

August 2016

ipsogen[®] JAK2 MutaQuant[®] Kit Handbuch



12 (Katalog-Nr. 673522)



24 (Katalog-Nr. 673523)

Version 1

IVD

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zum Gebrauch mit dem Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT
SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System oder
LightCycler[®] Thermocyclern



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R3

MAT

1072501DE



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglichen. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

QIAGEN setzt Standards in:

- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen,
- Nukleinsäure- und Protein-Assays,
- microRNA-Forschung und RNAi sowie
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien.

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website **www.qiagen.com**.

Inhaltsverzeichnis

Vorgesehener Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Hintergrundinformationen	4
Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung	7
Mit dem Kit gelieferte Materialien	10
Kit-Inhalt	10
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	11
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	12
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	12
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	13
Verfahren	15
DNA-Isolierung aus der Probe	15
Protokolle	
■ qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor	16
■ qPCR mit ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System oder LightCycler 480 Thermocycler	21
■ qPCR mit LightCycler 1.2 Thermocycler	27
Interpretation der Ergebnisse	31
Hilfe zur Fehlerbehebung	35
Qualitätskontrolle	39
Beschränkungen des Tests	39
Leistungscharakteristik	40
Untersuchung nichtklinischer Proben	40
Untersuchung klinischer Proben	41
Literatur	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Symbole	44
Kontaktinformationen	44
Bestellinformationen	45

Vorgesehener Verwendungszweck

Der *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit ist ein quantitativer In-vitro-Test, der für den Nachweis und die Quantifizierung des JAK2-V617F- bzw. -G1849T-Allels in genomischer DNA, die aus dem peripheren Blut von Personen mit Verdacht auf myeloproliferative Neoplasie (MPN) extrahiert wurde, vorgesehen ist.

Das Fehlen der JAK2-V617F- bzw. -G1849T-Mutation schließt das Vorhandensein anderer JAK2-Mutationen nicht aus. Der Test kann falsch-negative Ergebnisse anzeigen, falls zusätzliche Mutationen im Abschnitt zwischen den Nukleotiden 88504 und 88622 vorliegen (1).

Hinweis: Der Kit sollte gemäß den Anweisungen in diesem Handbuch und in Kombination mit validierten Reagenzien und Geräten verwendet werden. Bei nicht vorgesehenerem Gebrauch (sog. „Off-Label-Use“) dieses Produkts und/oder durch Modifikation seiner Komponenten erlischt jegliche Haftung QIAGENs.

Zusammenfassung und Hintergrundinformationen

Im Jahr 2005 wurde die rekurrente somatische Mutation V617F, die das Janus-Tyrosin-Kinase-2-(JAK2-)Gen betrifft, identifiziert (2–5). Diese Entdeckung stellte einen bedeutenden Durchbruch im Verständnis und für die Klassifizierung und Diagnose myeloproliferativer Neoplasien (MPNs) dar. JAK2 ist ein kritisches Molekül für intrazelluläre Signalwege für eine Reihe von Zytokinen, darunter auch Erythropoetin.

Die JAK2-Mutation V617F lässt sich bei > 95 % der Patienten mit Polycythaemia vera (PV), 50–60 % der Patienten mit essenzieller Thrombozythämie (ET) und bei 50 % der Patienten mit primärer Myelofibrose (PMF) nachweisen. JAK2-V617F wurde auch in einigen seltenen Fällen von chronischer myelomonozytärer Leukämie, myelodysplastischem Syndrom, systemischer Mastozytose und chronischer neutrophiler Leukämie detektiert, gar nicht (0 %) dagegen bei CML (6).

Die Mutation entspricht einer einzelnen Nukleotid-Veränderung, und zwar des JAK2-Nukleotids 1849 im Exon 14, wodurch es zu einer Substitution der Aminosäure Valin (V) durch Phenylalanin (F) in Position 617 des Proteins (in der JH2-Domäne) kommt. Sie führt zu einer konstitutiven JAK2-Aktivierung, einer hämatopoetischen Transformation in vitro und einem Erythropoetin-unabhängigen Wachstum endogener erythroider Kolonien (EECs) bei allen Patienten mit PV und einem hohen Prozentsatz der ET- und PMF-Patienten (7). JAK2-V617F ist einer der Hauptfaktoren, der die Transformation der hämatopoetischen Zellen bei MPN fördert. Allerdings müssen die zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen, die – bei Vorliegen derselben, einzigartigen Mutation – zu solch unterschiedlichen klinischen und biologischen Phänotypen führen, noch genauer erforscht werden.

Traditionell erfolgte die Diagnose der MPNs auf der Basis klinischer Befunde sowie aufgrund histologischer Knochenmarks- und zytogenetischer Kriterien.

Die Entdeckung eines krankheitsspezifischen molekularen Markers führte sowohl zu einer Vereinfachung des Verfahrens als auch zu erhöhter diagnostischer Genauigkeit. Der Nachweis der JAK2-Mutation V617F ist jetzt Bestandteil der Referenzkriterien der WHO des Jahres 2008 für die Diagnose einer BCR-ABL-negativen MPN (siehe Tab. 1), und das Vorhandensein dieser Mutation ist ein wesentliches Kriterium bei der Bestätigung der Diagnose.

Tabelle 1. WHO-Kriterien für die Diagnose einer MPN (nach Referenz 8)

Kriterien für die Diagnose einer Polycythaemia vera (PV)	
Hauptkriterien	<p>1. Hämoglobin (Hb) > 18,5 g·dl⁻¹ (Männer) bzw. > 16,5 g·dl⁻¹ (Frauen) oder Hb oder Hämatokrit (Hkt) > 99. Perzentil des Referenzbereichs bezogen auf Alter, Geschlecht oder Höhe des Wohnorts oder Hb > 17 g·dl⁻¹ (Männer) bzw. > 15 g·dl⁻¹ (Frauen), falls assoziiert mit anhaltender Erhöhung um ≥ 2 g·dl⁻¹ über Baseline, die nicht einer Eisenmangel-Korrektur zugeschrieben werden kann, oder Um > 25 % über dem mittleren normalen prognostischen Wert</p> <p><u>erhöhte Erythrozyten-Fraktion</u></p> <p><u>2. Vorhandensein von JAK2-V617F oder einer ähnlichen Mutation</u></p>
Nebenkriterien	<p>1. Knochenmark mit trilinearer Myeloproliferation</p> <p>2. Serum-Erythropoetin-Spiegel unterhalb des Normalbereichs</p> <p>3. Wachstum endogener erythroider Kolonien (EECs)</p>
Kriterien für die Diagnose einer essenziellen Thrombozythämie (ET)	
Hauptkriterien	<p>1. Thrombozytenzahl ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹</p> <p>2. Megakaryozyten-Proliferation mit großer und reifer Morphologie. Keine oder nur geringe Granulozyten- oder erythroide Proliferation</p> <p>3. Nichterfüllung der WHO-Kriterien für chronische myeloische Leukämie (CML), PV, primäre Myelofibrose (PMF), myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder eine andere myeloische Neoplasie</p> <p><u>4. Nachweis von JAK2-V617F oder anderer klonaler Marker</u> oder Kein Nachweis einer reaktiven Thrombozytose</p>
Nebenkriterien	–
Kriterien für die Diagnose einer primären Myelofibrose (PMF)	
Hauptkriterien	<p>1. Megakaryozyten-Proliferation und -Atypie, verbunden mit Retikulin- und/oder Kollagenfibrose, oder Bei Nichtvorhandensein einer Retikulinfibrose müssen die megakaryozytären Veränderungen mit Hyperzellularität des Knochenmarks, granulozytärer Proliferation und oftmals einer abgeschwächten Erythropoese verbunden sein (d. h. präfibrotische PMF)</p> <p>2. Nichterfüllung der WHO-Kriterien für (CML), PV, MDS oder eine andere myeloische Neoplasie</p> <p><u>3. Nachweis von JAK2-V617F oder anderer klonaler Marker</u> oder Kein Nachweis einer reaktiven Knochenmarkfibrose</p>
Nebenkriterien	<p>1. Leukoerythroblastose</p> <p>2. Erhöhte Serum-Lactatdehydrogenase-Aktivität (LDH)</p> <p>3. Anämie</p> <p>4. Tastbare Milzvergrößerung (Splénomegalie)</p>

Vor Kurzem hat ein internationales Expertengremium Kriterien für therapeutische Studien zu PV und ET vorgeschlagen. Auf der Grundlage von Daten zu Allotransplantationen, Alpha-Interferon bzw. Hydroxyharnstoff wurde die JAK2-V617F-Quantifizierung als ein potenziell hilfreiches Instrument zur Überwachung der Therapiereaktion mit aufgenommen (9). Als Reaktion auf einige neue auf JAK2 abzielende Arzneimittel, die sich in der klinischen Entwicklung befinden, wurde eine Abnahme der JAK2-V617F-Last beobachtet (10).

Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung

Verschiedene Methoden wurden vorgeschlagen, um den Anteil der Einzel-nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in DNA-Proben quantitativ zu bestimmen. Methoden, die auf der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) basieren, sind aufgrund ihrer höheren Sensitivität zu bevorzugen, da sie die Überwachung der Allel-Last im zeitlichen Verlauf ermöglichen. Viele dieser Methoden haben eine moderate Sensitivität von 1–10 %, zum Beispiel die TaqMan® Alleldiskriminierung, Pyrosequencing® Technologie, Schmelzkurvenanalyse und die direkte Sequenzierung. Einige Methoden, wie die Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung, sind lediglich semiquantitativer Natur, während andere Technologien wie die Pyrosequenzierung eine weitere Prozessierung nach der PCR oder Geräte erfordern, die nicht ohne Weiteres zur Verfügung stehen oder bei denen Set-up-Kosten anfallen, die für Labortests im Routinebetrieb untragbar hoch sind. Ein hoch empfindlicher Ansatz mit einer Sensitivität von < 0,1 % erfordert die Verwendung eines SNP-spezifischen Primers, der die selektive Amplifikation des Mutanten- oder Wildtyp-Allels ermöglicht und leicht mithilfe eines Real-Time-qPCR-Thermocyclers nachweisbar ist. Der *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit basiert auf dieser Methode.

