

РЪКОВОДСТВО за *ipsogen*[®] JAK2 MutaQuant[®] Kit

 12 (каталожен № 673522)

 24 (каталожен № 673523)

Версия 1

IVD

Количествена ин витро диагностика

За употреба с Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS,
Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System и
инструментите LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

R3

MAT

1072501BG



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN е водещ доставчик на иновативни технологии за проби и анализи, позволяващи изолиране и откриване на съдържание във всяка биологична проба. Нашите модерни висококачествени продукти и услуги гарантират успех от вземането на проба до получаването на резултат.

QIAGEN задава стандартите при:

- Пречистване на ДНК, РНК и протеини
- Анализи на нуклеинови киселини и протеини
- Изследване на микроРНК и РНК интерференция (RNA interference, RNAi)
- Автоматизиране на технологиите за проби и анализи

Мисията ни е да ви осигуряваме възможности за постигане на изключителни успехи и открития. За повече информация посетете www.qiagen.com.

Съдържание

Предназначение	4
Кратко изложение и обяснение	4
Принципи на процедурата	6
Предоставени материали	10
Съдържание на комплекта	10
Необходими, но непредоставени материали	11
Предупреждения и предпазни мерки	12
Общи предпазни мерки	12
Съхранение и работа на реактивите	13
Процедура	14
Получаване на ДНК проба	14
Протокол: qPCR в апарати Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM или Rotor-Gene Q 5plex HRM с ротор за 72 епруветки	15
Протокол: qPCR на ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System и апарат LightCycler 480	20
Протокол: qPCR на апарат LightCycler 1.2	26
Интерпретиране на резултатите	30
Ръководство за отстраняване на проблеми	34
Качествен контрол	38
Ограничения	38
Работни характеристики	39
Неклинични проучвания	39
Клинични проучвания	40
Литературни източници	42
Символи	43
Информация за контакти	43
Информация за поръчки	44

Предназначение

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit е ин витро количествен тест, предназначен за откриване и количествено характеризиране на алел JAK2 V617F/G1849T в геномна ДНК, извлечена от периферната кръв на пациенти с подозрения за миелопролиферативна неоплазма (myeloproliferative neoplasm, MPN).

Отсъствието на мутацията JAK2 V617F/G1849T не изключва наличието на други JAK2 мутации. Тестът може да докладва фалшиво отрицателни резултати в случай на допълнителни мутации, разположени в нуклеотиди 88504 до 88622 (1).

Забележка: Комплектът трябва да се използва съгласно дадените в настоящото ръководство инструкции, в комбинация с утвърдени реактиви и инструменти. Всяка употреба на този продукт и/или модификация на компонентите, които не отговарят на изискванията, ще анулира отговорността на QIAGEN.

Кратко изложение и обяснение

Рецидивираща соматична мутация – V617F, засягаща гена Янус-тирозин киназа 2 (JAK2), е идентифицирана през 2005 г. (2–5), което води до важно откритие за разбирането, класификацията и диагностиката на миелопролиферативна неоплазма (MPN). JAK2 е вътреклетъчна сигнализираща молекула от съществено значение за редица цитокини, включително еритропоетин.

Мутацията JAK2 V617F се открива при > 95% от пациентите с полицитемия вера (polycythemia vera, PV), 50–60% от пациентите с есенциална тромбоцитемия (essential thrombocythemia, ET) и при 50% от пациентите с първична миелофиброза (primary myelofibrosis, PMF). JAK2 V617F се открива също и в някои редки случаи на хронична миеломоноцитна левкемия, миелодиспластичен синдром, системна мастоцитоза и хронична неутрофилна левкемия, но в 0% от случаите на хронична миелоидна левкемия (chronic myeloid leukemia, CML) (6).

Мутацията съответства на промяна в един нуклеотид на JAK2 нуклеотид 1849 в екзон 14, водеща до уникално заместване на валин (V) с фенилаланин (F) в позиция 617 на белтъка (домен JH2). Това води до конститутивно активиране на JAK2, хематопоеична трансформация ин витро и растеж на еритропоетин-независима еритроидна колония (endogenous erythroid colony, EEC) при всички пациенти с PV и при голяма част от пациентите с ET и PMF (7). JAK2 V617F представлява ключов задвижващ елемент в трансформацията на хематопоеични клетки при MPN, но остават да бъдат напълно изяснени точните патологични механизми, които, при една и съща уникална мутация, водят до различни клинични и биологични единици.

Традиционно, диагностицирането на MPN се базираше на клинични, хистологични за костния мозък и цитогенетични критерии. Откриването на специфичен за заболяването молекулярен маркер доведе както до опростяване на процеса, така и до увеличена диагностична точност. Откриването на мутацията JAK2 V617F вече е част от референтните критерии на СЗО 2008 за диагностицирането на BCR-ABL отрицателна MPN (Таблица 1), а наличието на тази мутация е основен критерий за потвърждаване на диагнозата.

Таблица 1. Критерии на СЗО за диагностика на MPN (адаптирани от референция 8)

Критерии диагностика на полицитемия вера (PV)	
Основен	<p>1. Хемоглобин (Hgb) > 18,5 g.dl⁻¹ (мъже) или > 16,5 g.dl⁻¹ (жени) или Hgb или хематокрит (Hct) > 99-и перцентил на референтния диапазон за възраст, пол или надморска височина на пребиваване, или Hgb > 17 g.dl⁻¹ (мъже) или > 15 g.dl⁻¹ (жени), ако е свързан с устойчиво повишаване с ≥ 2 g.dl⁻¹ от базиса, което не може да се дължи на корекция на дефицит на желязо, или Увеличена маса на червените кръвни клетки > 25% над средната нормална прогнозна стойност</p> <p>2. Наличие на <i>JAK2V617F</i> или подобна мутация</p>
Второстепенен	<p>1. Трилинейна миелопролиферация на костен мозък 2. Ниво на серумния еритропоетин под нормата 3. Растеж на ендогенна еритроидна колония (ЕЕС)</p>
Критерии диагностика на есенциална тромбоцитемия (ЕТ)	
Основен	<p>1. Брой на тромбоцитите $\geq 450 \times 10^9$ l⁻¹ 2. Мегакариоцитна пролиферация с голяма и зряла морфология. Липса на или ниска гранулоцитна или еритроидна пролиферация 3. Не отговаря на критериите на СЗО за хронична миелоидна левкемия (СМЛ), PV, първична миелофиброза (PMF), миелодиспластичен синдром (myelodysplastic syndrome, MDS) или друга миелоидна неоплазма</p> <p>4. Демонстриране на <i>JAK2V617F</i> или на друг клонален маркер, или Липса на данни за реактивна тромбоцитоза</p>
Второстепенен	-

Критерии диагностика на първична миелофиброза (PMF)

Основен	<ol style="list-style-type: none">1. Мегакариоцитна пролиферация и атипия, придружени или от ретикулинова и/или от колагенова фиброза, или При отсъствие на ретикулинова фиброза, мегакариоцитните промени трябва да бъдат съпътствани от повишена костно-мозъчна целуларност, гранулоцитна пролиферация и често намалена еритропоеза (т.е. префибротична PMF)2. Не отговаря на критериите на СЗО за (CML), PV, MDS или друга миелоидна неоплазма3. Демонстриране на <i>JAK2V617F</i> или на друг клонален маркер, или Липса на данни за реактивна фиброза на костния мозък
Второстепенен	<ol style="list-style-type: none">1. Левко-еритробластоза2. Повишена серумна лактат дехидрогеназа (lactate dehydrogenase, LDH)3. Анемия4. Палпируема спленомегалия

Наскоро международни експерти предложиха критерии за терапевтични проучвания при PV и ET. На базата на данни за алогофт, алфа-интерферон или хидроксиуреа, количественото характеризиране на *JAK2V617F* е включено като потенциално полезен инструмент за наблюдение на отговора на лечението (9). В отговор на някои от новите прицелени към анти-*JAK2* лекарства в клинична разработка (10) се наблюдава понижението на *JAK2 V617F* натоварването.

Принципи на процедурата

Предложени са няколко различни методи за количествено определяне на частта на единични нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms, SNP) в ДНК проби. От тях се предпочитат методи, базирани на количествена полимеразна верижна реакция в реално време (quantitative polymerase chain reaction, qPCR), поради тяхната по-висока чувствителност, което дава възможност за наблюдение на алелния товар по надлъжен начин. Много от тези методи имат умерена чувствителност от 1–10%, например алелна дискриминация TaqMan®, Pyrosequencing®, анализ на кривата на топене и директно секвениране. Някои като кривата на топене и секвенирането са само полуколичествени анализи, докато други като пиросеквенирането изискват обработка след PCR, или за тях е необходима апаратура, която не е лесно достъпна или която има прекалено високи разходи за настройка за рутинни лабораторни

