

Příručka k soupravě *ipsogen*[®] JAK2 MutaScreen



10 (katalogové č. 673022)



24 (katalogové č. 673023)

Verze 1

IVD

Kvantitativní diagnostika in vitro

Pro použití se zařízeními Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] a LightCycler[®]



REF

673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NĚMECKO

R3

MAT

1072500CS



Technologie QIAGEN pro zpracování a analýzu vzorků

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru vzorku až po výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů;
- rozborů nukleových kyselin a proteinů;
- výzkum microRNA a RNAi;
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozborů.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách **www.qiagen.com**.

Obsah

Účel použití	4
Shrnutí a vysvětlení	4
Princip postupu	6
Dodávané materiály	8
Obsah soupravy	8
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	9
Upozornění a bezpečnostní opatření	10
Obecná ustanovení	10
Skladování činidel a manipulace s nimi	11
Postup	12
Příprava vzorku DNA	12
Skladování nukleových kyselin	12
Protokoly	
■ qPCR na přístrojích Rotor Gene Q s rotorem na 72 zkumavek	12
■ qPCR na přístrojích Applied Biosystems a ABI PRISM	21
■ qPCR na přístroji LightCycler 480	31
■ qPCR na přístroji LightCycler 2.0	40
Interpretace výsledků	45
Grafické zobrazení a kritéria kontroly kvality	45
Výpočet normalizovaného poměru FAM/VIC a genotypizace	46
Návod na řešení potíží	48
Kontrola kvality	50
Omezení	50
Charakteristiky funkčních vlastností analýz	51
Laboratorní studie	51
Klinické studie	52
Odkazy	58
Symboly	59
Kontaktní údaje	59
Informace pro objednávky	60

Účel použití

Soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen jsou určeny pro detekci mutací JAK2 V617F/G1849T v genomové DNA od pacientů s podezřením na myeloproliferativní nádor. Nepřítomnost JAK2 V617F/G1849T nevylučuje přítomnost jiných mutací JAK2. Tento test je schopen uvést falešně negativní výsledky v případě dalších mutací v kodonech 615 až 619 (1).

Poznámka: Tato souprava musí být použita dle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými činidly a přístroji. Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo rozsah příručky nebo úpravy jeho součástí bude mít za následek zrušení odpovědnosti společnosti QIAGEN.

Shrnutí a vysvětlení

V roce 2005 (2–5) byla identifikována recidivující somatická mutace, V617F, ovlivňující gen Janus tyrozinkinázy 2 (JAK2), což vedlo k velkému průlomu v pochopení, klasifikaci a diagnostice myeloproliferativních neoplazií (MPN). JAK2 je důležitou intracelulární signální molekulou pro množství cytokinů, včetně erytropoetinu.

Mutace V617F genu JAK2 je detekována u > 95 % pacientů s pravou polycytémií (polycythemia vera (PV)), 50–60 % pacientů s esenciální trombocytémií (ET), a 50 % pacientů s primární myelofibrózou (PMF). JAK2 V617F byla také zjištěna u některých vzácných případů chronické myelomonocytické leukémie, myelodysplastického syndromu, systémové mastocytózy a chronické neutrofilní leukémie, avšak v 0 % u chronické myeloidní leukémie (CML) (6).

Tato mutace odpovídá jednonukleotidové změně nukleotidu 1849 genu JAK2 v exonu 14, což má za následek unikátní substituci valinu (V) za fenylalanin (F) na pozici 617 proteinu (doména JH2). To vede ke konstitutivní aktivaci genu JAK2, hematopoetické transformaci *in vitro* a růstu erytroidních kolonií nezávislých na erytropoetinu (EEC) u všech pacientů s pravou polycytémií (PV) a velké části pacientů s esenciální trombocytémií (ET) a primární myelofibrózou (PMF) (7). JAK2 V617F představuje hlavní excitátor při transformaci hematopoetických buněk u pacientů s myeloproliferativních neoplazií (MPN), avšak přesný patologický mechanismus, se stejnou jedinečnou mutací u tak rozdílných klinických a biologických entit stále čeká na plné vysvětlení.

Tradičně byla diagnostika MPN založena na klinickém vyšetření, histologii kostní dřeně a cytogenetických kritériích. Díky objevu molekulárního markeru specifického pro určité onemocnění došlo ke zjednodušení procesu a zvýšení přesnosti diagnostiky. Detekce mutace V617F genu JAK2 je nyní součástí referenčních kritérií WHO 2008 pro diagnostiku BCR-ABL negativní MPN (tabulka 1) a přítomnost této mutace je hlavním kritériem pro potvrzení diagnózy.

Tabulka 1. Kritéria WHO pro diagnostiku MPN (převzato z reference 8)

Kritéria pro diagnostiku pravé polycytémie (PV)	
Hlavní	<p>1. Hemoglobin (Hgb) > 18,5 g.dl⁻¹ (muži) nebo >16,5 g.dl⁻¹ (ženy) nebo Hgb nebo hematokrit (Hct) > 99. percentil referenčního rozmezí pro věk, pohlaví nebo nadmořskou výšku bydliště nebo Hgb >17 g.dl⁻¹ (muži) nebo >15 g.dl⁻¹ (ženy) pokud souvisí s trvalým růstem ≥ 2 g.dl⁻¹ od výchozích hodnot, které není možné přepisovat korekci nedostatku železa nebo Zvýšené množství červených krvinek >25 % nad průměrnou normální predikovanou hodnotu</p> <p>2. Přítomnost <i>JAK2V617F</i> nebo podobné mutace</p>
Méně významné	<p>1. Trilineární myeloproliferace kostní dřeně 2. Subnormální hladina sérového erytropoetinu 3. Růst endogenních erytroidních kolonií (EEC)</p>
Kritéria pro diagnostiku esenciální trombocytémie (ET)	
Hlavní	<p>1. Počet krevních destiček $\geq 450 \times 10^9$ l⁻¹ 2. Proliferace megakaryocytů s velkou a zralou morfolgií. Žádná nebo slabá granulocytární nebo erytroidní proliferace 3. Nesplnění kritérií WHO pro chronickou myeloidní leukémii (CML), PV, primární myelofibrózu (PMF), myelodysplastický syndrom (MDS), nebo jiné myeloidní onemocnění</p> <p>4. Demonstrace <i>JAK2V617F</i> nebo jiného klonálního markeru nebo Žádný důkaz o přítomnosti reaktivní trombocytózy</p>
Méně významné	-
Kritéria pro diagnostiku primární myelofibrózy (PMF)	
Hlavní	<p>1. Proliferace megakaryocytů a atypických megakaryocytů doprovázená retikulinovou fibrózou nebo kolagenovou fibrózou nebo Při nepřítomnosti retikulinové fibrózy musí být změny megakaryocytů doprovázeny zvýšením celularity kostní dřeně, granulocytickou proliferací a často sníženou erytropoézou (tj. prefibrotická PMF) 2. Nesplnění kritérií WHO pro (CML), PV, MDS, nebo jiné myeloidní neoplazie</p> <p>3. Demonstrace <i>JAK2V617F</i> nebo jiného klonálního markeru nebo Žádný důkaz o přítomnosti fibrózy kostní dřeně</p>
Méně významné	<p>1. Leukoerytroblastóza 2. Zvýšená laktát dehydrogenáza (LDH) v séru 3. Anémie 4. Hmatná splenomegalie</p>

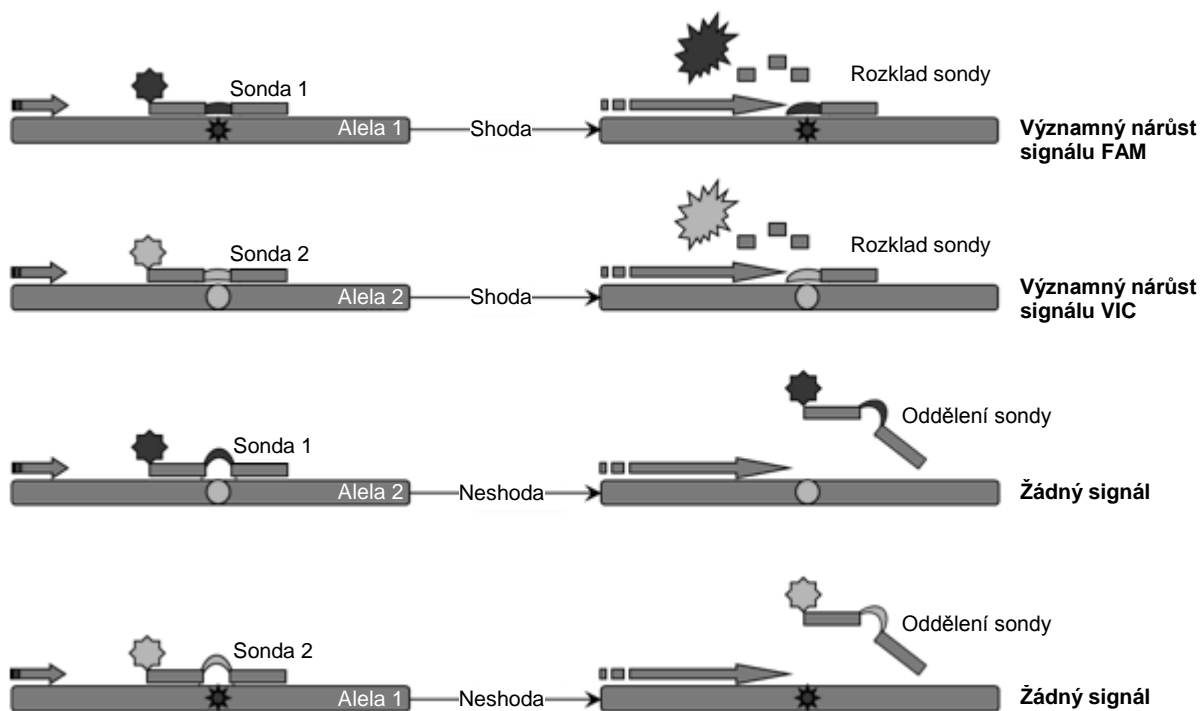
Mezinárodní odborníci v nedávné době navrhli kritéria pro terapeutické studie u pacientů s PV a ET. Na základě údajů o allograftu, interferonu alfa nebo hydroxyurei byla kvantifikace JAK2V617F zahrnuta jako možný užitečný nástroj ke sledování odezvy na léčbu (9). Jako reakce na některé nové léky proti JAK2 v klinickém vývoji (10) bylo pozorováno snížení zátěže JAK2 V617F.

Princip postupu

Při rozlišovacím testu alel jsou použity dvě sondy TaqMan[®] v multiplexním testu. Jedna se dokonale shoduje se sekvencí alely 2 (např. alela divokého typu) a druhá se dokonale shoduje se sekvencí alely 1 (např. alely s mutací). Každá sonda je značena rozlišujícím fluorescenčním barvivem na svém 5' konci, tzv. oznamovacím barvivem, např. FAM[™] nebo VIC[®], a obsahuje nefluorescenční zhášec na 3' konci. Sondy také obsahují MGB[™] (minor groove binder) umožňující použití kratších sond s vyšší stabilitou a tím přesnější rozlišení alel.

Během fáze polymerizace PCR reakce je dokonale odpovídající sonda rozštěpena 5'→3' exonukleázovou aktivitou polymerázy *Taq* DNA, čímž dojde k oddělení oznamovacího barviva od zhášeče a tím k uvolnění detekovatelné fluorescence. Sonda, která přesně neodpovídá, bude místo rozštěpení polymerázou *Taq* DNA oddělena a nedojde k uvolnění oznamovacího barviva. Vytvořený fluorescenční signál (VIC nebo FAM) je shromážděn na konci PCR reakce (výsledek) a okamžitě označí přítomnost cílových sekvencí ve vzorku (alela divokého typu, mutovaná alela nebo obě) aniž by bylo nutné provádět dlouho trvající a nákladné post-PCR kroky, které také mohou zvýšit riziko kontaminace. Skutečné množství cílové sekvence není stanoveno.

Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen používá tuto technologii následovně (viz obrázek 1).



Obrázek 1. Multiplexní test se sondou TaqMan. Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen používá tuto technologii pro rozlišení alel.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

<i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i>		(10)	(24)
Katalogové č.		673022	673023
Počet reakcí		24	10
V617F Positive Control* (Pozitivní kontrola V617F)	PC-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control† (Negativní kontrola V617F)	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample (Vzorek z hraniční hodnotou)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix JAK2 V617F‡ (Směs primerů a sond JAK2 V617F)	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit Handbook</i> (anglicky)		1	1

* Pozitivní kontrola: 100 % DNA V617F.

† Negativní kontrola: 100 % DNA divokého typu; 0 % V617F.

‡ Směs specifických reverzních a přímých primerů pro gen *JAK2*, FAM sonda specifická pro V617F a VIC sonda pro gen divokého typu.

Poznámka: Před použitím krátce zkumavky odstředíte.

Poznámka: Analýza neznámých vzorků pomocí soupravy *ipsogen JAK2 MutaScreen* vyžaduje extrakci genomové DNA. Činidla potřebná pro provedení extrakce DNA (např. QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, kat. č. 51304) nejsou poskytnuta a musí být validována v kombinaci se soupravou.

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Činidla

- Voda pro PCR bez nukleázy
- 1x Pufr TE bez nukleázy, pH 8,0 (např. Thermo Fisher Scientific Inc., kat. č. 12090015)
- Pufr a polymeráza *Taq* DNA: Validovanými činidly jsou TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. č. 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. č. 04535286001)
- Činidla pro 0,8–1% agarózový gel v 0,5x elektroforézním TBE pufru

Spotřební materiál

- Sterilní PCR pipetovací špičky bez nukleázy s aerosolovou bariérou s hydrofobními filtry
- Zkumavky PCR 0,5 ml nebo 0,2 ml bez RNázy a DNázy
- Led

Vybavení

- Pipety* určené pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga* s rotorem pro reakční zkumavky 0,2 ml/0,5 ml (schopná dosahovat 10000 otáček za minutu)
- Spektrofotometr* pro kvantifikaci DNA
- Příklad na provádění PCR v reálném čase:* Rotor-Gene Q 5plex HRM nebo jiný přístroj Rotor-Gene; LightCycler 2.0, nebo 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS, nebo ABI PRISM 7900HT SDS; a související specifický materiál
- Zařízení* pro pulzní gelovou elektroforézu

* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a zkalibrovány podle doporučení výrobce.

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Obecná ustanovení

Testy qPCR vyžadují dobrou laboratorní praxi, včetně údržby vybavení, které je určeno pro molekulární biologii a splňuje příslušné předpisy a normy.

Tato souprava je určena pro diagnostiku in vitro. Činidla a pokyny dodané s touto soupravou byly validovány pro zajištění optimálního výkonu. Další ředění činidel nebo změna inkubačních dob a teplot může mít za následek chybné nebo nesouhlasné údaje. U činidla PPM-VF může dojít ke změnám v případě jeho vystavení světlu. Složení všech činidel je specifické pro použití s tímto testem. Pro dosažení optimálního výkonu testu nesmí být provedeny žádné záměny součástí.

Dbejte maximální opatrnosti, abyste zabránili:

- kontaminaci DNÁzy, což může způsobit zničení templátu DNA;
- kontaminaci DNA nebo PCR přenosem, což by mělo za následek falešně pozitivní signál.

Proto doporučujeme následující.

- Při provádění testu používejte laboratorní vybavení bez nukleázy (např. pipety, pipetovací špičky, reakční zkumavky) a používejte rukavice.
- Používejte nové pipetovací špičky s aerosolovou bariérou pro všechny pipetovací kroky, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků a činidel.
- Připravte činidlo master před PCR pomocí určených materiálů (pipet, špiček, atd.) ve vyhrazeném prostoru, kde nebudou zaneseny žádné matrice DNA (DNA, plazmid). Přidejte templát v oddělené zóně (nejlépe v samostatné místnosti) pomocí vyhrazeného materiálu (pipety, špičky, atd.).