Die Anwendung der qPCR ermöglicht die genaue Quantifizierung von PCR-Produkten während der exponentiellen Phase des PCR-Amplifikationsprozesses. Durch die Erfassung der Fluoreszenzsignale in Echtzeit während und/oder im Anschluss an die PCR-Zyklen liegen schnell quantitative PCR-Daten vor, ohne dass eine Weiterverarbeitung nach der PCR notwendig ist, sodass das Risiko einer Kontamination des PCR-Produkts drastisch reduziert ist. Gegenwärtig sind drei Hauptvarianten der qPCR-Methode verfügbar: qPCR-Analyse mit dem Farbstoff SYBR® Green I, qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden und qPCR-Analyse mit Hybridisierungssonden.

Dieser qPCR-Assay nutzt das Prinzip der Oligonukleotid-Hydrolyse mit zwei Farbstoffen. Während der PCR hybridisieren Vorwärts- und Rückwärts-Primer an eine spezifische Sequenz. Ein Zwei-Farbstoff-Oligonukleotid ist in derselben Mischung vorhanden. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, das mit einem 5'-Reporter-Farbstoff und einem 3'-Quencher-Farbstoff markiert ist; sie hybridisiert an eine Zielsequenz (auch Target-Sequenz genannt) im PCR-Produkt. Die qPCR-Analyse mit Hydrolysesonden nutzt die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Solange die Sonde

intakt ist, führt die Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher-Farbstoff zu einer Unterdrückung der Reporter-Fluoreszenz, primär durch Förster-Resonanzenergietransfer.

Ist die Target-Sequenz vorhanden, lagert sich die Sonde während der PCR spezifisch zwischen der Vorwärts- und Rückwärts-Primerstelle an. Durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde zwischen Reporter und Quencher nur dann gespalten, wenn die Sonde an das Target hybridisiert ist. Die Sondenfragmente lösen sich dann durch Verdrängung von der Target-Sequenz ab und die Polymerisation des Strangs geht weiter. Das 3'-Ende der Sonde ist blockiert, um eine Extension der Sonde während der PCR zu verhindern (siehe Abb. 1). Diese Reaktionsfolge findet bei jedem Zyklus statt und stört die exponentielle Akkumulation des Produkts nicht.

Der Anstieg des Fluoreszenzsignals wird nur detektiert, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und daher während der PCR verstärkt wird. Aufgrund dieser Anforderungen wird eine unspezifische Amplifikation nicht detektiert. Folglich ist die Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zur Amplifikation der Target-Sequenz im Verlauf der PCR.

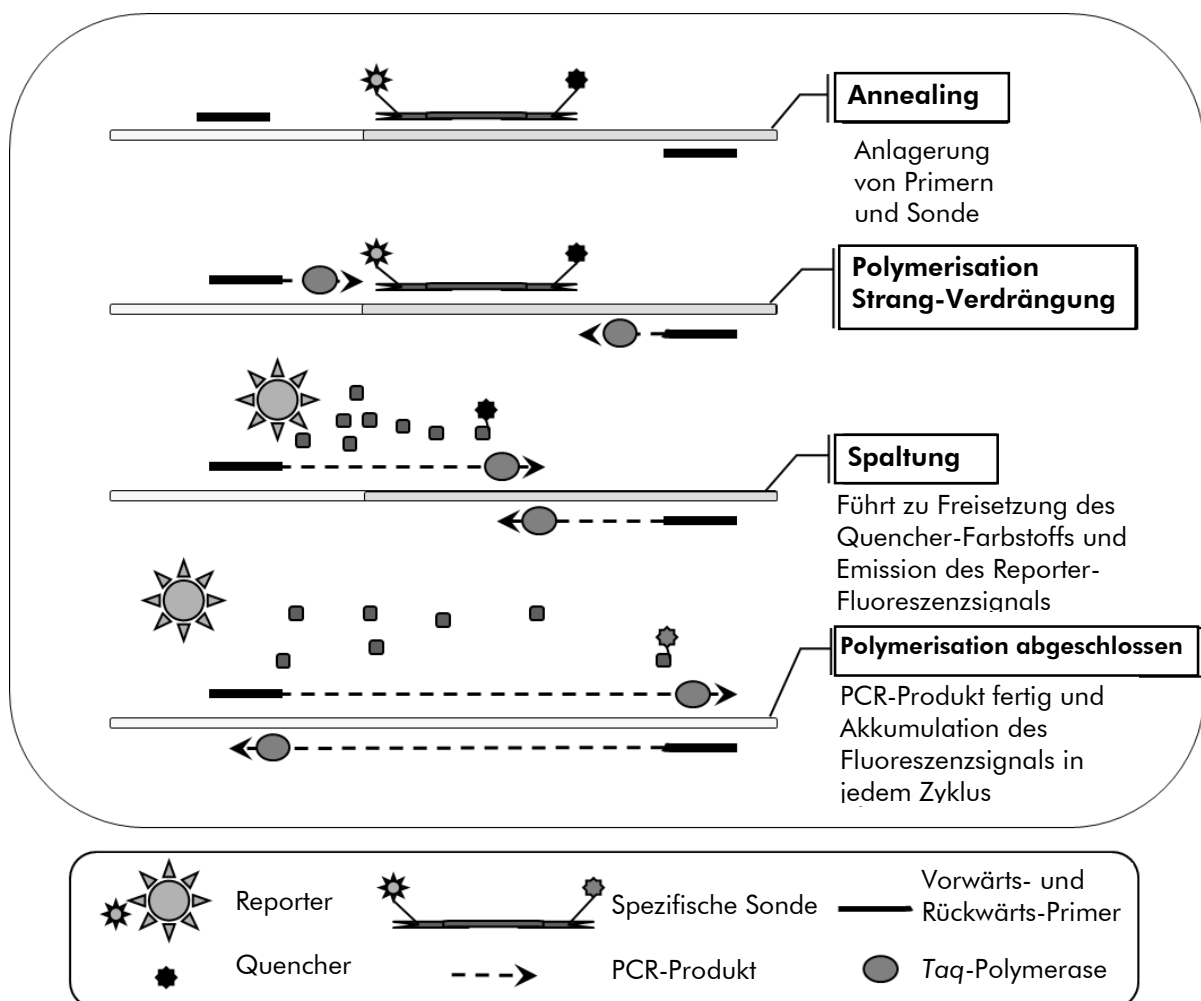


Abbildung 1. Reaktionsprinzip.

Bei diesem Assay-Kit kommt die quantitative allelspezifische PCR-Technologie zum Einsatz, die einen empfindlichen, genauen und hoch reproduzierbaren Nachweis der SNPs ermöglicht. Diese Methode beruht auf der Verwendung spezifischer Vorwärts-Primer für das Wildtyp- und das V617F-Allel (11). Nur bei einer perfekten Übereinstimmung zwischen Primer und Target-DNA kommt es zur Extension und Amplifikation in der PCR (Abb. 2).

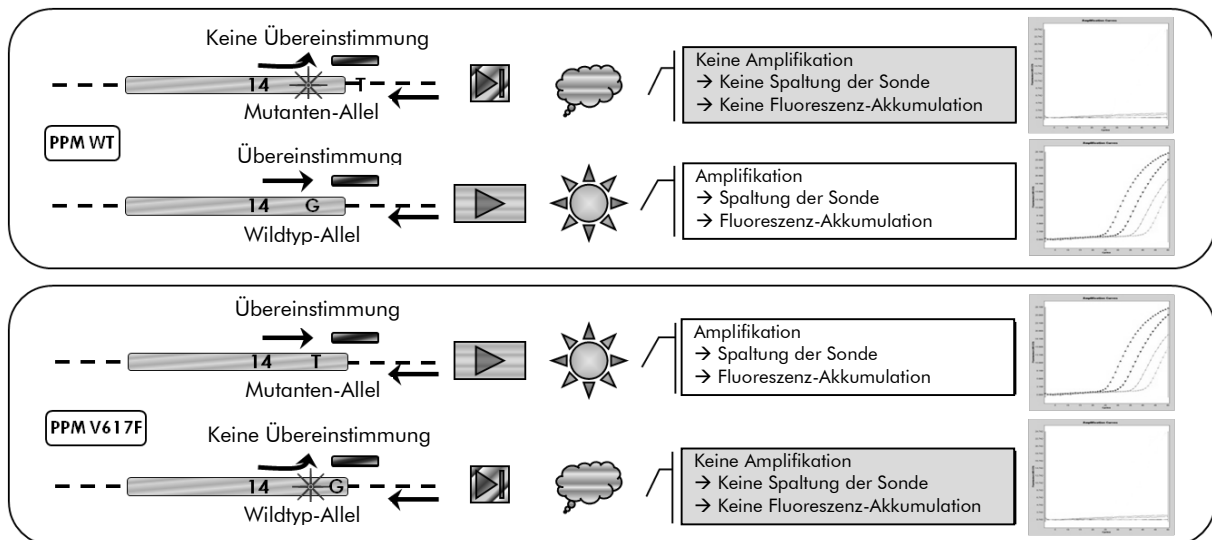


Abbildung 2. Allelspezifische PCR. Durch Verwendung von Wildtyp- oder V617F-Primer und -Sonden-Mix wird die spezifische Detektion des Wildtyp- bzw. mutierten Allels in zwei separaten Reaktionen, die mit derselben Probe durchgeführt werden, ermöglicht. Die Ergebnisse können als Prozentsatz der Kopien der VF-Mutation an der Gesamtmenge der JAK2-Kopien angegeben werden.

