

Εγχειρίδιο κιτ *ipsogen*[®] JAK2 MutaScreen RS



Έκδοση 1

IVD

Ποσοτική in vitro διαγνωστική εξέταση

Για χρήση σε συνδυασμό με τα όργανα Rotor-Gene[®] Q,
Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] και LightCycler[®]



REF

673123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R3

MAT

1072513EL



Τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης της QIAGEN

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιουδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στις αναλύσεις νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	5
Αρχή της διαδικασίας	7
Υλικά που παρέχονται	9
Περιεχόμενα του kit	9
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	11
Γενικές προφυλάξεις	11
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	12
Διαδικασία	13
Παρασκευή δείγματος DNA	13
Αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων	13
Πρωτόκολλο	
■ qPCR σε όργανα Rotor Gene Q με ρότορα 72 σωληναρίων	13
■ qPCR σε όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM	24
■ qPCR στο όργανο LightCycler 480	34
■ qPCR στο όργανο LightCycler 2.0	43
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	49
Γραφική αναπαράσταση και κριτήρια ελέγχου ποιότητας	49
Υπολογισμός κανονικοποιημένου λόγου FAM/VIC και γονοτυπική ανάλυση	50
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	53
Ποιοτικός έλεγχος	55
Περιορισμοί	55
Χαρακτηριστικά απόδοσης	56
Μη κλινικές μελέτες	56
Κλινικές μελέτες	57
Βιβλιογραφία	63
Σύμβολα	64
Πληροφορίες επικοινωνίας	64
Πληροφορίες παραγγελίας	65

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS προορίζεται για την ανίχνευση της μετάλλαξης V617F/G1849T στο γονίδιο JAK2, σε γονιδιωματικό DNA από άτομα με πιθανολογούμενο μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα. Η απουσία της μετάλλαξης V617F/G1849T από το JAK2 δεν αποκλείει την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων στο JAK2. Η εξέταση μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα εάν υπάρχουν άλλες μεταλλάξεις στα κωδικόνια 615 έως 619 (1).

Σημείωση: Το kit θα πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο αυτό, μαζί με εγκεκριμένα αντιδραστήρια και όργανα. Οποιαδήποτε μη ενδεδειγμένη χρήση του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών του απαλλάσσει την QIAGEN από κάθε ευθύνη.

Σύνοψη και επεξήγηση

Το 2005 ταυτοποιήθηκε μια επαναλαμβανόμενη σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο της κινάσης τυροσίνης Janus 2 (JAK2), η μετάλλαξη V617F (2–5), και η ανακάλυψη αυτή έφερε επανάσταση στην κατανόηση, την ταξινόμηση και τη διάγνωση των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (MYN). Η JAK2 είναι ένα μόριο ενδοκυττάριας σηματοδότησης με κρίσιμη σημασία για μια σειρά κυτοκινών, μεταξύ των οποίων και η ερυθροποιητίνη.

Η μετάλλαξη V617F της JAK2 ανιχνεύεται σε >95% των ασθενών με αληθή πολυκυτταραιμία (ΑΠ), στο 50–60% των ασθενών με ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) και στο 50% των ασθενών με πρωτοπαθή μυελοϊνωση (ΠΜΙ). Η μετάλλαξη V617F της JAK2 έχει ανιχνευτεί και σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας, μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, συστηματικής μαστοκυττάρωσης και χρόνιας ουδετεροφιλικής λευχαιμίας, αλλά έχει εντοπιστεί στο 0% των περιπτώσεων χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας (6).

Η μετάλλαξη συνίσταται σε μια μονονουκλεοτιδική αλλαγή στο νουκλεοτίδιο 1849 στο εξόνιο 14 του γονιδίου JAK2, που προκαλεί μια μοναδική αντικατάσταση μιας βαλίνης (V) από φαινυλαλανίνη (F) στη θέση 617 της πρωτεΐνης (περιοχή JH2). Αυτή οδηγεί σε συνεχή (συστατική) ενεργοποίηση του JAK2, σε μετασχηματισμό αιμοποιητικών κυττάρων *in vitro* και σε ανάπτυξη αποικιών ερυθροειδών ανεξάρτητη της ερυθροποιητίνης (erythropoietin-independent erythroid colony growth, EEC) σε όλους τους ασθενείς με ΑΠ και σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών με ΙΘ και ΠΜΙ (7). Η μετάλλαξη V617F της JAK2 αποτελεί βασικό παράγοντα στον μετασχηματισμό των αιμοποιητικών κυττάρων στα MYN, αλλά οι επιμέρους παθολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε τόσο ποικίλες κλινικές και βιολογικές καταστάσεις από την ίδια μοναδική μετάλλαξη δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

Παραδοσιακά, η διάγνωση των MYN βασίζεται σε κριτήρια κλινικά, κυτταρογενετικά και ιστολογίας του μυελού των οστών. Η ανακάλυψη ενός ειδικού μοριακού δείκτη για τη νόσο οδήγησε στην απλοποίηση της διαδικασίας και στη βελτίωση της ορθότητας της διάγνωσης. Η ανίχνευση της

μετάλλαξης V617F της JAK2 αποτελεί πλέον μέρος των κριτηρίων αναφοράς του ΠΟΥ (2008) για τη διάγνωση του αρνητικού για BCR-ABL μυελοϋπερπλαστικού νεοπλασματος (Πίνακας 1) και η παρουσία αυτής της μετάλλαξης είναι μείζον κριτήριο για τη διαγνωστική επιβεβαίωση.