Skladování činidel a manipulace s nimi

Soupravy jsou dodávány na suchém ledu a po převzetí musí být skladovány při teplotě -30 °C až -15 °C .

- Minimalizujte vystavení směsí primerů a sond (zkumavka PPM-VF) světlu.
- Zkumavky před otevřením lehce promíchejte a odstředte.
- Všechny součásti soupravy uchovávejte v původních obalech.

Tyto podmínky skladování platí pro otevřené i neotevřené součásti. Součásti skladované za jiných podmínek než jaké jsou uvedeny na štítcích nemusí mít správnou funkci a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky testu.

Datum expirace pro každé činidlo je uvedeno na jednotlivém štítku dané součásti. Při dodržení podmínek skladování zůstanou zachovány vlastnosti výrobku do data expirace vytištěného na štítku.

Neexistují žádné zřejmé známky, které by ukazovaly na nestabilitu tohoto výrobku. Nicméně pozitivní a negativní kontroly by měly být testovány současně s neznámými vzorky.

Postup

Příprava vzorku DNA

Genomová DNA by měla být získána buď z plné krve, purifikovaných lymfocytů z periferní krve, vícejaderných buněk nebo granulocytů. Aby bylo možné porovnat výsledky, doporučujeme provádět stejnou metodu získání buněčných frakcí a metodu extrakce DNA. Extrakce DNA by měla být prováděna jakoukoliv domácí nebo komerční metodou.

Množství DNA je určeno měřením optické hustoty při vlnové délce 260 nm. Kvalita DNA by měla být posuzována pomocí spektrofotometrie nebo gelové elektroforézy.

Poměr A_{260}/A_{280} by měl činit 1,7–1,9. Menší poměry obvykle znamenají kontaminaci proteinem nebo organickými chemikáliemi. Elektroforézní analýza na 0,8–1% agarózovém gelu by měla umožnit vizualizaci izolované DNA jako odlišný proužek v pásmu přibližně 20 kb. Malý roztěr je přijatelný.

Výsledná DNA je zředěna na 5 ng/μl v TE pufru. Reakce qPCR je optimalizována pro 25 ng purifikované genomové DNA.

Skladování nukleových kyselin

Pro krátkodobé skladování do 24 hodin doporučujeme uchovávat purifikované kyseliny při teplotě 2–8 °C. Pro dlouhodobé skladování delší dobu než 24 hodin doporučujeme uchovávat při teplotě –20 °C.

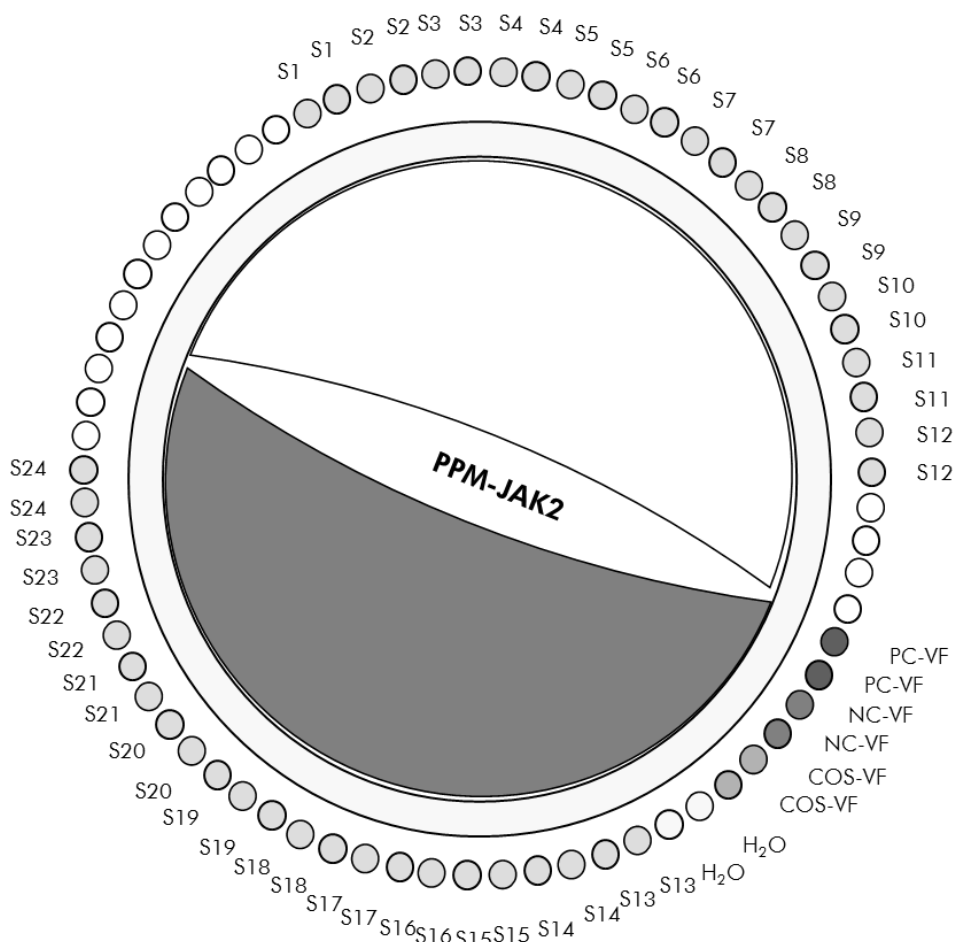
Protokol: qPCR na přístrojích Rotor Gene Q s rotorem na 72 zkumavek

Při použití tohoto přístroje doporučujeme veškerá měření duplikovat, viz tabulka 2.

Tabulka 2. Počet reakcí pro přístroje Rotor Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor Gene Q 5plex HRM s rotorem na 72 zkumavek

Vzorky	Reakce
Směs primerů JAK2 V617F a sond (PPM-VF) (56 reakcí)	
24 vzorků DNA	24 x 2 reakcí
3 kontroly DNA	3 x 2 reakce (PC-VF, NC-VF a COS-VF, každá testována duplicitně)
Kontrola vodou	2 reakce

Zpracování vzorku na přístrojích Rotor-Gene Q s rotorem na 72 zkumavek



Obrázek 2. Doporučené uspořádání rotoru pro testování se soupravou *ipsogen JAK2 MutaScreen*. PC-VF: pozitivní kontrola; NC-VF: negativní kontrola; COS-VF: vzorek s hraniční hodnotou; S: vzorek DNA; H₂O: kontrola vodou.

Poznámka: Dbejte, abyste vždy umístili testovaný vzorek do pozice 1 rotoru. V opačném případě při kroku kalibrace přístroj kalibraci neprovede a budou získána nesprávné údaje fluorescence.

Všechny ostatní pozice vyplňte prázdnými zkumavkami.

qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q s rotorem na 72 zkumavek

Poznámka: Provádějte všechny kroky na ledu.

Postup

- 1. Rozmrazte všechny nezbytné součásti a umístěte je na led.**
Součásti by měly být vytaženy z mrazničky přibližně 10 min před zahájením postupu.

2. Všechny zkumavky protřepejte na protřepávačce a lehce odstřed'te (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).
3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace jsou určeny pro konečný objem reakce.

V tabulce 3 je popsáno pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi činidel, vypočtené pro získání finálního objemu reakce 25 μ l. Je možné připravit předběžnou směs dle počtu reakcí, a to s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování.

Na přístrojích Rotor-Gene může být použita souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen pro analýzu 24 vzorků duplicitně v jednom testu (obrázek 2), 20 vzorků duplicitně ve 2 testech, nebo 15 vzorků duplicitně ve 3 testech.

Tabulka 3. Příprava směsi qPCR

Složka	Počet reakcí (μ l)				Konečná koncentrace
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan univerzální master mix pro PCR, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Směs primerů a sond, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	5	285	145	95	–
Vzorek (bude přidán v kroku 5)	5	5 pro každou	5 pro každou	5 pro každou	–
Celkový objem	25	25 pro každou	25 pro každou	25 pro každou	–

* 24 vzorků; 1 cyklus/soupravu.

† 10 vzorků; 2 cykly/soupravu.

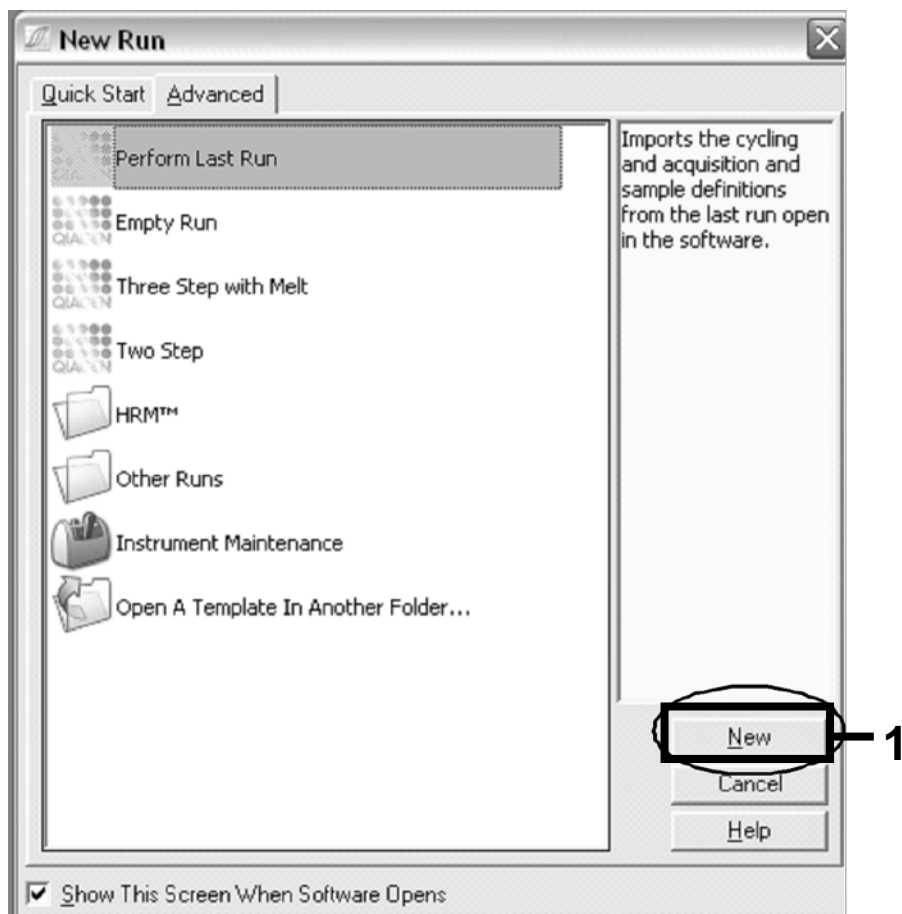
‡ 5 vzorků; 3 cykly/soupravu.

4. Směs qPCR protřepejte na protřepávače a lehce odstředte (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).
5. Do každé zkumavky umístěte 20 µl předběžné směsi qPCR.
6. Přidejte 5 µl materiálu vzorku DNA nebo kontroly do odpovídající zkumavky (celkový objem 25 µl).
7. Jemně směs promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
8. Uzavřete zkumavky PCR. Umístěte zkumavky do rotoru na 72 zkumavek dle doporučení výrobce. Všechny ostatní pozice vyplňte prázdnými zkumavkami.
9. Zkontrolujte, zda pojistný kroužek (příslušenství přístroje Rotor-Gene) je umístěn v horní části rotoru a během zpracování brání náhodnému otevření zkumavek. Umístěte rotor do přístroje Rotor-Gene Q dle doporučení výrobce.
10. Následujícím postupem vytvořte teplotní profil pro detekci DNA JAK2.

Nastavení obecných parametrů analýzy	Obrázky 3, 4
Amplifikace DNA	Obrázek 5
Nastavení citlivosti fluorescenčního kanálu	Obrázek 6

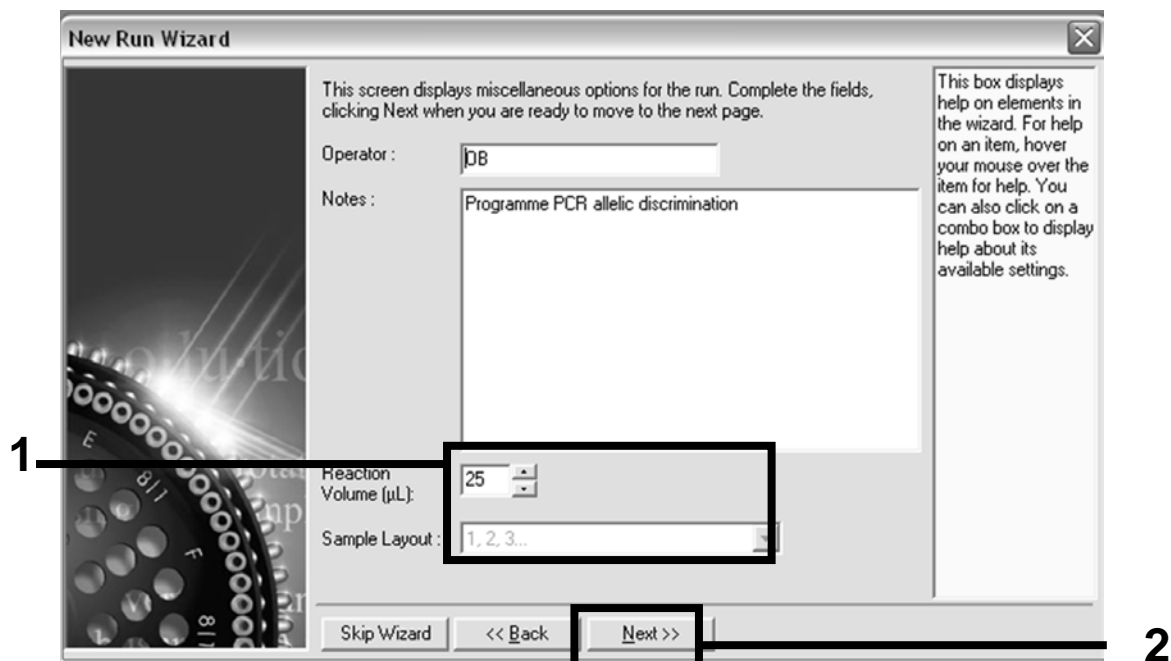
Další informace o programování přístrojů Rotor-Gene jsou uvedeny v uživatelské příručce přístroje. Na obrázcích jsou tato softwarová nastavení orámována silnou černou čarou. Uvedeny jsou ilustrace s přístrojem Rotor-Gene Q.

11. Spust'te software Rotor-Gene. V dialogovém okně „New Run“ (Nový cyklus) klikněte na „New“ (Nový).



Obrázek 3. Dialogové okno „New Run“ (Nový cyklus).

12. V průvodci „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním) nastavte objem na 25 µl a klikněte na „Next“ (Další).