Mit dem Kit gelieferte Materialien

Kit-Inhalt

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalog-Nr.		673522	673523
Anzahl Reaktionen		12	24
V617F positive control (100% V617F allele) (V617F- Positivkontrolle [100 % V617F-Allel])	PC-VF JAK2 PC-VF JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (100% wild-type allele) (V617F- Negativkontrolle [100 % Wildtyp-Allel])	NC-VF JAK2 NC-VF JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (5 x 10 ¹ V617F copies/5 µl) (M1-VF- Standard-Verdünnung, 50 Kopien [5 x 10 ¹ V617F-Kopien/5 µl])	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (5 x 10 ² V617F copies/5 µl) (M2-VF-Standard-Verd., 500 Kopien [5 x 10 ² V617F-Kopien/5 µl])	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (5 x 10 ³ V617F copies/5 µl) (M3-VF-Standard-Verd., 5000 Kopien [5 x 10 ³ V617F-Kopien/5 µl])	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (5 x 10 ⁴ V617F copies/5 µl) (M4-VF-Standard-Verd., 50.000 Kopien [5 x 10 ⁴ V617F-Kopien/5 µl])	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (5 x 10 ¹ wild-type copies/5 µl) (WT-1- Standard-Verdünnung, 50 Kopien [5 x 10 ¹ Wildtyp-Kopien/5 µl])	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (5 x 10 ² wild-type copies/5 µl) (WT- 2-Standard-Verd., 500 Kopien [5 x 10 ² Wildtyp-Kopien/5 µl])	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalog-Nr.		673522	673523
Anzahl Reaktionen		12	24
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (5 x 10 ³ wild-type copies/5 µl) (WT-3-Standard-Verd., 5000 Kopien [5 x 10 ³ Wildtyp-Kopien/5 µl])	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (5 x 10 ⁴ wild-type copies/5 µl) (WT-4-Standard-Verd., 50.000 Kopien [5 x 10 ⁴ Wildtyp-Kopien/5 µl])	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Primer- und Sonden-Mix JAK2-WT)	PPM-JAK2 WT, 25x PPM-JAK2 WT Mini, 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (Primer- und Sonden-Mix JAK2-V617F)	PPM-JAK2 V617F, 25x PPM-JAK2 V617F Mini, 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (in Englisch)		1	1

* Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für das JAK2-Gen als Wildtyp-Kontrolle plus einer spezifischen FAM™-TAMRA™-Sonde.

† Mischung spezifischer Rückwärts- und Vorwärts-Primer für die JAK2-V617F-Mutation plus einer spezifischen FAM-TAMRA-Sonde.

Hinweis: Schütteln (auf einem Vortex) und zentrifugieren Sie die Standard-Verdünnungen, Primer- und Sonden-Mischungen jeweils kurz, bevor Sie sie verwenden.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern (*Material Safety Data Sheets, MSDS*) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reagenzien

- Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)
- Puffer und Taq-DNA-Polymerase: Als validierte Reagenzien werden der TaqMan Universal PCR Master Mix (2x-PCR-Master-Mix; von Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 4304437) und der LightCycler TaqMan Master (5x-PCR-

Master-Mix; von Roche, Kat.-Nr. 04535286001) oder LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (5x-Master-Mix; von Roche, Kat.-Nr. 03515567001) verwendet.

Verbrauchsartikel

- Nukleasefreie, sterile PCR-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern
- Nukleasefreie 0,5-ml- oder 1,5-ml-PCR-Reaktionsgefäße
- Eis

Geräte

- Für PCR reservierte Mikroliter-Pipetten* (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 0,5-ml-/1,5-ml-Reaktionsgefäße und Mikrottestplatten (erforderliche Drehzahl: 13.000–14.000 UpM)
- Real-Time-PCR-Thermocycler:* Rotor-Gene Q 5plex HRM[®] oder anderer Rotor-Gene Thermocycler; LightCycler 1.2 oder 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; sowie gerätespezifisches Zubehörmaterial
- Fotometer

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern entnehmen (*Safety Data Sheets*, SDS). In unserer Online-Sammlung der Material-sicherheits-Datenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige MSDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Entsorgen Sie beim Assay anfallende Proben- und sonstige Abfälle gemäß den regionalen Umwelt- und Sicherheitsbestimmungen.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Die Anwendung quantitativer PCR-Tests setzt die Einhaltung der guten Laborpraxis voraus, einschließlich der Wartung der für molekularbiologische Zwecke vorgesehenen Geräte gemäß den anzuwendenden Vorschriften und relevanten Normen.

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft und kalibriert werden.

Dieser Kit ist für in-vitro-diagnostische Anwendungen vorgesehen. Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien und mitgelieferten Anweisungen wurden für optimale Leistung validiert. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien oder die Änderung von Inkubationszeiten oder -temperaturen könnte zu fehlerhaften oder widersprüchlichen Daten führen. Die PPM-WT- und PPM-VF-Reagenzien könnten unter Lichteinfluss chemischen Veränderungen unterliegen. Die Formulierung aller Reagenzien ist spezifisch auf den Gebrauch mit diesem Test abgestimmt. Um die optimale Leistungsfähigkeit des Tests zu erhalten, dürfen keine Reagenzien ausgetauscht werden.

Gehen Sie äußerst sorgfältig vor, um Folgendes zu vermeiden:

- DNase-Kontamination, die einen Abbau der Template-DNA verursachen könnte
- DNA- oder PCR-Produkt-Kontaminationen durch Verschleppung, die zu einem falsch-positiven Signal führen könnten

Wir empfehlen daher, folgende Maßnahmen einzuhalten.

- Verwenden Sie nukleasefreie Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) und tragen Sie bei der Durchführung des Assays immer Einmal-Handschuhe.
- Benutzen Sie bei allen Pipettierschritten neue Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere, um eine Kreuzkontamination der Proben und Reagenzien zu vermeiden.
- Setzen Sie den Master-Mix vor der PCR mit dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.) in einem speziell dafür vorgesehenen Laborbereich an, in den keine DNA-Matrizen (DNA, Plasmid oder PCR-Produkte) hineingetragen werden. Pipettieren Sie die Template-DNA in einem separaten Laborbereich (vorzugsweise in einem anderen Laborraum) mit speziell dafür reservierten Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen etc.).

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Kits werden auf Trockeneis verschickt und müssen nach Eingang bei -15 °C bis -30 °C gelagert werden.

- Sorgen Sie dafür, dass die Primer- und Sonden-Mischungen (PPM-WT- und PPM-VF-Röhrchen) nicht (bzw. möglichst wenig) dem Licht ausgesetzt werden.
- Schütteln Sie die Röhrchen vorsichtig und zentrifugieren Sie sie kurz vor dem Öffnen.
- Lagern Sie alle Kit-Komponenten in ihren Originalgefäßen/-behältern.

Diese Lagerungsbedingungen gelten sowohl für geöffnete als auch ungeöffnete Komponenten. Komponenten, die nicht unter den auf den Etiketten angege-

benen Bedingungen gelagert wurden, könnten in ihrer Funktion beeinträchtigt sein, was sich ungünstig auf die Assay-Ergebnisse auswirken könnte.

Das Haltbarkeitsdatum eines Reagenzes ist jeweils auf dem Etikett der einzelnen Komponente angegeben. Bei Aufbewahrung unter korrekten Lagerungsbedingungen behält das Produkt seine Leistungsfähigkeit bis zu dem Haltbarkeitsdatum, das auf dem Etikett angegeben ist.

Es liegen keine Anhaltspunkte vor, die auf eine Instabilität dieses Produkts hindeuten. Dennoch sollten beim Testen unbekannter Proben immer Positiv- und Negativkontrollen simultan mitgeführt werden.

Verfahren

DNA-Isolierung aus der Probe

Die genomische DNA sollte entweder aus Vollblut, gereinigten Lymphozyten aus peripherem Blut, polynukleären Zellen oder Granulozyten isoliert werden. Um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wird empfohlen, dass dieselbe Zellfraktion und dieselbe DNA-Extraktionsmethode verwendet werden. Die DNA-Extraktion kann nach einer laboreigenen Methode oder mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits erfolgen.

Die DNA-Menge sollte durch Messung der optischen Dichte (OD) der Probe bei 260 nm bestimmt werden. Die Kontrolle der DNA-Qualität kann entweder durch Spektrofotometrie oder Gelelektrophorese* vorgenommen werden.

- Das OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis sollte 1,7–1,9 betragen; geringere Werte könnten auf eine Kontamination mit Protein oder auf organische Chemikalien hindeuten.
- Bei der elektrophoretischen Analyse in einem 0,8–1,0%igen Agarosegel* sollte sich die isolierte DNA als einzelne klare Bande bei ungefähr 20 kb anfärben lassen (auch ein leichter Schmier ergibt akzeptable Ergebnisse).

Die erhaltene DNA muss auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l in 1x-TE-Puffer* bei pH 8,0 verdünnt werden. Sie kann anschließend bei +4 °C bis +8 °C für maximal eine Woche oder, falls eine längerfristige Lagerung notwendig ist, bei –20 °C gelagert werden.

Die qPCR-Reaktion ist für DNA-Proben, die 25 ng gereinigte genomische DNA enthalten, optimiert.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern (*Material Safety Data Sheets, MSDS*) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Protokoll: qPCR mit Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit 72er-Rotor

Bei Verwendung dieses Thermocyclers empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 2 angegeben, durchzuführen.

Tabelle 2. Anzahl an Reaktionen für Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Proben	Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-VF)	
4 M-VF-Standards	8 Reaktionen, jede als Doppelbestimmung getestet
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
2 DNA-Kontrollen	4 Reaktionen: Positivkontrolle (PC-VF) und Negativkontrolle (NC-VF), jede als Doppelbestimmung getestet
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
Mit JAK2-Wildtyp-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-WT)	
4 Wildtyp-Standards	8 Reaktionen, jede als Doppelbestimmung getestet
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
2 DNA-Kontrollen	4 Reaktionen: PC-VF und NC-VF, jede als Doppelbestimmung getestet
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

Probenverarbeitung bei Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Wir empfehlen, mindestens DNA-Proben mit dem 24-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673523) bzw. mindestens 6 DNA-Proben mit dem 12-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673522) im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen.

