajte standardne otopine i mješavine primera i proba prije uporabe.

## Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija pogledajte odgovarajuće listove sa sigurnosnim podacima (SDSs) koji su dostupni kod dobavljača proizvoda.

### Reagensi

- Sterilna voda bez nukleaze za PCR
- Pufer i Taq DNA polimeraza: Validirani reagensi su TaqMan Universal PCR Master Mix (glavna mješavina za PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 4304437) i LightCycler TaqMan Master (glavna mješavina za PCR 5x)

(Roche, kat. br. 04535286001) ili LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe<sup>®</sup> (glavna mješavina 5x) (Roche, kat. br. 03515567001)

### Potrošni materijal

- Sterilni vrhovi pipeta s hidrofobičnim filtrima otporni na aerosole za PCR bez nukleaze
- Epruvete od 0,5 ml ili 1,5 ml za PCR bez prisutnosti nukleaze
- Led

### Oprema

- Mikrolitarska pipeta\* za PCR (1–10  $\mu$ l; 10–100  $\mu$ l; 100–1000  $\mu$ l)
- Stacionarni uređaj za centrifugu\* s rotorom za reakcijske epruvete od 0,5 ml/1,5 ml (sposobne za postizanje 13.000-14.000 rpm)
- Instrument za PCR u realnom vremenu:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM<sup>®</sup> ili Rotor-Gene; LightCycler 1.2, ili 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; i prateći specifični materijal.
- Biofotometar

\* Uvjerite se da su instrumenti provjereni i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

## Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija molimo pogledajte odgovarajuće listove s podacima o sigurnosti (SDSs). Dostupni su online u standardnom i kompaktnom PDF formatu na [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) gdje možete pronaći, pregledati i ispisivati SDS za svaki QIAGEN komplet i komponente kompleta.

Zbrinite uzorke i otpad od testiranja u skladu s vašim lokalnim sigurnosnim odredbama.

## Opće mjere opreza

Za qPCR testiranja potrebne su dobre laboratorijske prakse, uključujući održavanje opreme, koje su vezane uz molekularnu biologiju i koje su u skladu s primjenjivim odredbama i relevantnim standardima.

Ovaj komplet je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. Reagensi i upute koji su priloženi uz ovaj komplet predviđeni su za optimalnu izvedbu. Daljnje razrjeđivanje reagenasa ili izmjena vremena i temperatura inkubacije za rezultat može imati krive ili odstupajuće podatke. Do promjene PPM-WT i PPM-VF reagenasa može doći ukoliko se izlože svjetlosti. Svi reagensi su formulirani specifično za uporabu s ovim testom. Da bi se postigla optimalna izvedba testa, ne smiju se vršiti nikakve preinake.

Budite iznimno oprezni kako biste spriječili:

- kontaminaciju dezoksiribonukleazom koja može prouzročiti degradaciju matične DNA.
- kontaminaciju DNA ili kontaminaciju zbog prijenosa u PCR koja za rezultat ima lažno pozitivan signal

Zbog toga mi preporučamo sljedeće.

- Koristite laboratorijsku opremu bez prisutnosti nukleaze (npr. pipete, vrhove pipeta, reakcijske bočice) i nosite rukavice kad provodite testiranje.
- Koristite svježih vrhove pipeta otporne na aerosole za sve korake pipetiranja kako biste spriječili križnu kontaminaciju uzoraka i reagenasa.
- Pripremite glavnu mješavinu prije PCR s priloženim materijalom (pipete, vrhovi, itd.) na predviđenom mjestu gdje nisu uvedene DNA matrice (DNA, plazmid ili proizvodi PCR). Dodajte matricu na odvojenom mjestu (po mogućnosti u odvojenoj prostoriji) s predviđenim materijalom (pipete, vrhovi, itd.).

## Pohranjivanje i rukovanje reagensima

Kompleti se isporučuju na suhom ledu i po prijemu se moraju pohraniti na temperaturi od  $-15^{\circ}\text{C}$  do  $-30^{\circ}\text{C}$ .

- Pobrinite se da se mješavine primera i proba što manje izlažu svjetlosti (PPM-WT i PPM-VF epruvete).
- Lagano promiješajte i centrifugirajte epruvete prije otvaranja.
- Čuvajte sve komponente kompleta u originalnim spremnicima.

Ovi uvjeti pohrane odnose se i na otvorene i na neotvorene komponente. Komponente koje se pohranjuju pod nekim drugim uvjetima a ne onim koji su navedeni na naljepnicama možda neće pravilno funkcionirati i mogu negativno utjecati na rezultate testiranja.

Rokovi valjanosti za svaki reagens su navedeni na naljepnicama pojedinačnih komponenti. Pod pravilnim uvjetima pohrane proizvod će nastaviti funkcionirati do isteka roka valjanosti koji je otisnut na naljepnici.

Nema očiglednih znakova koji ukazuju na nestabilnost ovog proizvoda. Međutim, pozitivne i negativne kontrole moraju se provoditi istodobno s nepoznatim uzorcima.

# Postupak

## Priprema DNA iz uzorka

Genomsku DNA treba uzeti iz pune krvi, limfocita pročišćene periferne krvi iz pune krvi, polinuklearnih stanica ili granulocita. Za usporedive rezultate preporuča se uporaba iste stanične frakcije i metode ekstrakcije DNA. Ekstrakcija DNA može se provesti primjenom metode iz kućne izrade ili pomoću kompleta koji je dostupan u prodaji.

Količinu DNA treba odrediti mjerenjem optičke gustoće (OD) uzorka pri 260 nm, a kvaliteta DNA se može odrediti ili spektrofotometrijom ili elektroforezom s gelom\*.

- $OD_{260}/OD_{280}$  omjer treba biti između 1,7–1,9 dok manji omjeri od ovog mogu ukazivati na kontaminaciju proteinom ili prisutnost organskih kemikalija.
- Elektroforetska analiza na 0,8–1,0% agaroznom gelu\* treba omogućiti vizualizaciju izolirane DNA kao zasebne grupe od približno 20 kb (laganim razmazivanjem postići će se prihvatljivi rezultati).

DNA koja se dobije kao rezultat bit će potrebno razrijediti u koncentraciji od 5 ng/ $\mu$ l u 1x TE pufer\* pri pH 8,0 i potom pohraniti pri +4 do +8°C tijekom 1 tjedan ili pri –20°C ako je potrebno dulje pohranjivanje.

qPCR reakcija je optimirana za DNA uzorke koji sadržavaju 25 ng pročišćene genomske DNA.

\* Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija pogledajte odgovarajuće listove sa sigurnosnim podacima (SDSs) koji su dostupni kod dobavljača proizvoda.

## Protokol: qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete

Koristite li ovaj instrument, preporučamo provođenje svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u tablici 2.