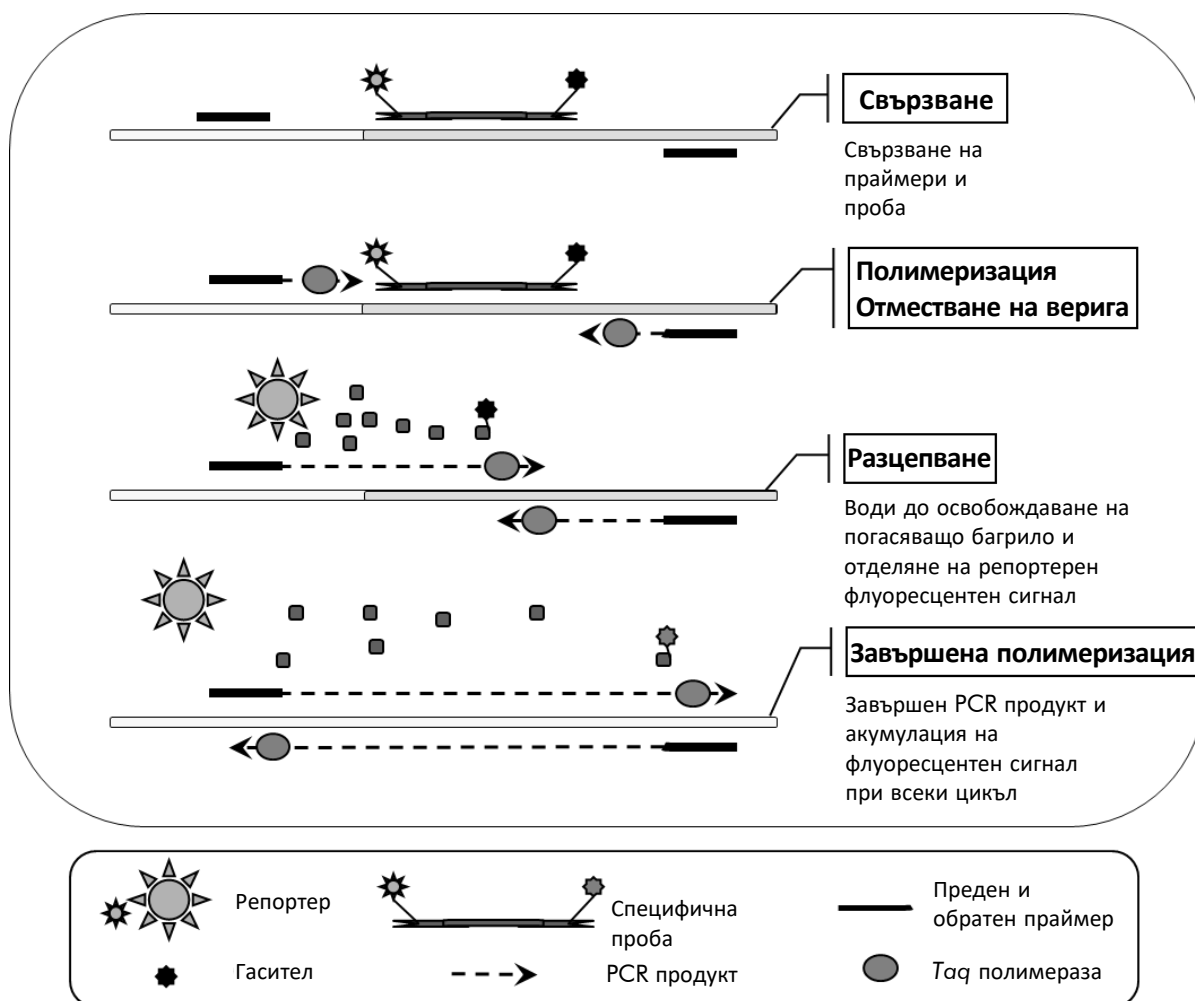
изследвания. Високочувствителен подход с чувствителност < 0,1% изисква използването на специфичен за SNP праймер, който позволява селективната амплификация на мутанта или дивия тип алел, която може лесно да бъде отчетена на qPCR инструмент в реално време. *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* е базиран на този метод.

Използването на qPCR позволява точното количествено определяне на PCR продукти по време на експоненциалната фаза на процеса на амплификация на PCR. Количествени PCR данни могат да бъдат получени бързо, без последваща PCR обработка, чрез откриване в реално време на флуоресцентни сигнали по време на и/или след циклите на PCR, като по този начин драстично се намалява риска от замърсяване на продукта на PCR. Към момента са налични 3 основни типа qPCR методи: qPCR анализ с използване на багрило SYBR® Green I, qPCR анализ с използване на проби за хидролиза и qPCR анализ с използване на проби за хибридизация.

Този анализ използва принципа на qPCR олигонуклеотидна хидролиза с две багрила. По време на PCR предни и обратни праймери хибридизират до специфична последователност. В същата смес се съдържа олигонуклеотид с две багрила. Тази проба, която се състои от олигонуклеотид, маркиран с 5' репортерно багрило и по-долно 3' погасяващо багрило, хибридизира до прицелна последователност в PCR продукта. qPCR анализ с проби за хидролиза използва 5'→3' екзонуклеазната дейност на ДНК полимеразата *Thermus aquaticus* (*Taq*). Когато пробата е цяла, близостта на репортерното багрило до погасяващото багрило води до потискане на репортерната флуоресценция основно чрез пренос на енергия тип Förster.

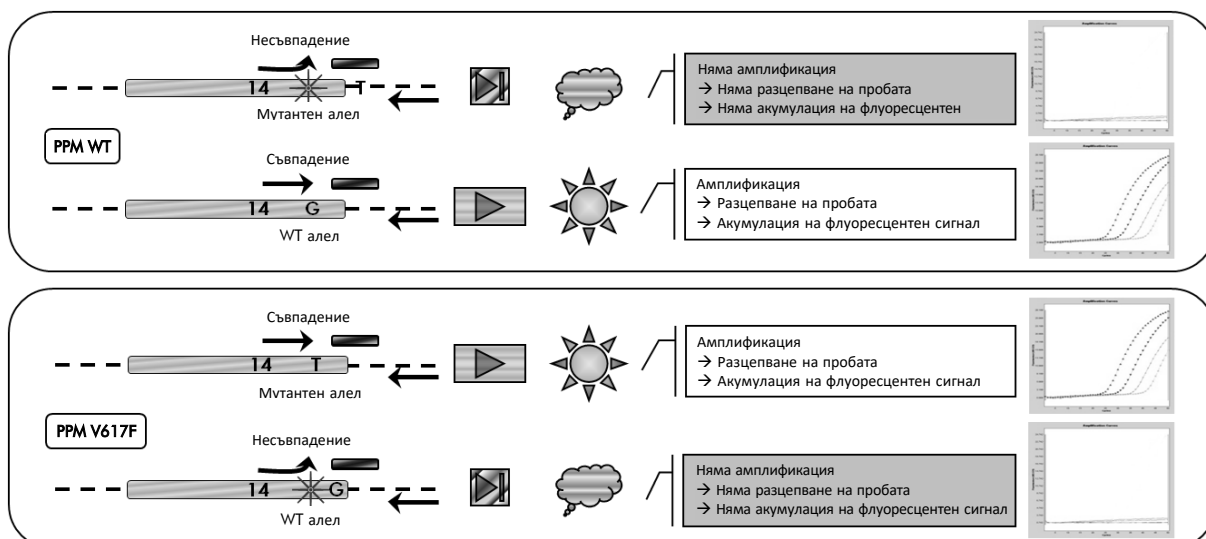
По време на PCR, ако е налице целта, представляващ интерес, пробата специфично се свързва между местата на предния и обратния праймер. 5'→3' екзонуклеазната активност на ДНК полимеразата разцепва пробата между репортера и гасителя, само ако пробата хибридизира до целта. След това фрагментите от пробата се отместват от целта и полимеризацията на веригата продължава. 3' край на пробата е блокиран, за да се предотврати удължаване на пробата по време на PCR (Фигура 1). Този процес настъпва при всеки цикъл и не оказва възпрепятства експоненциалното натрупване на продукта.

Увеличението на флуоресцентния сигнал се открива само ако прицелната последователност е комплементарна на пробата и следователно е амплифицирана по време на PCR. Поради тези изисквания не се открива неспецифична амплификация. Следователно увеличението във флуоресценцията е директно пропорционално на целевата амплификация по време на PCR.



Фигура 1. Принцип на реакцията.

Количественият алел-специфичен PCR метод, използван в този комплект за анализ позволява чувствително, точно и високо възпроизводимо откриване на SNP. Този метод е базиран на използването на специфични предни праймери за дивия тип алел и алела V617F (11). Само перфектното съвпадение между праймера и прицелната ДНК дава възможност за удължаване и амплификация в PCR (Фигура 2).



Фигура 2. Алел-специфична PCR. Използването на див тип или на V617F праймери и смес с пробата позволява специфично откриване на дивия тип алел или на мутирания алел в две отделни реакции, проведени с използване на една и съща проба. Резултатите могат да бъдат изразени като процент VF копия от общите JAK2 копия.

Предоставени материали

Съдържание на комплекта

<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Каталожен №		673522	673523
Брой реакции		12	24
V617F positive control (V617F положителна контрола) (100% V617F алел)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (V617F отрицателна контрола) (100% див тип алел)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF стандартно разреждане, 50 копия) (5 x 10 ¹ V617F копия/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (M2-VF стандартно разреждане, 500 копия) (5 x 10 ² V617F копия/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (M3-VF стандартно разреждане, 5000 копия) (5 x 10 ³ V617F копия/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (M4-VF стандартно разреждане, 50 000 копия) (5 x 10 ⁴ V617F копия/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (WT-1 стандартно разреждане, 50 копия) (5 x 10 ¹ див тип копия/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (WT-2 стандартно разреждане, 500 копия) (5 x 10 ² див тип копия/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (WT-3 стандартно разреждане, 5000 копия) (5 x 10 ³ див тип копия/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT-4 стандартно разреждане, 50 000 копия) (5 x 10 ⁴ див тип копия/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl

Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Смес от праймери и проба JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (Смес от праймери и проба JAK2 V617F†)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
Ръководство за ipsogen <i>JAK2 MutaQuant Kit</i> (на български език)		1	1

* Смес от специфични обратни и предни праймери за контролния ген от див тип JAK2 плюс специфична FAM™ –TAMRA™ проба.

† Смес от специфични обратни и предни праймери за мутацията JAK2 V617F плюс специфична FAM–TAMRA проба.

Забележка: Преди употреба разбъркайте и центрофугирайте за кратко стандартните разреждания и смесите на праймери и проби.