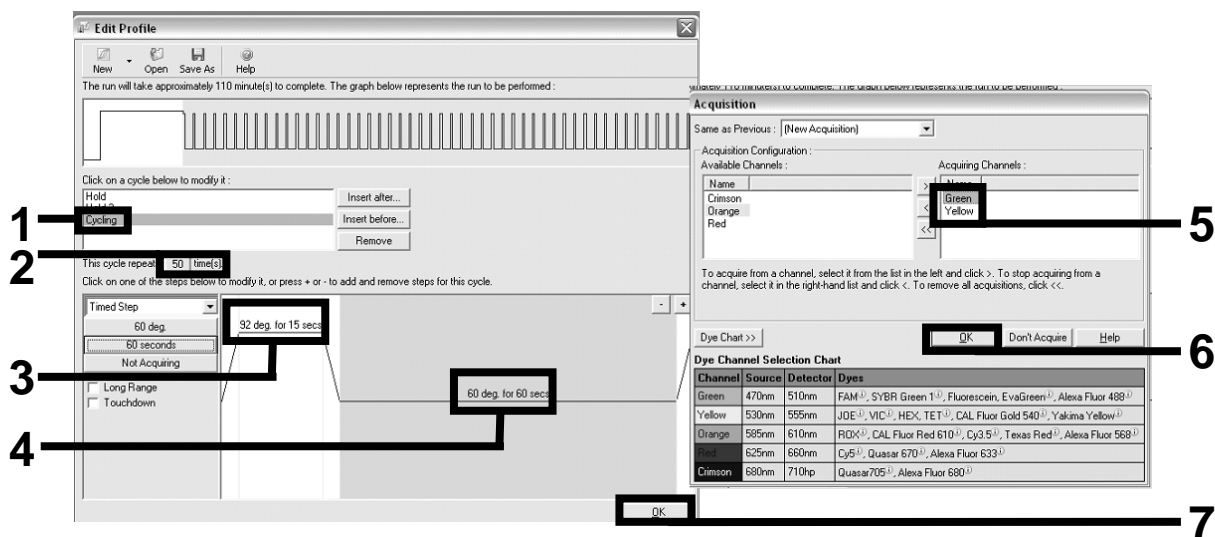


Obrázek 4. Nastavení obecných parametrů analýzy.

13. Klikněte na tlačítko „Edit Profile“ (Upravit profil) v dalším dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním) a naprogramujte teplotní profil podle informací v tabulce 4 a na obrázku 5. Ujistěte se, že ke každému cyklu přidáte poslední krok získávání při 60 °C pro oba kanály; zelený (FAM) i žlutý (VIC).

Tabulka 4. Teplotní profil

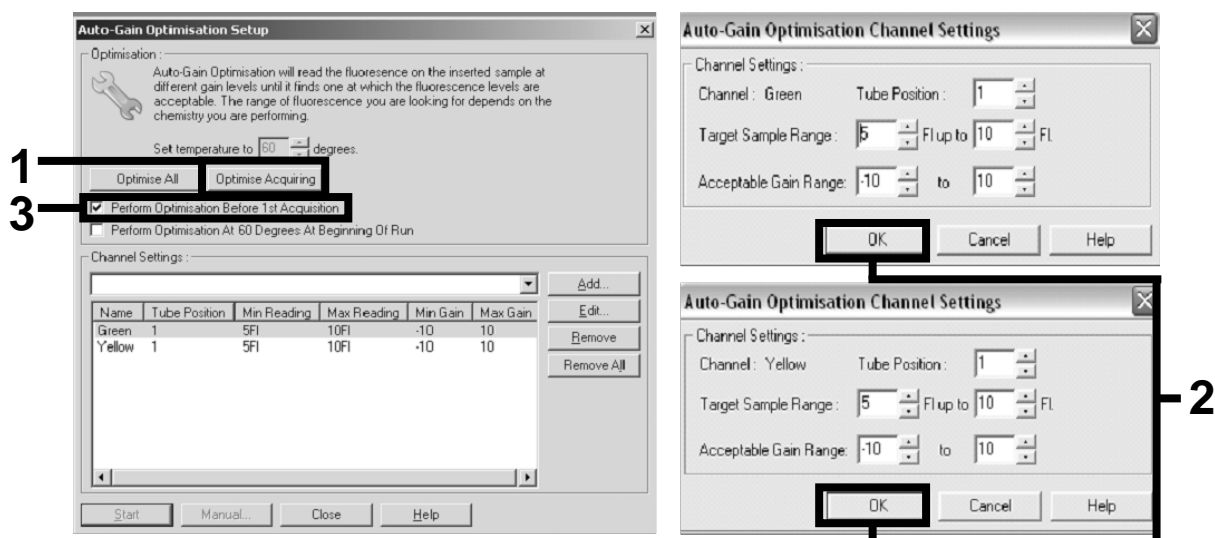
Pozastavení	Teplota: 50 stupňů Čas: 2 min
Pozastavení 2	Teplota: 95 stupňů Čas: 10 min
Cyklování	50krát 92 stupňů po dobu 15 s 60 stupňů po dobu 1 min; samostatný Získání fluorescence FAM v kanálu cyklování A zelený Získání fluorescence VIC v kanálu cyklování A žlutý



Obrázek 5. Amplifikace DNA.

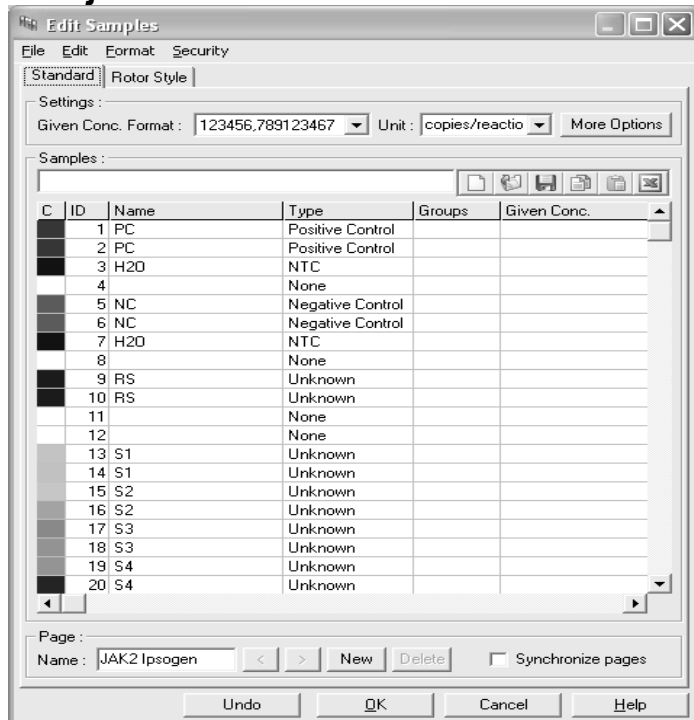
14. Detekční rozsah fluorescenčních kanálů musí být stanoven podle intenzit fluorescence ve zkumavkách PCR. Klikněte na „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku) v dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním), abyste otevřeli dialogové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavení automatické optimalizace zisku). Klikněte na „Optimise Acquiring“ (Optimalizovat pořizování) (obrázek 6) a poté klikněte na „OK“ v dialogových oknech „Auto-Gain Optimisation Channel Settings“ (Nastavení kanálu

automatické optimalizace zisku) pro každý kanál (zelený a žlutý, obrázek 6). Ujistěte se, že je pro každý kanál zatrženo políčko „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (Provést optimalizaci před 1. pořízením) (obrázek 6).



Obrázek 6. Nastavení citlivosti fluorescenčního kanálu.

15. Hodnoty zisku stanovené kalibrací kanálu jsou automaticky uloženy a uvedeny v posledním okně nabídky programovacího postupu. Kliknutím na „Start Run“ (Spustit cyklus) spustíte program.
16. Zadejte nastavení rotoru do softwaru Rotor-Gene (obrázek 7).



Obrázek 7. Nastavení Rotor-Gene: „Edit Samples“ (Upravit vzorky).

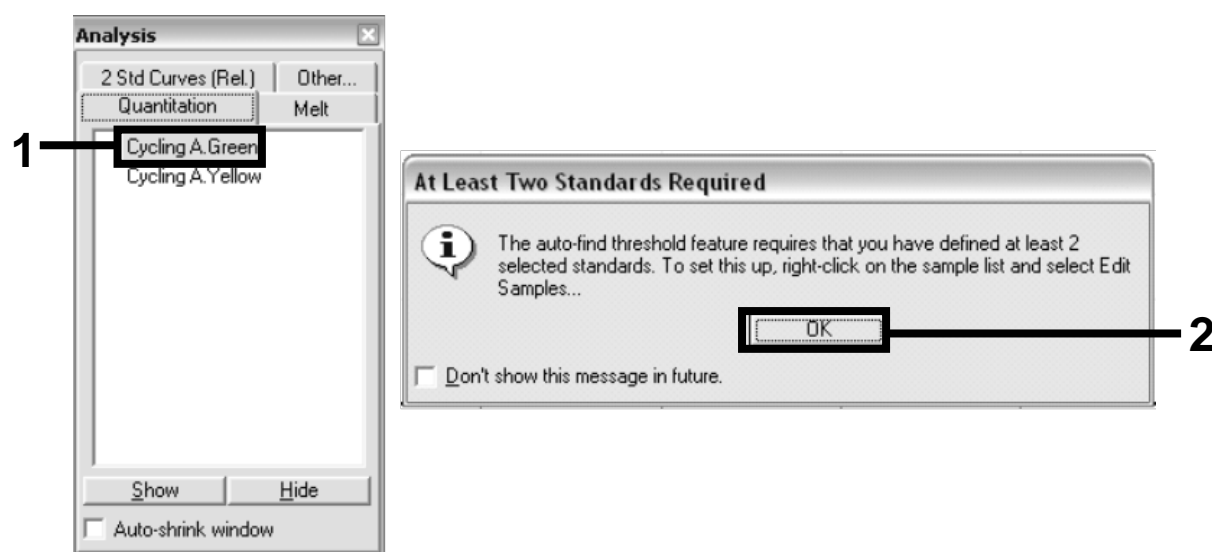
Postup konečné analýzy pro nastavení přístroje Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. Po dokončení programu PCR klikněte na tlačítko „Analysis“ (Analýza) na nástrojové liště (obrázek 8).



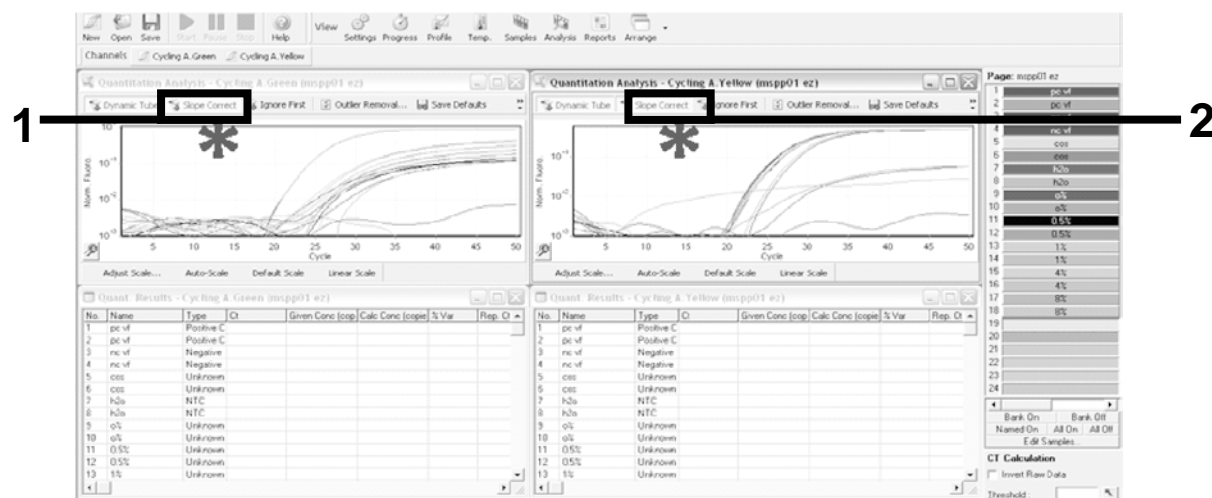
Obrázek 8. Analýza.

18. V dialogovém okně „Analysis“ (Analýza) (obrázek 9), dvakrát klikněte na „Cycling A Green“ (Cyklování A, Zelená) a poté klikněte na „OK“. Zopakujte pro „Cycling A Yellow“ (Cyklování A, Žlutá).



Obrázek 9. Kvantifikace: „Cycling A. Green“ (Cyklování A, Zelená).

19. Objeví se nové okno (obrázek 10). Klikněte na „Slope Correct“ (Oprava křivky) v obou panelech, viz obrázek 10.



Obrázek 10. Nastavení „Slope Correct“ (Oprava křivky).

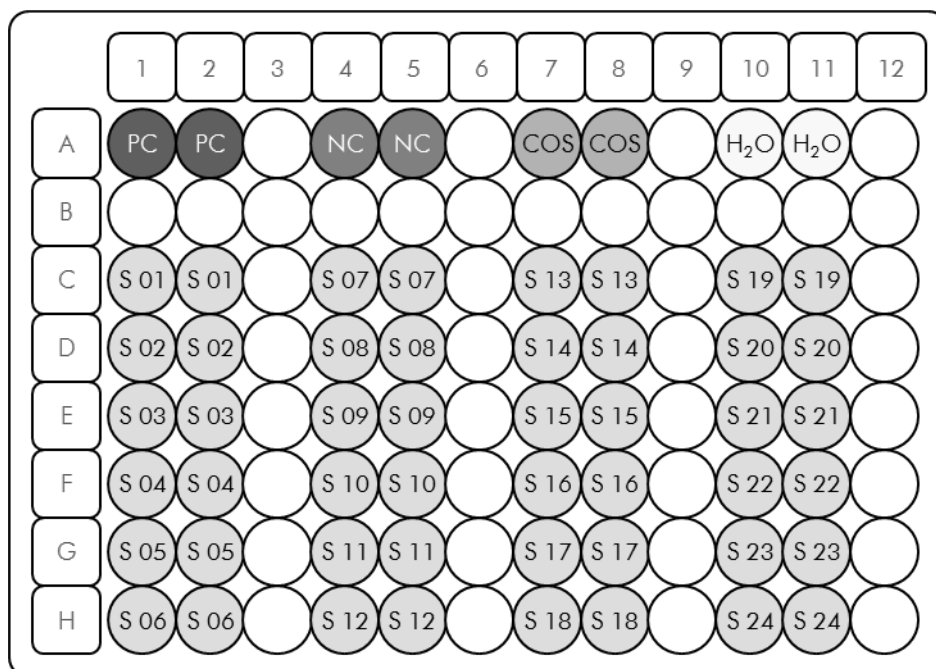
Protokol: qPCR na přístrojích Applied Biosystems a ABI PRISM

Při použití zařízení qPCR s 96 jamkami doporučujeme veškerá měření duplikovat, viz tabulka 5.

Tabulka 5. Počet reakcí pro přístroje Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 nebo ABI PRISM 7900HT

Vzorky	Reakce
Směs primerů JAK2 V617F a sond (PPM-VF) (56 reakcí)	
24 vzorků DNA	24 x 2 reakcí
3 kontroly DNA	3 x 2 reakce (PC-VF, NC-VF a COS-VF, každá testována duplicitně)
Kontrola vodou	2 reakce

Zpracování vzorků na přístrojích Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 nebo ABI PRISM 7900HT



Obrázek 12. Doporučené uspořádání destičky pro testování se soupravou *ipsogen* JAK2 MutaScreen. PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; COS: vzorek s hraniční hodnotou; S: Vzorek DNA; H₂O: kontrola vodou.

qPCR na přístrojích Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 nebo ABI PRISM 7900HT

Poznámka: Provádějte všechny kroky na ledu.

Postup

- 1. Rozmrazte všechny nezbytné součásti a umístěte je na led.**
Součásti by měly být vytaženy z mrazničky přibližně 10 min před zahájením postupu.
- 2. Všechny zkumavky protřepejte na protřepávačce a lehce odstřed'te (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).**
- 3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace jsou určeny pro konečný objem reakce.