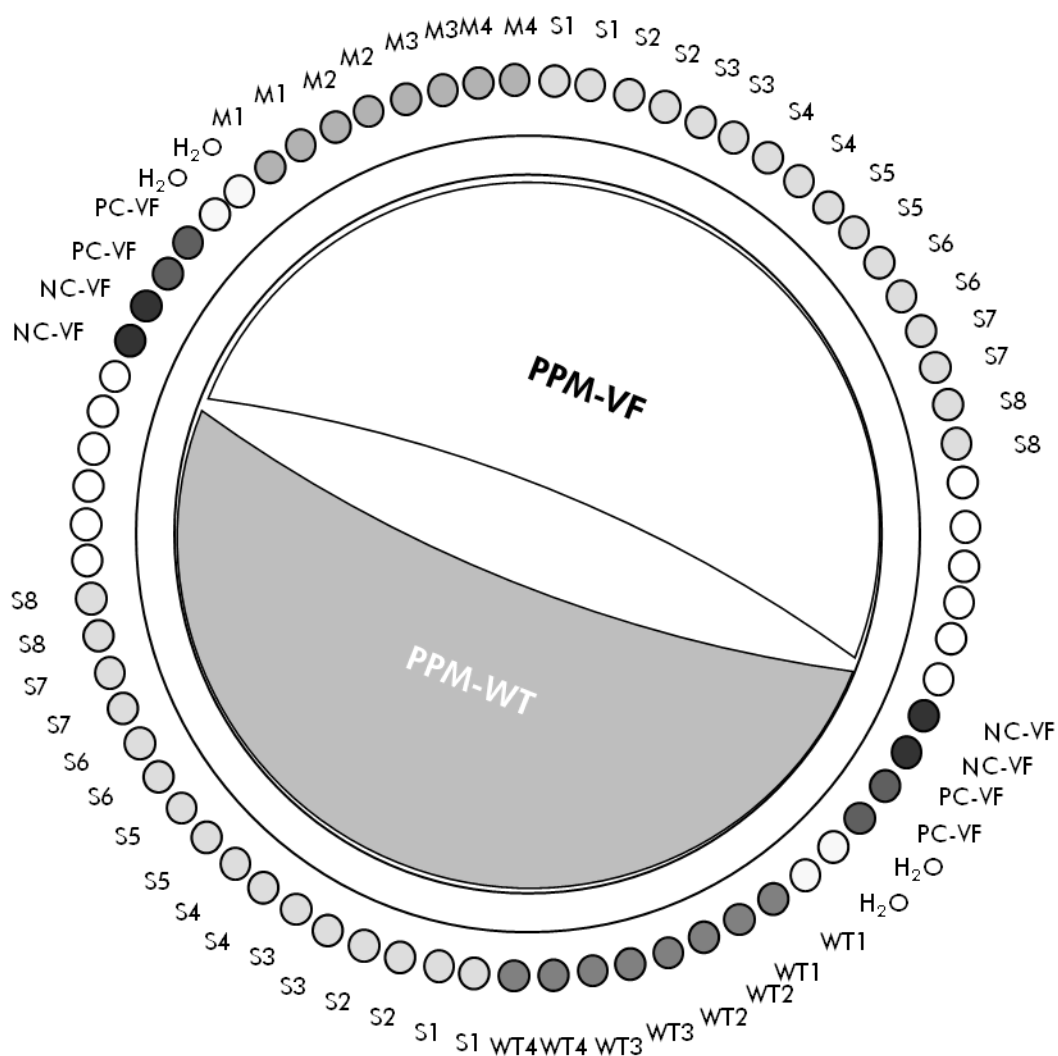
**Tablica 2. Broj reakcija za instrumente Rotor-Gene Q s rotorom sa 72-epruvete**

Uzorci	Reakcije
<b>S mješavinom primera i probe za JAK2 V617F (PPM-VF)</b>	
4 M-VF standarda	8 reakcija, svaka od njih testirana dvaput
n DNA uzoraka	n x 2 reakcije
2 DNA kontrole	4 reakcije: pozitivna kontrola (PC-VF) i negativna kontrola (NC-VF), svaka od njih testirane dvaput
Kontrola vode	2 reakcije
<b>S mješavinom primera i probe za JAK2 divljeg tipa (PPM-WT)</b>	
4 standarda divljeg tipa	8 reakcija, svaka od njih testirana dvaput
n DNA uzoraka	n x 2 reakcije
2 DNA kontrole	4 reakcije: PC-VF i NC-VF, svaka od njih testirana dvaput
Kontrola vode	2 reakcije

### Obrada uzoraka na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Mi preporučamo testiranje najmanje 8 DNA uzoraka s kompletom za 24 reakcije (kataloški br. 673523) i najmanje 6 DNA uzoraka s kompletom za 12 reakcija (kataloški br. 673522) u istom eksperimentu kako bi se optimirala uporaba standarda i mješavina primera i proba.





**Slika 3. Predložena postavka rotora za svaki eksperiment s kompletom *ipsogen 24 sample JAK2 MutaQuant*. PC-VF: V617F pozitivna kontrola; NC-VF: V617F negativna kontrola; M-VF: V617F standardi; M-WT: standardi divljeg tipa; S: DNA uzorak; H<sub>2</sub>O: kontrola vode.**

**Napomena:** Pobrinite se da uzorak koji treba testirati uvijek stavite u poziciju 1 na rotoru. U suprotnom, tijekom koraka kalibracije, instrument neće provesti kalibraciju i prikupit će se netočni podaci o fluorescenciji.

Popunite sve ostale pozicije praznim epruветama.

### qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruветe

**Napomena:** Provedite sve korake na ledu.

#### Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablicama 3 i 4 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25  $\mu$ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu istih mješavina primera i proba (ili PPM-VF ili PPM-WT). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

**Tablica 3. Priprema mješavine za qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>V617F predmješavina 30 + 1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Konačna koncentracija</b>
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	387,5	1x
Mješavina primera i proba, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	201,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	–
ukupni volumen	25,0	svaki po 25	–

**Tablica 4. Priprema mješavine za qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT predmješavina 30 + 1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Konačna koncentracija</b>
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	387,5	1x
Mješavina primera i proba, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	201,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	–
ukupni volumen	25,0	svaki po 25	–

- 3. Uzmite 20  $\mu$ l predmješavine za qPCR (VF ili WT) po epruveti.**
- 4. Dodajte 5  $\mu$ l materijala koji treba kvantificirati (25 ng uzorka genomske DNA ili kontrole) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 25  $\mu$ l).**
- 5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
- 6. Stavite epruvete u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.**
- 7. Programirajte instrument Rotor-Gene Q s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 5.**

**Tablica 5. Temperaturni profil**

<b>Način analiziranja</b>	<b>Kvantifikacija</b>
<b>Hold</b>	temperatura: 50 stup. vrijeme: 2 min
<b>Hold 2</b>	temperatura: 95°C vrijeme: 10 min
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C tijekom 15 sek. 62°C tijekom 1 min uz prikupljanje FAM fluorescencije u kanalu Green (Zeleno): pojedinačno

- 8. Za instrumente Rotor-Gene Q odaberite "Slope Correct" (Ispravka pada krivulje) za analizu. Mi preporučamo postavljanje granice na 0,03. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 5.**

## Protokol: qPCR na instrumentu ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Koristite li opremu s pločom s po 96 udubljenja za qPCR, preporučamo provođenje svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u tablici 6.