Необходими, но непредоставени материали

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (safety data sheets, SDS), които можете да намерите при доставчика на продукта.

Реактиви

- Вода без нуклеаза с клас за PCR
- Буфер и Taq ДНК полимераза: Утвърдените реактиви са TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4304437) и LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, кат. № 04535286001) или LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (Master Mix 5x) (Roche, кат. № 03515567001)

Консумативи

- Стерилни крайници за пипети за PCR без нуклеаза и устойчиви на аерозол, с хидрофобни филтри
- 0,5 ml или 1,5 ml епруветки за PCR без нуклеаза
- Лед

Оборудване

- Микролитърна пипета*, предназначена за PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Настолна центрофуга* с ротор за 0,5 ml/1,5 ml реакционни епруветки и микроплаки (която може да достигне 13 000–14 000 об./мин)
- Апарат за PCR в реално време:* Rotor-Gene Q 5plex HRM или друг Rotor-Gene; LightCycler 1.2, или 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; и свързан специфичен материал
- Биофотометър

Предупреждения и предпазни мерки

За ин витро диагностика

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (SDS). Тези листове са налични онлайн в удобен и компактен PDF формат на адрес www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате SDS за всеки комплект на QIAGEN и компонент на набора.

Изхвърляйте отпадъците от пробите и анализите съгласно местните разпоредби за безопасност.

Общи предпазни мерки

Използването на qPCR тестове изисква добра лабораторна практика, включително поддръжка на оборудването, която е предназначена за молекулярна биология и която съответства с приложимите регламенти и съответните стандарти.

Този комплект е предназначен за ин витро диагностика. Реактивите и инструкциите, доставени в този комплект са утвърдени за оптимални работни характеристики. Допълнителното разреждане на реактивите или промяна на инкубационните времена и температури могат да доведат до погрешни или фалшиви данни. PPM-WT и PPM-VF реактиви могат да бъдат изменени, ако бъдат изложени на светлина. Всички реактиви са съставени конкретно за употреба с този тест. За оптимални работни характеристики на теста не трябва да бъдат правени никакви замествания.

* Апаратите задължително трябва да се проверяват и калибрират по препоръките на производителя.

Използвайте повишено внимание, за да предотвратите:

- Замърсяване с дезоксирибонуклеаза (DNase), което може да предизвика разграждане на матричната ДНК
- ДНК или PCR замърсяване чрез увличане, което води до грешно положителен сигнал

Поради тази причина препоръчваме следното.

- Използвайте лабораторни материали без нуклеаза (напр. пипети, накрайници за пипети, реакционно съдове) и носете ръкавици при извършване на анализа.
- Използвайте нови, устойчиви на аерозол, накрайници за пипети за всички стъпки на пипетиране, за да избегнете кръстосано замърсяване на пробите и реактивите.
- Пригответе предварителната PCR главна смес с подходящи материали (пипети, накрайници и т.н.) в подходяща зона, в която не се въвеждат ДНК матрици (ДНК, плазмид или PCR продукти). Добавете еталон в отделна зона (предпочитано в отделна стая) със специфичен материал (пипети, накрайници и т.н.).

Съхранение и работа на реактивите

Комплектите се доставят в сух лед и при получаване трябва да се съхраняват при -15°C до -30°C .

- Сведете излагането на светлина до минимум на праймерите и смесите проби (PPM-WT и PPM-VF епруветки).
- Внимателно смесете и центрофугирайте епруветките преди отваряне.
- Съхранявайте компонентите на комплекта в оригиналните контейнери.

Тези условия на съхранение се отнасят както за отворените, така и за неотворените компоненти. Компоненти, съхранявани при различни от посочените върху етикетите условия, могат да не функционират правилно и могат да окажат неблагоприятно влияние върху резултатите от анализа.

Сроковете на годност за всеки реактив са посочени върху индивидуалните етикети на компонентите. При правилни условия на съхранение продуктът ще запази работните си характеристики до датата на изтичане на срока на годност, отпечатана върху етикета.

Няма очевидни признаци, които да показват нестабилност на този продукт. Въпреки това положителни и отрицателни контроли следва да се изпълняват едновременно с неизвестни проби.

Процедура

Получаване на ДНК проба

Геномна ДНК трябва да бъде получена или от цяла кръв, лимфоцити от пречистена периферна кръв от цяла кръв, полинуклеарни клетки или от гранулоцити. За сравними резултати се препоръчва да се използват една и съща клетъчна фракция и метод за ДНК екстракция. ДНК екстракция може да бъде извършена чрез използване на домашен метод или на предлаган в търговската мрежа комплект.

Количеството ДНК трябва да бъде определено чрез използване на оптичната плътност (optical density, OD) на пробата при 260 nm, а качеството на ДНК може да се определи чрез спектофотометрия или гел* електрофореза.

- Съотношението OD_{260}/OD_{280} трябва да бъде 1,7–1,9, а по-малки от това съотношения могат да показват замърсяване с белтък или присъствието на органични химични вещества.
- Електрофоретичният анализ на 0,8–1,0% агарозен гел* трябва да позволи визуализация на изолираната ДНК като отделна лента с приблизително 20 kb (лека намазка ще даде приемливи резултати).

Получената ДНК трябва да бъде разреждана до концентрация 5 ng/μl в 1x TE буфер* при pH 8,0 след това да бъде съхранявана при +4 до +8°C в продължение на 1 седмица, или при –20°C, ако е необходим по-дълъг период на съхранение.

qPCR реакцията е оптимизирана за ДНК проби, съдържащи 25 ng пречистена геномна ДНК.

* При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (SDS), които можете да намерите при доставчика на продукта.

Протокол: qPCR в апарати Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM или Rotor-Gene Q 5plex HRM с ротор за 72 епруветки

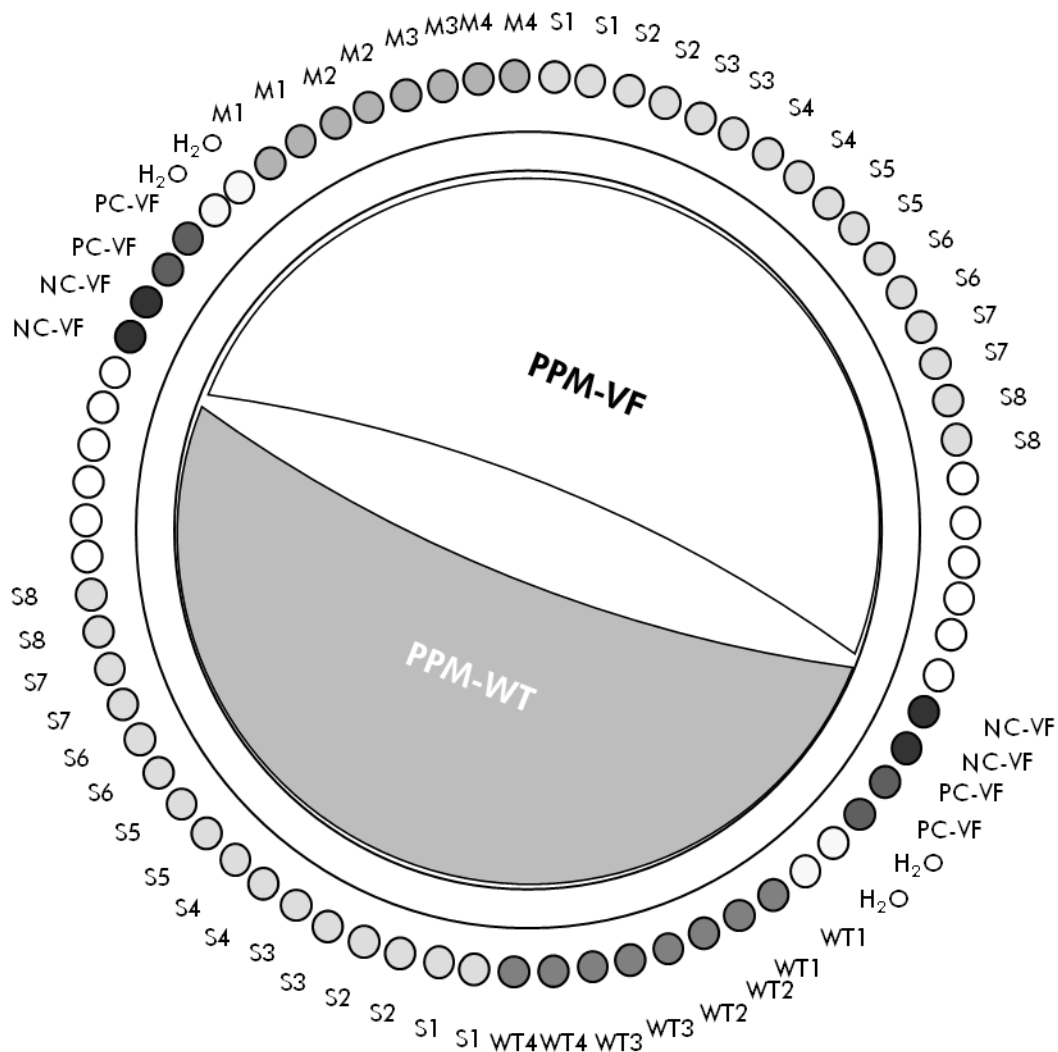
При използване на този апарат препоръчваме извършване на всички измервания двукратно, както е посочено в Таблица 2.