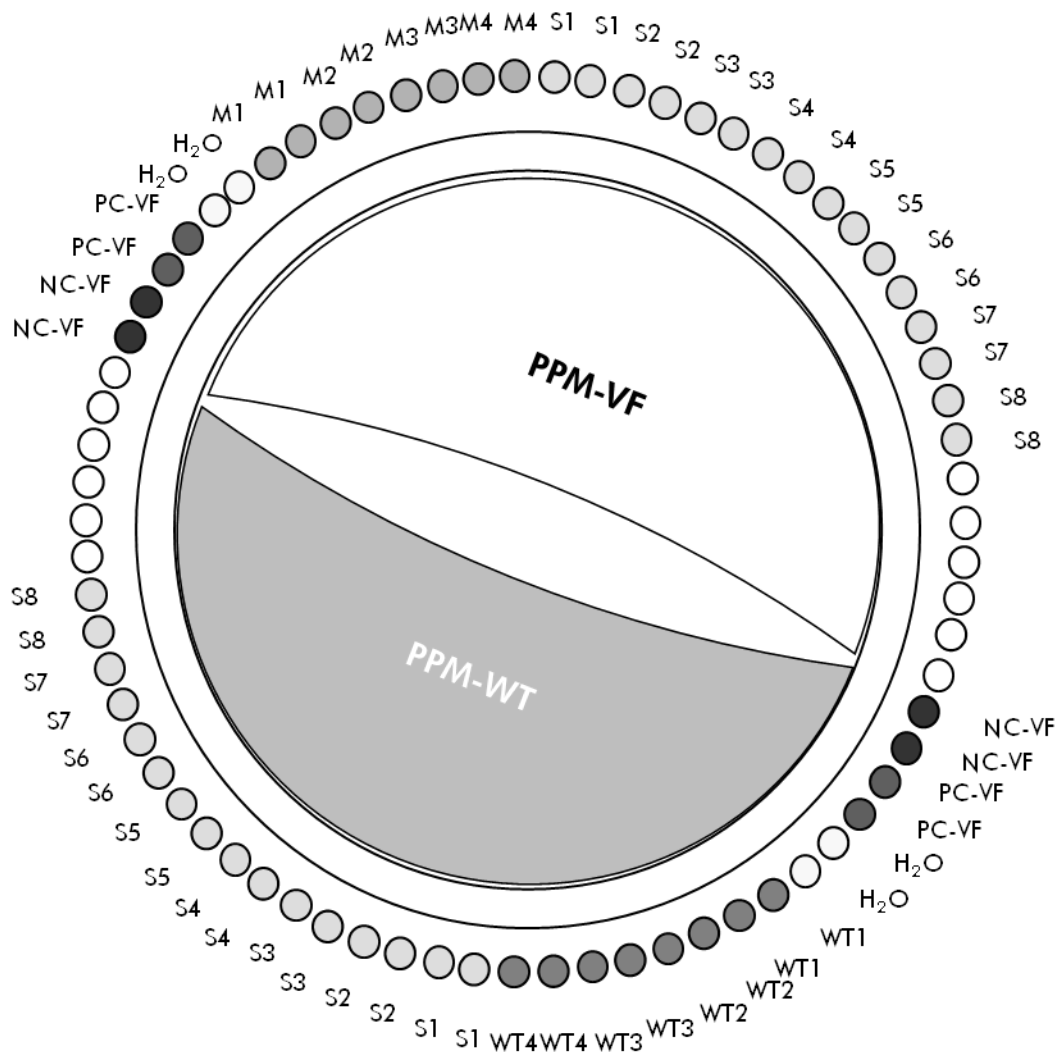


Abbildung 3. Vorgeschlagenes Rotor-Set-up für jedes Experiment mit dem ipsogen JAK2 MutaQuant Kit für 24 Proben. PC-VF: V617F-Positivkontrolle; **NC-VF:** V617F-Negativkontrolle; **M-VF:** V617F-Standards; **M-WT:** Wildtyp-Standards; **S:** DNA-Probe; **H₂O:** Wasser-Kontrolle.

Hinweis: Achten Sie darauf, immer eine zu testende Probe in Position 1 des Rotors zu platzieren. Andernfalls wird der Thermocycler während des Kalibrierungsschritts keine Kalibrierung durchführen und es werden falsche Fluoreszenzsignaldaten erfasst.

Setzen Sie in alle übrigen Positionen ein leeres Reaktionsgefäß ein.

qPCR mit Rotor-Gene Q Thermocycler mit 72er-Rotor

Hinweis: Führen Sie alle Schritte auf Eis durch.

Durchführung

1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.
2. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabellen 3 und 4 dienen als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 μ l berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPM-VF oder PPM-WT) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 3. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	V617F-Pre-Mix 30 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR-Master-Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primer- und Sonden-Mix (PPM-VF), 25x	1,0	31,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	201,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	–

Tabelle 4. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	WT-Pre-Mix 30 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR-Master-Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Primer- und Sonden-Mix (PPM-WT), 25x	1,0	31,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	201,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	–

- 3. Pipettieren Sie 20 μ l des qPCR-Pre-Mix (VF oder WT) pro Reaktionsgefäß.**
- 4. Geben Sie 5 μ l des zu quantifizierenden Materials (25 ng genomische DNA der Probe oder Kontrolle) in die entsprechenden Reaktionsgefäße (Gesamtvolumen 25 μ l).**
- 5. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.**
- 6. Setzen Sie die Reaktionsgefäße gemäß den Empfehlungen des Herstellers in den Thermocycler.**
- 7. Programmieren Sie den Rotor-Gene Q Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 5 angegeben.**

Tabelle 5. Temperaturprofil

Analysemodus	Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen ("Cycling")	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 62 °C für 1 Minute mit Erfassung der FAM- Fluoreszenz im Kanal Grün: Einzel ("Single")

- 8. Aktivieren Sie bei den Rotor-Gene Q Thermocyclern bei der Analyse die Funktion "Slope Correct" („Steigung korrigieren“). Wir empfehlen, den Schwellenwert ("Threshold") auf 0,03 einzustellen. Starten Sie das in Tabelle 5 angegebene zyklische Temperaturprogramm.**

Protokoll: qPCR mit ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System oder LightCycler 480 Thermocycler

Bei Verwendung eines dieser qPCR-Thermocycler für 96-Well-Platten empfehlen wir, alle Messungen als Doppelbestimmung, wie in Tabelle 6 angegeben, durchzuführen.

Tabelle 6. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines qPCR-Thermocyclers für 96-Well-Platten

Proben	Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-VF)	
4 M-VF-Standards	8 Reaktionen, jede als Doppelbestimmung getestet
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
2 DNA-Kontrollen	4 Reaktionen: PC-VF und NC-VF, jede als Doppelbestimmung getestet
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen
Mit JAK2-Wildtyp-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-WT)	
4 Wildtyp-Standards	8 Reaktionen, jede als Doppelbestimmung getestet
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
2 DNA-Kontrollen	4 Reaktionen: PC-VF und NC-VF, jede als Doppelbestimmung getestet
Wasser-Kontrolle	2 Reaktionen

Probenverarbeitung bei ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System oder LightCycler 480 Thermocycler

Wir empfehlen, 8 DNA-Proben mit dem 24-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673523) bzw. mindestens 6 DNA-Proben mit dem 12-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673522) im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen.

Das Platten-Schema in Abbildung 4 zeigt ein Beispiel eines solchen Experiments mit dem 24-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673523); das Schema in Abbildung 5 entspricht einem Experiment mit dem 12-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673522).

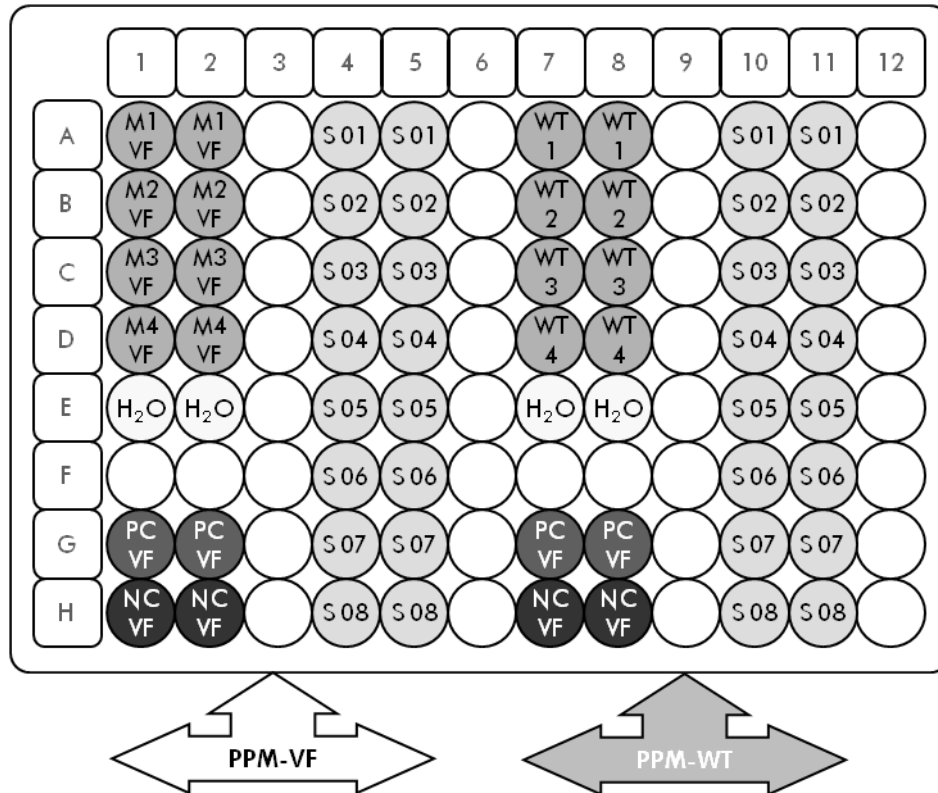


Abbildung 4. Vorgeschlagenes Platten-Set-up für ein Experiment mit dem 24-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673523). PC-VF: V617F-Positivkontrolle; NC-VF: V617F-Negativkontrolle; M-VF: V617F-Standards; M-WT: Wildtyp-Standards; S: DNA-Probe; H₂O: Wasser-Kontrolle