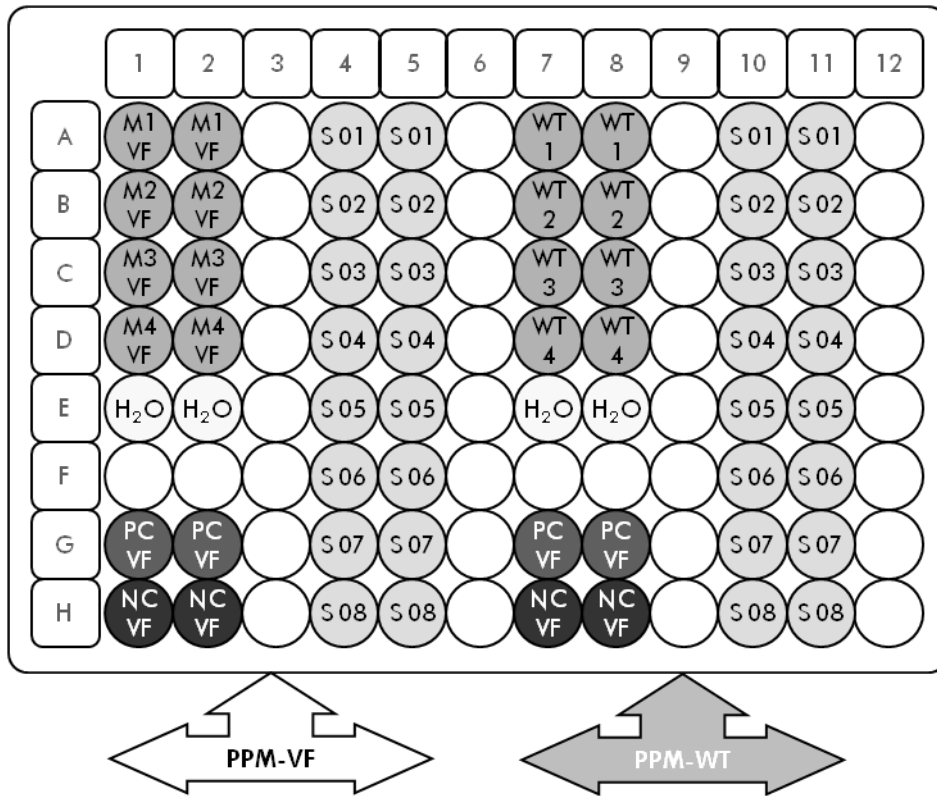
**Tablica 6. Broj reakcija uz uporabu opreme s pločom s po 96 udubljenja za qPCR**

Uzorci	Reakcije
<b>S mješavinom primera i probe za JAK2 V617F (PPM-VF)</b>	
4 M-VF standarda	8 reakcija, svaka od njih testirana dvaput
n DNA uzoraka	n x 2 reakcije
2 DNA kontrole	4 reakcije: PC-VF i NC-VF, svaka od njih testirana dvaput
Kontrola vode	2 reakcije
<b>S mješavinom primera i probe za JAK2 divljeg tipa (PPM-WT)</b>	
4 standarda divljeg tipa	8 reakcija, svaka od njih testirana dvaput
n DNA uzoraka	n x 2 reakcije
2 DNA kontrole	4 reakcije: PC-VF i NC-VF, svaka od njih testirana dvaput
Kontrola vode	2 reakcije

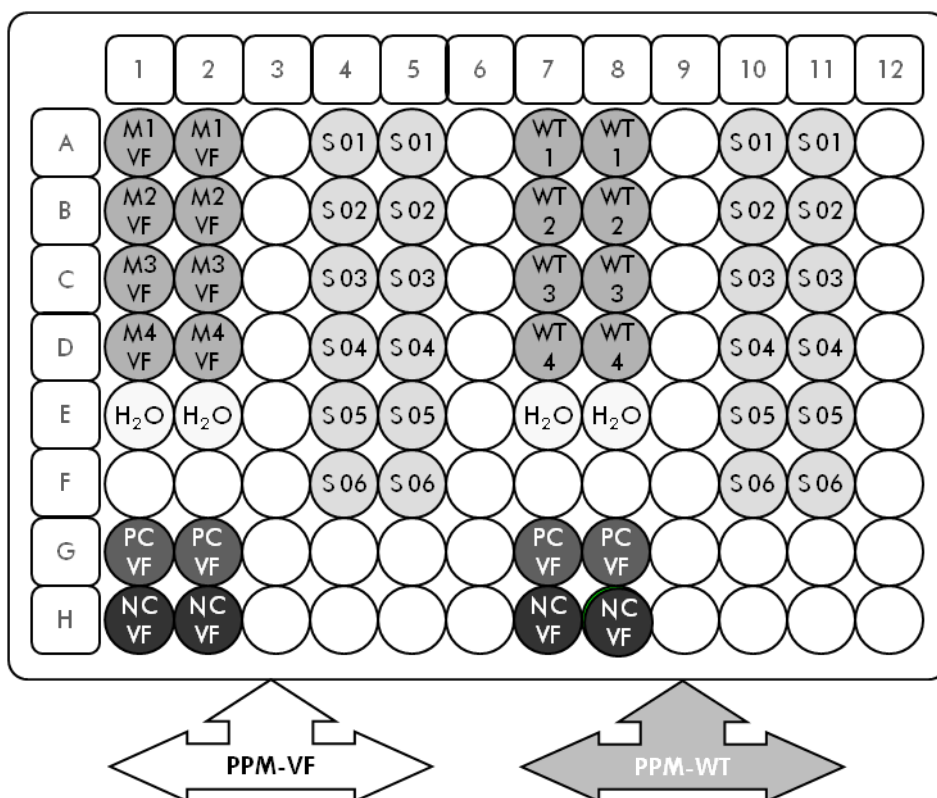
### Obrada uzoraka na instrumentu ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Mi preporučamo testiranje 8 DNA uzoraka s kompletom za 24 reakcije (kataloški br. 673523) i najmanje 6 DNA uzoraka s kompletom za 12 reakcija (kataloški br. 673522) u istom eksperimentu kako bi se optimirala uporaba standarda i mješavina primera i proba.

Shema ploče na slici 4 prikazuje primjer eksperimenta s uporabom kompleta za 24 reakcije (kataloški br. 673523), a na slici 5 prikazan je primjer eksperimenta s uporabom kompleta za 12 reakcija (kataloški br. 673522)



**Slika 4. Predložena postavka ploče za jedan eksperiment uz uporabu kompleta za 24 reakcije (kataloški br. 673523). PC-VF:** V617F pozitivna kontrola; **NC-VF:** V617F negativna kontrola; **M-VF:** V617F standardi; **M-WT:** standardi divljeg tipa; **S:** DNA uzorak; **H<sub>2</sub>O:** kontrola vode



**Slika 5. Predložena postavka ploče za jedan eksperiment uz uporabu kompleta za 12 reakcije (kataloški br. 673522). PC-VF:** V617F pozitivna kontrola; **NC-VF:** V617F negativna kontrola; **M-VF:** V617F standardi; **M-WT:** standardi divljeg tipa; **S:** DNA uzorak; **H<sub>2</sub>O:** kontrola vode

## qPCR na instrumentu ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

**Napomena:** Provedite sve korake na ledu.

### Postupak

- Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.**
- Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.**

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablicama 7 i 8 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25  $\mu$ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu istih mješavina primera i proba (ili PPM-VF ili PPM-WT). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

**Tablica 7. Priprema mješavine za qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>V617F predmješavina</b>			<b>Konačna koncentracija</b>
	<b>1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>26 + 1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>30 + 1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mješavina primera i proba, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	175,5	201,5	–
Uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	svaki po 5	–
Ukupni volumen	25,0	svaki po 25	svaki po 25	–



**Tablica 8. Priprema mješavine za qPCR**

Komponenta	WT predmješavina			Konačna koncentracija
	1 reakcija ( $\mu$ l)	26 + 1 reakcija ( $\mu$ l)	30 + 1 reakcija ( $\mu$ l)	
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mješavina primera i proba, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	175,5	201,5	–
Uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	svaki po 5	–
Ukupni volumen	25,0	svaki po 25	svaki po 25	–

3. Uzmite 20  $\mu$ l predmješavine za qPCR (VF ili WT) po udubljenju.
4. Dodajte 5  $\mu$ l materijala koji treba kvantificirati (25 ng uzorka genomske DNA ili kontrole) u odgovarajuće udubljenje (ukupni volumen 25  $\mu$ l).
5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.
6. Zatvorite ploču i kratko centrifugirajte (300 x g, približno 10 sekundi).
7. Stavite ploču u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.
8. Programirajte amplifikator s programom za toplinsko cikliranje i podesite instrument za prikupljanje dvostruko označene FAM fluorescentne probe kao što je navedeno u tablici 9 za instrument ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ili tablici 10 za instrument LightCycler 480.