Таблица 2. Брой реакции за апарати Rotor-Gene Q с ротор за 72 епруветки

Проби	Реакции
Със сместа от праймери JAK2 V617F и проба (PPM-VF)	
4 M-VF стандарти	8 реакции, всяка изпитана двукратно
n ДНК проби	n x 2 реакции
2 ДНК контроли	4 реакции: положителна контрола (PC-VF) и отрицателна контрола (NC-VF), всяка от които тествана двукратно
Водна контрола	2 реакции
Със сместа от див тип праймери JAK2 и проба (PPM-WT)	
4 стандарта див тип	8 реакции, всяка изпитана двукратно
n ДНК проби	n x 2 реакции
2 ДНК контроли	4 реакции: PC-VF и NC-VF, всяка изпитана двукратно
Водна контрола	2 реакции

Обработка на проби с апарати Rotor-Gene Q с ротор за 72 епруветки

Препоръчваме тестване на най-малко осем ДНК проби с комплект за 24 реакции (кат. № 673523) и най-малко шест ДНК проби с комплект за 12 реакции (кат. № 673522) в един и същи експеримент, за да се оптимизира използването на стандартите и на смесите от праймери и проба.



Фигура 3. Предложена настройка на ротора за всеки експеримент с комплекта *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* за 24 проби. **PC-VF:** V617F положителна контрола; **NC-VF:** V617F отрицателна контрола; **M-VF:** V617F стандарти; **M-WT:** див тип стандарти; **S:** ДНК проба; **H₂O:** водна контрола.

Забележка: Внимавайте винаги да поставяте пробата за тестване в позиция 1 на ротора. В противен случай по време на стъпката на калибриране апаратът няма да изпълни калибриране и ще се получат неправилни данни за флуоресценцията.

Запълнете всички останали позиции с празни епруветки.

qPCR на апарати Rotor-Gene Q с ротор за 72 епруветки

Забележка: Извършете всички стъпки в сух лед.

Процедура

1. Размразете всички необходими компоненти и ги поставете върху лед.
2. Пригответе следната qPCR смес в съответствие с броя проби, които се обработват.

Всички концентрации са за крайния обем на реакцията.

Таблица 3 и 4 описват схемата на пипетиране за получаването на една смес от реактиви, изчислена за постигане на краен реакционен обем от 25 µl. Предварителна смес, в съответствие с броя реакции, може да бъде получена с използване на същата смес от праймер и проба (или PPM-VF, или PPM-WT). За компенсирание на грешка в пипетирането са включени допълнителни обеми.

Таблица 3. Получаване на qPCR смес

Компонент	1 реакция (µl)	Предварителна смес V617F 30 + 1 реакция (µl)	Крайна концентрация
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Смес от праймери и проба, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Вода без нуклеаза с клас за PCR	6,5	201,5	–
Проба (за добавяне в стъпка 4)	5,0	5 от всяка	–
Общ обем	25,0	25 от всяка	–

Таблица 4. Получаване на qPCR смес

Компонент	1 реакция (µl)	Предварителна смес WT 30 + 1 реакция (µl)	Крайна концентрация
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Смес от праймери и проба, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Вода без нуклеаза с клас за PCR	6,5	201,5	–
Проба (за добавяне в стъпка 4)	5,0	5 от всяка	–
Общ обем	25,0	25 от всяка	–

3. Поставете 20 µl от предварителната qPCR смес (VF или WT) в епруетка.
4. Добавете 5 µl от материала, който трябва да бъде количествено определен (25 ng проба геномна ДНК или контрола) в съответната епруетка (общ обем 25 µl).
5. Смесете внимателно като пипетирате и отпипетирате.
6. Поставете епруетките в термосайклера съгласно препоръките на производителя.
7. Програмирайте апарата Rotor-Gene Q с програмата за термосайклер, както е посочено в Таблица 5.

Таблица 5. Температурен профил

Mode of analysis (Режим на анализ)	Quantitation (Количествено определяне)
Hold (Задържане)	Temperature (Температура): 50 градуса Time (Време): 2 минути
Hold 2 (Задържане 2)	Temperature (Температура): 95°C Time (Време): 10 минути
Cycling (Циклизиране)	50 пъти 95°C за 15 секунди 62°C за 1 мин. с придобиване на FAM флуоресценция в канал Green: Single (Зелен: единичен)

8. За апарати Rotor-Gene Q изберете „Slope Correct“ („Правилен наклон“) за анализа. Препоръчваме задаване на гранична стойност 0,03. Стартирайте програмата за термично циклизиране, както е посочено в Таблица 5.

Протокол: qPCR на ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System и апарат LightCycler 480

При използване на qPCR оборудване с 96-ямкови плаки препоръчваме двукратно извършване на всички измервания, както е посочено в Таблица 6.

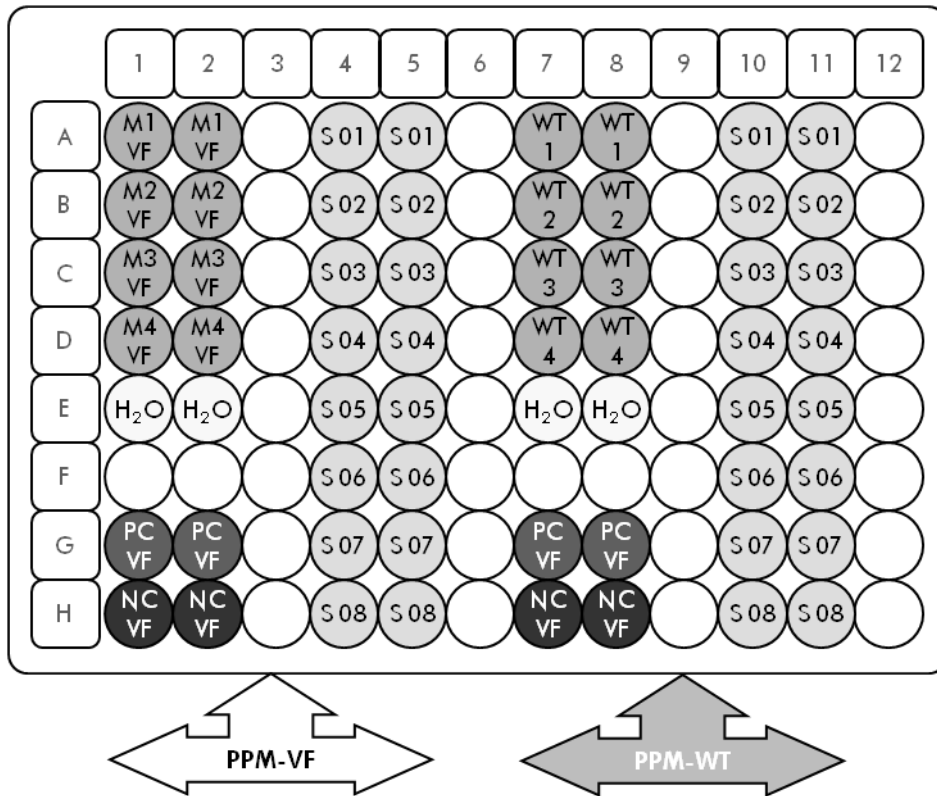
Таблица 6. Брой реакции при използване на 96-ямково qPCR оборудване

Проби	Реакции
Със сместа от праймери JAK2 V617F и проба (PPM-VF)	
4 M-VF стандарти	8 реакции, всяка изпитана двукратно
n ДНК проби	n x 2 реакции
2 ДНК контроли	4 реакции: PC-VF и NC-VF, всяка изпитана двукратно
Водна контрола	2 реакции
Със сместа от див тип праймери JAK2 и проба (PPM-WT)	
4 стандарта див тип	8 реакции, всяка изпитана двукратно
n ДНК проби	n x 2 реакции
2 ДНК контроли	4 реакции: PC-VF и NC-VF, всяка изпитана двукратно
Водна контрола	2 реакции

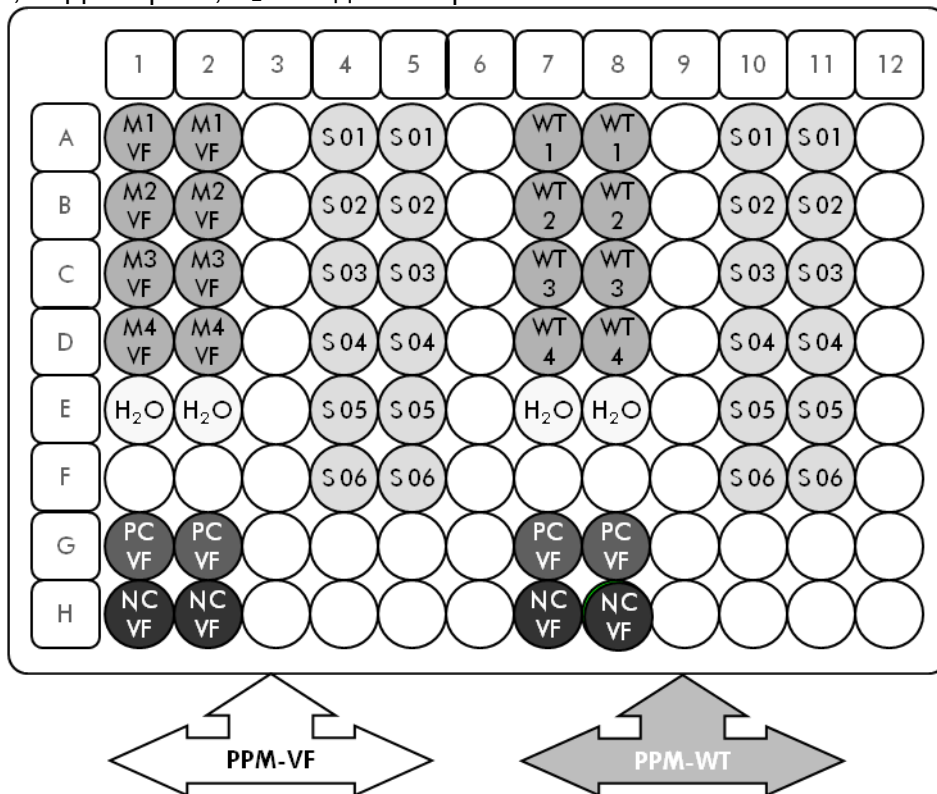
Обработка на проба на ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System и апарат LightCycler 480

Препоръчваме тестване на осем ДНК проби с комплект за 24 реакции (кат. № 673523) и най-малко шест ДНК проби с комплект за 12 реакции (кат. № 673522) в един и същи експеримент, за да се оптимизира използването на стандартите и на смесите от праймери и проба.