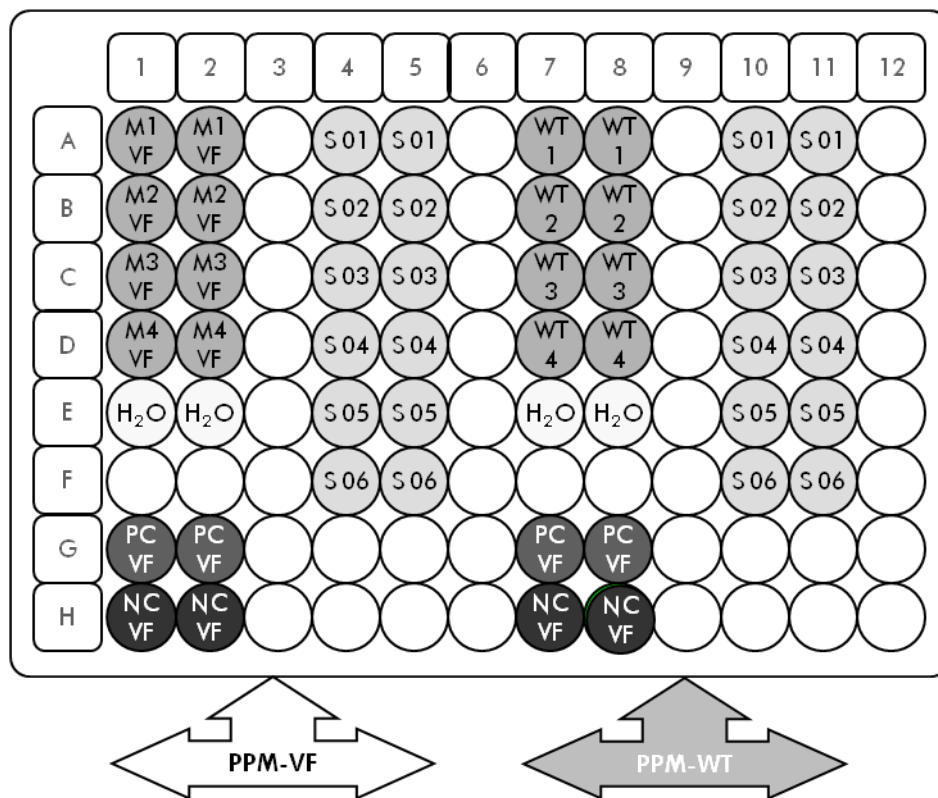


Abbildung 5. Vorgeschlagenes Platten-Set-up für ein Experiment mit dem 12-Reaktionen-Kit (Katalog-Nr. 673522). PC-VF: V617F-Positivkontrolle; NC-VF: V617F-Negativkontrolle; M-VF: V617F-Standards; M-WT: Wildtyp-Standards; S: DNA-Probe; H₂O: Wasser-Kontrolle

qPCR mit ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System oder LightCycler 480 Thermocycler

Hinweis: Führen Sie alle Schritte auf Eis durch.

Durchführung

- 1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.**
- 2. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabellen 7 und 8 dienen als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 25 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPM-VF oder PPM-WT) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 7. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	V617F-Pre-Mix			Endkonzentration
	1 Reaktion (μl)	26 + 1 Reaktionen (μl)	30 + 1 Reaktionen (μl)	
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primer- und Sonden-Mix (PPM-VF), 25x	1,0	27,0	31,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	175,5	201,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

Tabelle 8. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	WT-Pre-Mix			Endkonzentration
	1 Reaktion (μl)	26 + 1 Reaktionen (μl)	30 + 1 Reaktionen (μl)	
TaqMan Universal PCR- Master-Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primer- und Sonden-Mix (PPM-WT), 25x	1,0	27,0	31,0	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	6,5	175,5	201,5	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	25,0	jeweils 25,0	jeweils 25,0	–

3. Pipettieren Sie 20 μl des qPCR-Pre-Mix (VF oder WT) pro Well.
4. Geben Sie 5 μl des zu quantifizierenden Materials (25 ng genomische DNA der Probe oder Kontrolle) in die entsprechenden Wells (Gesamtvolumen 25 μl).
5. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
6. Schließen Sie die Platte und zentrifugieren Sie kurz (300 x g, ca. 10 Sekunden).
7. Setzen Sie die Platte gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler.
8. Programmieren Sie den Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm und stellen Sie das Gerät auf Datenerfassung für die zweifach markierte FAM-Fluoreszenz-Sonde ein, wie in Tabelle 9 für den ABI PRISM 7900HT SDS oder das Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System bzw. in Tabelle 10 für den LightCycler 480 Thermocycler angegeben.

Tabelle 9. Temperaturprofil für den ABI PRISM 7900HT SDS und das Applied Biosystems 7500 Real-Time-PCR-System

Analysemodus	Standardkurve – absolute Quantifizierung
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen „Cycling“	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 63 °C für 1 Minute und 30 Sekunden mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz; Quencher: TAMRA

Tabelle 10. Temperaturprofil für den LightCycler 480 Thermocycler

Analysemodus	Absolute Quantifizierung ("Abs Quant")
Detektionsformat	Wählen Sie im "Detection formats"-Fenster („Detektionsformate“) die Option "Simple Probe" („Einfach markierte Sonde“).
Halten ("Hold")	Temperatur: 50 °C Zeit: 2 Minuten
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten
Zykleneinstellungen („Cycling“)	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden 63 °C für 1 Minute und 30 Sekunden mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz im Bereich 483–533 nm bei LC-Version 01 bzw. im Bereich 465–510 nm bei LC-version 02

9. Bei Verwendung eines **ABI PRISM 7900HT** oder **Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems** fahren Sie mit Schritt 9a fort. Bei einem **LightCycler 480 Thermocycler** fahren Sie mit Schritt 9b fort.
- 9a. Bei **ABI PRISM 7900HT** oder **Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**: Wir empfehlen, einen Schwellenwert von **0,1** einzustellen. Starten Sie das in Tabelle 9 angegebene zyklische Temperaturprogramm.
- 9b. **LightCycler 480**: Wir empfehlen, den **Fit-Point-Analysemodus** mit einem Hintergrundwert von **2,0** und einem Schwellenwert von **2,0** zu verwenden. Starten Sie das in Tabelle 10 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Protokoll: qPCR mit LightCycler 1.2 Thermocycler

Bei Verwendung eines Kapillar-Thermocyclers empfehlen wir, die Proben in Doppelbestimmung und Kontrollen lediglich in Einfachbestimmung zu testen, wie in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11. Anzahl an Reaktionen bei Verwendung eines LightCycler 1.2 Thermocyclers

Proben	Reaktionen
Mit JAK2-V617F-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-VF)	
4 M-VF-Standards	4 Reaktionen, jede als Einfachbestimmung getestet
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
2 DNA-Kontrollen	2 Reaktionen: PC-VF und NC-VF, jede als Einfachbestimmung getestet
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion
Mit JAK2-Wildtyp-Primer- und -Sonden-Mix (PPM-WT)	
4 Wildtyp-Standards	4 Reaktionen, jede als Einfachbestimmung getestet
n DNA-Proben	n x 2 Reaktionen
2 DNA-Kontrollen	2 Reaktionen: PC-VF und NC-VF, jede als Einfachbestimmung getestet
Wasser-Kontrolle	1 Reaktion

Probenverarbeitung bei LightCycler 1.2 Thermocycler

Wir empfehlen 4 DNA-Proben im selben Experiment zu testen, um die Standard-Lösungen sowie Primer- und Sonden-Mischungen optimal zu nutzen. Das Kapillaren-Schema in Abbildung 6 gibt beispielhaft die Belegung der Kapillaren bei einem Experiment wieder.

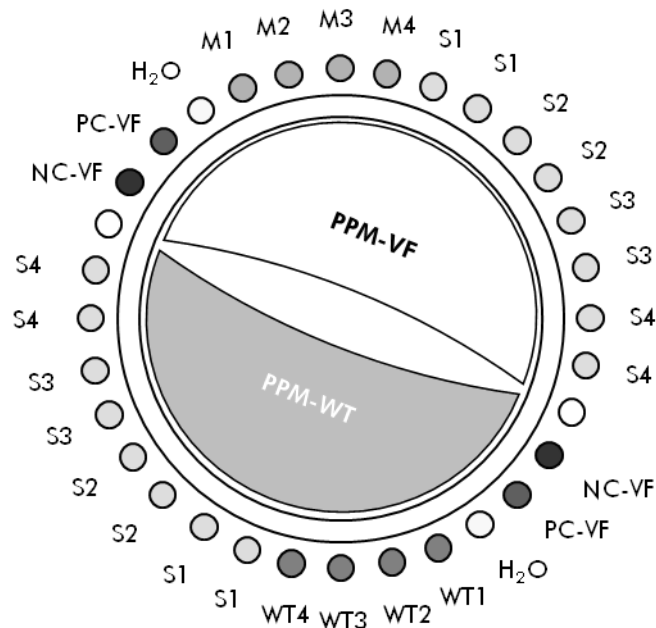


Abbildung 6. Vorgeschlagenes Set-up für jedes Experiment mit dem ipsogen JAK2 MutaQuant Kit. PC-VF: V617F-Positivkontrolle; **NC-VF:** V617F-Negativkontrolle; **M-VF:** V617F-Standards; **M-WT:** Wildtyp-Standards; **S:** DNA-Probe; **H₂O:** Wasser-Kontrolle.

qPCR mit LightCycler 1.2 Thermocycler

Hinweis: Wegen der besonderen technologischen Anforderungen müssen Experimente mit einem LightCycler Gerät unter Verwendung spezifischer Reagenzien durchgeführt werden. Wir empfehlen, beim Ansetzen des 5-fach konzentrierten Master-Mix LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe zu benutzen und dabei die Anweisungen des Herstellers zu befolgen.

Hinweis: Führen Sie alle Schritte auf Eis durch.

Durchführung

- 1. Tauen Sie alle Komponenten auf und stellen Sie sie auf Eis.**
- 2. Setzen Sie entsprechend der Anzahl an zu verarbeitenden Proben den folgenden qPCR-Mix an.**

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen der Reaktion.

Die Tabellen 12 und 13 dienen als Pipettierschema für das Ansetzen eines Reagenzien-Mix, der für ein Reaktions-Endvolumen von 20 µl berechnet ist. Sie können, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, einen Pre-Mix mit demselben Primer- und Sonden-Mix (entweder PPM-VF oder PPM-WT) ansetzen. Ein zusätzliches Volumen zur Kompensation von Pipettierfehlern ist jeweils berücksichtigt.

Tabelle 12. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	V617F-Pre-Mix 15 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
Frisch angesetzter LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primer- und Sonden- Mix (PPM-VF), 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	10,2	163,2	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	20,0	jeweils 20,0	–

Tabelle 13. Ansetzen des qPCR-Mix

Komponente	1 Reaktion (μl)	WT-Pre-Mix 15 + 1 Reaktionen (μl)	Endkonzentration
Frisch angesetzter LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primer- und Sonden- Mix (PPM-WT), 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasefreies Wasser (für PCR-Zwecke)	10,2	163,2	–
Probe (Zugabe bei Schritt 4)	5,0	jeweils 5,0	–
Gesamtvolumen	20,0	jeweils 20,0	–

3. Pipettieren Sie 15 μl des qPCR-Pre-Mix (VF oder WT) pro Kapillare.
4. Geben Sie 5 μl des zu quantifizierenden Materials (25 ng genomische DNA der Probe oder Kontrolle) in die entsprechenden Röhren (Gesamtvolumen 25 μl).
5. Mischen Sie jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.
6. Setzen Sie die Kapillaren in die mit dem Gerät gelieferten Adapter und zentrifugieren Sie sie kurz (700 x g, ca. 10 Sekunden).
7. Setzen Sie die Kapillaren gemäß den Angaben des Herstellers in den Thermocycler ein.
8. Programmieren Sie den LightCycler 1.2 Thermocycler mit dem zyklischen Temperaturprogramm, wie in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14. Temperaturprofil

Analysemodus	Quantifizierung
Halten 1 ("Hold 1")	Temperatur: 55 °C Zeit: 2 Minuten "Ramp": 20
Halten 2 ("Hold 2")	Temperatur: 95 °C Zeit: 10 Minuten "Ramp": 20
Zykleneinstellungen („Cycling“)	50 Zyklen 95 °C für 15 Sekunden; "Ramp": 20 66 °C für 1 Minute; "Ramp": 20; mit Erfassung der FAM-Fluoreszenz: Einzel ("Single")

9. Für den LightCycler 1.2 wird der F1/F2- und "2nd derivative"-Analysemodus („2. Ableitung“) empfohlen. Starten Sie das in Tabelle 14 angegebene zyklische Temperaturprogramm.