V tabulce 6 je popsáno pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi činidel, vypočtené pro získání finálního objemu reakce 25 μ l. Je možné připravit předběžnou směs dle počtu reakcí, a to s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování.

Na přístrojích Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 nebo ABI PRISM 7900HT může být souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen použita pro analýzu 24 vzorků duplicitně v jednom cyklu (obrázek 12), 20 vzorků duplicitně ve 2 cyklech, nebo 15 vzorků duplicitně ve 3 cyklech.

Tabulka 6. Příprava směsi qPCR

Složka	Počet reakcí (μl)				Konečná koncentrace
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan univerzální master mix pro PCR, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Směs primerů a sond, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	5	285	145	95	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 pro každou	5 pro každou	5 pro každou	–
Celkový objem	25	25 pro každou	25 pro každou	25 pro každou	–

* 24 vzorků; 1 cyklus/soupravu.

† 10 vzorků; 2 cykly/soupravu.

‡ 5 vzorků; 3 cykly/soupravu.

4. Směs qPCR protřepejte na protřepávače a lehce odstředte (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).
5. Do každé jamky umístěte 20 μl předběžné směsi qPCR.
6. Přidejte 5 μl materiálu vzorku DNA nebo kontroly do odpovídající jamky (celkový objem 25 μl).
7. Jemně směs promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
8. Uzavřete destičku a lehce odstředte (300 x g, přibližně 10 s).
9. Umístěte destičku do termocykleru dle doporučení výrobce.
10. Naprogramujte termocykler programem pro tepelné cykly dle tabulky 7 a spusťte cyklus.

Tabulka 7. Teplotní profil pro přístroje Applied Biosystems a ABI PRISM

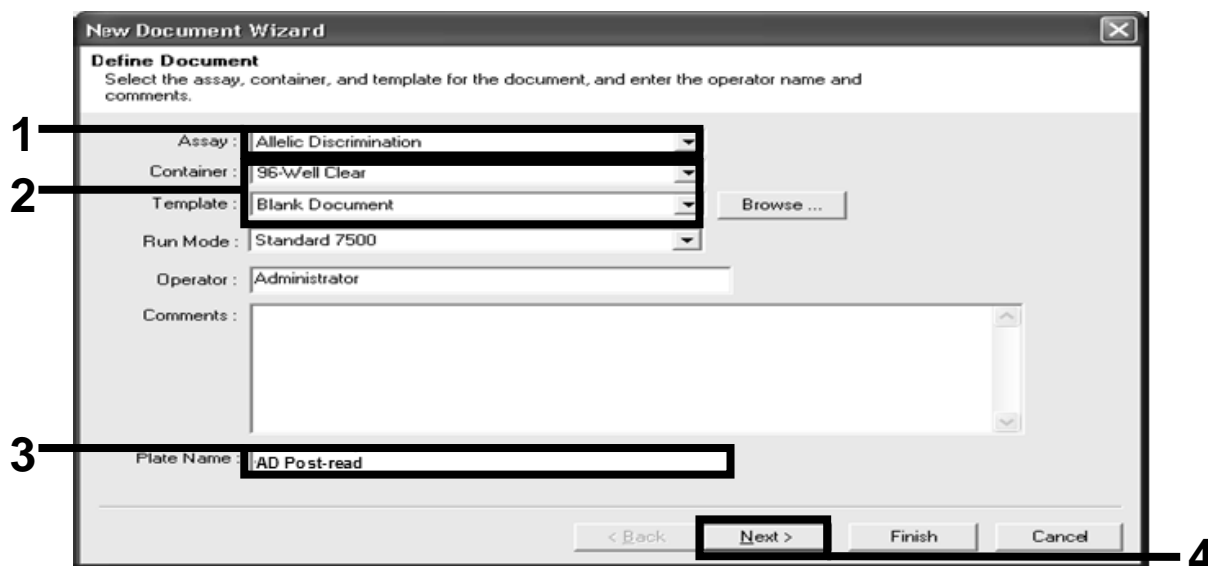
Pozastavení	Teplota: 50 °C Čas: 2 min
Pozastavení 2	Teplota: 95 °C Čas: 10 min
Cyklování	50krát 92 °C na 15 s 60 °C na 1 min

Postup pro následnou analýzu cyklu pro přístroje Applied Biosystems a ABI PRISM

Podrobnosti o programování přístrojů Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 nebo ABI PRISM 7900HT naleznete v uživatelské příručce daného přístroje. Pro lepší přehled jsou tato softwarová nastavení orámována silnou černou čarou.

- 11. Po dokončení cyklu zvolte „Start/Program“ (Spustit/Program) a poté zvolte „File/New“ (Soubor/Nový).**
- 12. V dialogovém okně „New Document Wizard“ (Průvodce novým dokumentem) klikněte na rozevírací seznam „Assay“ (Analýza) a zvolte „Allelic Discrimination“ (Rozlišení alel) (obrázek 13).**

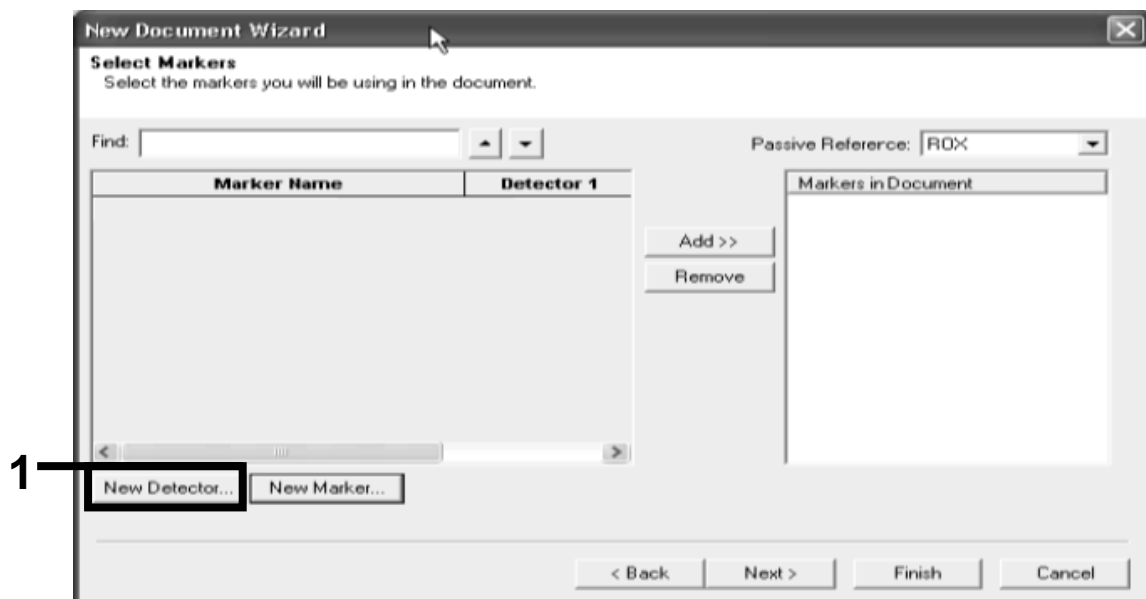
13. Přijměte výchozí nastavení pro pole „Container“ (Zásobník) a „Template“ (Templát) („96-Well Clear“ (Čistých 96 jamek) a „Blank Document“ (Prázdný dokument), obrázek 13). V poli „Plate Name“ (Název destičky) zadejte *AD Post-read* (obrázek 13), a poté kliknutím na „Next>“ (Další) otevřete dialogové okno „Select Markers“ (Zvolit markery).



Obrázek 13. Předběžná nastavení pro vytvoření nového následného cyklu (post-read) (New Document Wizard) (Průvodce novým dokumentem).

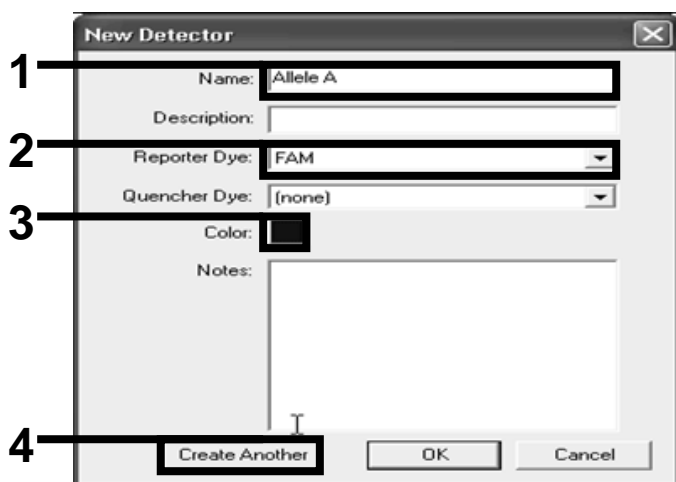
14. Jestliže panel „Markers in Document“ (Markery v dokumentu) v dialogovém okně „Select Markers“ (Zvolit markery) obsahuje vhodný marker pro vaše použití, pokračujte krokem 18. Pokud ne, pokračujte krokem 15.

15. Vytvořte detektory a markery následujícím způsobem. Klikněte na „New Detector“ (Nový detektor) (obrázek 14).



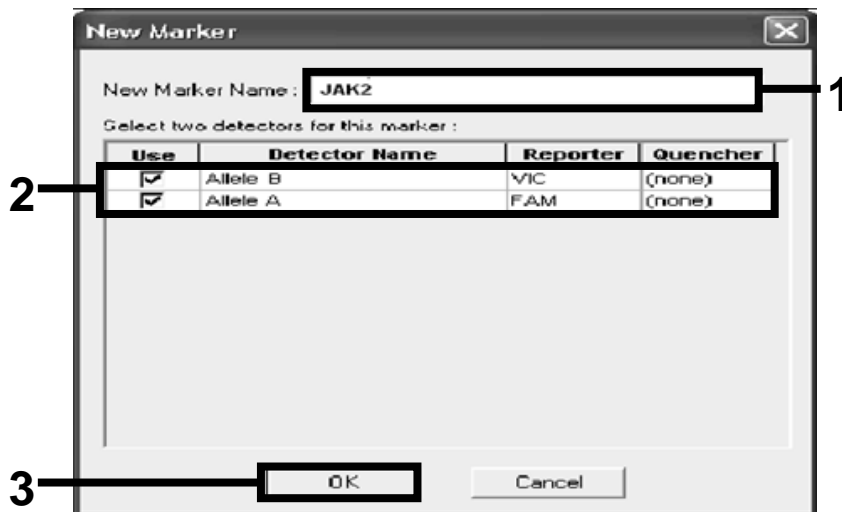
Obrázek 14. Panel „Markers in Document“ (Markery v dokumentu) neobsahuje vhodný marker pro vaše použití.

16. V dialogovém okně „New Detector“ (Nový detektor) zadejte „Alela A“ do pole „Name“ (Název) (obrázek 15). Ponechte „Reporter Dye“ (Oznamovací barvivo) nastaveno na „FAM“. Kliknutím na tlačítko „Color“ (Barva) zvolte barvu a poté klikněte na tlačítko „OK“ (obrázek 15). Klikněte na „Create Another“ (Vytvořit další) (obrázek 15).



Obrázek 15. Vytvoření detektorů.

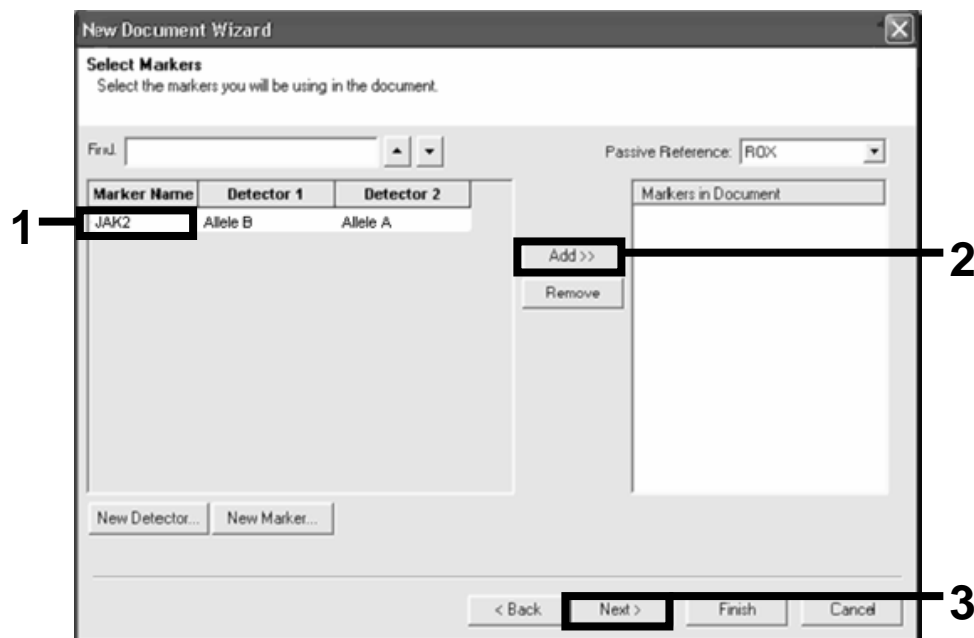
17. V dialogovém okně „New Detector“ (Nový detektor) zadejte „Allele B“ (Alela B) do pole „Name“ (Název) . V poli „Reporter Dye“ (Oznamovací barvivo) zvolte „VIC“. Kliknutím na tlačítko „Color“ (Barva) zvolte barvu a poté klikněte na tlačítko „OK“.
18. Klikněte na „New Marker“ (Nový marker) v dialogovém okně „Select Markers“ (Zvolit markery) (viz obrázek 14).
19. V dialogovém okně „New Marker“ (Nový marker) zadejte „JAK2“ do pole „New Marker Name“ (Název nového markeru) (obrázek 16). Zvolte detektory „Allele A“ (Alela A) a „Allele B“ (Alela B), jak byly vytvořeny v krocích 16 a 17 (nebo již definované) a klikněte na „OK“ (obrázek 16).



Obrázek 16. Vytvoření markerů.

20. V dialogovém okně „Select Markers“ (Zvolit markery) zvolte „JAK2“, který byl vytvořen výše nebo vhodný předem definovaný marker a poté klikněte na „Add>>“ (Přidat) (obrázek 17).

Poznámka: Chcete-li marker odstranit, zvolte jej a poté klikněte na „Remove“ (Odstranit).