Схемата на плаки на Фигура 4 показва пример за такъв експеримент с използване на комплекта за 24 реакции (кат. № 673523), а Фигура 5 показва пример за такъв експеримент с използване на комплекта за 12 реакции (кат. № 673522).



Фигура 4. Предложена настройка на плаките за един експеримент с използване на комплект за 24 реакции (кат. № 673523). **PC-VF:** V617F положителна контрола; **NC-VF:** V617F отрицателна контрола; **M-VF:** V617F стандарти; **M-WT:** див тип стандарти; **S:** ДНК проба; **H₂O:** водна контрола



Фигура 5. Предложена настройка на плаките за един експеримент с използване на комплект за 12 реакции (кат. № 673522). **PC-VF:** V617F положителна контрола; **NC-VF:** V617F отрицателна контрола; **M-VF:** V617F стандарти; **M-WT:** див тип стандарти; **S:** ДНК проба; **H₂O:** водна контрола

qPCR на ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System и апарат LightCycler 480

Забележка: Извършете всички стъпки в сух лед.

Процедура

1. Размразете всички необходими компоненти и ги поставете върху лед.
2. Пригответе следната qPCR смес в съответствие с броя проби, които се обработват.

Всички концентрации са за крайния обем на реакцията.

Таблица 7 и 8 описват схемата на пипетиране за получаването на една смес от реактиви, изчислена за постигане на краен реакционен обем от 25 μ l. Предварителна смес, в съответствие с броя реакции, може да бъде получена с използване на същата смес от праймер и проба (или PPM-VF, или PPM-WT). За компенсиране на грешка в пипетирането са включени допълнителни обеми.

Таблица 7. Получаване на qPCR смес

Компонент	Предварителна смес V617F			Крайна концентрация
	1 реакция (μ l)	26 + 1 реакция (μ l)	30 + 1 реакция (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Смес от праймери и проба, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Вода без нуклеаза с клас за PCR	6,5	175,5	201,5	–
Проба (за добавяне в стъпка 4)	5,0	5 от всяка	5 от всяка	–
Общ обем	25,0	25 от всяка	25 от всяка	–

Таблица 8. Получаване на qPCR смес

Компонент	Предварителна смес WT			Крайна концентрация
	1 реакция (µl)	26 + 1 реакция (µl)	30 + 1 реакция (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Смес от праймери и проба, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Вода без нуклеаза с клас за PCR	6,5	175,5	201,5	–
Проба (за добавяне в стъпка 4)	5,0	5 от всяка	5 от всяка	–
Общ обем	25,0	25 от всяка	25 от всяка	–

3. Поставете 20 µl от предварителната qPCR смес (VF или WT) в ямка.
4. Добавете 5 µl от материала, който трябва да бъде количествено определен (25 ng проба геномна ДНК или контрола) в съответната ямка (общ обем 25 µl).
5. Смесете внимателно като пипетирате и отпипетирате.
6. Затворете плаката и центрофугирайте за кратко (300 x g, приблизително 10 секунди).
7. Поставете плаката в термосайклера съгласно препоръките на производителя.
8. Програмирайте термосайклера с програмата за термично циклизиране и настройте апарата за получаване на двойна маркирана FAM флуоресцентна проба, както е посочено в Таблица 9 за ABI PRISM 7900HT SDS и Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, или в Таблица 10 за апарата LightCycler 480.

Таблица 9. Температурен профил за ABI PRISM 7900HT SDS и за Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Mode of analysis (Режим на анализ)	Standard Curve – Absolute Quantitation (Стандартна крива – абсолютно количествено определяне)
Hold (Задържане)	Temperature (Температура): 50°C Time (Време): 2 минути
Hold 2 (Задържане 2)	Temperature (Температура): 95°C Time (Време): 10 минути
Cycling (Циклизиране)	50 пъти 95°C за 15 секунди 63°C за 1 минута и 30 секунди с получаване на FAM флуоресценция; гасител: TAMRA

Таблица 10. Температурен профил за аппарата LightCycler 480

Mode of analysis (Режим на анализ)	Absolute Quantification („Abs Quant“) (Абсолютно количествено определяне)
Detection formats (Формати на откриване)	Изберете „Simple Probe“ (Обикновена проба) в прозореца с формати на откриване
Hold (Задържане)	Temperature (Температура): 50°C Time (Време): 2 минути
Hold 2 (Задържане 2)	Temperature (Температура): 95°C Time (Време): 10 минути
Cycling (Циклизиране)	50 пъти 95°C за 15 секунди 63°C за 1 минута и 30 секунди с получаване на FAM флуоресценция, отговаряща на (483–533 nm) за LC версия 01 и (465–510 nm) за LC версия 02

9. За ABI PRISM 7900HT и за Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System следвайте стъпка 8a. За аппарата LightCycler 480 следвайте стъпка 8b.

- 9a. ABI PRISM 7900HT и Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Препоръчваме гранична стойност 0,1. Стартирайте програмата за циклизиране, както е посочено в Таблица 9.
- 9b. LightCycler 480: Препоръчваме режим на анализ Fit point (с точка на съответствие) с фон 2,0 и гранична стойност 2,0. Стартирайте програмата за термично циклизиране, както е посочено в Таблица 10.

Протокол: qPCR на апарат LightCycler 1.2

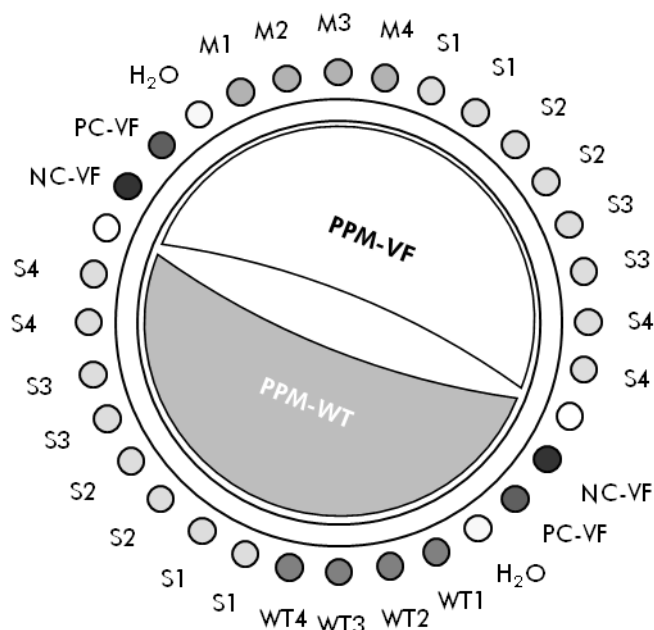
При използване на капилярни апарати препоръчваме двукратно измерване на пробите и еднократно на контролите, както е посочено в Таблица 11.

Таблица 11. Брой реакции за апарат LightCycler 1.2

Проби	Реакции
Със сместа от праймери JAK2 V617F и проба (PPM-VF)	
4 M-VF стандарти	4 реакции, всяка тествана по веднъж
n ДНК проби	n x 2 реакции
2 ДНК контроли	2 реакции: PC-VF и NC-VF, всяка тествана по веднъж
Водна контрола	1 реакция
Със сместа от див тип праймери JAK2 и проба (PPM-WT)	
4 стандарта див тип	4 реакции, всяка тествана по веднъж
n ДНК проби	n x 2 реакции
2 ДНК контроли	2 реакции: PC-VF и NC-VF, всяка тествана по веднъж
Водна контрола	1 реакция

Обработка на проби на апарат LightCycler 1.2

Препоръчваме тестване на четири ДНК проби в един и същи експеримент, за да се оптимизира използването на стандартите и на смесите от праймери и проба. Схемата на капилярите на Фигура 6 показва пример на експеримент.



Фигура 6. Предложена настройка на ротора за всеки експеримент с комплекта *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit*. **PC-VF:** V617F положителна контрола; **NC-VF:** V617F отрицателна контрола; **M-VF:** V617F стандарти; **M-WT:** див тип стандарти; **S:** ДНК проба; **H₂O:** водна контрола.

qPCR на апарат LightCycler 1.2

Забележка: Поради конкретните технологични изисквания, експериментите с LightCycler трябва да се извършват с използване на специфични реактиви. Препоръчваме използването на LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe и следване на инструкциите на производителя за приготвяне на главната смес Master Mix 5x.

Забележка: Извършете всички стъпки в сух лед.

Процедура

1. Размразете всички необходими компоненти и ги поставете върху лед.
2. Пригответе следната qPCR смес в съответствие с броя проби, които се обработват.

Всички концентрации са за крайния обем на реакцията.

Таблица 12 и 13 описват схемата на пипетиране за получаването на една смес от реактиви, изчислена за постигане на краен реакционен обем от 20 µl. Предварителна смес, в съответствие с броя реакции, може да бъде получена с използване на същата смес от праймер и проба (или PPM-VF, или PPM-WT). За компенсиране на грешка в пипетирането са включени допълнителни обеми.