**Tablica 9. Temperaturni profil za ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Način analiziranja</b>	Standardna krivulja — Apsolutna kvantifikacija
<b>Hold</b>	temperatura: 50°C vrijeme: 2 minuta
<b>Hold 2</b>	temperatura: 95°C vrijeme: 10 minuta
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C tijekom 15 sekundi 63°C tijekom 1 minutu i 30 sekundi s prikupljanjem FAM fluorescencije; hvatač: TAMRA

**Tablica 10. Temperaturni profil za instrument LightCycler 480**

<b>Način analiziranja</b>	Apsolutna kvantifikacija ("Abs Quant")
<b>Formati detekcije</b>	Odaberite "Simple Probe" ("Jednostavna proba") u prozoru za formate detekcije
<b>Hold</b>	temperatura: 50°C vrijeme: 2 minuta
<b>Hold 2</b>	temperatura: 95°C vrijeme: 10 minuta
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C tijekom 15 sekundi 63°C tijekom 1 minutu i 30 sekundi s prikupljanjem FAM fluorescencije što odgovara (483–533 nm) za LC verziju 01 i (465–510 nm) za LC verziju 02

**9. Za ABI PRISM 7900HT i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System slijedite korak 9a. Za instrument LightCycler 480 slijedite korak 9b.**

**9a. ABI PRISM 7900HT i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Preporučamo postavljanje granice na 0,1. Pokrenite program cikliranja kao što je navedeno u tablici 9.**

**9b. LightCycler 480: Preporučamo način analize "Fit point" s pozadinom na 2,0 i granicom na 2,0. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 10.**

## Protokol: qPCR na instrumentu LightCycler 1.2

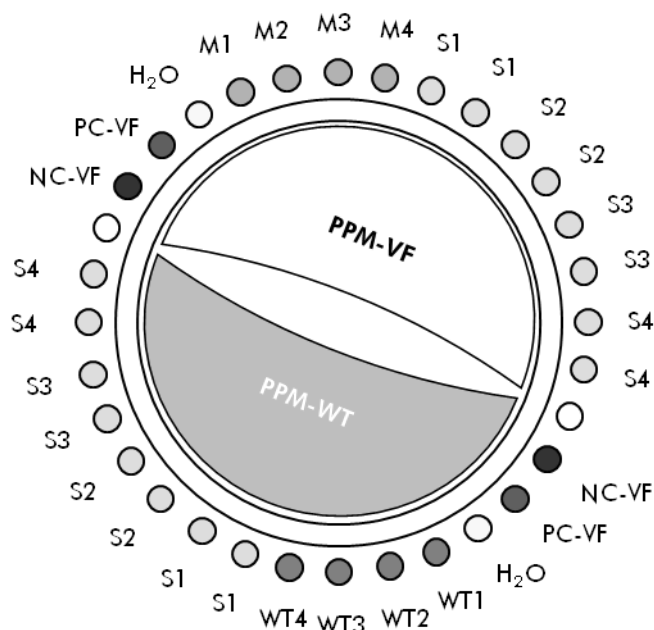
Ako se koriste kapilarni instrumenti, preporučamo mjerenje uzoraka dvaput, a kontrola samo jednom, kao što je navedeno u tablici 11.

**Tablica 11. Broj reakcija za instrument LightCycler 1.2**

Uzorci	Reakcije
<b>S mješavinom primera i probe za JAK2 V617F (PPM-VF)</b>	
4 M-VF standarda	4 reakcije, svaka od njih testirana jednom
n DNA uzoraka	n x 2 reakcije
2 DNA kontrole	2 reakcije: PC-VF i NC-VF, svaka od njih testirana jednom
Kontrola vode	1 reakcija
<b>S mješavinom primera i probe za JAK2 divljeg tipa (PPM-WT)</b>	
4 standarda divljeg tipa	4 reakcije, svaka od njih testirana jednom
n DNA uzoraka	n x 2 reakcije
2 DNA kontrole	2 reakcije: PC-VF i NC-VF, svaka od njih testirana jednom
Kontrola vode	1 reakcija

### Obrada uzoraka na instrumentu LightCycler 1.2

Mi preporučamo testiranje 4 uzorka DNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Kapilarna shema na slici 6 prikazuje primjer takvog pokusa.



**Slika 6. Predložena postavka rotora za svaki eksperiment s kompletom *ipsogen JAK2 MutaQuant*. PC-VF: V617F pozitivna kontrola; NC-VF: V617F negativna kontrola; M-VF: V617F standardi; M-WT: standardi divljeg tipa; S: DNA uzorak; H<sub>2</sub>O: kontrola vode.**

## qPCR na instrumentu LightCycler 1.2

**Napomena:** Zbog posebnih tehnoloških zahtjeva eksperimenti s instrumentom LightCycler moraju se provoditi uz uporabu specifičnih reagenasa. Mi preporučamo uporabu LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe i slijedenje uputa proizvođača za pripremu glavne mješavine 5x.

**Napomena:** Provedite sve korake na ledu.

### Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablicama 12 i 13 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 20  $\mu$ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu istih mješavina primera i proba (ili PPM-VF ili PPM-WT). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

**Tablica 12. Priprema mješavine za qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>V617F predmješavina 15 + 1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Konačna koncentracija</b>
Svježe pripremljena mješavina LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe, 5x	4,0	64,0	1x
Mješavina primera i proba, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Sterilna voda bez nukleaze za PCR	10,2	163,2	–
Uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	–
Ukupni volumen	20,0	svaki po 20	–

**Tablica 13. Priprema mješavine za qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT predmješavina 15 + 1 reakcija (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Konačna koncentracija</b>
Svježe pripremljena mješavina LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe, 5x	4,0	64,0	1x
Mješavina primera i proba, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Sterilna voda bez nukleaze za PCR	10,2	163,2	–
Uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	–
Ukupni volumen	20,0	svaki po 20	–

- 3. Uzmite 15  $\mu$ l predmješavine za qPCR (VF ili WT) po kapilaru.**
- 4. Dodajte 5  $\mu$ l materijala koji treba kvantificirati (25 ng uzorka genomske DNA ili kontrole) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 20  $\mu$ l).**
- 5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
- 6. Stavite kapilare u adaptere koji su priloženi uz aparaturu i kratko centrifugirajte (700 x g, približno 10 sekundi).**
- 7. Stavite kapilare u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.**
- 8. Programirajte instrument LightCycler 1.2 s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 14.**

**Tablica 14. Temperaturni profil**

<b>Način analiziranja</b>	<b>Kvantifikacija</b>
<b>Hold 1</b>	Temperatura: 55°C Vrijeme: 2 minuta Rampa: 20
<b>Hold 2</b>	Temperatura: 95°C Vrijeme: 10 minuta Rampa: 20
<b>Cikliranje</b>	50 puta 95°C tijekom 15 sekundi; rampa: 20 66°C tijekom 1 minute; rampa: 20; s prikupljanjem FAM fluorescencije: pojedinačno

- 9. Za LightCycler 1.2 preporučuje se način rada F1/F2 i "2. derivativna analiza". Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 14.**



# Tumačenje rezultata

## Načelo analize podataka

Vrijednosti podataka za granični ciklus ( $C_T$ ) i točke križanja ( $C_P$ ) mogu se izvesti iz qPCR instrumenta i unijeti u Excel® dokument radi analize. Te vrijednosti se potom mogu koristiti za izračunavanje srednje vrijednosti za  $C_P$  i  $C_T$  i standardne srednje  $C_T$  vrijednosti se mogu obilježiti kako bi se dobila standardna krivulja za standarde divljeg tipa i V617F standarde pomoću sljedeće jednadžbe i tablice 15.