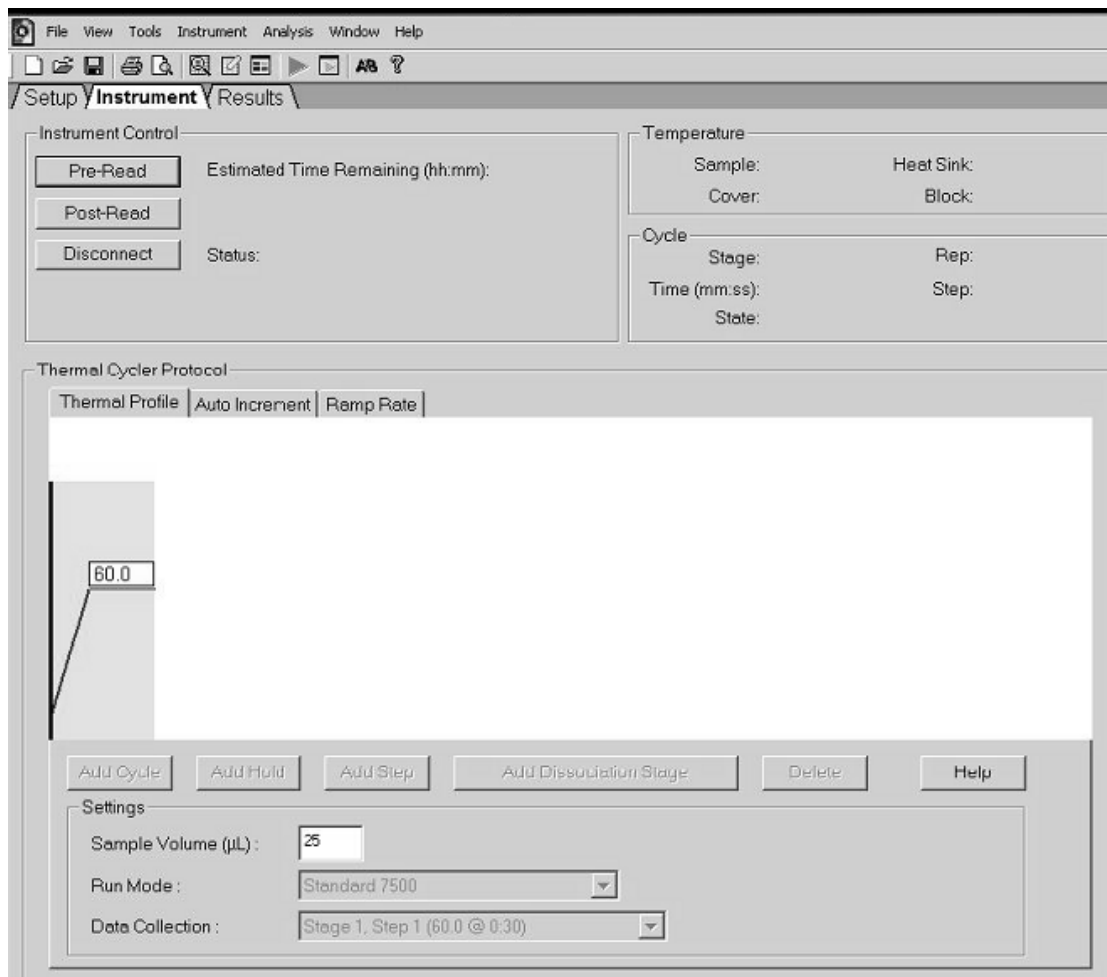


Obrázek 17. Výběr markerů.

21. Klikněte na „Next>“ (Další).
22. V dialogovém okně „Setup Sample Plate“ (Nastavení destičky se vzorky) klikněte a přetáhněte myší marker pro jamky, které obsahují vzorky. Klikněte na „Finish“ (Dokončit).
23. Zvolte záložku „Instrument“ (Zařízení) a změňte objem vzorku na 25 µl.
24. Zvolte „File/Save“ (Soubor/Uložit) a poté klikněte na „Save“ (Uložit) pokud chcete zachovat název, který jste přiřadili při vytvoření destičky.
25. Zaveďte reakční destičku do přístroje podle doporučení výrobce.

26. Spustíte následný (post-read) cyklus. Klikněte na „Post-Read“ (Následný).

Přístroj provede 1 cyklus po dobu 60 sekund při 60 °C. Během tohoto cyklu přístroj shromáždí FAM a VIC fluorescence do každé jamky (obrázek 18).



Obrázek 18. Cyklus Post-read (Následný).

27. Zvolte „File/Export“ (Soubor/Exportovat) a poté kliknutím na „Results“ (Výsledky) provedete export výsledků do souboru Excel. Výsledky jsou uvedeny jako na obrázku 19.

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

Obrázek 19. Příklad výsledků, uvedených v souboru Excel.

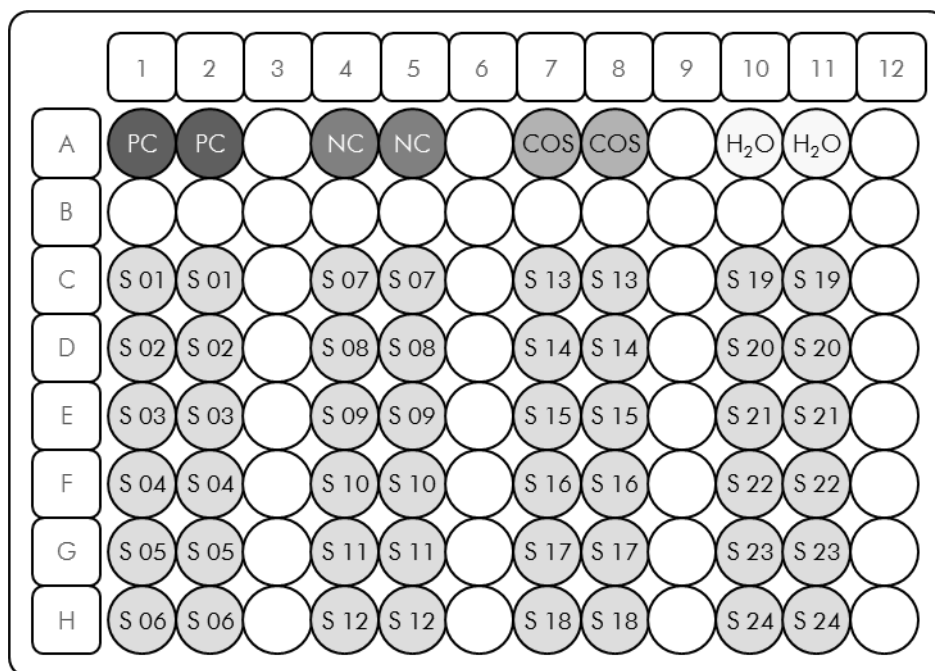
Protokol: qPCR na přístroji LightCycler 480

Při použití zařízení qPCR s destičkou s 96 jamkami doporučujeme veškerá měření duplikovat, viz tabulka 8.

Tabulka 8. Počet reakcí pro přístroj LightCycler 480

Vzorky	Reakce
Se směsí primerů a sond JAK2 V617F (PPM-JAK2)	
24 vzorků DNA	24 x 2 reakcí
3 kontroly DNA	3 x 2 reakce (PC-VF, NC-VF a COS-VF, každá testována duplicitně)
Kontrola vodou	2 reakce

Zpracování vzorků na přístroji LightCycler 480



Obrázek 20. Doporučené uspořádání destičky pro testování se soupravou *ipsogen* JAK2 MutaScreen. PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; COS: vzorek s hraniční hodnotou; S: Vzorek DNA; H₂O: kontrola vodou.

qPCR na přístroji LightCycler 480

Poznámka: Provádějte všechny kroky na ledu.

Postup

- 1. Rozmrazte všechny nezbytné součásti a umístěte je na led.**
Součásti by měly být vytaženy z mrazničky přibližně 10 min před zahájením postupu.
- 2. Všechny zkumavky protřepejte na protřepávače a lehce odstřed'te (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).**
- 3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace jsou určeny pro konečný objem reakce.

V tabulce 9 je popsáno pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi činidel, vypočtené pro získání finálního objemu reakce 25 μ l. Je možné připravit předběžnou směs dle počtu reakcí, a to s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování.

Na přístroji LightCycler 480 může být použita souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen pro analýzu 24 vzorků duplicitně v jednom testu (obrázek 20), 20 vzorků duplicitně ve 2 testech, nebo 15 vzorků duplicitně ve 3 testech.

Tabulka 9. Příprava směsi qPCR

Složka	Počet reakcí (μl)				Konečná koncentrace
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan univerzální master mix pro PCR, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Směs primerů a sond, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	5	285	145	95	–
Vzorek (bude přidán v kroku 6)	5	5 pro každou	5 pro každou	5 pro každou	–
Celkový objem	25	25 pro každou	25 pro každou	25 pro každou	–

* 24 vzorků; 1 cyklus/soupravu.

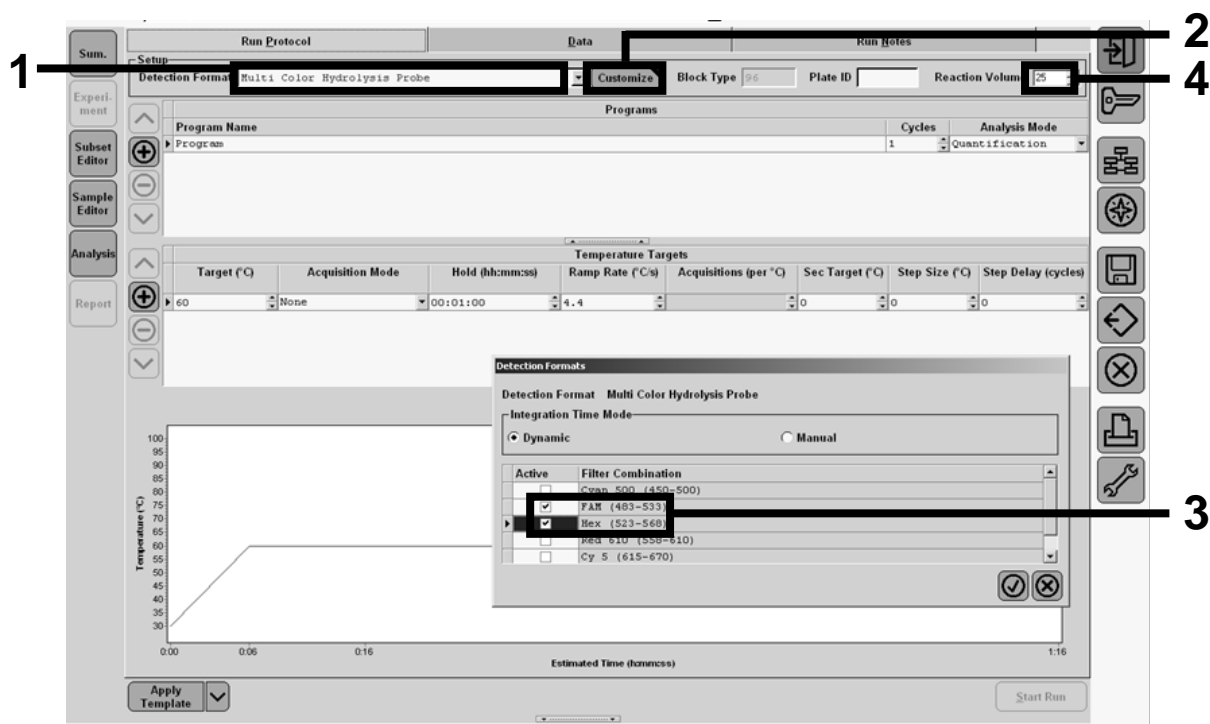
† 10 vzorků; 2 cykly/soupravu.

‡ 5 vzorků; 3 cykly/soupravu.

4. Směs qPCR protřepejte na protřepávačce a lehce odstředte (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).
5. Do každé jamky umístěte 20 μl předběžné směsi qPCR.
6. Přidejte 5 μl materiálu vzorku DNA nebo kontroly do odpovídající jamky (celkový objem 25 μl).
7. Jemně směs promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
8. Uzavřete destičku a lehce odstředte (300 x g, přibližně 10 s).
9. Umístěte destičku do termocykleru dle doporučení výrobce.
10. Na stejné stránce zvolte „New Experiment“.
11. U přístroje LightCycler 480 I postupuje dle kroku 11a. U přístroje LightCycler 480 II postupuje dle kroku 11b.

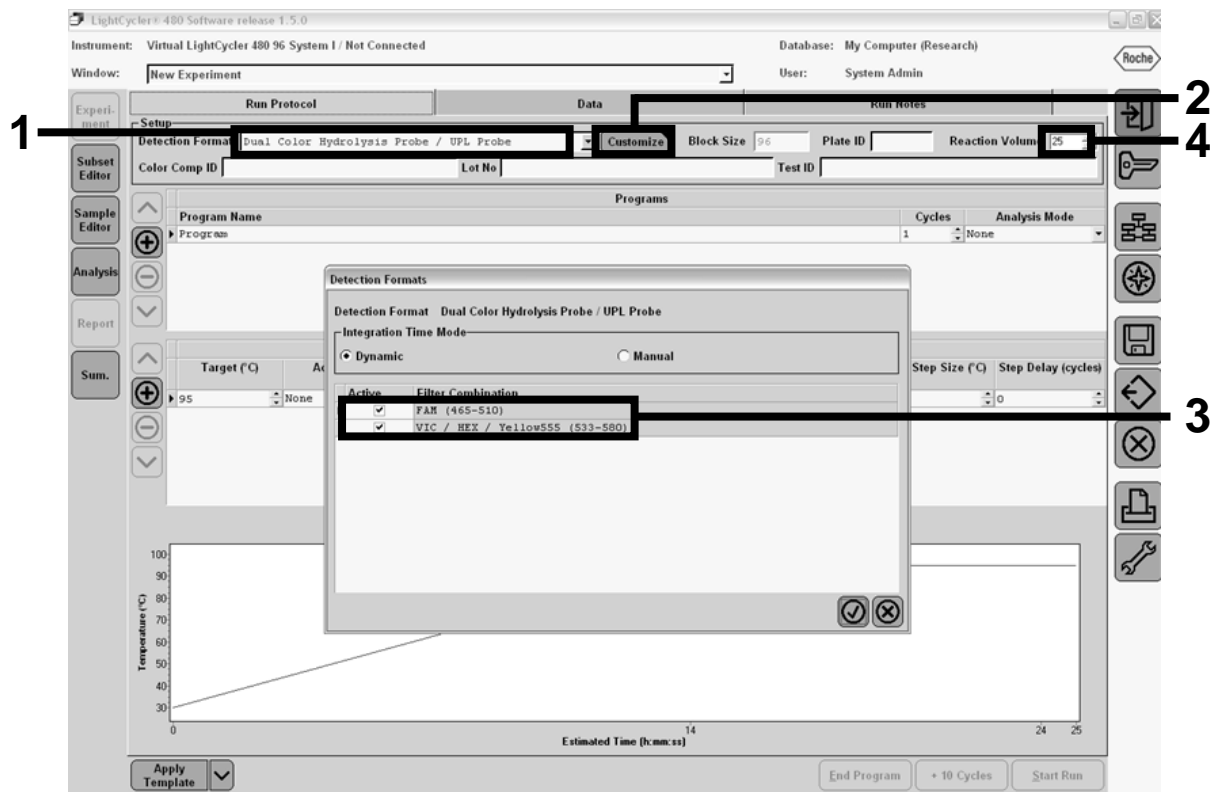
Podrobnosti o programování přístroje LightCycler 480 naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Pro lepší přehled jsou tato softwarová nastavení orámována silnou černou čarou.

11a. LightCycler 480 I: Zvolte „Multi Color Hydrolysis Probe“ (Vícebarevná sonda pro hydrolýzu), klikněte na „Customize“ (Přizpůsobit) a poté zkontrolujte, zda jsou zatrženy kanály „FAM (483–533)“ a „Hex (533–568)“ (tj. VIC) (obrázek 21). Nastavte reakční objem na „25“ µl (obrázek 21) a pokračujte krokem 12.



Obrázek 21. LightCycler 480 I: Nastavení formátu detekce.

11b. LightCycler 480 II: Zvolte „Dual Color Hydrolysis Probe“ (Dvoubarevná sonda pro hydrolýzu), klikněte na „Customize“ (Přizpůsobit) a poté zkontrolujte, zda jsou zatrženy kanály „FAM (465-510)“ a „VIC / HEX / (533–580)“ (obrázek 22). Nastavte reakční objem na „25“ µl (obrázek 22) a pokračujte krokem 12.



Obrázek 22. LightCycler 480 II: Nastavení formátu detekce.