Таблица 12. Получаване на qPCR смес

Компонент	1 реакция (µl)	Предварителна смес V617F 15 + 1 реакция (µl)	Крайна концентрация
Прясно приготвена смес LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Смес от праймери и проба, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Вода без нуклеаза с клас за PCR	10,2	163,2	–
Проба (за добавяне в стъпка 4)	5,0	5 от всяка	–
Общ обем	20,0	20 от всяка	–

Таблица 13. Получаване на qPCR смес

Компонент	1 реакция (µl)	Предварителна смес WT 15 + 1 реакция (µl)	Крайна концентрация
Прясно приготвена смес LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Смес от праймери и проба, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Вода без нуклеаза с клас за PCR	10,2	163,2	–
Проба (за добавяне в стъпка 4)	5,0	5 от всяка	–
Общ обем	20,0	20 от всяка	–

3. Поставете 15 µl от предварителната qPCR смес (VF или WT) в капиляр.
4. Добавете 5 µl от материала, който трябва да бъде количествено определен (25 ng проба геномна ДНК или контрола) в съответната епруветка (общ обем 20 µl).
5. Смесете внимателно като пипетирате и отпипетирате.
6. Поставете капилярите в доставените с апарата адаптери и центрофугирайте за кратко (700 x g, приблизително 10 секунди).
7. Заредете капилярите в термосайклера съгласно препоръките на производителя.
8. Програмирайте апарата LightCycler 1.2 с програмата за термосайклер, както е посочено в Таблица 14.

Таблица 14. Температурен профил

Mode of analysis (Режим на анализ)	Quantification (Количествено определяне)
Hold 1 (Задържане 1)	Temperature (Температура): 55°C Time (Време): 2 минути Наклон: 20
Hold 2 (Задържане 2)	Temperature (Температура): 95°C Time (Време): 10 минути Наклон: 20
Cycling (Циклизиране)	50 пъти 95°C за 15 секунди; наклон: 20 66°C за 1 минута; наклон: 20; с получаване на FAM флуоресценция: Една

9. За LightCycler 1.2 се препоръчва режим F1/F2 и „2nd derivative analysis“ (анализ на 2^{ра} производна). Стартирайте програмата за термично циклизиране, както е посочено в Таблица 14.

Интерпретиране на резултатите

Принцип за анализ на данни

Данните за граничния цикъл (C_T) и стойностите на точката на пресичане (C_P) могат да бъдат експортирани от апарата qPCR и да бъдат копирани във файл в Excel® за анализ. След това тези стойности могат да бъдат използвани за изчисляване на средната стойност на C_P и C_T , и стандартните средни C_T стойности могат да бъдат нанесени като точки за получаване на стандартна крива за дивия тип и V617F стандарта с използване на следното уравнение и Таблица 15.

$y =$ Средна C_P ; $x = \log_{10} CN$, където $CN =$ брой на генните копия в пробата от $5 \mu l$

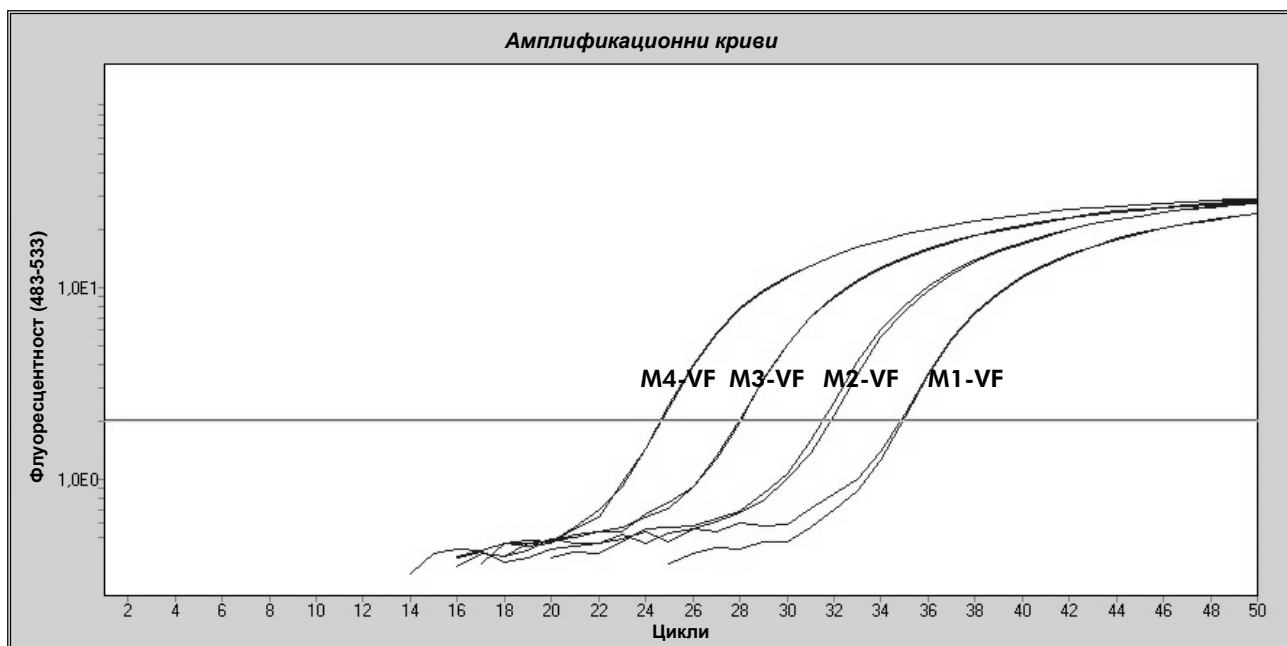
Таблица 15. Количествени данни за див тип и V617F стандарти

Стандарт	Брой копия (Copy number, CN)	$\log_{10} CN$
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

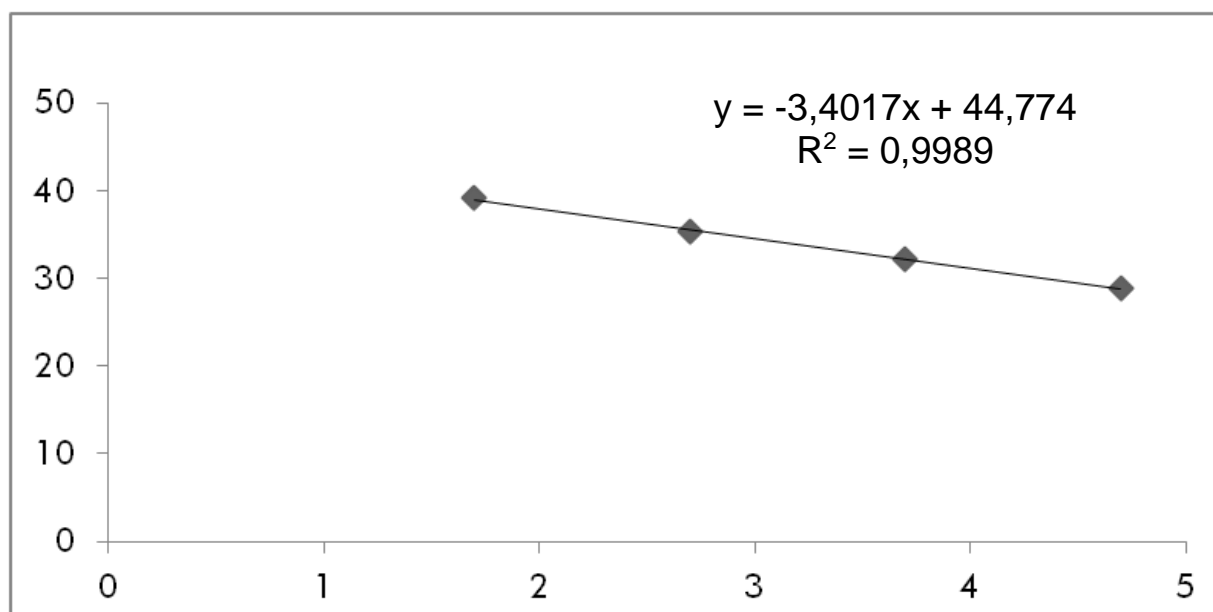
Забележка: Всеки потребител трябва да измери собствена възпроизводимост в своята лаборатория.

Стандартна крива и критерии за качество

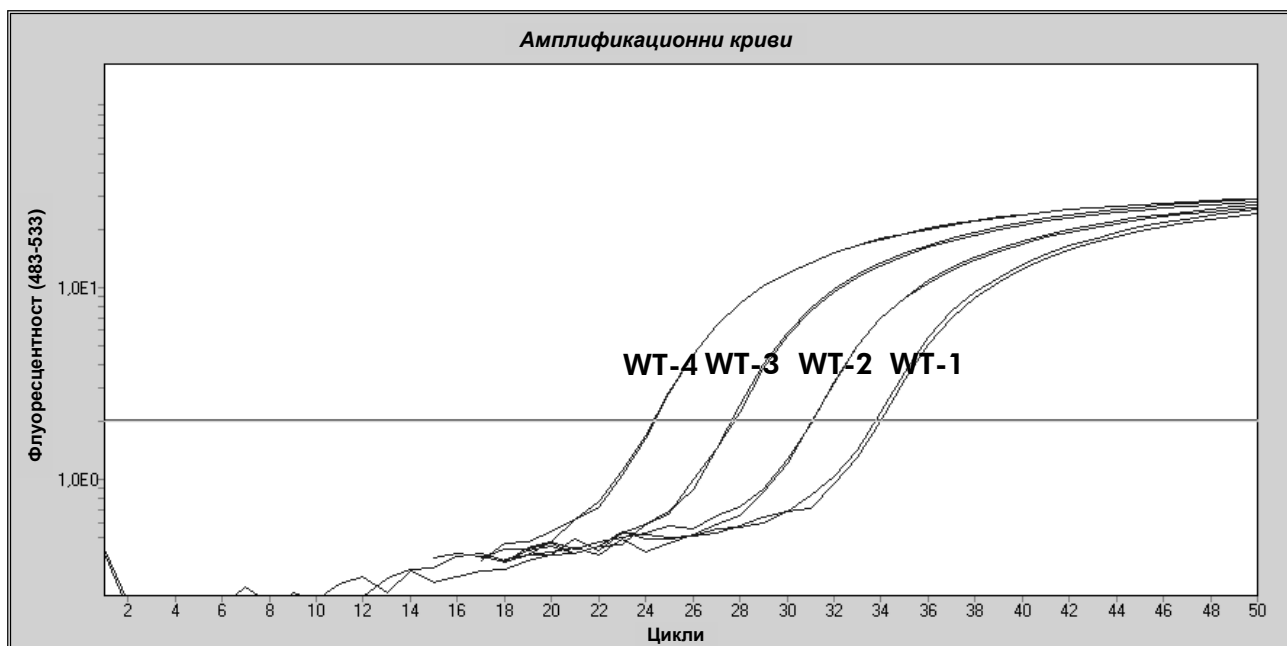
Фигури 7 и 9 показват примери за резултати, получени с *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit, а Фигури 8 и 10 показват пример за теоретичната крива, изчислена за четири стандартни разреждания.