Πίνακας 1. Κριτήρια του ΠΟΥ για τη διάγνωση των MYN (διασκευασμένα, από την παραπομπή 8)

Κριτήρια για τη διάγνωση της αληθούς πολυκυτταραιμίας (ΑΠ)	
Μείζονα	<p>1. Αιμοσφαιρίνη (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (άνδρες) ή $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (γυναίκες) ή Hgb ή αιματοκρίτης (Hct) >99η εκατοστιαία θέση του εύρους αναφοράς για την ηλικία, το φύλο ή το υψόμετρο διαβίωσης ή Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (άνδρες) ή $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (γυναίκες) εάν συνοδεύεται από παρατεταμένη αύξηση κατά $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ ως προς την τιμή αναφοράς η οποία δεν εξηγείται από διόρθωση ανεπάρκειας σιδήρου ή Αυξημένη μάζα ερυθροκυττάρων $>25\%$ πάνω από τη μέση φυσιολογική προβλεπόμενη τιμή</p> <p>2. Παρουσία της <i>JAK2V617F</i> ή άλλης παρόμοιας μετάλλαξης</p>
Ελάσσονα	<p>1. Μυελός με υπερπλασία των τριών κυτταρικών σειρών</p> <p>2. Επίπεδο ερυθροποιητίνης στον ορό χαμηλότερο του κανονικού</p> <p>3. Ανάπτυξη ενδογενών αποικιών ερυθροειδών (EEC)</p>
Κριτήρια για τη διάγνωση της ιδιοπαθούς θρομβοκυτταραιμίας (ΙΘ)	
Μείζονα	<p>1. Αριθμός αιμοπεταλίων $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$</p> <p>2. Υπερπλασία μεγακαρυοκυτταρικής σειράς με μεγάλα και ώριμα μεγακαρυοκύτταρα. Μικρή ή καθόλου υπερπλασία κοκκιδώδους ή ερυθράς σειράς</p> <p>3. Δεν πληρούνται τα κριτήρια του ΠΟΥ για τη χρόνια μυελοειδή λευχαιμία (ΧΜΛ), την ΑΠ, την πρωτοπαθή μυελοϊνώση (ΠΜΙ), το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ) ή άλλο μυελοειδές νεόπλασμα</p> <p>4. Παρουσία της <i>JAK2V617F</i> ή άλλου κλωνικού δείκτη ή Αποκλεισμός αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης</p>
Ελάσσονα	-

Κριτήρια για τη διάγνωση της πρωτοπαθούς μυελοϊνώσεως (ΠΜΙ)

Μείζονα	<ol style="list-style-type: none">1. Αυξημένος αριθμός μεγακαρυοκυττάρων και ατυπία συνοδευόμενη από ίνωση από αυξημένη εναπόθεση ρετικουλίνης ή/και κολλαγόνου ή Σε περίπτωση απουσίας ίνωσης από ρετικουλίνη, οι μεταβολές των μεγακαρυοκυττάρων πρέπει να συνοδεύονται από αυξημένη κυτταροβρίθεια του μυελού, από υπερπλασία της κοκκιώδους σειράς και συχνά από μειωμένη ερυθροποίηση (δηλαδή, προϊνωτική ΠΜΙ)2. Δεν πληρούνται τα κριτήρια του ΠΟΥ για (τη ΧΜΚ), την ΑΠ, το ΜΔΣ ή άλλο μυελοειδές νεόπλασμα3. Παρουσία της <i>JAK2V617F</i> ή άλλου κλωνικού δείκτη ή
	Απουσία ευρημάτων αντιδραστικής ίνωσης
Ελάσσονα	<ol style="list-style-type: none">1. Λευκοερυθροβλάστωση2. Αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) στον ορό3. Αναιμία4. Ψηλαφητή σπληνομεγαλία

Πρόσφατα, ειδικοί από διάφορες χώρες πρότειναν κριτήρια για τις κλινικές δοκιμές πάνω στις θεραπευτικές μεθόδους για την ΑΠ και την ΙΘ. Με βάση δεδομένα για αλλομοσχεύματα, για την α-ιντερφερόνη και για την υδροξουρία, η ποσοτική μέτρηση της *JAK2V617F* συμπεριελήφθη σε αυτά ως πιθανό χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (9). Κατά τη φάση κλινικής ανάπτυξης κάποιων από τα νέα φάρμακα που στρέφονται έναντι της *JAK2*, παρατηρήθηκε μείωση του φορτίου της *JAK2V617F* (10).