12. Naprogramujte termocykler programem pro tepelné cykly dle tabulky 10 a spusťte cyklus.

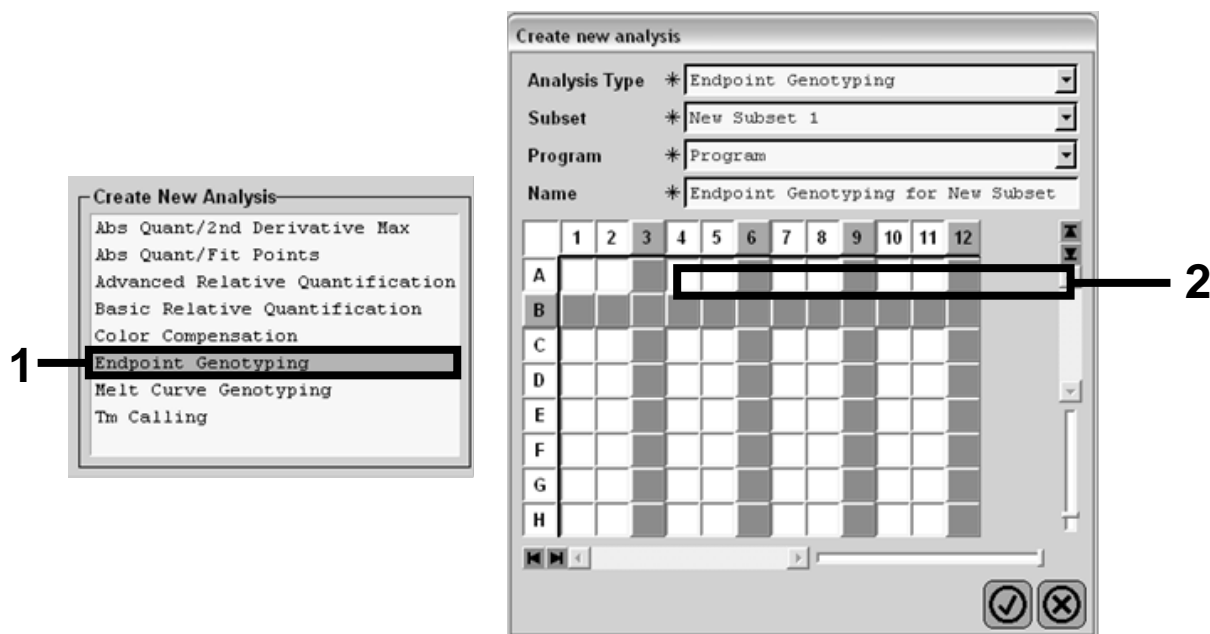
Poznámka: Při popisu nastavení destičky na přístroji zvolte „Endpt Geno“ (Koncové stanovení genotypu) v části „Step 1: select workflow“ (Krok 1: Volba pracovního postupu).

Tabulka 10. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480

Pozastavení	Teplota: 50 °C Čas: 2 min
Pozastavení 2	Teplota: 95 °C Čas: 10 min
Cyklování	50krát 92 °C na 15 s; samostatný 60 °C na 1 min; samostatný
Pozastavení 3	60 °C na 1 min; samostatný

Postup analýzy výsledků pro přístroj LightCycler 480

- Po dokončení cyklu klikněte na „Analysis“ (Analýza).
- V dialogovém okně „Create New Analysis“ (Vytvořit novou analýzu) zvolte „Endpoint Genotyping“ (Koncové stanovení genotypu) a poté zvolte podskupinu k analýze v nabídce „Subset“ (Podskupina) (obrázek 23).



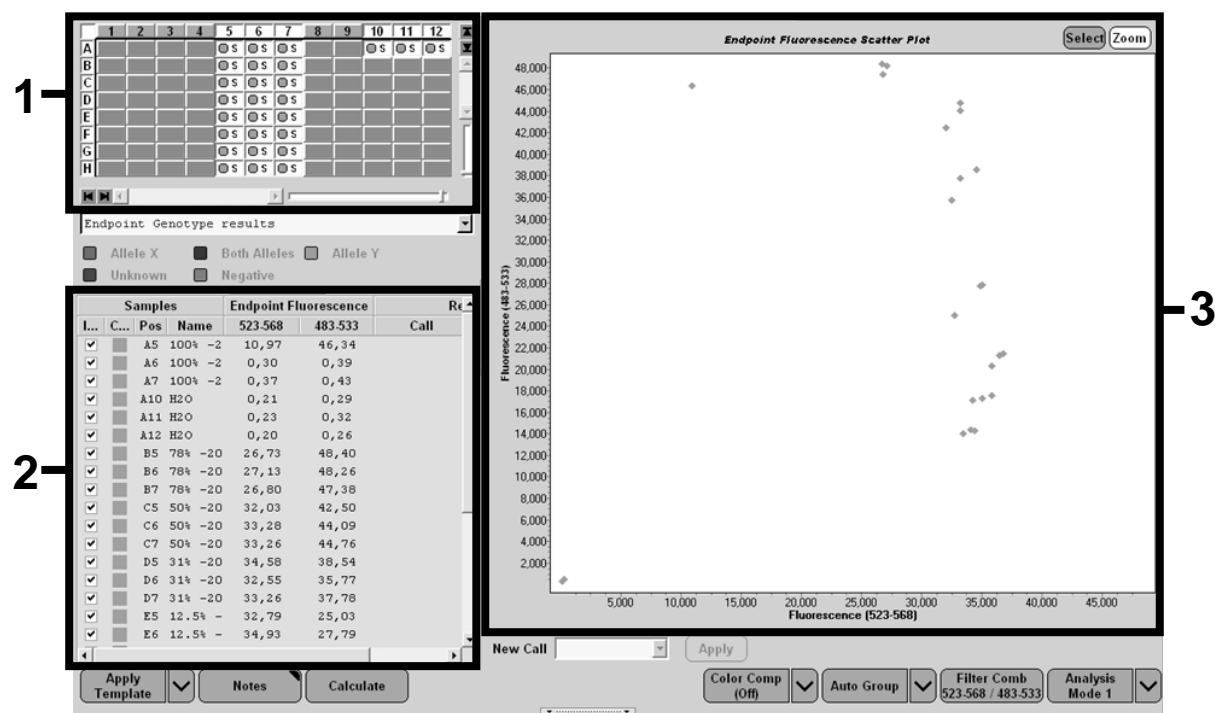
Obrázek 23. Výběr typu analýzy a podskupiny k analýze.

- V dalším okně zvolte „Hex“ (tj. VIC) fluorescence pro „Allele X“ (Alela X) a „FAM“ fluorescence pro „Allele Y“ (Alela Y) (obrázek 24).



Obrázek 24. Výběr fluorescence pro „Allele X“ (Alela X) a „Allele Y (Alela Y)“.

16. V dalším okně (obrázek 25) je znázorněno uspořádání destičky (1, vlevo nahoře), výsledky fluorescence pro každý vzorek (2, vlevo dole) a grafické znázornění s rozlišením alel (3, vpravo; fluorescence FAM a VIC změřené při 50. cyklu PCR).



Obrázek 25. Souhrn údajů.

17. Chcete-li exportovat údaje, klikněte pravým tlačítkem myši na šablonu výsledků vzorku a poté zvolte „Export Table“ (Exportovat tabulku). Soubor bude uložen ve formátu textového souboru (.txt).

18. Chcete-li prohlížet a analyzovat výsledky, otevřete soubor pomocí aplikace Excel. Výsledky jsou uvedeny jako na obrázku 26.

Microsoft Excel - test

Fichier Edition Affichage Insertion Format Outils Données Fenêtre ?

A1 Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)

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

VIC
FAM

Obrázek 26. Příklad výsledků, uvedených v souboru Excel.

Protokol: qPCR na přístroji LightCycler 2.0

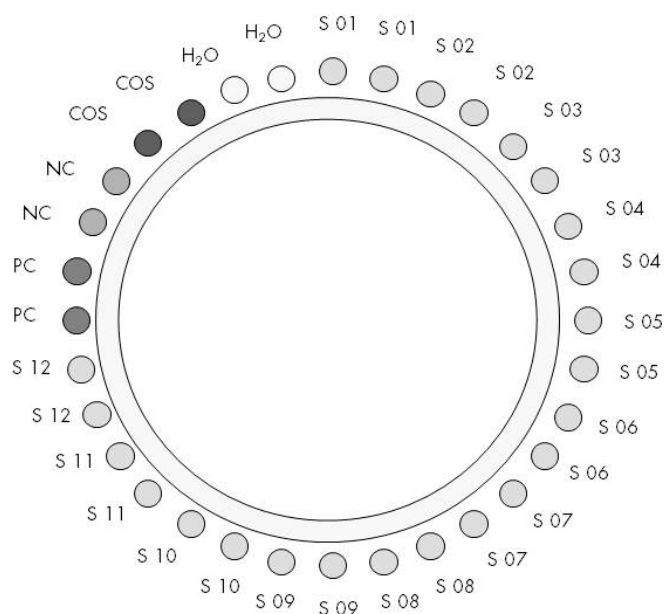
Poznámka: Vzhledem k určitým technologickým požadavkům musí být testy na přístroji LightCycler 2.0 prováděny s použitím specifických činidel. Doporučujeme použít činidlo LightCycler TaqMan Master. Při přípravě směsi Master Mix 5x se řiďte pokyny výrobce.

Při použití rotoru s 32 kapilárami doporučujeme veškerá měření duplikovat, viz tabulka 11.

Tabulka 11. Počet reakcí pro přístroj LightCycler 2.0

Vzorky	Reakce
Směs primerů JAK2 V617F a sond (PPM-VF) (32 reakcí)	
12 vzorků DNA	12 x 2 reakcí
3 kontroly DNA	3 x 2 reakce (PC-VF, NC-VF a COS-VF, každá testována duplicitně)
Kontrola vodou	2 reakce

Zpracování vzorků na přístroji LightCycler 2.0



Obrázek 27. Doporučené uspořádání rotoru pro testování se soupravou *ipsogen JAK2 MutaScreen*. PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; COS: vzorek s hraniční hodnotou; S: Vzorek DNA; H₂O: kontrola vodou.

qPCR na přístroji LightCycler 2.0

Poznámka: Provádějte všechny kroky na ledu.

Postup

- 1. Rozmrazte všechny nezbytné součásti a umístěte je na led.**
Součásti by měly být vytaženy z mrazničky přibližně 10 min před zahájením postupu.
- 2. Všechny zkumavky protřepejte na protřepávače a lehce odstřed'te (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).**
- 3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace jsou určeny pro konečný objem reakce.

V tabulce 12 je popsáno pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi činidel, vypočtené pro získání finálního objemu reakce 20 μ l. Je možné připravit předběžnou směs dle počtu reakcí, a to s použitím stejné směsi primerů a sond. Jsou zahrnuty objemy navíc, aby kompenzovaly chybu pipetování.

Na přístroji LightCycler 2.0 může být souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen použita pro analýzu 12 vzorků duplicitně při jednom cyklu testu (obrázek 27).

Tabulka 12. Příprava směsi qPCR pro přístroj LightCycler 2.0

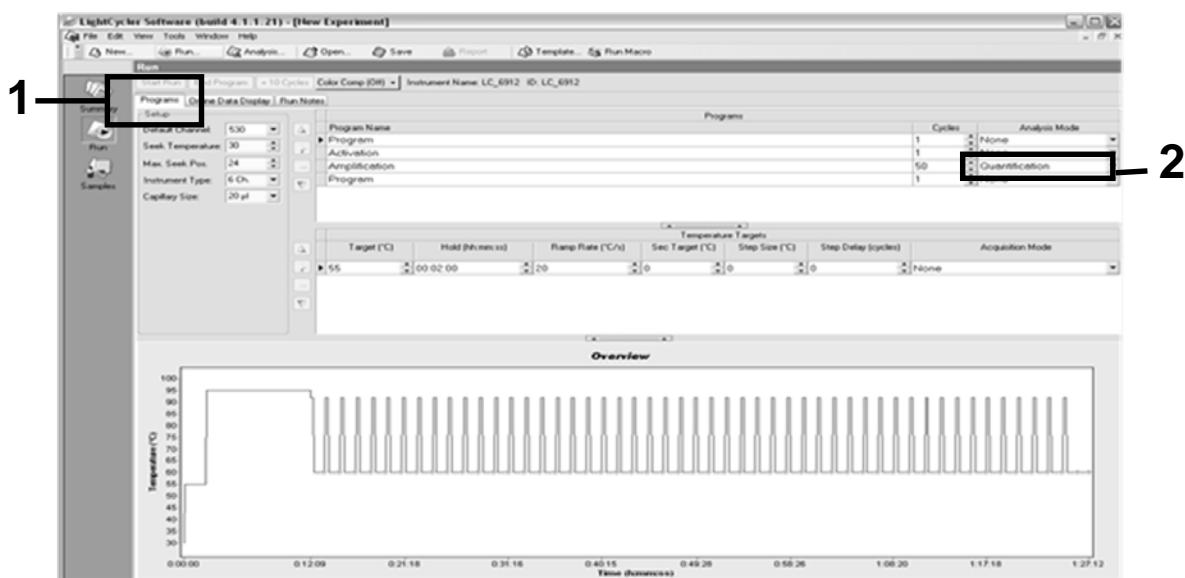
Složka	Počet reakcí (μ l)		Konečná koncentrace
	1	32+1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Směs primerů a sond, 10x	2	66	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	9	297	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 pro každou	–
Celkový objem	20	20 pro každou	–

- 4. Směs qPCR protřepejte na protřepávače a lehce odstřed'te (přibližně 10 s, 10 000 ot/min, aby se kapalina shromáždila na dně zkumavky).**

5. Do každé kapiláry umístěte 15 μ l předběžné směsi qPCR.
6. Přidejte 5 μ l materiálu vzorku DNA nebo kontroly do odpovídající kapiláry (celkový objem 20 μ l).
7. Jemně směs promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
8. Umístěte kapiláry do nástavce poskytnutého s přístrojem a krátce odstředte (700 x g, přibližně 10 s).
9. Umístěte vzorky do termocyklieru dle doporučení výrobce.
10. Naprogramujte termocyklier (obrázek 28) pomocí programu uvedeného v tabulce 13.

Podrobnosti o programování přístroje LightCycler 2,0 naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Pro lepší přehled jsou tato softwarová nastavení orámována silnou černou čarou.

Poznámka: Ujistěte se, že nastavení je pro Kvantifikaci (Quantification) a samostatné pořízení fluorescence FAM a samostatné pořízení fluorescence VIC u kroku amplifikace/cyklování a poslední pozastavení při 60 °C.



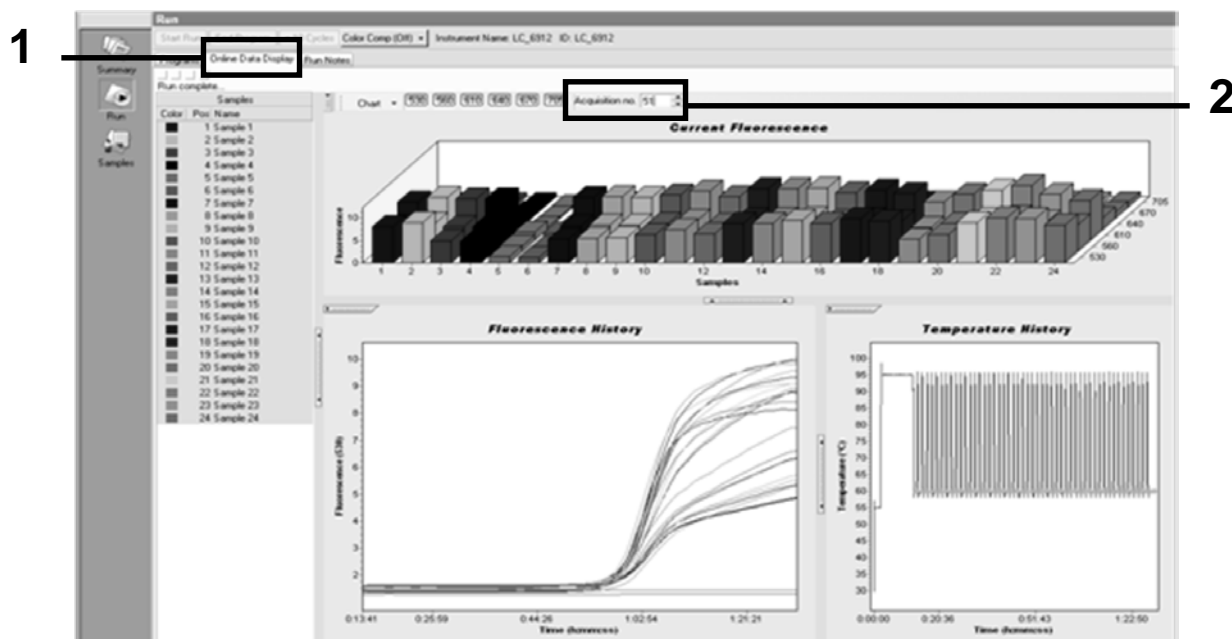
Obrázek 28. Obrazovka programování pro LightCycler 2.0.