$y = \text{srednja } C_P; x = \log_{10} \text{ CN}$  gdje je CN = broj genske kopije u uzorku od 5  $\mu\text{l}$

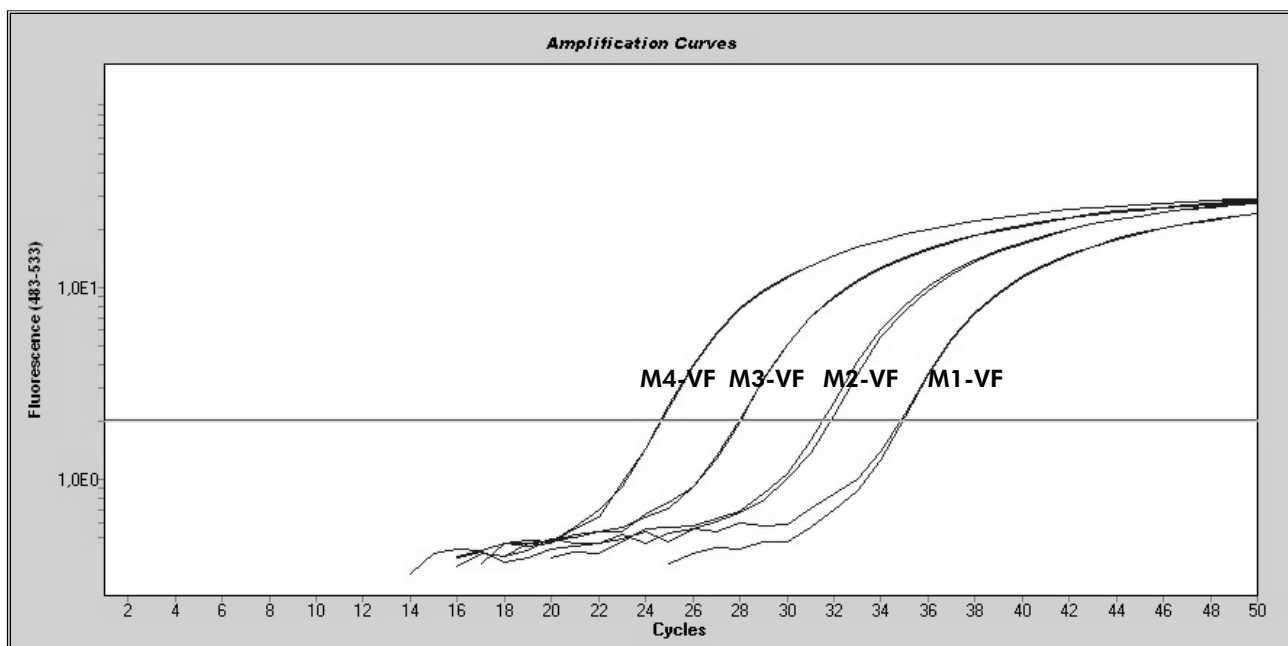
**Tablica 15. Kvantitativni podaci za standarde divljeg tipa i V617F standarde**

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

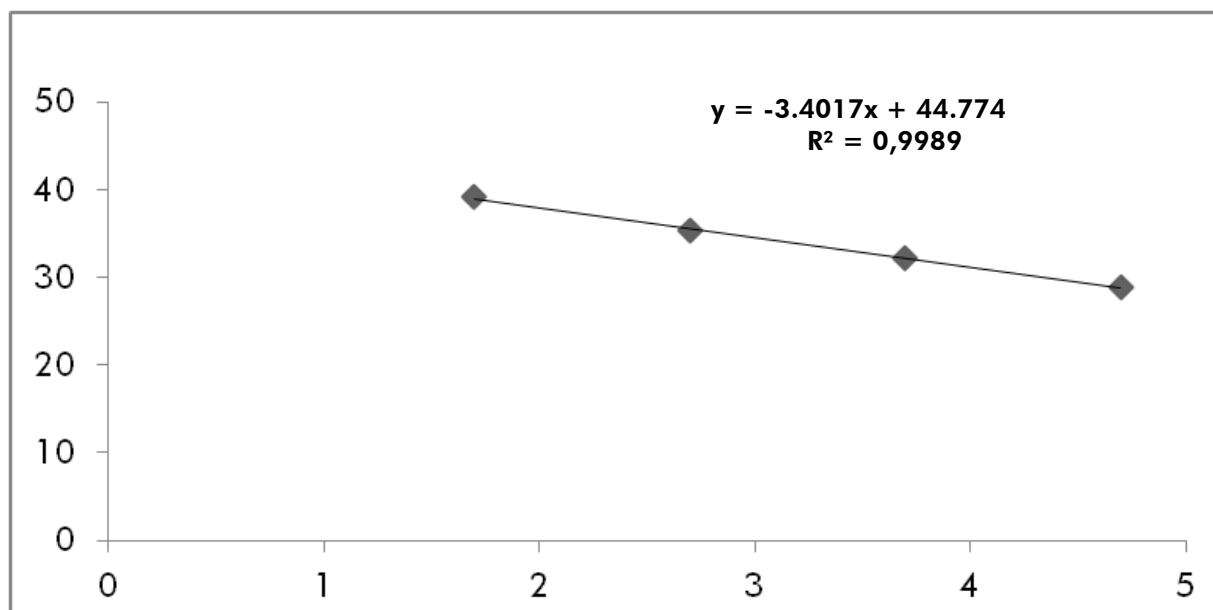
**Napomena:** Svaki korisnik treba izmjeriti svoju vlastitu ponovljivost u svom laboratoriju.

## Standardna krivulja i kriteriji kvalitete

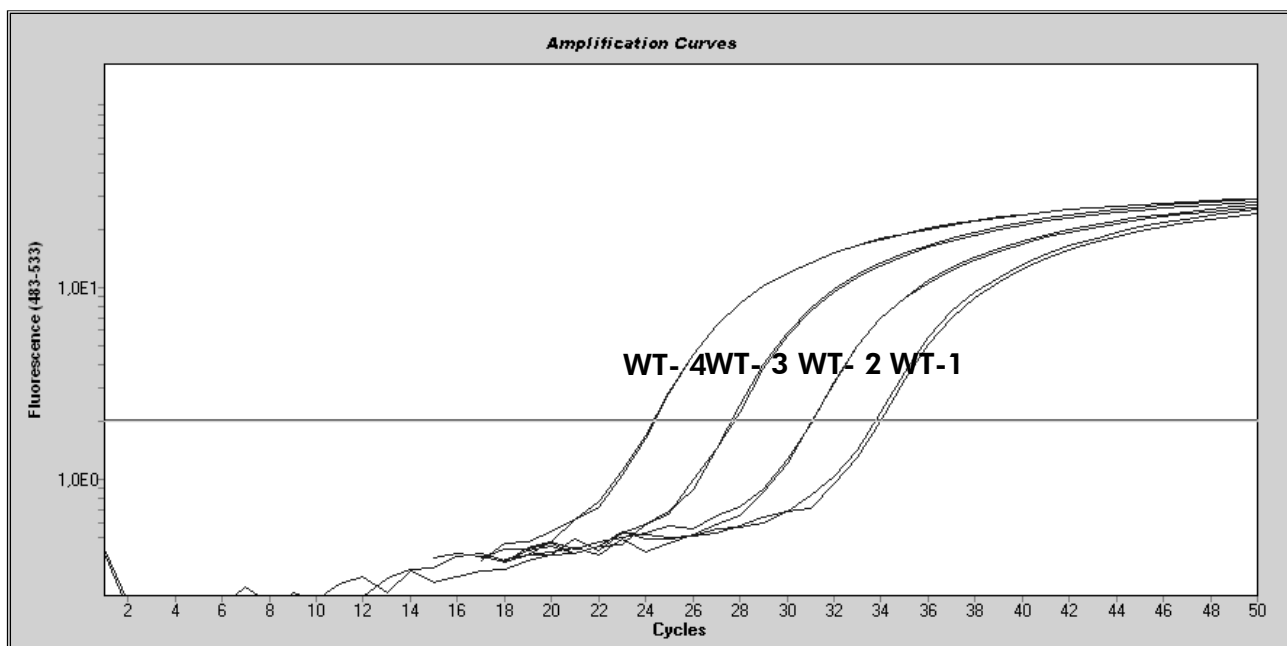
Na slikama 7 i 9 prikazani su primjeri rezultata koji su dobiveni s kompletom *ipsogen JAK2 MutaQuant* a na slikama 8 i 10 prikazan je primjer teoretske krivulje koja je izračunata s 4 standardne otopine.