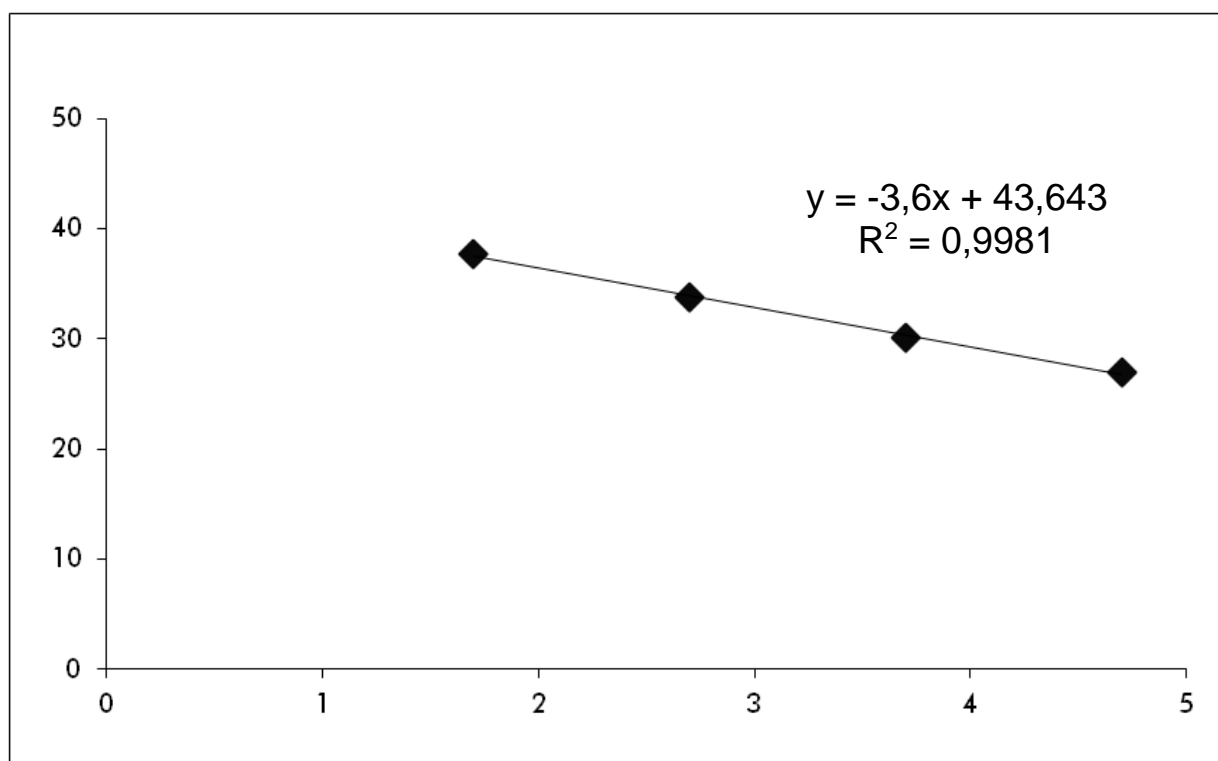
Фигура 7. Амплификационна графика за 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 и 5×10^4 копия от плазида JAK2 V617F (контроли съответно M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF).



Фигура 8. Стандартна крива за JAK2 V617F.



Фигура 9. Амплификационна графика за 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 и 5×10^4 копия от див тип плазмид JAK2 (контроли съответно WT-1, WT-2, WT-3 и WT-4).



Фигура 10. Стандартна крива за див тип JAK2.

Като стандарти са 10-кратни разреждания, теоретичният наклон на кривата е $-3,32$. Допустим е наклон между $-3,0$ и $-3,9$, стига R^2 да е $> 0,95$ (12). За прецизни резултати, обаче, е желателна стойност за $R^2 > 0,98$ (13).

След това стандартните уравнения на кривата могат да бъдат използвани за изчисляване на броя на копията на V617F и WT \log_{10} в непознатите проби.

Стандартното уравнение на кривата V617F трябва да се използва за преобразуване на грубата средна стойност на C_P/C_T (получена с PPM-VF) за непознатите и контролните проби, до брой копия на JAK2 V617F (CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Средна } C_{PV617F} - \text{Пресичане на стандартна крива}_{V617F})}{\text{Наклон на стандартна крива}_{V617F}}$$

Стандартното уравнение на кривата за див тип трябва да се използва за преобразуване на грубата средна стойност на C_P/C_T (получена с PPM-WT) за непознатите и контролните проби, до брой копия на див тип JAK2 (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Средна } C_{PWT} - \text{Пресичане на стандартна крива}_{WT})}{\text{Наклон на стандартна крива}_{WT}}$$

Изразяване на резултатите

Резултатите се отнасят за 25 ng от обща геномна ДНК и трябва да бъдат изразени като процент от JAK2 V617F, както следва.

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

Възпроизводимост между повторни проби

Получените данни трябва да са съвместими между дубликатите.

Положителни и отрицателни контроли

Положителната контрола или PC-VF трябва да дава JAK2 V617F процент, който е по-висок от 99,9%.

Отрицателната контрола или NC-VF трябва да дава JAK2 V617F процент, който е по-нисък от 0,1%.

Ако тези контроли не функционират правилно, моля, вижте „Ръководство за отстраняване на проблеми“, страница 34, за да намерите решение.

Водни контроли

Отрицателните контроли трябва да дават нула CN за откриване както на JAK2 V617F, така и на див тип JAK2.

Положителна водна контрола се получава от кръстосано замърсяване. Вижте „Ръководство за отстраняване на проблеми“ по-долу, за да намерите решение.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Frequently Asked Questions“ (Често задавани въпроси) в нашия Център за техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Учените в „Технически услуги“ на QIAGEN винаги с радост ще отговарят на всички Ваши въпроси относно информацията и протокола в този наръчник или относно пробите и технологиите на изследване (за информация за контакти вж. „Информация за контакти“, страница 43).

Коментари и предложения

Стандартните криви за див тип или за V617F не са линейни

Обръщане на флакона, обръщане по време на разпределение, кръстосано замърсяване, частично разграждане на стандарта, RQPCR реактив, неспецифична амплификация или грешка в PCR програма

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Съхранявайте *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit при –15 до –30°C и пазете от слънчева светлина смесите от праймери и проба. Вижте „Съхранение и работа на реактивите“ на страница 13.

Избягвайте повторно замразяване и размразяване.

Никакъв или слаб сигнал за един стандарт

Стандартът не е разпределен или използван на същата PPM смес

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Повторете изпълнението на PCR.

Коментари и предложения

Отрицателна (H₂O) контрола е положителна

Кръстосано замърсяване, замърсяване с реактив, грешка в апарата, обръщане на ямка или капиляр, или разграждане на проба

Сменете всички критични реактиви.

Винаги боравете с пробите, компонентите на комплекта и консумативите в съответствие със стандартните приети практики, за да предотвратите замърсяване чрез увличане.

Пазете от слънчева светлина смесите от праймери и проба.

Проверете за фалшиви положителни при флуоресцентните криви.

Няма сигнал, дори и в стандартна контрола

а) Избран е неправилен канал за откриване

Настройте канала на F1/F2 или 530 nm/640 nm.

б) Грешка при пипетиране или пропуснати реактиви

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Повторете изпълнението на PCR.

в) Няма програма за получаване на данни

Проверете програмата на цикъла.

Изберете режим на получаване „Single“ („Единичен“) в края на всеки свързващ се сегмент на програмата за PCR.

Липсващ или слаб сигнал в пробите, без проблем при стандартните контроли

Инхибиторни ефекти на материала на пробата вследствие на недостатъчно пречистване

Винаги проверявайте качеството на ДНК (OD₂₆₀/OD₂₈₀) и концентрацията преди да започнете.

Повторете получаването на ДНК.

Твърде ниска интензивност на флуоресценцията

- a) Неправилно съхранение на компонентите на комплекта
- Разпределете алиquot от реактивите за съхранение.
- Съхранявайте *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit при -15 до -30°C и пазете от слънчева светлина смесите от праймери и проба. Вижте „Съхранение и работа на реактивите“ на страница 13.
- Избягвайте повторно замразяване и размразяване.
- b) Много ниско първоначално количество на прицелна ДНК
- Проверете количеството на пробата ДНК.
- Забележка:** В зависимост от избрания метод за получаване на ДНК могат да възникнат инхибиторни ефекти.