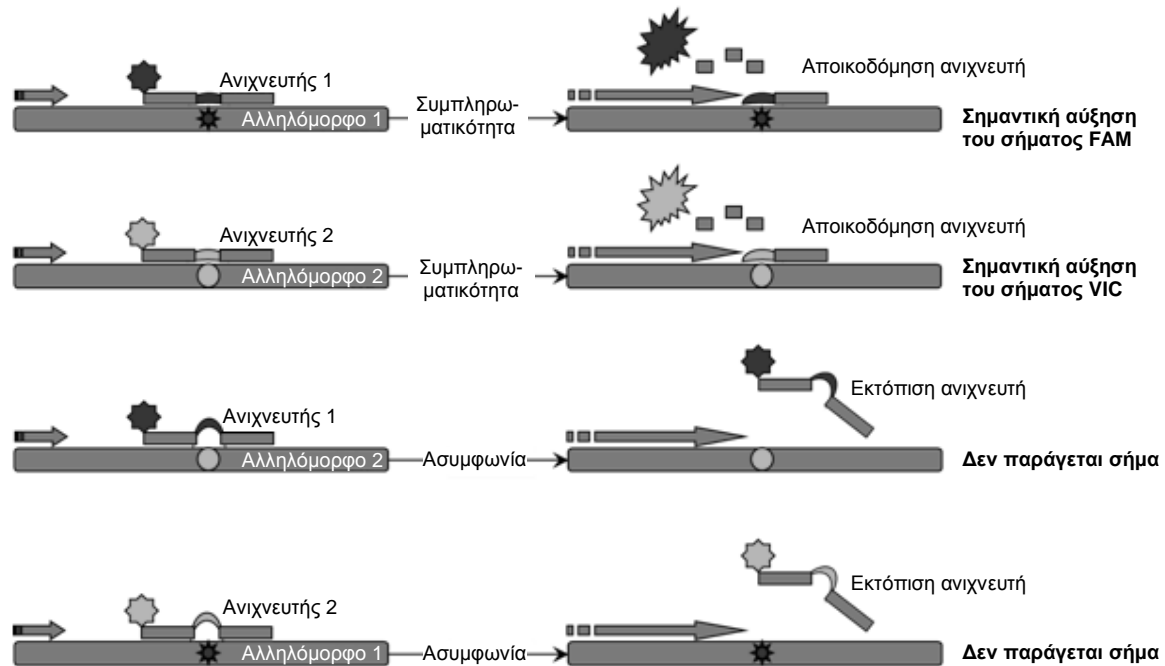
Αρχή της διαδικασίας

Σε μια ανάλυση διάκρισης αλληλομόρφων χρησιμοποιούνται δύο ανιχνευτές *TaqMan*[®] με μια μέθοδο πολλαπλής αντίδρασης (multiplex). Ο ένας από αυτούς είναι απόλυτα συμπληρωματικός προς την αλληλουχία του αλληλομόρφου 2 (π.χ. το αλληλόμορφο φυσικού τύπου) ενώ ο δεύτερος είναι απόλυτα συμπληρωματικός προς την αλληλουχία του αλληλομόρφου 1 (π.χ. το αλληλόμορφο που φέρει μετάλλαξη). Κάθε ανιχνευτής έχει σημειωθεί με μια χαρακτηριστική φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο, τη χρωστική αναφοράς (Reporter) όπως π.χ. οι χρωστικές *FAM*[™] ή *VIC*[®], και φέρει μια χρωστική απόσβεσης φθορισμού (Quencher) στο 3' άκρο. Οι ανιχνευτές διαθέτουν επίσης μια ομάδα δέσμευσης στη μικρή αύλακα του DNA (minor groove binder, *MGB*[™]), η οποία επιτρέπει τη χρήση ανιχνευτών μικρότερου μήκους με μεγαλύτερη σταθερότητα και άρα και την ορθότερη διάκριση μεταξύ αλληλομόρφων.

Κατά τη φάση επιμήκυνσης της PCR, ο απολύτως συμπληρωματικός ανιχνευτής διασπάται χάρη στη δράση 5'→3' εξωνουκλεάσης της *Taq*

πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να αποχωρίζεται η χρωστική αναφοράς από τη χρωστική απόσβεσης και άρα να εκλύεται ανιχνεύσιμη ποσότητα φθορισμού. Ο ανιχνευτής που δεν είναι απολύτως συμπληρωματικός θα εκτοπιστεί αντί να διασπαστεί από την Taq πολυμεράση, και συνεπώς δεν θα ελευθερωθεί χρωστική αναφοράς. Το παραγόμενο σήμα φθορισμού (VIC ή FAM) συγκεντρώνεται στο τέλος της PCR (τελικό σημείο) και υποδεικνύει αμέσως την παρουσία της ή των εξεταζόμενων αλληλουχιών στο δείγμα (αλληλόμορφο φυσικού τύπου, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ή και τα δύο) χωρίς να χρειάζονται χρονοβόρα και κοπιαστικά βήματα επεξεργασίας μετά την PCR, τα οποία αυξάνουν επιπλέον τον κίνδυνο μόλυνσης. Η πραγματική ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου δεν προσδιορίζεται.

Το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS χρησιμοποιεί αυτήν την τεχνολογία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Ανάλυση multiplex με ανιχνευτές TaqMan. Το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS χρησιμοποιεί αυτήν την τεχνολογία για να διακρίνει τα αλληλόμορφα.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

Κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen RS		(19)
Αρ. καταλόγου		673123
Αριθμός αντιδράσεων		19
V617F Positive Control* (Δείγμα θετικού ελέγχου V617F)	MP-VF	30 µl
V617F Negative Control† (Δείγμα αρνητικού ελέγχου V617F)	MN-VF	30 µl
Reference Scale M1‡ (Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς M1)	M1-VF	30 µl
Reference Scale M2‡ (Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς M2)	M2-VF	30 µl
Reference Scale M3‡ (Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς M3)	M3-VF	30 µl
Reference Scale M4‡ (Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς M4)	M4-VF	30 µl
Reference Scale M5‡ (Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς M5)	M5-VF	30 µl
Reference Scale M6‡ (Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς M6)	M6-VF	30 µl
Primers and probes mix JAK2 V617F§ (Μείγμα ανιχνευτών και εκκινητών JAK2 V617F)	PPM-VF 10x	145 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaScreen RS Kit Handbook</i> (Εγχειρίδιο κιτ <i>ipsogen JAK2 MutaScreen RS</i> (Αγγλικά))		1

* Δείγμα θετικού ελέγχου: 100% V617F DNA.

† Δείγμα αρνητικού ελέγχου: 100% DNA φυσικού τύπου, 0% V617F DNA.

‡ Διάλυμα για κλίμακα αναφοράς (αραιώσεις γονιδιωµατικού DNA).

§ Μείγμα ανάδρομων και ορθόδρομων εκκινητών ειδικά για το γονίδιο *JAK2*, ανιχνευτή FAM ειδικά για τη V617F και ανιχνευτή VIC για τον φυσικό τύπο.

Σημείωση: Φυγοκεντρήστε σύντομα τα σωληνάρια πριν τη χρήση.

Σημείωση: Για την ανάλυση άγνωστων δειγμάτων με το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS απαιτείται απομόνωση γονιδιωματικού DNA. Τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για την απομόνωση του DNA (π.χ. QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, αρ. κατ. 51304) δεν παρέχονται και η χρήση τους σε συνδυασμό με το κιτ αυτό πρέπει να επικυρωθεί.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών, κατάλληλο για PCR
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1x TE ελεύθερο νουκλεασών, pH 8,0 (π.χ. Thermo Fisher Scientific, αρ. κατ. 12090-015)
- Ρυθμιστικό διάλυμα και *Taq* DNA πολυμεράση: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι τα TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, αρ. κατ. 4304437) και LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, αρ. κατ. 04535286001)
- Αντιδραστήρια για πήκτωμα αγαρόζης 0,8–1% σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5x TBE

Αναλώσιμα

- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας για PCR, ελεύθερα νουκλεασών, με προστασία από τα αερολύματα και με υδρόφοβο φίλτρο
- Σωληνάρια PCR των 0,5 ml ή των 0,2 ml, ελεύθερα RNάσης και DNάσης
- Πάγος

Εξοπλισμός

- Μικροπιπέτες* ειδικά για την PCR (1–10 μl, 10–100 μl, 100–1000 μl)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος* με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0,5 ml (με δυνατότητα περιστροφής στις 10.000 σ.α.λ.)
- Φασματοφωτόμετρο* για ποσοτικό προσδιορισμό του DNA

* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

- Όργανο PCR πραγματικού χρόνου:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή άλλο όργανο Rotor-Gene, LightCycler 2.0, ή 480, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS ή ABI PRISM 7900HT SDS και ανάλογο ειδικό υλικό
- Εξοπλισμός* για ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου σε πήκτωμα

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Διατίθενται στο Διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να εμφανίσετε και να εκτυπώσετε τα SDS για κάθε κιτ της QIAGEN καθώς και για τα περιεχόμενά του.