Tabulka 13. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 2.0


Pozastavení	Teplota: 55 °C Čas: 2 min Teplotní nárůst: 20
Pozastavení 2	Teplota: 95 °C Čas: 10 min Teplotní nárůst: 20
Cyklování	50krát 92 °C po dobu 15 s; nárůst: 20 60 °C po dobu 1 min; nárůst: 20
Pozastavení 3	60 °C po dobu 1 min; nárůst: 20

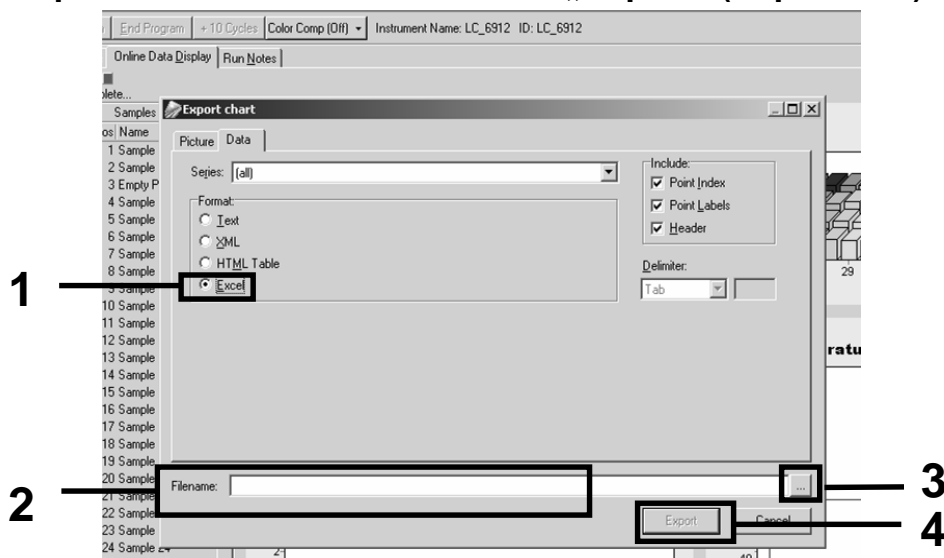
Postup pro analýzu výsledků pro přístroj LightCycler 2.0

- Na konci amplifikace klikněte na záložku „Online Data Display“ (Online zobrazení údajů) (obrázek 29). Otevřete nabídku zobrazení v levé horní části okna „Current Fluorescence“ (Aktuální fluorescence), poté napište 51 v poli „Acquisition no.“ (Počet akvizic).



Obrázek 29. Výsledky a historie v online zobrazení údajů (Online Data Display).

12. Klikněte pravým tlačítkem myši v blízkosti grafu „Current Fluorescence“ (Aktuální fluorescence) a zvolte „Export“ (Exportovat).
13. Klikněte na pole „Excel“ v dialogovém okně „Export chart“ (Exportovat tabulku) (obrázek 30). Zadejte název v dialogovém okně „Filename“ (Název souboru). Zvolte umístění exportu výsledného souboru pomocí tlačítka . Klikněte na „Export“ (Exportovat).



Obrázek 30. Výběr formátu exportu a umístění datového souboru.

14. Chcete-li prohlížet a analyzovat výsledky, otevřete soubor pomocí aplikace Excel. Výsledky pro LightCycler 2.0 se zobrazí tak, jak jsou uvedeny níže.

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

Obrázek 31. Příklad výsledků pro přístroj LightCycler 2.0, uvedených v souboru Excel.

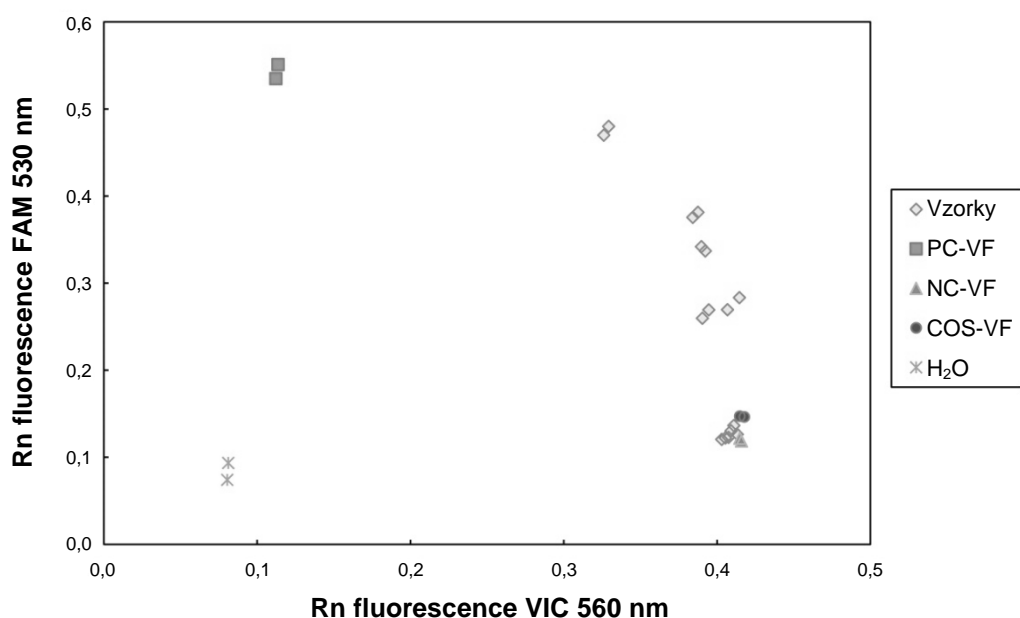
Interpretace výsledků

Najděte soubor vhodný k extrakci exportovaných údajů pro všechny přístroje: Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo jiný přístroj Rotor-Gene, LightCycler 2.0 nebo 480; Applied Biosystems 7300 nebo 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS, nebo 7900HT SDS a zkontrolujte hladiny fluorescence (musí být konzistentní mezi duplikáty).

Připravte grafické zobrazení (graf) nebo údaje o fluorescence. Osa x je fluorescence VIC; osa y je fluorescence FAM.

Grafické zobrazení a kritéria kontroly kvality

Příklad grafického zobrazení je znázorněn na obrázku 32.



Obrázek 32. Grafické znázornění typického příkladu testu rozlišení alel.

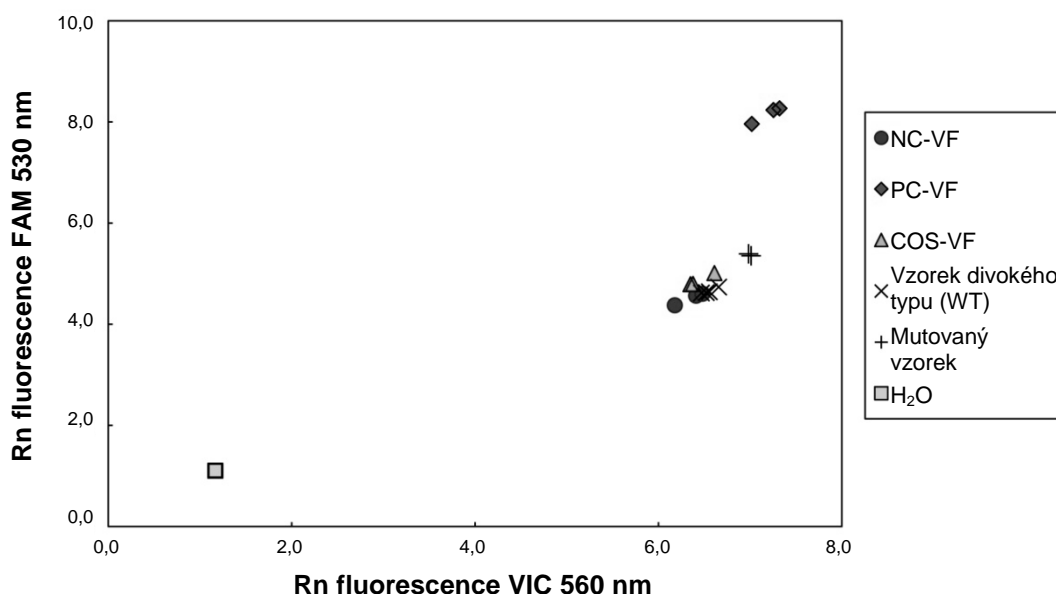
Přístroje: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM a LightCycler 480.

Vzorky se musí nacházet na oblouku propojujícím negativní kontroly (NC) s pozitivními kontrolami (PC).

Nesprávné umístění jakékoliv kontroly může označovat chybu testu.

- Pozitivní kontroly by se měly nacházet v levé horní části.
- Negativní kontroly by se měly nacházet v pravé dolní části.
 - Nesprávné umístění negativní kontroly může ukazovat na kontaminaci.
- Vzorek s hraniční hodnotou by se měl objevit nad negativními kontrolami.
- Vodní kontroly by se měly nacházet v levé dolní části.
 - Nesprávné umístění vodní kontroly (vyšší pozice než NC pro měření FAM nebo vyšší než PC pro VIC) může znamenat kontaminaci.

Poznámka: Umístění kontrol se může u analýzy dat přístroje LightCycler 2.0 lišit (viz obrázek 33). Vodní kontroly by se však stále měly nacházet v levé dolní části.



Obrázek 33. Grafické znázornění typického příkladu testu rozlišení alel.
Přístroj: LightCycler 2.0.

Výpočet normalizovaného poměru FAM/VIC a genotypizace

Vypočtete poměry FAM/VIC pro všechny vzorky. Vypočtete poměry FAM/VIC pro pozitivní kontrolu (PC), vzorek s hraniční hodnotou (COS) a negativní kontrolu (NC). Tyto poměry musí být mezi duplikáty konzistentní. Vypočtete průměrný poměr všech duplikátů.

Vypočtete normalizovaný poměr (NRatio) pro vzorek s hraniční hodnotou (COS) a pro všechny vzorky:

$$\text{NRatio}_{\text{Sample}} = \frac{\text{Ratio}_{\text{Sample}}}{\text{Ratio}_{\text{NC}}}$$

Poznámka: Šedá zóna (GZ) testu je definována jako oblast hodnot, kde je rozlišovací schopnost nedostatečně přesná. Hodnota v šedé zóně naznačuje, že u cílového markeru nebylo možné vyhodnotit jeho přítomnost nebo nepřítomnost. Šedá zóna musí být vypočítána pro každý test.

Vypočtete šedou zónu nebo nejistou oblast v okolí normalizovaného poměru COS (NRatio_{cos}):

$$\text{Šedá zóna: } [(\text{NRatio}_{\text{cos}} \times 0,94); (\text{NRatio}_{\text{cos}} \times 1,06)]$$

Porovnejte normalizovaný poměr každého vzorku s poměrem $NRatio_{COS}$ GZ. Interpretace výsledků je nastíněna v tabulce 14 a příklad výpočtu údajů a interpretace je uvedena v tabulce 15.

Tabulka 14. Interpretace výsledků genotypizace pomocí normalizovaných poměrů

Výsledky	Interpretace
$NRatio_{Sample} > NRatio_{COS} \times 1,06$	JAK2 V617F je detekována
$NRatio_{Sample} < NRatio_{COS} \times 0,94$	JAK2 V617F není detekována
$NRatio_{Sample}$ v rámci $NRatio_{COS}$ GZ	Výsledek není průkazný

Tabulka 15. Příklad výpočtu údajů fluorescence a interpretace

Vzorek	VIC	FAM	Poměr	Průměrný poměr	Normalizovaný poměr	Interpretace
NC	2415	1782	0738	0747	1000	Mutace nebyla detekována
NC	2,46	1861	0757			
PC	1241	5606	4517	4672	6253	Mutace detekována
PC	1182	5706	4827			
COS	1,91	1832	0959	0958	1282	Vzorek z hraniční hodnotou
COS	2035	1946	0956			
S 1	2311	1783	0772	0742	0992	Mutace nebyla detekována
S 1	2555	1818	0712			
S 2	1097	5745	5237	4276	5723	Mutace detekována
S 2	1437	4764	3315			
S 3	2265	2149	0949	0927	1241	Výsledek není průkazný
S 3	2435	2206	0906			
S 4	2385	2063	0865	0904	1210	Výsledek není průkazný
S 4	2322	2191	0944			
GZ	1205	1359				

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologií přípravy vzorků či zpracování analýz (kontaktní informace viz „Kontaktní údaje“, na straně 59).

Komentáře a návrhy

Negativní signál pozitivní kontroly

- | | |
|--|---|
| a) Chyba pipetování | Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Zopakujte cyklus PCR. |
| b) Nevhodné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>ipsogen JAK2 MutaScreen</i> skladujte při teplotě -30 až -15 °C a chraňte směs primerů a sond (PPM) před světlem. Viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“ na straně 11.
Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.
Rozdělte činidla do alikvotních podílů pro skladování. |

Negativní kontroly jsou pozitivní

- | | |
|---------------------|--|
| Křížová kontaminace | Vyměňte všechna nezbytná činidla.
Zopakujte test pomocí nových alikvotních podílů všech činidel.
Se vzorky, součástmi soupravy a spotřebním materiálem vždy zacházejte v souladu s běžně přijímanou praxí k zabránění kontaminace. |
|---------------------|--|

Komentáře a návrhy

Žádné signály, ani v pozitivních kontrolách

- | | |
|---|---|
| a) Chyba pipetování nebo vynechaná činidla | Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Zopakujte cyklus PCR. |
| b) Inhibitorní účinky materiálu vzorku, způsobené nedostatečnou purifikací. | Zopakujte přípravu DNA. |
| c) LightCycler: Nesprávně vybraný detekční kanál. | Nastavte parametr kanálu na F1/F2 nebo 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Není naprogramováno pořízení dat. | Zkontrolujte programy cyklů.
U režimu pořizování dat zvolte „single“ (jednotlivě) na konci každého hybridizačního segmentu PCR programu. |

Nepřítomný nebo slabý signál u vzorků, avšak pozitivní kontroly jsou v pořádku.

- | | |
|--|---|
| Špatná kvalita DNA nebo nízká koncentrace. | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu DNA a koncentraci. |
|--|---|

LightCycler: Příliš nízká intenzita fluorescence.

- | | |
|---|---|
| a) Nevhodné skladování součástí soupravy | Soupravu <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen skladujte při teplotě -30 až -15 °C a chraňte směs primerů a sond (PPM) před světlem. Viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“ na straně 11.
Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.
Rozdělte činidla do alikvotních podílů pro skladování. |
| b) Velmi nízké prvotní množství cílové DNA. | Zvyšte množství DNA ve vzorku.
Poznámka: V závislosti na vybrané metodě přípravy DNA se mohou objevit inhibiční účinky. |

Komentáře a návrhy

LightCycler: Rozdíly v intenzitě fluorescence.