Interpretation der Ergebnisse

Verfahren der Datenauswertung

Die Daten für den Schwellenwert-Zyklus ("Threshold Cycle"; C_T) und der Wert beim Übergangspunkt ("Crossing Point"; C_P) können aus dem qPCR-Thermocycler exportiert und zur Auswertung in eine Excel® Datei eingefügt werden. Diese Werte können dann dazu benutzt werden, um den Mittelwert für C_P und C_T zu berechnen und die mittleren C_T -Werte der Standards in einem Diagramm darzustellen. Verwenden Sie zur Berechnung der Standardkurve für die Wildtyp- und die V617F-Standards die folgende Gleichung und Tabelle 15.

$y = \text{Mittelwert } C_P; x = \log_{10} \text{ CN}$, wobei CN = Gen-Kopienzahl in 5- μ l-Probe

Tabelle 15. Quantitative Daten für die Wildtyp- und V617F-Standards

Standard	Kopienzahl (CN)	$\log_{10} \text{ CN}$
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

Hinweis: Jeder Benutzer sollte seine eigene Reproduzierbarkeit im eigenen Labor bestimmen.

Standardkurve und Qualitätskriterien

In den Abbildungen 7 und 9 sind Beispiele für Ergebnisse dargestellt, die mit dem *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit erhalten wurden. In den Abbildungen 8 und 10 sind beispielhaft die theoretischen Standardkurven dargestellt, die aus den vier Standard-Verdünnungen berechnet wurden.

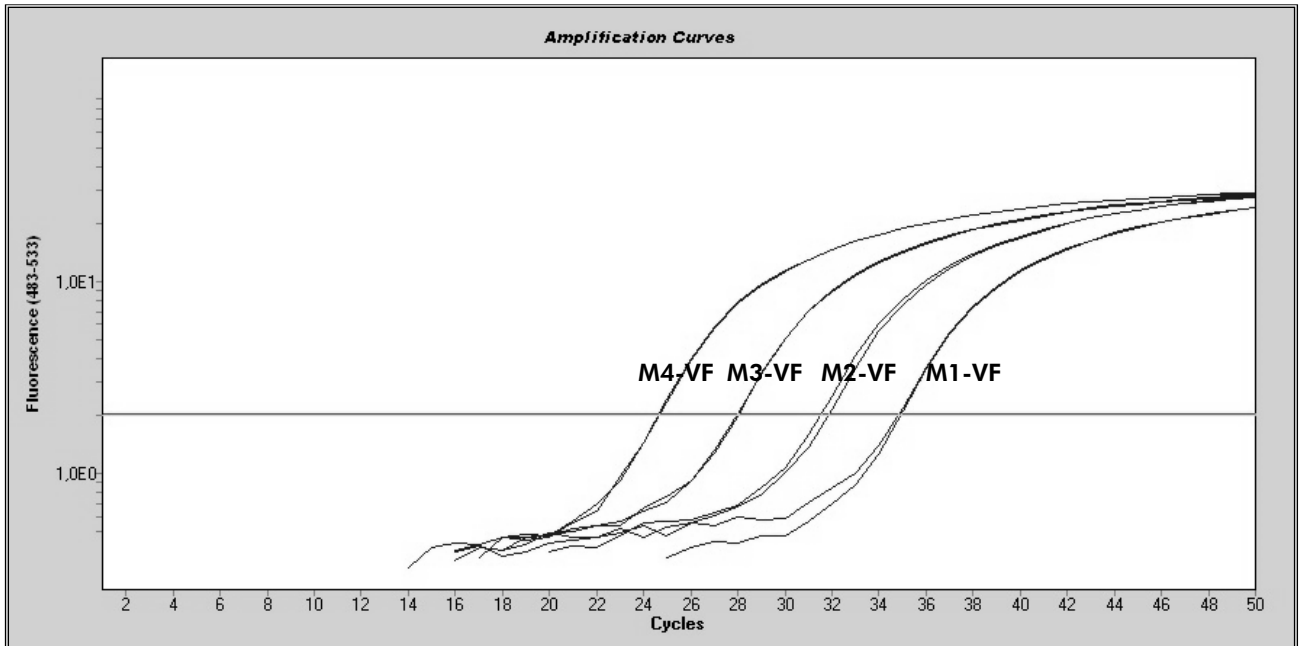


Abbildung 7. Amplifikationsdiagramm von 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 und 5×10^4 Kopien des JAK2-V617F-Plasmids (Kontrolle M1-VF, M2-VF, M3-VF bzw. M4-VF).

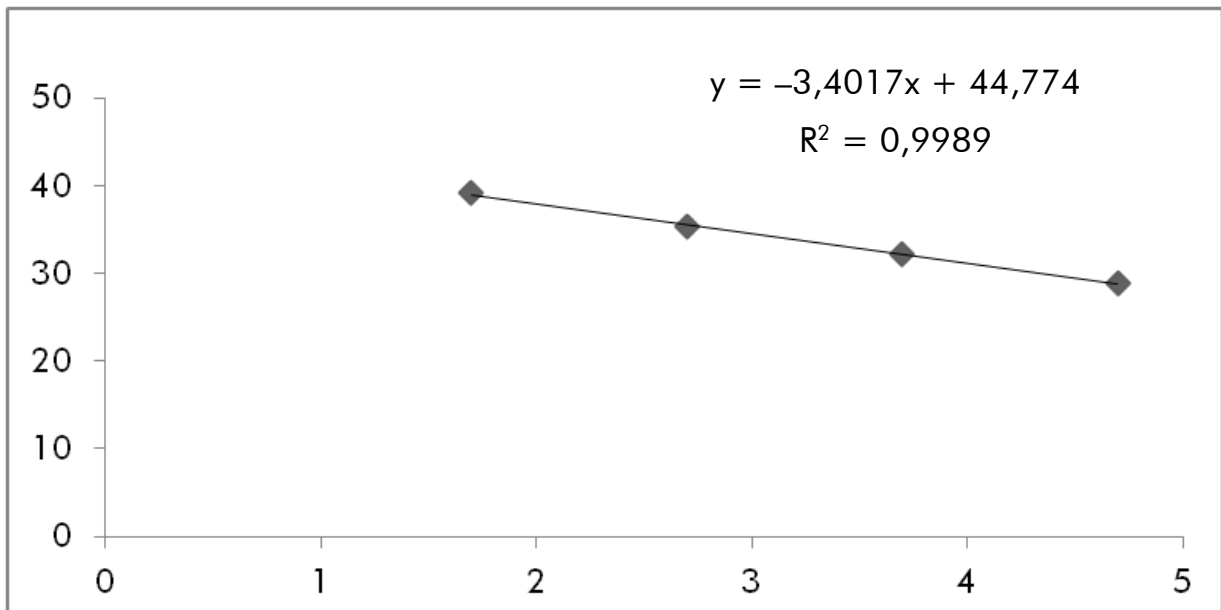


Abbildung 8. Standardkurve für JAK2-V617F.

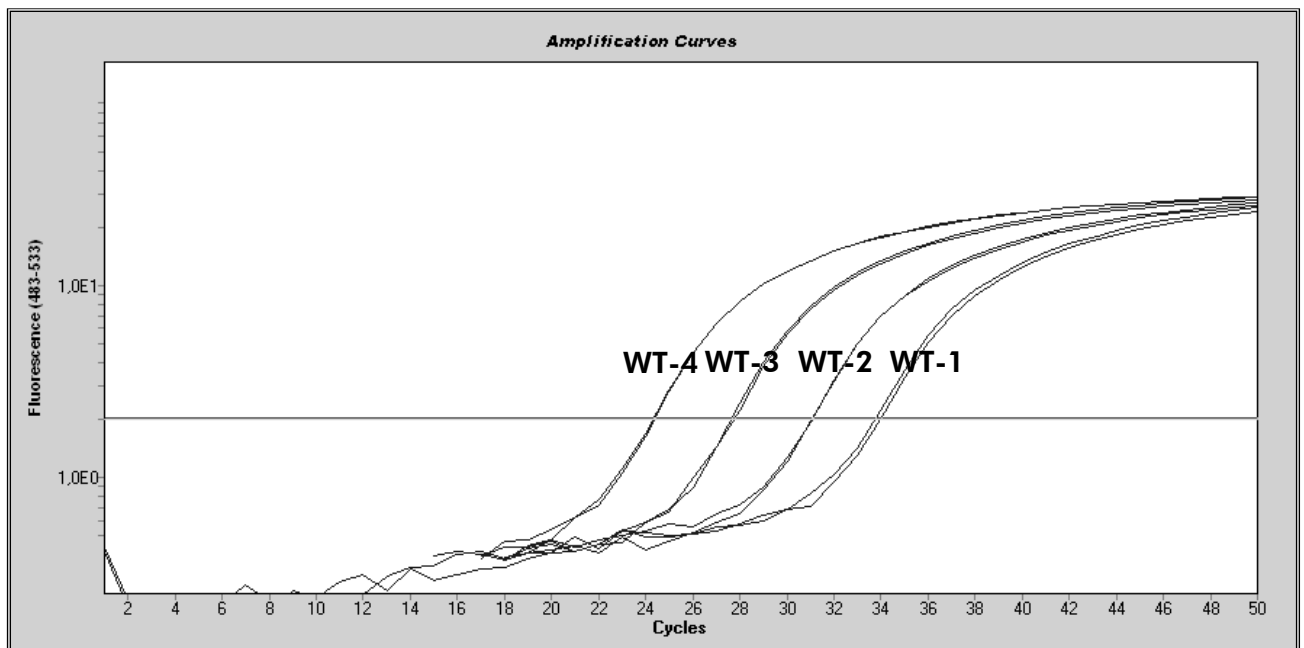


Abbildung 9. Amplifikationsdiagramm von 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 und 5×10^4 Kopien des JAK2-Wildtyp-Plasmids (Kontrolle WT-1, WT-2, WT-3 bzw. WT-4).