Τα απόβλητα των δειγμάτων και των αναλύσεων πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς ασφαλείας.

Γενικές προφυλάξεις

Οι αναλύσεις qPCR απαιτούν ορθές εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για πειράματα μοριακής βιολογίας και συμμορφώνεται με τους ισχύοντες κανονισμούς και τα σχετικά πρότυπα.

Το κιτ αυτό προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται με το κιτ αυτό έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση. Η περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων ή η τροποποίηση των χρόνων και των θερμοκρασιών επώασης μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασυνεπή δεδομένα. Το αντιδραστήριο PPM-VF μπορεί να αλλοιωθεί εάν εκτεθεί στο φως. Όλα τα αντιδραστήρια παρασκευάζονται ειδικά για χρήση με την ανάλυση αυτή. Προκειμένου να αποδώσει άριστα η ανάλυση, δεν θα πρέπει να αντικατασταθεί κανένα υλικό.

Προσέξτε ιδιαίτερα προκειμένου να αποφευχθεί:

- Η επιμόλυνση από DNAση, που μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση της μήτρας DNA
- Η επιμόλυνση από μεταφορά DNA ή μείγματος PCR, που μπορεί να δώσει ψευδώς θετικό σήμα

Κατά συνέπεια, συνιστούμε τα εξής.

- Να χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό ελεύθερο νουκλεασών (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπετών, φιαλίδια αντίδρασης) και να φοράτε γάντια όταν εκτελείτε αναλύσεις.
- Να χρησιμοποιείτε νέα ρύγχη πιπέτας, με προστασία από τα αερολύματα, για όλα τα βήματα αναρρόφησης ώστε να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Να προετοιμάσετε κύριο μείγμα προ της PCR χρησιμοποιώντας εξοπλισμό αποκλειστικής χρήσης (πιπέτες, ρύγχη κ.λπ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν θα εισέρχεται καθόλου μήτρα DNA (DNA ή πλασμίδια). Να προσθέτετε τη μήτρα σε χωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε χωριστό δωμάτιο) χρησιμοποιώντας ειδικό εξοπλισμό (πιπέτες, ρύγχη κ.λπ.).

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα κιτ αποστέλλονται μέσα σε ξηρό πάγο και πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -15°C έως -30°C μετά την παραλαβή.

- Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των μειγμάτων εκκινητών και ανιχνευτών στο φως (σωληνάριο PPM-VF).
- Ανακινήστε απαλά και φυγοκεντρήστε τα σωληνάρια πριν τα ανοίξετε.
- Φυλάξτε όλα τα συστατικά του κιτ μέσα στο αρχικό δοχείο τους.

Αυτές οι συνθήκες αποθήκευσης ισχύουν τόσο για τα ανοιγμένα όσο και για τα σφραγισμένα συστατικά. Τα συστατικά που φυλάσσονται υπό συνθήκες διαφορετικές από αυτές που καθορίζονται στις ετικέτες τους ενδέχεται να μη λειτουργήσουν κανονικά και να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Η ημερομηνία λήξης κάθε αντιδραστηρίου αναγράφεται στην ετικέτα του κάθε συστατικού. Υπό τις σωστές συνθήκες αποθήκευσης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Τυχόν αστάθεια του προϊόντος αυτού δεν εκδηλώνεται με ορατές ενδείξεις. Θα πρέπει όμως να αναλύονται δείγματα θετικού και αρνητικού ελέγχου μαζί με τα άγνωστα δείγματα.

Διαδικασία

Παρασκευή δείγματος DNA

Το γονιδιωματικό DNA θα πρέπει να λαμβάνεται από πλήρες αίμα, απομονωμένα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, πολυπύρηννα κύτταρα ή κοκκιοκύτταρα. Σας συνιστούμε να υιοθετήσετε τη χρήση ενός ορισμένου κυτταρικού κλάσματος και μίας μεθόδου απομόνωσης DNA προκειμένου να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Η απομόνωση του DNA μπορεί να γίνει με οποιαδήποτε μέθοδο, αυτοσχέδια ή του εμπορίου.

Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm. Η ποιότητα του DNA πρέπει να αξιολογείται με φασματοφωτομετρία ή με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.

Ο λόγος A_{260}/A_{280} θα πρέπει να είναι 1,7–1,9. Οι μικρότεροι λόγοι συνήθως υποδηλώνουν επιμόλυνση από πρωτεΐνες ή οργανικές χημικές ουσίες. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8–1% αναμένεται να δείξει το απομονωμένο DNA με τη μορφή διακριτής ζώνης μεγέθους 20 kb περίπου. Ένας μικρός βαθμός διάχυσης είναι αποδεκτός.

Το DNA που θα προκύψει αραιώνεται στα 5 ng/μl σε ρυθμιστικό διάλυμα TE. Η αντίδραση qPCR είναι βελτιστοποιημένη για 25 ng απομονωμένου γονιδιωματικού DNA.

Αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων

Για βραχυχρόνια αποθήκευση διάρκειας 24 ωρών το πολύ, συνιστούμε την αποθήκευση των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων στους 2–8°C. Για μακροχρόνια αποθήκευση (άνω των 24 ωρών), συνιστούμε την αποθήκευση στους -20°C.