- | | |
|--|---|
| a) Chyba pipetování | Variabilita způsobená takzvanou chybou pipetování může být omezena analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm. |
| b) Nedostatečná centrifugace kapilár. | Připravená směs PCR může být stále v horní části nádoby kapiláry nebo může být ve špičce kapiláry zachycena vzduchová bublina.

Vždy proveďte odstředění kapilár naplněných reakční směsí dle popisu v provozní příručce k danému zařízení. |
| c) Znečištění vnějšího povrchu kapiláry. | Při manipulaci s nimi noste vždy na ruku rukavice. |

Kontrola kvality

V souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobků společnosti QIAGEN je každá výrobní šarže souprav *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu. Certifikáty analýzy jsou k dispozici na požádání na stránkách www.qiagen.com/support/.

Omezení

Uživatelé musí být před zahájením práce s tímto přístrojem proškoleni a dobře obeznámeni s touto technologií. Tato souprava musí být použita dle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovaným přístrojem uvedeným v části „Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy“ na stránce 9.

Všechny získané diagnostické výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými nebo laboratorními nálezy. Každý uživatel je zodpovědný za platnost funkčnosti systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčnosti výrobků QIAGEN.

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti po datu expirace.

Charakteristiky funkčních vlastností analýz

Laboratorní studie

Byly provedeny laboratorní studie za účelem stanovení analytické výkonnosti soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen.

Přesnost

Tři úrovně ředění genomové DNA z buněčných linií obsahujících mutaci JAK2 V617F v DNA divokého typu byly testovány pomocí soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen. Tato ředění odpovídala hladině mutace 1 %, 2 % a 3 %. Pro každou úroveň byly získány nezávislé dávky ředění a replikáty těchto ředění byly testovány ve 3 nezávislých testovacích cyklech. Získané poměry pro každý vzorek DNA ($\text{Ratio}_{\text{Sample}}$) byly porovnány s poměrem negativní kontroly (JAK2 100% DNA divokého typu, Ratio_{NC}). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 16.

Tabulka 16. Přesnost údajů pro laboratorní studie

Úroveň mutace	$\text{Ratio}_{\text{Sample}} > \text{Ratio}_{\text{NC}}$	%CV (poměr)
1 % V617F DNA	100 % (n = 183)	6,8
2% V617F DNA	100 % (n = 72)	4,5
3% V617F DNA	100 % (n = 135)	5,1

Mezilaboratorní analytické údaje

Byla provedena multicentrická studie zahrnující 13 laboratoří. Byly shromážděny analytické údaje o ředěních genomové DNA s obsahem mutace JAK2 V617F u DNA divokého typu. V každé laboratoři byly provedeny tři testovací cykly. U každého cyklu byly testovány následující vzorky DNA z buněčných linií:

- 1 negativní kontrola (NC) 0 % V617F
- 1 pozitivní kontrola (PC) 100 % V617F
- 1 vzorek s hraniční hodnotou testu (COS) 2 % V617F
- 3 vzorky s obsahem středně velké hladiny mutace (20 %, 50 % a 80 %)

Testovací cykly byly provedeny na 7 různých modelech přístrojů:

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

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 17.

Tabulka 17. Mezilaboratorní analytické údaje získané z ředění genomové DNA z buněčných linií obsahujících mutaci JAK2 V617F v DNA divokého typu

Detekce vzorku	Pozitivní vzorky	Negativní vzorky
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 divokého typu	0	36

* Pozitivní vzorky zahrnovaly 36 pozitivních kontrol (PC-VF), 36 vzorků s hraniční hodnotou (COS-VF; 2 % V617F), 34 vzorků s obsahem 20 % JAK2 V617F, 35 vzorků s obsahem 50 % JAK2 V617F a 36 vzorků s obsahem 80 % JAK2 V617F.

Klinické studie

Srovnání mezi metodami *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit a ARMS®

Vzorky DNA od 141 pacientů s podezřením na MPN byly paralelně testovány pomocí soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen a testu qPCR založeným na metodě ARMS (amplification refractory mutation system) (11). Výsledky tohoto porovnání jsou uvedeny v tabulce 18 (2 x 3 kontingenční tabulka) a tabulce 19 (procentní shoda).

Tabulka 18. Srovnání mezi metodami: Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen a ARMS

		Výsledky testovací metody ARMS		
		JAK2 V617F > 2 %	JAK2 divokého typu (JAK2 V617F < 2 %)	Celkem
Výsledky testovací metody soupravy <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutace detekována	91	0	91
	Výsledek není průkazný	1	2	3
	JAK2 WT Mutace nebyla detekována	1	46	47
Celkem		93	48	n = 141

Tabulka 19. Srovnání mezi metodami: Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen a ARMS

	Shoda (%)	95% CI* (interval spolehlivosti) (%)
Pozitivní údaje		
Shoda mezi soupravou <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen a ARMS	98,9	94,1–99,8
Negativní údaje		
Shoda mezi soupravou <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen a ARMS	100	92,3-100
Celková shoda	99,3	96,0-99,9

* Intervaly spolehlivosti byly vypočítány dle CLSI EP12-A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Uživatelský protokol pro vyhodnocení účinnosti kvalitativního testu; schválené pokyny).

Srovnání mezi soupravou *ipsogen* JAK2 MutaScreen a sekvenací

Vzorky DNA od 51 pacientů s podezřením na MPN byly paralelně testovány pomocí soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen a referenční techniky („zlatého standardu“) přímé sekvenace. Jeden vzorek nebylo možné interpretovat v důsledku chyby sekvenace. Srovnání výsledků získaných z 50 interpretovatelných vzorků je uvedeno v tabulce 20 (2 x 3 kontingenční tabulka) a tabulce 21 (procentní shoda).

Tabulka 20. Srovnání mezi metodami: Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen a sekvenace

		Výsledky přímé sekvenace		
		JAK2 V617F > 2 %	JAK2 divokého typu (JAK2 V617F < 2 %)	Celkem
Výsledky testovací metody soupravy <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutace detekována	26	1	27
	Výsledek není průkazný	0	1	1
	JAK2 WT Mutace nebyla detekována	2	20	22
Celkem		28	22	n = 50

Tabulka 21. Srovnání mezi metodami: Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen a sekvenace

	Shoda (%)	95% CI* (interval spolehlivosti) (%)
Pozitivní údaje		
Shoda mezi soupravou <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen a sekvenací	92,9	77,4-98,0
Negativní údaje		
Shoda mezi soupravou <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen a sekvenací	95,2	77,3-99,2
Celková shoda	93,9	83,5-97,9

* Intervaly spolehlivosti byly vypočítány dle CLSI EP12-A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline".

Multicentrická studie vzorků od 228 pacientů

Vzorky DNA od pacientů byly analyzovány pomocí domácí techniky přípravy (home brew) ve 13 laboratořích, které se účastnily mezilaboratorní studie. V každé laboratoři byly provedeny 3 testovací cykly s použitím DNA z buněčných linií dle popisu pro laboratorní přesnost údajů (viz nahoře), a DNA od 10 pacientů, které byly k dispozici v laboratoři.

228 vzorků se známým genotypem JAK2 bylo paralelně testováno pomocí soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen a metodami domácí přípravy (home brew), včetně kvalitativní PCR, PCR pro specifické alely, rezonančního přenosu fluorescenční energie (FRET), sekvenace, oligonukleotidové PCR pro specifické alely, RFLP a rozlišovacího testu alel. Výsledky těchto srovnání jsou uvedeny v tabulce 22 (2 x 3 kontingenční tabulka) a tabulce 23 (procentní shoda).

Tabulka 22. Srovnání mezi metodami: Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen a „home brew“ metody

		Výsledky testů „home brew“		
		Mutace detekována JAK2 V617F	Mutace nebyla detekována JAK2 divokého typu	Celkem
Výsledky testovací metody soupravy <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutace detekována	139	3	142
	Výsledek není průkazný	5	17	22
	JAK2 WT Mutace nebyla detekována	3	61	64
Celkem		147	81	n = 228

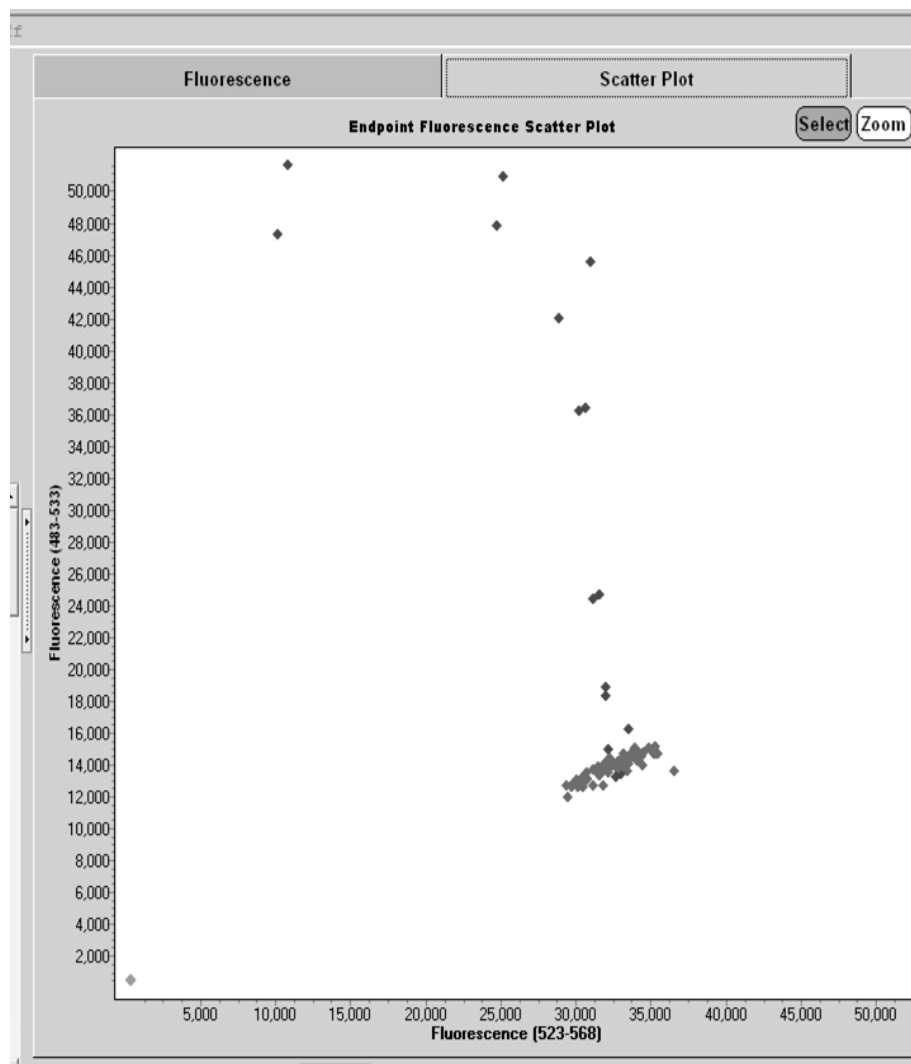
Tabulka 23. Srovnání mezi metodami: Souprava *ipsogen* JAK2 MutaScreen a „home brew“ metody

	Shoda (%)	95% CI* (interval spolehlivosti) (%)
Pozitivní údaje		
Shoda mezi soupravou <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen a metodou „home brew“	97,9	94,0-99,3
Negativní údaje		
Shoda mezi soupravou <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen a metodou „home brew“	95,3	87,1-98,4
Celková shoda	97,1	93,8-98,7

* Interval spolehlivosti byly vypočítány dle CLSI EP12-A “User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” (Uživatelský protokol pro vyhodnocení účinnosti kvalitativního testu; schválené pokyny).

Správnost: testování vzorků od zdravých dárců

Vzorky DNA od 103 zdravých dárců krve byly analyzovány pomocí soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS. Všechny vzorky byly detekovány jako JAK2 divokého typu. Analýza 38 vzorků pomocí přístroje LightCycler 480 je znázorněna na obrázku 34.



Obrázek 34. Analýza zdravých dárců. Analýza 38 vzorků od zdravých dárců na přístroji LightCycler 480 (◆) pomocí soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS (kat. č. 673123). Pozitivní výsledky duplicitních testů (◆) odpovídají referenční stupnici dodané se soupravou. Hodnoty fluorescence VIC jsou znázorněny na ose x a hodnoty FAM jsou znázorněny na ose y.

Literatura

1. Ma, W. et al. (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diagn.* 11, 49.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144.
3. Levine, R.L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779.
5. Baxter, E.J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 36, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 290, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 113, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 29, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 108, 1865.

Symbols

Na obalu nebo štítcích se mohou objevit následující symboly:



Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí.



Datum použitelnosti



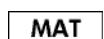
Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití

Kontaktní údaje

Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách www.qiagen.com/Support, nebo se obraťte telefonicky na telefonní číslo 00800-22-44-6000, nebo kontaktujte některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN Technical Service Departments nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky www.qiagen.com).

Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (10)	Pro 10 reakcí: pozitivní kontrola V617F, negativní kontrola V617F, vzorek s hraniční hodnotou V617F, směs primerů a sond JAK2 divokého typu a JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (24)	Pro 24 reakcí: pozitivní kontrola V617F, negativní kontrola V617F, vzorek s hraniční hodnotou V617F, směs primerů a sond JAK2 divokého typu a JAK2 V617F	673023
Rotor-Gene Q MDx — pro IVD-validovanou PCR analýzu v reálném čase v klinickém použití		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení.	9002033

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušná příručka soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Manuály souprav QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tento výrobek je určen pro diagnostiku in vitro. Výrobky *ipsogen* nesmí být dále prodávány, upravovány pro další prodej ani použity pro výrobu komerčních výrobků bez písemného schválení společnosti QIAGEN.

Informace v tomto dokumentu se mohou měnit bez předchozího upozornění. Společnost QIAGEN nepřebírá odpovědnost za jakékoliv chyby, které se mohou vyskytnout v tomto dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době publikace. Společnost QIAGEN nenesou za žádných okolností odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo následné škody v souvislosti nebo vyplývající z použití tohoto dokumentu.

Na výrobky *ipsogen* se vztahuje záruka, že splňují uváděné specifikace. Výhradní uvážení společnosti QIAGEN a náhrada zákazníkovi je omezeno na bezplatnou výměnu výrobku v případě, že výrobek nesplní vlastnosti dle záruky.

Tento výrobek je prodáván dle licenčního ujednání se společností Epoch Biosciences, a to pouze pro účely diagnostiky in vitro, a nesmí být použit pro žádný jiný výzkum, komerční ani klinický výzkum nebo jiné účely mimo diagnostiky in vitro.

Mutace JAK2 V617F a její použití je chráněno patentovými právy, včetně Evropského patentu EP1692281, patentů USA 7,429,456 a 7,781,199, podaných patentových žádostí USA US20090162849 a US20120066776, a zahraničních protějšků.

Nákup tohoto výrobku nezaručuje žádná práva na jeho použití v klinických zkouškách pro léky zacílené na JAK2 V617F. Společnost QIAGEN vytváří pro tyto účely specifické licenční programy. Kontaktujte prosím naše právní oddělení na e-mailové adrese jak2licenses@qiagen.com.

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

Ujednání o omezené licenci

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel soupravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Soupravu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit lze používat pouze v souladu s pokyny uvedenými v příručce *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit Handbook a pouze se součástmi, které souprava obsahuje. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění složek, které jsou součástí této soupravy, společně s kterýmikoli složkami, které nejsou součástí této soupravy, s výjimkou případů popsanych v příručce *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit Handbook a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovně nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

HB-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