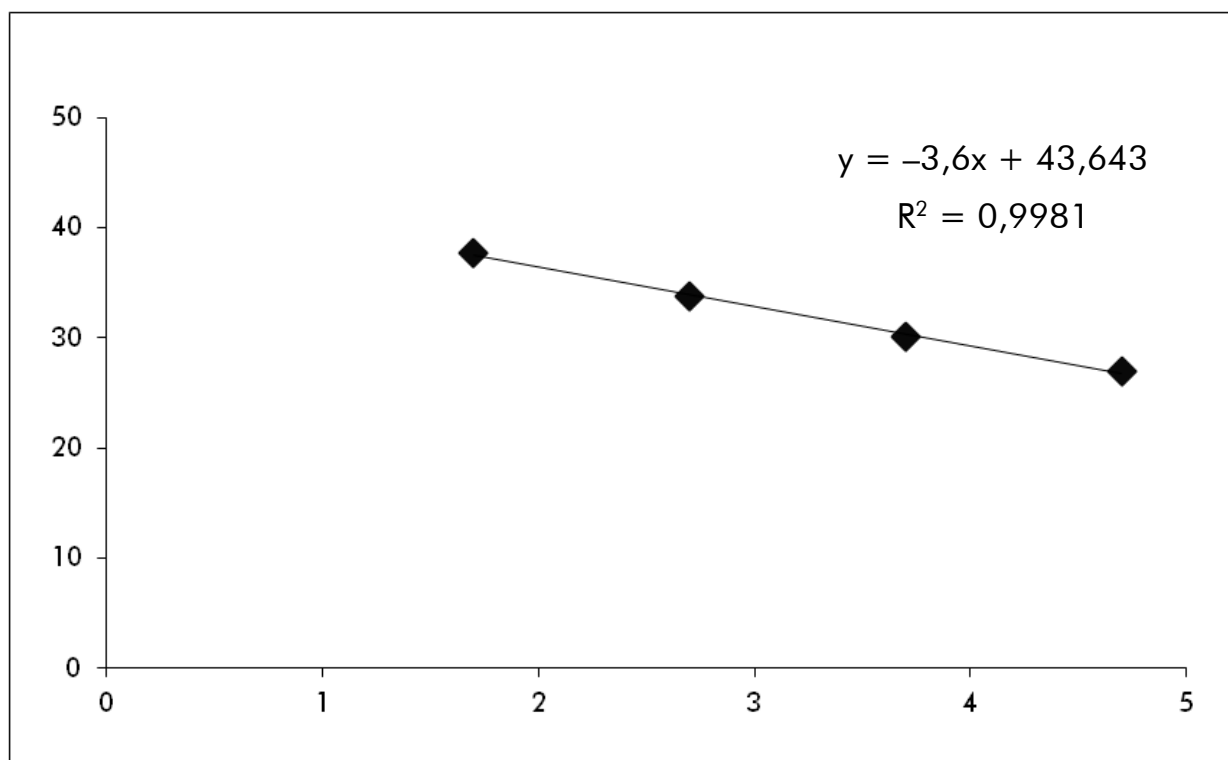


Abbildung 10. Standardkurve für JAK2-Wildtyp.

Da es sich bei den Standards um 10-fache Verdünnungen handelt, beträgt die theoretische Steigung der Geraden $-3,32$. Eine Steigung zwischen $-3,0$

und -3,9 gilt als akzeptabel, solange der Wert $R^2 > 0,95$ ist (12). Für präzise Ergebnisse ist allerdings ein R^2 -Wert von $> 0,98$ wünschenswert (13).

Die Gleichungen der Standardkurven können dann benutzt werden, um den \log_{10} -Wert der V617F- und WT-Kopienzahl in den unbekanntenen Proben zu berechnen.

Die Gleichung der V617F-Standardkurve sollte benutzt werden, um die C_P/C_T -Mittelwerte (mit PPM-VF erhalten) der unbekanntenen und der Kontrollproben in die JAK2-V617F-Kopienzahlen (CN_{V617F}) umzurechnen.

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Mittelwert } C_{pV617F} - \text{Standardkurven-Achsenabschnitt}_{V617F})}{\text{Standardkurven-Steigung}_{V617F}}$$

Die Gleichung der Wildtyp-Standardkurve sollte benutzt werden, um den C_P/C_T -Mittelwert (mit PPM-WT erhalten) der unbekanntenen und der Kontrollproben in die JAK2-Wildtyp-Kopienzahlen (CN_{WT}) umzurechnen.

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Mittelwert } C_{pWT} - \text{Standardkurven-Achsenabschnitt}_{WT})}{\text{Standardkurven-Steigung}_{WT}}$$

Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse beziehen sich auf 25 ng totale genomische DNA und sollten wie folgt als Prozentsatz JAK2-V617F angegeben werden:

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

Reproduzierbarkeit zwischen Wiederholproben

Die bei den Wiederholproben erhaltenen Daten sollten konsistent sein.

Positiv- und Negativkontrollen

Die Positivkontrolle (oder PC-VF) sollte einen JAK2-V617F-Prozentsatz von über 99,9 % ergeben.

Die Negativkontrolle (oder NC-VF) sollte einen JAK2-V617F-Prozentsatz von unter 0,1 % ergeben.

Falls die Kontrollen nicht korrekt funktionieren und nicht diesen Kriterien entsprechen, lesen Sie bitte im Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“ auf Seite 35 ff. nach, um eine Lösung zu finden.

Wasser-Kontrollen

Die Negativkontrollen sollten eine CN von null ergeben, sowohl bei der JAK2-V617F- als auch der JAK2-Wildtyp-Detektion.

Bei einem positiven Testergebnis bei der Wasser-Kontrolle liegt eine Kreuzkontamination vor. Siehe unten, den Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“, um eine Lösung zu finden.

Hilfe zur Fehlerbehebung

Diese Anleitung zur Fehlerbehebung soll Ihnen eine Hilfe geben, falls einmal Probleme auftreten sollten. Weitere Informationen finden Sie auch auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Außerdem beantwortet das Team vom Technischen Service bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und zu den Protokollen in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme, siehe „Kontaktinformationen“ auf Seite 44).

Kommentare und Vorschläge

Standardkurve für Wildtyp oder V617F nicht linear

Fläschchen-Verwechslung,
Verwechslung beim Pipettieren,
Kreuzkontamination, partieller
Abbau des Standards, RQPCR-
Reagenz, unspezifische
Amplifikation oder PCR-
Programmfehler

Überprüfen Sie das Pipettierschema
und den Reaktionsansatz.

Lagern Sie den *ipsogen* JAK2
MutaQuant Kit bei -15 °C bis -30 °C
und schützen Sie Primer- und Sonden-
Mischungen vor Lichteinfluss. Siehe
„Lagerung und Handhabung der
Reagenzien“ auf Seite 13.

Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren
und Wiederauftauen.

Kein oder schwaches Signal bei einem Standard

Standard nicht verteilt oder
Verwendung desselben PPM-Mix

Überprüfen Sie das Pipettierschema
und den Reaktionsansatz.

Wiederholen Sie den PCR-Lauf.

Negativkontrolle (H₂O) ist positiv

Kreuzkontamination, Reagenzien-Kontamination, Gerätefehler, Well- oder Kapillaren-Verwechslung oder Abbau der Sonde

Tauschen Sie alle kritischen Reagenzien aus.

Handhaben Sie Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsartikel gemäß den allgemein anerkannten Regeln der guten Laborpraxis, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden.

Lagern Sie Primer- und Sonden-Mischungen unter Lichtausschluss.

Überprüfen Sie die Fluoreszenzkurven auf falsch-positive Ergebnisse.

Kein Signal, auch nicht bei Standard-Kontrolle

a) Falschen Detektionskanal gewählt

Stellen Sie den Kanal auf F1/F2 oder 530 nm / 640 nm ein.

b) Pipettierfehler oder Reagenzien vergessen

Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz.

Wiederholen Sie den PCR-Lauf.

c) Keine Datenerfassung programmiert

Überprüfen Sie das Zyklusprogramm.

Wählen Sie den Erfassungsmodus "Single" („Einzel“) am Ende jedes Annealing-Schritts des PCR-Programms.

Kein oder schwaches Signal in Proben, während Standard-Kontrollen in Ordnung sind

Inhibitorische Effekte des Probenmaterials, verursacht durch unzureichende Nukleinsäure-Reinigung

Überprüfen Sie immer die DNA-Qualität (O₂₆₀/O₂₈₀) und -Konzentration vor Testbeginn.

Wiederholen Sie die DNA-Präparation.

Fluoreszenzintensität zu gering

- a) Unsachgemäße Lagerung von Kit-Komponenten
- Aliquotieren Sie die Reagenzien vor der Lagerung.
- Lagern Sie den *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit bei -15 °C bis -30 °C und schützen Sie Primer- und Sonden-Mischungen vor Lichteinfluss. Siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 13.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen.
- b) Sehr geringe Ausgangsmenge an Target-DNA
- Kontrollieren Sie die Menge an Proben-DNA.
- Hinweis:** Je nach gewählter Methode für die DNA-Präparation können inhibitorische Effekte auftreten.

Negativkontrollen sind positiv

- Verschleppungskontamination
- Tauschen Sie alle kritischen Reagenzien aus.
- Wiederholen Sie das Experiment mit neuen Aliquots sämtlicher Reagenzien.
- Handhaben Sie Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsartikel gemäß den allgemein anerkannten Regeln der guten Laborpraxis, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden.

Fluoreszenzintensität variiert

- a) Pipettierfehler
- Schütteln und zentrifugieren Sie kurz alle Reagenzien nach dem Auftauen.
- Die durch sogenannte „Pipettierfehler“ verursachte Variabilität beim Light-Cycler kann reduziert werden, indem die Daten im Modus F1/F2 oder 530 nm / 640 nm analysiert werden.