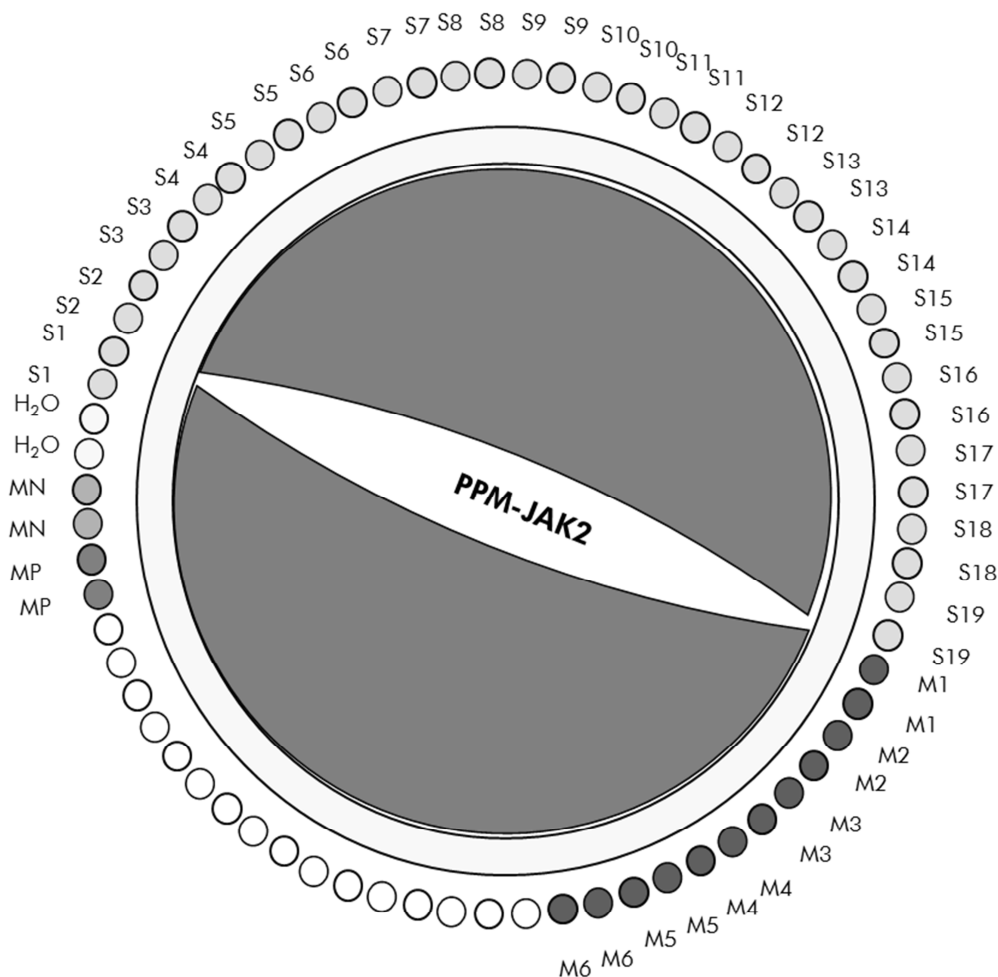
Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα Rotor Gene Q με ρότορα 72 σωληναρίων

Εάν χρησιμοποιείται το όργανο αυτό, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν όπως αναφέρεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αριθμός αντιδράσεων για τα όργανα Rotor Gene Q MDx 5plex HRM ή Rotor Gene Q 5plex HRM με ρότορα 72 σωληναρίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών JAK2 V617F (PPM-VF) (56 αντιδράσεις)	
19 δείγματα DNA	19 x 2 αντιδράσεις
2 δείγματα ελέγχου DNA	2 x 2 αντιδράσεις (MP-VF, MN-VF, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Κλίμακα αναφοράς	6 x 2 αντιδράσεις (M1 έως M6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανα Rotor-Gene Q με ρότορα 72 σωληναρίων



Εικόνα 2. Συνιστώμενη διάταξη ρότορα για ένα πείραμα με το κιτ *ipsogen JAK2 MutaScreen RS*. MP-VF: δείγμα θετικού ελέγχου, MN-VF: δείγμα αρνητικού ελέγχου, M1 έως M6: κλίμακα αναφοράς S: δείγμα DNA, H₂O: δείγμα ελέγχου καθαρού νερού.

Σημείωση: Φροντίστε να τοποθετείτε πάντοτε ένα δείγμα προς ανάλυση στη θέση 1 του ρότορα. Διαφορετικά το όργανο δεν θα εκτελέσει βαθμονόμηση κατά το στάδιο της βαθμονόμησης με αποτέλεσμα να ληφθούν λανθασμένα δεδομένα φθορισμού.

Τοποθετήστε κενά σωληνάκια σε όλες τις άλλες θέσεις.

qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με ρότορα 72 σωληναρίων

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

- 1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.**
Τα συστατικά θα πρέπει να βγουν από τον καταψύκτη περίπου 10 λεπτά προτού ξεκινήσει η διαδικασία.
- 2. Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα όλα τα σωληνάρια (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).**
- 3. Παρασκευάστε το παρακάτω μείγμα qPCR ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.**

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 3 περιγράφει τη μέθοδο μεταφοράς με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 25 μl. Μπορείτε να παρασκευάσετε ένα προμείγμα, ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών. Έχουν συμπεριληφθεί περίσσειες όγκου για να αντισταθμιστεί τυχόν σφάλμα μεταφοράς.

Στα όργανα Rotor-Gene, το kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση 19 δειγμάτων εις διπλούν σε ένα πείραμα (Εικόνα 2).

Πίνακας 3. Παρασκευή μείγματος qPCR

Συστατικό	Αριθμός αντιδράσεων (μl)		Τελική συγκέντρωση
	1	56+1*	
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	712,5	1x
Μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών, 10x	2,5	142,5	1x
Νερό ελεύθερο νουκλεασών, κατάλληλο για PCR	5	285	–
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	–

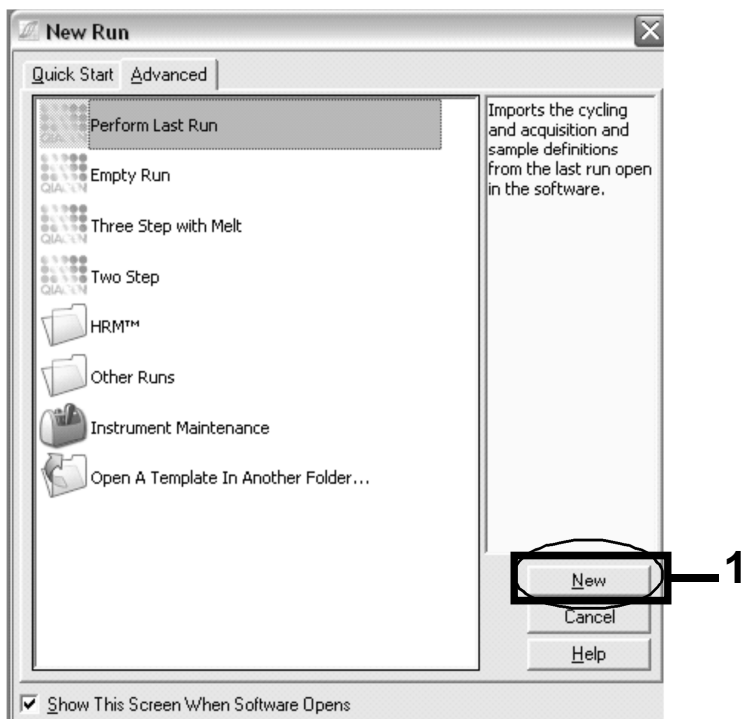
* 19 δείγματα, 1 πείραμα/κιτ.

4. Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα το μείγμα qPCR (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).
5. Μεταφέρετε 20 μl προμείγματος qPCR ανά σωληνάριο.
6. Προσθέστε 5 μl από το υλικό δείγματος DNA ή το δείγμα ελέγχου στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).
7. Αναμείξτε μαλακά με επανειλημμένη αναρρόφηση και έγχυση με την πιπέτα.
8. Κλείστε τα σωληνάρια της PCR. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στον ρότορα 72 σωληναρίων σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Τοποθετήστε κενά σωληνάρια σε όλες τις άλλες θέσεις.
9. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene) είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του ρότορα για να αποφευχθεί τυχόν ακούσιο άνοιγμα των σωληναρίων κατά την εκτέλεση της ανάλυσης. Τοποθετήστε τον ρότορα μέσα στο όργανο Rotor-Gene Q σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
10. Για την ανίχνευση του JAK2 DNA, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων ανάλυσης	Εικόνες 3, 4
Ενίσχυση του DNA	Εικόνα 5
Ρύθμιση της ευαισθησίας των καναλιών φθορισμού	Εικόνα 6

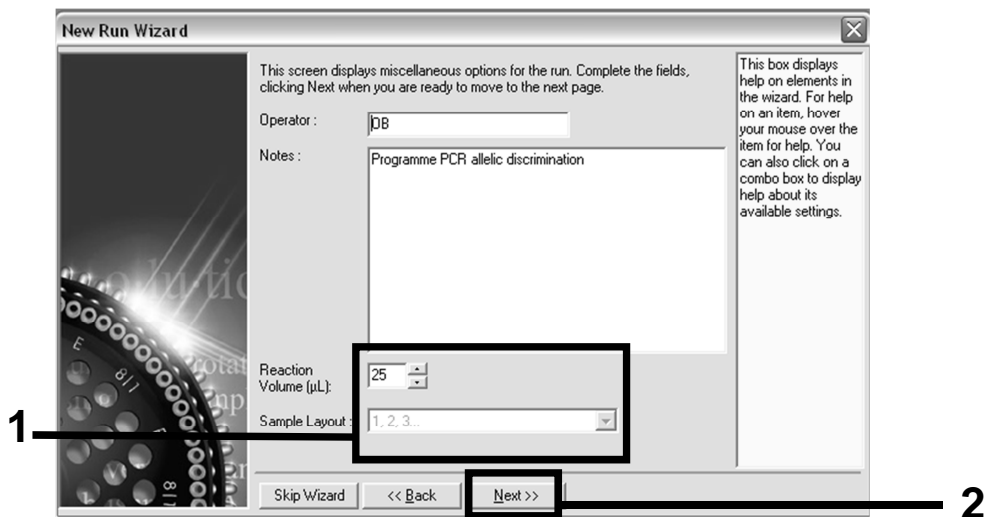
Περισσότερες πληροφορίες για τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene θα βρείτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις εικόνες, οι ρυθμίσεις του λογισμικού περιβάλλονται από ένα έντονο μαύρο πλαίσιο. Περιλαμβάνονται εικόνες των οργάνων Rotor-Gene Q.

11. Εκκινήστε το λογισμικό Rotor-Gene. Στο πλαίσιο διαλόγου «New Run» (Νέα ανάλυση), πατήστε «New» (Νέα).



Εικόνα 3. Πλαίσιο διαλόγου «New Run» (Νέα ανάλυση).

12. Στην οθόνη «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης), ρυθμίστε τον όγκο στα 25 μl και πατήστε «Next» (Επόμενο).



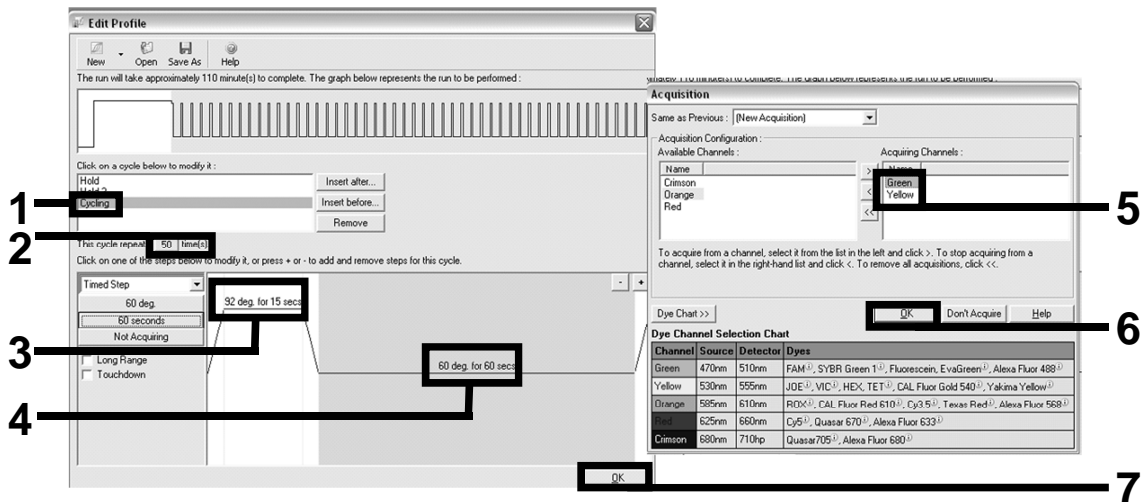
Εικόνα 4. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων μεθόδου.

13. Κάντε κλικ στο κουμπί «Edit Profile» (Επεξεργασία προφίλ) στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης) και προγραμματίστε το προφίλ θερμοκρασίας όπως

δείχνει ο Πίνακας 4 και η Εικόνα 5. Φροντίστε να προσθέσετε το τελευταίο βήμα λήψης στους 60°C, σε κάθε κύκλο, τόσο για το πράσινο (FAM) όσο και για το κίτρινο (VIC) κανάλι.