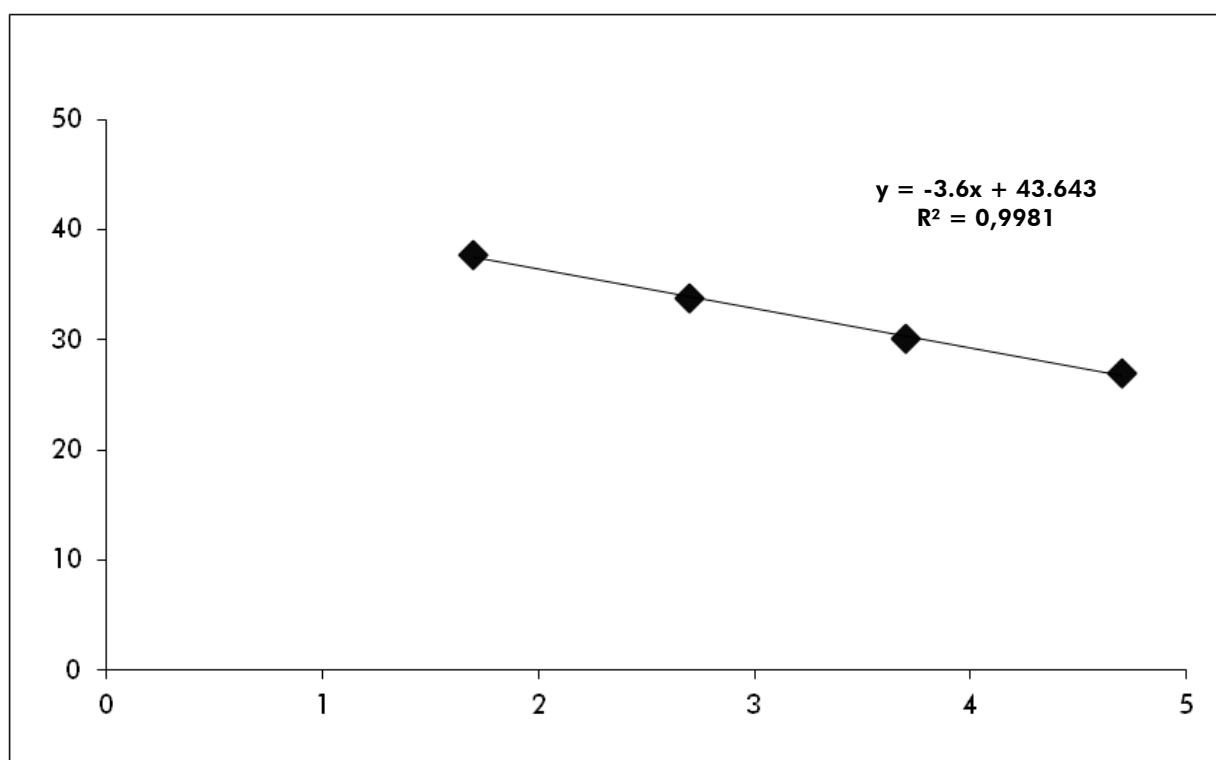
Slika 7. Oznaka amplifikacije za kopije  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  i  $5 \times 10^4$  plazmida JAK2 V617F (kontrola M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF).



Slika 8. Standardna krivulja za JAK2 V617F.



**Slika 9. Oznaka amplifikacije za kopije  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  i  $5 \times 10^4$  plazmida JAK2 divljeg tipa (kontrola WT-1, WT-2, WT-3 i WT-4).**



**Slika 10. Standardna krivulja za JAK2 divljeg tipa.**

Kao standardi se koriste 10-erostruke otopine, teoretski pad krivulje je  $-3,32$ . Pad između  $-3,0$  i  $-3,9$  je prihvatljiv sve dok je  $R^2 > 0,95$  (12). Međutim, vrijednost za  $R^2 > 0,98$  je poželjna za precizne rezultate (13).

Jednadžba standardne krivulje može se potom koristiti za izračunavanje V617F i WT log<sub>10</sub> broja kopija u nepoznatim uzorcima.

Jednadžba standardne krivulje za V617F treba se koristiti za pretvorbu srednje vrijednosti neobrađenih C<sub>P</sub>/ C<sub>T</sub> podataka (dobivenih s PPM-VF) za nepoznate i kontrolne uzorke u JAK2 V617F brojeve kopija (CN<sub>V617F</sub>).

$$\log_{10} \text{CN}_{V617F} = \frac{(\text{srednja vrijednost } C_{pV617F} - \text{sjecište standardne krivulje}_{V617F})}{\text{Pad standardne krivulje}_{V617F}}$$

Jednadžba standardne krivulje za divlji tip treba se koristiti za pretvorbu srednje vrijednosti neobrađenih C<sub>P</sub>/ C<sub>T</sub> podataka (dobivenih s PPM-WT) za nepoznate i kontrolne uzorke u brojeve kopija JAK2 divljeg tipa (CN<sub>WT</sub>).

$$\log_{10} \text{CN}_{WT} = \frac{(\text{srednja vrijednost } C_{pWT} - \text{sjecište standardne krivulje}_{WT})}{\text{Pad standardne krivulje}_{WT}}$$

### Izražavanje rezultata

Rezultati su relativni do 25 ng od ukupne genomske DNA i treba ih izraziti kao postotak JAK2 V617F na sljedeći način.

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

### Ponovljivost između replikacija

Dobiveni podaci za duplikate moraju biti konzistentni.

### Pozitivne i negativne kontrole

Pozitivna kontrola ili PC-VF treba dati JAK2 V617F postotak koji je veći od 99,9%.

Negativna kontrola ili NC-VF treba dati JAK2 V617F postotak koji je manji od 0,1%.

Ako ove kontrole ne funkcioniraju ispravno, molimo pogledajte "Vodič za uklanjanje smetnji", stranica 37 kako biste pronašli rješenje.

## Kontrole vode

Negativne kontrole trebaju dati nulti CN za detekcije JAK2 V617F i JAK2 divljeg tipa.

Pozitivni rezultati kontrole vode iz križne kontaminacije. Vidjeti "Vodič za uklanjanje smetnji" ispod kako biste pronašli rješenje.

## Vodič za uklanjanje smetnji

Ovaj vodič za uklanjanje smetnji može biti od koristi u rješavanju svih problema koji se mogu pojaviti. Za više informacija pogledajte i stranicu Često postavljana pitanja u našem Centru za tehničku podršku:

**[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)**. Znanstvenici u tehničkim službama tvrtke QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokol u ovom priručniku ili uzorak i tehnologije testiranja (za kontakt informacije pogledajte "Kontakt informacije", stranica 46).

## Komentari i prijedlozi

---

### Standardna krivulja za divlji tip ili V617F nije linearna

Preokretanje bočice, preokretanje tijekom raspodjele, križna kontaminacija, djelomična razgradnja standarda, RQPCR reagensa, nespecifična amplifikacija ili greška programa PCR

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.