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|---|
| b) Unzureichende Zentrifugation der Platte, Reaktionsgefäße oder Kapillaren, oder angesetzter PCR-Mix befindet sich noch im oberen Kapillarengefäß, oder Luftblase ist in Kapillarenspitze | Zentrifugieren Sie die mit dem Reaktionsgemisch gefüllten Kapillaren immer, wie im gerätespezifischen Bedienungshandbuch beschrieben. |
| c) Äußere Oberfläche der Kapillarenspitze verschmutzt | Tragen Sie beim Umgang mit den Kapillaren immer Laborhandschuhe. |

Signal bei Wildtyp- oder V617F-Positivkontrollen bei Verwendung des reziproken PPM

- | | |
|--|--|
| Kreuzkontamination, Reagenzien-Kontamination oder Verwechslung von Well oder Kapillare | Tauschen Sie alle kritischen Reagenzien aus.
Wiederholen Sie das Experiment mit neuen Aliquots sämtlicher Reagenzien.
Handhaben Sie Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsartikel gemäß den allgemein anerkannten Regeln der guten Laborpraxis, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden.
Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz. |
|--|--|

Verwechslung bei Detektion der Positivkontrolle

- | | |
|--|---|
| Verwechselte PPM in Well oder Kapillare oder in Pre-Mix pipettiert | Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz. |
|--|---|

Kein Signal für eine oder beide Positivkontrolle(n)

- | | |
|---------------------------------|---|
| PPM oder Kontroll-DNA vergessen | Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz. |
|---------------------------------|---|

Hohes Hintergrundsignal

- | | |
|-----------------------------|---|
| Ausbleichen des Fluorophors | Lagern und handhaben Sie die Sonde unter Lichtausschluss. |
|-----------------------------|---|

Geringe Reproduzierbarkeit bei Doppelbestimmungen der Proben

- | | |
|---|---|
| Pipettierfehler oder Kreuzkontamination | Überprüfen Sie das Pipettierschema und den Reaktionsansatz. |
|---|---|

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Analysenzertifikate sind auf Anfrage unter www.qiagen.com/support erhältlich.

Beschränkungen des Tests

Die Anwender müssen in dieser Technologie geschult und mit ihrer Anwendung vertraut sein, bevor Sie dieses Testverfahren anwenden. Dieser Kit sollte gemäß den Anweisungen in diesem Handbuch und in Kombination mit einem validierten Gerät der im Abschnitt „Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien“ auf Seite 11 genannten Modelle verwendet werden.

Alle mit dem System erhaltenen diagnostischen Ergebnisse dürfen nur im Zusammenhang mit anderen klinischen und/oder labormedizinischen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Leistungscharakteristik des Systems für jede Methode, die im Labor des Anwenders angewendet wird und die durch die QIAGEN Untersuchungen zur Leistungsevaluierung nicht abgedeckt ist, selbst zu validieren.

Achten Sie auf die Haltbarkeitsdaten, die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Verwenden Sie keine Kit-Komponenten, deren Haltbarkeitsdatum abgelaufen ist.

Leistungscharakteristik

Untersuchung nichtklinischer Proben

Präzision

Eine Untersuchung zur Präzision wurde mit 12 DNA-Proben durchgeführt, die aus Zelllinien mit unterschiedlichen JAK2-V617F-Allel-Lasten extrahiert worden war. Insgesamt wurden mit jeder Probe 80 Messungen durchgeführt, wobei drei verschiedene Chargen des *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kits verwendet wurden. Diese Testreihe zur Untersuchung der Präzision wurde mit einem Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System durchgeführt.

Die analytischen Daten sind in der folgenden Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15. Präzisionsdaten zu den DNA-Proben

Probe	Theoretischer Anteil JAK2-V617F (%)	n*	Mittelwert (%)	CV (%)	Perzentil	
					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

* Ausreißer-Werte wurden ausgeschlossen. Als solche wurden Werte definiert, die kleiner waren als das unterste Quartil minus dem dreifachen Interquartilsabstand oder solche, die größer waren als das oberste Quartil plus dem dreifachen Interquartilsabstand in einem Box-Whisker-Plot.

n = Anzahl der validierten Probe; CV = globaler Variationskoeffizient.

Grenzwert der Leerprobe und Nachweisgrenze

Der Hintergrundwert oder Leerproben-Grenzwert (LOB = "level of blank") wurde mit negativen Proben bestimmt (8 Proben, 76 Messungen). Der gemessene Wert lag bei 0,014 %.

Die Nachweisgrenze (LOD = "limit of detection") wurde mit Proben ermittelt, die zum einen bekanntermaßen positiv waren und eine geringe Expression hatten (7 Proben, 68 Messungen). Dieser Grenzwert betrug 0,061 %, wobei die Obergrenze des 90-%-Konfidenzintervalls bei 0,091 % lag.

Diese optimale Sensitivität wird bei Proben mit mindestens 10.000 Kopien des JAK2-Gens (Wildtyp- oder V617F-Mutation) erhalten.

Die Quantifizierungsdaten sollten wie folgt angegeben werden.

- JAK2-V617F \leq 0,014 % kann interpretiert werden als: Die JAK2-V617F-Mutation wurde nicht nachgewiesen.
- JAK2-V617F ist $>$ 0,014 % und $<$ 0,091 %: Dies kann als nicht eindeutiges Ergebnis interpretiert werden.
- JAK2-V617F \geq 0,091 % kann als ein positives Ergebnis interpretiert werden: Die JAK2-V617F-Mutation wurde nachgewiesen.

Linearität

Die Untersuchungen zur Linearität wurden mit 12 Proben durchgeführt, wobei jede aus einer unterschiedlichen Mischung von DNA bestand, welche aus Zelllinien, die positiv oder negativ für die JAK2-V617F-Mutation waren, extrahiert worden war. Jede Probe wurde in Fünffach-Bestimmung getestet. Die bei dieser Untersuchung erhaltenen Daten zeigten, dass der *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit lineare Ergebnisse über den Dynamikbereich ergibt.

Untersuchung klinischer Proben

Die DNA aus Blut oder Knochenmark wurde aus 87 Patientenproben isoliert und mithilfe des *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kits analysiert. Außerdem wurde der Prozentsatz der JAK2-V617F-Mutation quantifiziert und mit den Screening-Testergebnissen verglichen, die mit dem *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (Katalog-Nr. 673223) erhalten wurden. Die Daten sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Kontingenztabelle zur Darstellung der Übereinstimmung zwischen den mit dem *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit und den mit dem *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit erhaltenen Ergebnissen

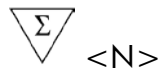
		Ergebnisse mit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit			n
		Mutation detektiert	Ergebnis nicht eindeutig	Mutation nicht detektiert	
Ergebnisse mit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit	Mutation detektiert	40	2	7	49
	Ergebnis nicht eindeutig	0	0	21	21
	Mutation nicht detektiert	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Positive Übereinstimmung	100 % (95%-Konfidenzintervall: 91 %, 100 %)				
Negative Übereinstimmung	71 % (95%-Konfidenzintervall: 51 %, 85 %)				
Gesamt-Übereinstimmung	89 % (95%-Konfidenzintervall: 79 %, 95 %)				

Referenzen

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.

Symbole

Folgende Symbole werden auf der Verpackung und den Etiketten verwendet:



Kit enthält Reagenzien für < n > Tests



Zur Verwendung bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Beachten Sie die Anwendungshinweise

Kontaktinformationen

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/support oder erhalten Sie unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Für 12 Reaktionen: Wildtyp-Kontrolle des JAK2-Gens, Kontrolle der JAK2-V617F-Mutation, Primer- und Sonden-Mischung PPM-WT (Wildtyp), Primer- und Sonden-Mischung PPM-VF (V617F-Mutation)	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Wildtyp-Kontrolle des JAK2-Gens, Kontrolle der JAK2-V617F-Mutation, Primer- und Sonden-Mischung PPM-WT (Wildtyp), Primer- und Sonden-Mischung PPM-VF (V617F-Mutation)	673523
Rotor-Gene Q MDx - für IVD-validierte Real-Time-PCR-Analysen bei klinisch-diagnostischen Applikationen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör und 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten; Installation und Unterweisung nicht inbegriffen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-Time-PCR-Thermocycler und Analyzer für hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRM) mit fünf Fluoreszenz-Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpur) und einem HRM-Kanal, inklusive Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf alle Teile sowie Arbeitskosten, Installation und Unterweisung	9002033

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

Dieses Produkt ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen. *ipsogen* Produkte dürfen weder wiederverkauft noch für den Wiederverkauf modifiziert oder ohne vorherige schriftliche Zustimmung durch QIAGEN zur Herstellung kommerzieller Produkte verwendet werden.

Die in diesem Dokument gemachten Angaben können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. QIAGEN übernimmt keine Verantwortung für Fehler, die möglicherweise in diesem Dokument vorhanden sind. Die Angaben in diesem Dokument zum Zeitpunkt der Veröffentlichung werden als vollständig und richtig erachtet. In keinem Fall haftet QIAGEN für zufällige, besondere, mehrfache oder Folgeschäden, die aus oder in Verbindung mit dem Gebrauch dieses Dokuments entstehen können.

Die Einhaltung der angegebenen Spezifikationen der *ipsogen* Produkte wird zugesichert. QIAGENS einzige Verpflichtung und der ausschließliche Anspruch des Kunden beschränken sich auf den kostenfreien Ersatz von Produkten für den Fall, dass die Produkte nicht die zugesicherte Leistung einhalten.

Die JAK2-V617F-Mutation und deren Nutzung unterliegen dem Schutz von Patenten, einschließlich des europäischen Patents EP1692281, der US-Patente 7.429.456 und 7.781.199, der beantragten US-Patente US20090162849 und US20120066776 sowie den entsprechenden Patenten in anderen Ländern.

Der Kauf dieses Produkts gewährt keinerlei Recht, das Produkt bei klinischen Studien zu Arzneimitteln, die auf JAK2-V617F abzielen, einzusetzen. Für derartige Verwendungszwecke entwickelt QIAGEN spezifische Lizenzprogramme. Wenden Sie sich diesbezüglich bitte per E-Mail an unsere Rechtsabteilung unter jak2licenses@qiagen.com.

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

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit darf nur gemäß den Angaben im *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit *Handbuch* und ausschließlich mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit *Handbuch* und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich genannten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