Πίνακας 4. Προφίλ θερμοκρασίας

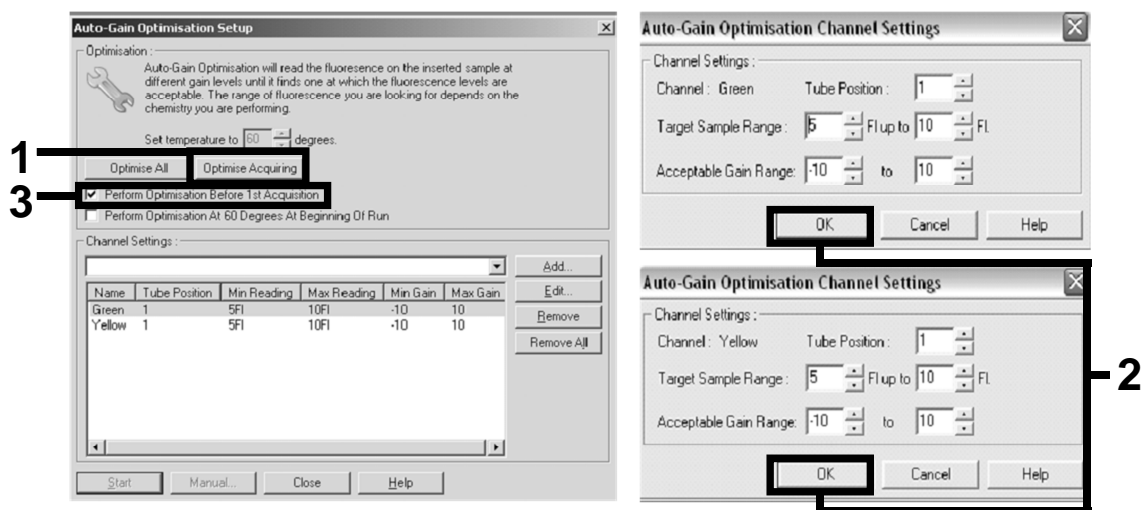
Hold (Διατήρηση)	Θερμοκρασία: 50 βαθμοί Χρόνος: 2 λεπτά
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 95 βαθμοί Χρόνος: 10 λεπτά
Cycling (Κύκλοι)	50 φορές 92 βαθμοί για 15 δευτερόλεπτα 60 βαθμοί για 1 λεπτό, μία φορά Λήψη φθορισμού FAM στο κανάλι Cycling A Green (Κύκλοι A, πράσινο) Λήψη φθορισμού VIC στο κανάλι Cycling A Yellow (Κύκλοι A, κίτρινο)



Εικόνα 5. Ενίσχυση του DNA.

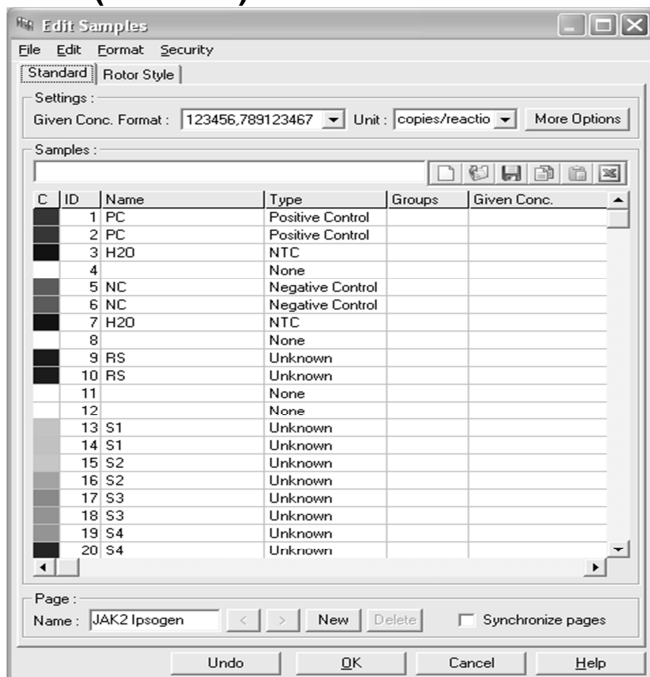
14. Το εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να προσδιοριστεί ανάλογα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Πατήστε το «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου «Auto-Gain Optimisation Setup» (Ρυθμίσεις βελτιστοποίησης αυτόματης απολαβής). Πατήστε «Optimise Acquiring» (Βελτιστοποίηση λήψης) (Εικόνα 6), και κατόπιν «OK» στα πλαίσια διαλόγου «Auto-Gain Optimisation Channel Settings» (Ρυθμίσεις καναλιού βελτιστοποίησης αυτόματης απολαβής) για κάθε κανάλι [Green (πράσινο) και Yellow (κίτρινο),

Εικόνα 6]. Βεβαιωθείτε ότι έχει επιλεγεί το πλαίσιο «Perform Optimisation Before 1st Acquisition» (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν την 1η λήψη) για κάθε κανάλι (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ρύθμιση της ευαισθησίας των καναλιών φθορισμού.

15. Οι τιμές απολαβής που προσδιορίζονται με τη βαθμονόμηση καναλιού αποθηκεύονται αυτόματα και εμφανίζονται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού. Πατήστε «Start Run» (Έναρξη ανάλυσης) για να εκτελέσετε το πρόγραμμα.
16. Μεταβείτε στην οθόνη διαμόρφωσης ρότορα στο λογισμικό Rotor-Gene (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Διαμόρφωση του Rotor-Gene: «Edit Samples» (Επεξεργασία δειγμάτων).