Čuvajte komplet *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* pri temperaturi –15 do –30°C i držite mješavine primera i proba zaštićene od svjetlosti. Vidjeti "Pohranjivanje i rukovanje reagensima", stranica 14.

Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje.

### Nema signala za jedan standard ili je signal slab

Standard nije raspodijeljen ili se koristi ista PPM mješavina

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.

Ponovite postupak PCR.

## Komentari i prijedlozi

---

### Negativna (H<sub>2</sub>O) kontrola je pozitivna

Križna kontaminacija, kontaminacija reagensa, greška na instrumentu, preokretanje udubljenja ili kapilara ili razgradnja probe

Zamijenite sve kritične reagense.

Uvijek rukujte uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalima u skladu s opće prihvaćenim praksama kako bi se izbjegla kontaminacija prijenosom.

Držite mješavine primera i proba zaštićene od svjetlosti.

Provjerite ima li lažno pozitivnih rezultata na krivuljama fluorescencije.

### Nema signala, čak i u standardnoj kontroli

a) Odabran je neodgovarajući kanal detekcije

Podesite kanal na F1/F2 ili 530 nm/640 nm.

b) Greška pri pipetiranju ili izostavljeni reagensi

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.

Ponovite postupak PCR.

c) Nema programa za prikupljanje podataka

Provjerite program cikliranja.

Odaberite način prikupljanja "Single" na kraju svakog segmenta vezivanja zagrijavanjem u programu PCR.

### Nema signala ili slab signal u uzorcima, ali standardne kontrole su u redu

Ometajući utjecaji materijala uzorka prouzročeni nedovoljnim pročišćavanjem

Uvijek provjerite kvalitetu i koncentraciju DNA (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) prije početka.

Ponovite preparaciju DNA.

### Jakost fluorescencije preslaba.

- a) Neodgovarajuća pohrana komponenti kompleta

Alikvotirajte reagense za pohranu.

Čuvajte komplet *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* pri temperaturi  $-15$  do  $-30^{\circ}\text{C}$  i držite mješavine primera i proba zaštićene od svjetlosti. Vidjeti "Pohranjivanje i rukovanje reagensima", stranica 14.

Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje.

- b) Vrlo mala početna količina ciljne DNA

Provjerite količinu DNA za uzorak.

**Napomena:** Ovisno o odabranoj metodi DNA preparacije, mogu se pojaviti ometajući efekti.

### Negativne kontrole su pozitivne

Kontaminacija prijenosom

Zamijenite sve kritične reagense.

Ponovite eksperiment s novim alikvotima svih reagenasa.

Uvijek rukujte uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalima u skladu s opće prihvaćenim praksama kako bi se izbjegla kontaminacija prijenosom.

### Jakost fluorescencije varira

- a) Greška pri pipetiranju

Sve reagense nakon odmrzavanja prpromiješajte uz vrtnju.

Varijabilnost rezultata s LightCycler prouzročena takozvanom "greškom pri pipetiranju" može se smanjiti analiziranjem podataka u načinu rada F1/F2 ili 530 nm/640 nm.

## Komentari i prijedlozi

---

- |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b) Nedovoljno centrifugiranje ploče, epruveta ili kapilara ili pripremljene mješavine za PCR može još uvijek biti u gornjoj komori kapilara ili je moguće da se zračni mjehur zadržao u vrhu kapilara | Uvijek centrifugirajte kapilare napunjene reakcijskom mješavinom kao što je opisano u odgovarajućem radnom priručniku aparature. |
| c) Vanjska površina vrha kapilara zaprljana                                                                                                                                                           | Uvijek nosite rukavice kad rukujete kapilarima.                                                                                  |

### Signal pozitivnih kontrola za divlji tip ili V617F koji koristi recipročni PPM

Križna kontaminacija, kontaminacija reagensa ili inverzija udubljenja ili kapilara

Zamijenite sve kritične reagense.

Ponovite eksperiment s novim alikvotima svih reagenasa.

Uvijek rukujte uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalima u skladu s opće prihvaćenim praksama kako bi se izbjegla kontaminacija prijenosom.

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.

### Invertirana detekcija pozitivne kontrole

Distribuirana inverzija PPM u udubljenju ili kapilaru ili u predmješavini

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.

### Nema signala za jednu pozitivnu kontrolu ili obje

PPM ili kontrolna DNA izostavljene

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.

### Visoka pozadina

Izbjeljivanje fluoroforom

Čuvajte probe i rukujte njima tako da su zaštićene od svjetlosti.

### Loša ponovljivost za duplicirane uzorke

Greška pri pipetiranju ili križna kontaminacija

Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.



## Kontrola kvalitete

Svaki dio kompleta *ipsogen JAK2 MutaQuant* se u skladu sa QIAGENOVIM ISO-certificiranim Sustavom upravljanja kvalitetom testira prema predodređenim specifikacijama, da bi se osigurala dosljedna kvaliteta. Certifikati analize dostupni su na zahtjev na web-mjestu [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Ograničenja

Korisnici moraju proći obuku i upoznati se s ovom tehnologijom prije uporabe ovog uređaja. Ovaj komplet treba koristiti uz slijeđenje uputa koje su navedene u ovom priručniku, u kombinaciji s validiranim instrumentom koji je naveden u "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 11.

Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti ovisno o ostalim kliničkim ili laboratorijskim nalazima. U odgovornost korisnika spada da potvrdi izvedbu sustava za sve postupke koji se koriste u njegovom laboratoriju a koji nisu pokriveni ispitivanjima izvedbi od strane tvrtke QIAGEN.

Potrebno je obratiti pozornost na rokove valjanosti koji su otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponenti. Ne koristite komponente čiji je rok valjanosti istekao.

# Karakteristike izvedbe

## Nekliničke studije

### Preciznost

Ispitivanje preciznosti provedeno je uz korištenje 12 uzoraka DNA koji su izdvojeni iz staničnih linija koje su odgovarale različitim veličinama alela JAK2 i V617F. Provedeno je ukupno 80 mjerenja na svakom uzorku uz uporabu 3 različite serije kompleta *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Za ovo ispitivanje preciznosti korišten je instrument Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Analitički podaci su sažeti u tablici 15.

**Tablica 15. DNA uzorci s preciznim podacima**

Uzorak	Teoretski JAK2 V617F (%)	n*	Srednja vrijednost (%)	CV (%)	Postotak	
					5	95
A	0	73	0,004	117,5	0,000	0,015
B	0,05	80	0,101	89,2	0,003	0,284
C	0,5	79	0,449	61,6	0,161	0,950
D	1	68	1,169	41,6	0,611	1,998
E	2	80	2,046	33,5	1,168	3,185
F	4	80	3,733	30,6	2,120	5,560
G	5	77	5,246	22,4	3,647	7,309
H	12,5	80	16,633	16,6	12,792	22,335
I	31	80	28,602	14,8	22,705	34,773
J	50	76	56,181	6,6	50,024	63,724
K	78	80	80,153	3,8	75,352	85,551
L	100	70	99,998	0,003	99,992	100,000

\* Vrijednosti izvan ovih raspona su isključene. One su definirane kao vrijednosti manje od donjeg kvartila minus 3 puta interkvartilni raspon ili veće od gornjeg kvartila plus 3 puta interkvartilni raspon na oznaci Box i Whisker.

n = broj validiranih uzoraka; CV = globalni koeficijent varijacije.

## Granica praznine i granica detekcije

Pozadinska razina ili razina praznine (LOB) utvrđena je na negativnim uzorcima (8 uzoraka, 76 mjerenja). Utvrđeno je da je to 0,014%.

Granica detekcije (LOD) je utvrđena pomoću uzoraka za koje se znalo da su pozitivni, ali s malom ekspresijom (7 uzoraka, 68 mjerenja). Utvrđeno je da je to 0,061%, s intervalom pouzdanosti od 90% čija je gornja granica na 0,091%.