Отрицателни контроли са положителни

- Замърсяване чрез увличане
- Сменете всички критични реактиви.
- Повторете експеримента с нови алиquotи за всички реактиви.
- Винаги боравете с пробите, компонентите на комплекта и консумативите в съответствие със стандартните приети практики, за да предотвратите замърсяване чрез увличане.

Интензивността на флуоресценцията варира

- a) Грешка при пипетиране
- Разбъркайте и центрофугирайте всички реактиви след размразяване.
- Променливостта на LightCycler, причинена от така наречената „pipetting error“ (грешка при пипетиране) може да бъде намалена чрез анализ на данните в режима F1/F2 или 530 nm/640 nm.

Коментари и предложения

- | | |
|--|---|
| b) Недостатъчно центрофугиране на плаката, епруветките или капиллярите, или приготвената PCR смес все още може да е в горния съд на капиляра, или в крайника на капиляра може да е уловен въздушен мехур | Винаги центрофугирайте капиллярите, заредени с реакционната смес, както е описано в конкретното ръководство за експлоатация на апарата. |
| c) Мръсна външна повърхност на крайника на капиляра | При работа с капиллярите винаги носете ръкавици. |

Сигнал от див тип или V617F положителни контроли при използване на реципрочна PPM

Кръстосано замърсяване, замърсяване на реактив или обръщане на ямка или капиляр

Сменете всички критични реактиви.

Повторете експеримента с нови аликвоти за всички реактиви.

Винаги боравете с пробите, компонентите на комплекта и консумативите в съответствие със стандартните приети практики, за да предотвратите замърсяване чрез увличане.

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Обърнато откриване на положителна контрола

Разпределена инверсия на PPM в ямката или капиляра, или в предварителната смес

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Няма сигнал за една положителна контрола или и за двете

Пропуснатата PPM или контролна ДНК

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Висок фон

Избелване с флуорофор

Съхранявайте и работете се пробата на място, защитено от светлина.

Ниска възпроизводимост за дубликатните проби

Грешка при пипетиране или кръстосано замърсяване

Проверете схемата на пипетиране и настройката на реакцията.

Качествен контрол

В съответствие със сертифицираната по ISO Система за управление на качеството на QIAGEN всяка производствена партида на *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit се тества по предварително определени спецификации, за да се осигури постоянно качество на продуктите. Сертификатите за анализ могат да бъдат получени при поискване на www.qiagen.com/support/.

Ограничения

Потребителите трябва да бъдат обучени и да са запознати с тази технология преди използването на това изделие. Този комплект трябва да се използва съгласно дадените в настоящото ръководство инструкции, в комбинация с утвърден апарат, посочен в „Необходими, но непредоставени материали“, стр. 11.

Всички получени диагностични резултати трябва да се интерпретират съвместно с други клинични или лабораторни констатации. Потребителят носи отговорност за валидиране на характеристиките на системата при процедури, използвани в лабораторията, които не се обхващат от изпитванията на QIAGEN.

Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност, отпечатани на опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти с изтекъл срок на годност.

Работни характеристики

Неклинични проучвания

Прецизност

Проведено е проучване на прецизността с използване на 12 ДНК проби, извлечени от клетъчни линии, които отговарят на различни натоварвания с JAK2 V617F алел. За всяка проба са извършени общо 80 измервания с използване на 3 различни партии от *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit*. За проучване на прецизността се използва Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Аналитичните данни са обобщени в Таблица 15.

Таблица 15. Данни за прецизност ДНК проби

Проба	Теоретичен JAK2 V617F (%)	n*	Средна стойност (%)	CV (%)	Персентил	
					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

* Рязко отклоняващите се стойности са изключени. Те са определени като стойности, по-малки от долния квартил минус 3 пъти интерквартилния диапазон, или по-големи от горния квартил плюс 3 пъти интерквартилния диапазон на диаграма тип „кутия“ и „мустаци“.

n = брой валидирани проби; CV = общ коефициент на вариация.

Граница на сляпа проба (бланк) и граница на откриване

Фоновото ниво или границата на сляпа проба (level of blank, LOB) се определя върху отрицателни проби (8 проби, 76 измервания). Открива се, че тя е 0,014%.

Границата на откриване (limit of detection, LoD) се определя чрез използване на проби, за които е известно, че са положителни, но са с ниска експресия (7 проби, 68 измервания). Открива се, че тя е 0,061% с горна граница на 90% доверителен интервал от 0,091%.

Тази оптимална чувствителност може да бъде получена за проби, съдържащи най-малко 10 000 копия на гена JAK2 (див тип или V617F мутация).

Данните за количествено определяне трябва да се докладват, както следва.

- JAK2 V617F \leq 0,014% може да бъде интерпретирано като неоткрита мутация JAK2 V617F.
- JAK2 V617F е $>$ 0,014%, но $<$ 0,091% може да бъде интерпретирано като неубедителен резултат.
- JAK2 V617F \geq 0,091% може да бъде интерпретирано като положителен резултат и че е открита JAK2 V617F мутация.

Линейност

Проучвания на линейността за изпълнени за 12 проби, като всяка от тях е получена от различна смес на ДНК, извлечена от клетъчни линии, които са положителни и отрицателно за мутацията JAK2 V617F. Всяка проба се тества 5 пъти. Данните от това проучване показват, че *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit дава линейни резултати за динамичния диапазон.

Клинични проучвания

Извлечена е ДНК от кръв или костен мозък от 87 проби на пациенти и е анализирана с използване на *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. В допълнение, процентът на JAK2 V617F мутации се определя количествено и се сравнява с резултати от скрининг тест, получени с *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (кат. № 673223). Получените данни са показани в Таблица 16.

Таблица 16. Таблица за непредвидени обстоятелства, показваща съответствието между резултатите, получени с *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit и с *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit

		Резултати от <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit				n
		Открита мутация	Неубедителен резултат	Не е открита мутация		
Резултати от <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit	Открита мутация	40	2	7	49	
	Неубедителен резултат	0	0	21	21	
	Не е открита мутация	0	0	17	17	
	n	40	2	45	87	
Положително съответствие	100% (95% доверителен интервал: 91%, 100%)					
Отрицателно съответствие	71% (95% доверителен интервал: 51%, 85%)					
Общо съответствие	89% (95% доверителен интервал: 79%, 95%)					

Литературни източници

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.

СИМВОЛИ

Върху опаковката и етикетите може да са изобразени следните символи:



Съдържа реагенти, достатъчни за <N> реакции



Използвайте до



Медицинско изделие за ин витро диагностика



Каталожен номер



Партиден номер



Номер на материала



Глобален номер на търговска единица



Температурни ограничения



Производител



Вижте инструкциите за употреба

Информация за контакти

За техническа помощ и повече информация вижте нашия център за техническа поддръжка на www.qiagen.com/Support, позвънете на безплатния телефон 00800-22-44-6000 или се свържете с един от отделите за техническа поддръжка на QIAGEN (вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

Информация за поръчки

Продукт	Съдържание	Кат. №
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	За 12 реакции: Контрола див тип JAK2 ген, контролен ген JAK2 V617F, смес от праймери и проба PPM-WT, смес от праймери и проба PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	За 24 реакции: Контрола див тип JAK2 ген, контролен ген JAK2 V617F, смес от праймери и проба PPM-WT, смес от праймери и проба PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx – за IVD-валидиран PCR анализ в реално време в клинични приложения		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Апарат за цикли на PCR в реално време и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности, 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Апарат за цикли на PCR в реално време и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности, 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение	9002033

За актуална информация относно лицензирането и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на комплекта QIAGEN. Ръководствата и наръчниците за потребителя на комплекта QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Този продукт е предназначен за ин витро диагностика. Продуктите *ipsogen* не препродавани, модифицирани за препродажба или използвани за производство на търговски продукти без писменото одобрение на QIAGEN.

Информацията в настоящия документ подлежи на промяна без предизвестие. QIAGEN не поема отговорност за грешки, които могат да се появят в този документ. Счита се, че този документ е пълен и точен към датата на публикуване. В никакъв случай QIAGEN не носи отговорност за инцидентни, специални, многократни или последващи щети във връзка с или възникващи от използването на този документ.

Продуктите *ipsogen* са с гаранция, че отговарят на посочените за тях спецификации. Единственото задължение на QIAGEN и единственото средство за защита на клиента са ограничени до безплатна подмяна на продукти, в случай че продуктите нямат работни характеристики като гарантираните.

Мутацията JAK2 V617F и нейните употреби са защитени с патентни права, включително Европейски патент EP1692281, патенти в САЩ 7,429,456 и 7,781,199, патентни заявки в САЩ US20090162849 и US20120066776 и чуждестранни аналози.

Закупуването на този продукт не носи никакво право за неговото използване за клинични проучвания за лекарства, прицелени към JAK2V617F. QIAGEN разработва специфични лицензионни програми за такива цели. Моля, свържете се с нашия правен отдел на jak2licenses@qiagen.com.

Търговски марки: 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).

Ограничено лицензно споразумение

Употребата на този продукт означава, че всеки купувач или потребител на *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit приема следните условия:

1. *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit може да се използва само в съответствие с ръководството към *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit и само със съдържащите се в комплекта компоненти. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на този набор с други компоненти, които не са включени в този комплект, освен както е описано в ръководството за *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit и допълнителните протоколи, които могат да се изтеглят от адрес www.qiagen.com.
2. Освен изрично посочените лицензи QIAGEN не дава никаква гаранция, че този комплект и/или неговата употреба(и) не нарушават права на други производители.
3. Този комплект и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично отхвърля всички други лицензи, посочени или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на комплекта дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат каквито и да са стъпки, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензионно споразумение в който и да е съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензионно споразумение или някое от правата на интелектуална собственост, свързани с комплекта и/или неговите компоненти.

За актуални условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

Авг-16 НВ-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, всички права запазени.

www.qiagen.com