Ova optimalna osjetljivost može se odrediti na uzorcima koji sadržavaju najmanje 10.000 kopija JAK2 gena (mutacija divljeg tipa ili V617F).

Podatke za kvantifikaciju treba objasniti na sljedeći način.

- JAK2 V617F  $\leq 0,014\%$  može se protumačiti kao da JAK2 V617F mutacija nije detektirana.
- JAK2 V617F je  $> 0,014\%$  ali  $< 0,091\%$  se može protumačiti kao nerazriješen rezultat (siva zona).
- JAK2 V617F  $\geq 0,091\%$  se može protumačiti kao pozitivan rezultat i da je JAK2 V617F mutacija detektirana.

## Linearnost

Ispitivanja linearnosti su provedena na 12 uzoraka, pri čemu je svaki dobiven iz različite mješavine DNA koja je izdvojena iz staničnih linija koje su bile pozitivne i negativne za JAK2 V617F mutaciju. Svaki uzorak je testiran 5 puta. Podaci iz ove studije pokazuju da je komplet *ipsogen* JAK2 MutaQuant dao linearne rezultate u dinamičkom rasponu.

## Klinička ispitivanja

DNA iz krvi ili koštane srži izdvojena je iz 87 uzoraka bolesnika i analizirana pomoću kompleta *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Osim toga, postotak JAK2 V617F mutacija je kvantificiran i uspoređen s rezultatima skrining testa koji su dobiveni s kompletom *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ (kataloški br. 673223). Dobiveni podaci su prikazani u tablici 16.

**Tablica 16. Kontingencijska tablica u kojoj su prikazane podudarnosti između rezultata dobivenih s kompletom *ipsogen JAK2 MutaQuant* i kompletom *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ***

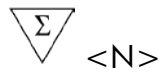
		Rezultati iz kompleta <i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ</i>			n
		Mutacija detektirana	Nerazrješiv rezultat	Mutacija nedetektirana	
Rezultati iz kompleta <i>ipsogen JAK2 MutaQuant</i>	Mutacija detektirana	40	2	7	49
	Nerazrješiv rezultat	0	0	21	21
	Mutacija nedetektirana	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Pozitivna podudarnost	100% (interval pouzdanosti od 95%: 91%, 100%)				
Negativna podudarnost	71% (interval pouzdanosti od 95%: 51%, 85%)				
Ukupna podudarnost	89% (interval pouzdanosti od 95%: 79%, 95%)				

## Reference

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT\_008413.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R. L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

## Simboli

Sljedeći simboli se mogu pojaviti na pakiranju i naljepnici:



Sadržava reagens koji je dovoljan za <N> reakcija



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski uređaj



Kataloški broj



Broj serije



Broj materijala



Global broj proizvoda (GTIN)



Ograničenje temperature



Proizvođač



Pogledati upute za uporabu

## Kontakt informacije

Za tehničku pomoć i više informacija molimo pogledajte naš Centar za tehničku podršku na poveznici [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), pozovite 00800-22-44-6000 ili kontaktirajte jedan od odjela tehničke službe tvrtke QIAGEN ili lokalne distributere (pogledajte stražnju koranicu ili posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Za 12 reakcije: JAK2 kontrolni gen divljeg tipa, JAK2 V617F kontrolni gen, mješavina primera i probe PPM-WT, mješavina primera i probe PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Za 24 reakcije: JAK2 kontrolni gen divljeg tipa, JAK2 V617F kontrolni gen, mješavina primera i probe PPM-WT, mješavina primera i probe PPM-VF	673523
<b>Rotor-Gene Q MDx - za IVD validiranu analizu PCR u realnom vremenu u kliničkim primjenama</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR uređaj u realnom vremenu i uređaj za analizu mekšanja velike razlučivosti (engl. High Resolution Melt analyzer, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i izradu, instalacija i obuka nisu uključene	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR uređaj u realnom vremenu i uređaj za analizu mekšanja velike razlučivosti (engl. High Resolution Melt analyzer, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i izradu, instalacija i obuka	9002033

Za aktualizirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju specifične za određen proizvod pogledajte odgovarajući priručnik za QIAGEN komplet ili korisnički priručnik. Priručnici za QIAGEN komplete i korisnički priručnici dostupni su na poveznici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili se mogu zatražiti od tehničkih službi tvrtke QIAGEN ili vašeg lokalnog distributera.





Ovaj proizvod je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. *ipsogen* proizvodi se ne smiju preprodavati, modificirati u svrhu preprodaje ili koristiti za izradu komercijalnih proizvoda bez pismenog odobrenja tvrtke QIAGEN.

Informacije u ovom dokumentu podložne su izmjenama bez prethodnog obavještenja. Tvrtka QIAGEN ne preuzima nikakvu odgovornost za bilo kakve greške koje se mogu pojaviti u ovom dokumentu. Ovaj dokument važi kao potpun i točan u trenutku objavljivanja. Ni u kojem slučaju tvrtka QIAGEN se ne može smatrati odgovornom za slučajne, posebne, višestruke ili posljedične štete koje nastanu u svezi s ovim dokumentom ili proizađu iz njegove uporabe.

Zajamčeno je da *ipsogen* proizvodi odgovaraju svojim navedenim specifikacijama. Jedina odgovornost tvrtke QIAGEN i jedini lijek za korisnika ograničeni su na besplatnu zamjenu proizvoda u slučaju da proizvodi ne funkcioniraju onako kako je zajamčeno.

JAK2 V617F mutacija i njena uporaba su zaštićeni pravima bolesnika, uključujući Europski patent EP1692281, Američki patent 7,429,456 i 7,781,199, Aplikacije američkog patenta US20090162849 i US20120066776 i strane prijepise.

Kupnjom ovog proizvoda ne stječe se nikakvo pravo na njegovu uporabu u kliničkim ispitivanjima lijekova za JAK2V617F. QIAGEN ima specifične programe licenciranja za takve uporabe. Molimo kontaktirajte naš pravni odjel na [jak2licenses@qiagen.com](mailto:jak2licenses@qiagen.com).

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

### Ugovor o ograničenom licenciranju

Uporaba ovog proizvoda znači prihvatanje sljedećih uvjeta od strane svakog kupca ili korisnika kompleta *ipsogen* JAK2 *MutaQuant*:

1. Komplet *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* može se koristiti samo u skladu s *Priručnikom za komplet* *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* i samo u kombinaciji s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne dodjeljuje licencu niti za jedno svoje intelektualno vlasništvo radi uporabe ili povezivanja priloženih komponenti ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije uključena u ovaj komplet osim onog što je opisano u priručniku za komplet *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* *Kit Handbook* i dodatnim protokolima koji su dostupni na poveznici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Osim kako je izričito navedeno u licencama, tvrtka QIAGEN ne daje nikakvo jamstvo da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krše prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno koristiti, prerađivati ili preprodavati.
4. Tvrtka QIAGEN posebice ne prihvaća nikakve druge licence, izričite ili implicirane, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik kompleta prihvaćaju da neće angažirati nikog drugog ili mu dopustiti da poduzima bilo kakve korake koji bi doveli do ili olakšali bilo kakve aktivnosti koje su gore zabranjene. Tvrtka QIAGEN na bilo kojem sudu može osporiti ovaj Ugovor o ograničenom licenciranju i može tražiti naknadu za sve troškove istrage i sudske troškove, uključujući troškove odvjetnika, na bilo koji način može nametnuti poštovanje ovog ugovora o ograničenom licenciranju ili bilo kojeg prava na svoje intelektualno vlasništvo vezano uz ovaj komplet i/ili njegove komponente.

Za aktualizirane uvjete o licenciranju posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, sva prava pridržana.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