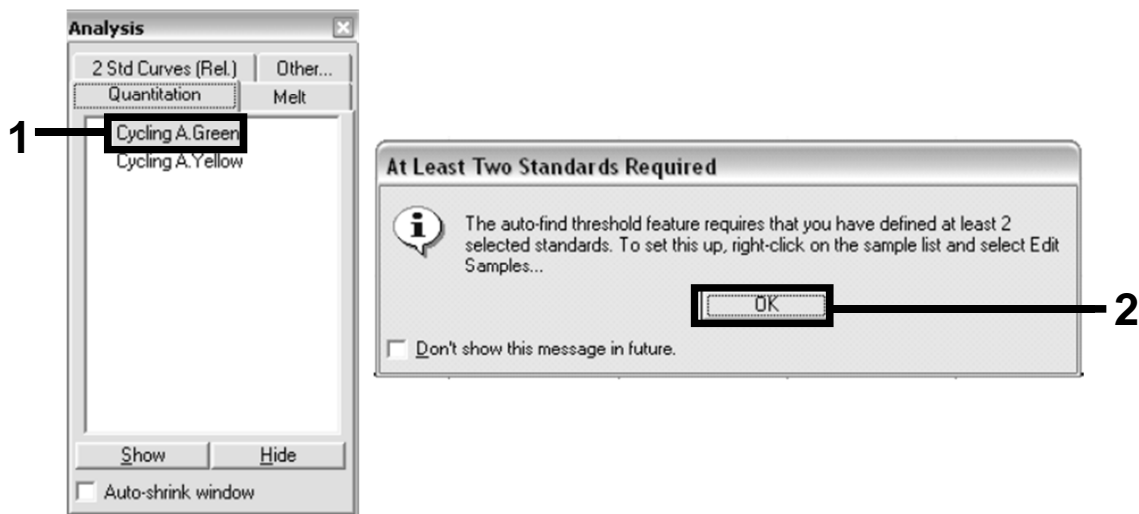
Διαδικασία ανάλυσης τελικού σημείου για τη ρύθμιση του οργάνου Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. Αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα PCR, πατήστε το «Analysis» (Ανάλυση) στη γραμμή εργαλείων (Εικόνα 8).



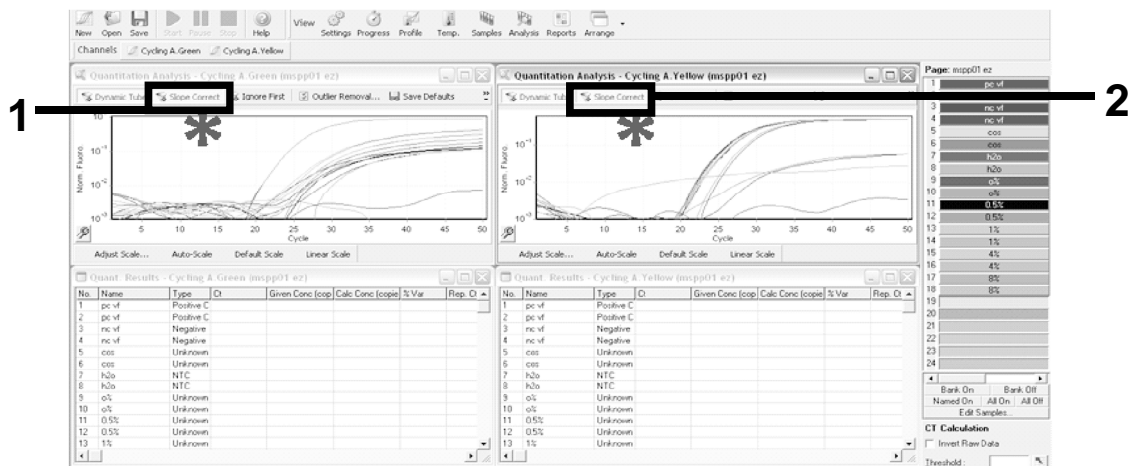
Εικόνα 8. Analysis (Ανάλυση).

18. Στο πλαίσιο διαλόγου «Analysis» (Ανάλυση) (Εικόνα 9), κάντε διπλό κλικ στο «Cycling A Green» (Κύκλοι A, Πράσινο) και κατόπιν πατήστε «OK». Επαναλάβετε τα βήματα για το «Cycling A Yellow» (Κύκλοι A, Κίτρινο).



Εικόνα 9. Ποσοτικός προσδιορισμός: «Cycling A. Green» (Κύκλοι A, Πράσινο).

19. Θα εμφανιστεί ένα νέο παράθυρο (Εικόνα 10). Πατήστε «Slope Correct» (Σωστή κλίση) και στα δύο τμήματα οθόνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10. Ρύθμιση «Slope Correct» (Σωστή κλίση).

20. Για να εξαγάγετε τα δεδομένα, αποθηκεύστε τα σε μορφή φύλλου Excel®. Πατήστε OK, ονομάστε το αρχείο εξαγωγής και αποθηκεύστε το αρχείο κειμένου (*.txt).

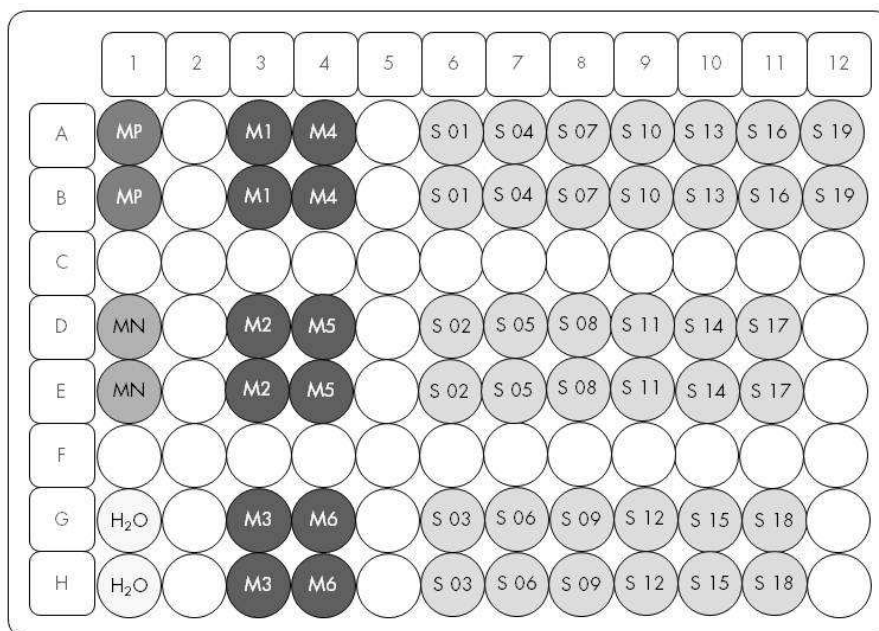
Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM

Εάν χρησιμοποιείται εξοπλισμός qPCR με πλάκες των 96 βυθισμάτων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν όπως αναφέρεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αριθμός αντιδράσεων για τα όργανα Applied Biosystems 7300 και 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ή ABI PRISM 7900HT

Δείγματα	Αντιδράσεις
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών JAK2 V617F (PPM-VF) (56 αντιδράσεις)	
19 δείγματα DNA	19 x 2 αντιδράσεις
2 δείγματα ελέγχου DNA	2 x 2 αντιδράσεις (MP-VF, MN-VF, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Κλίμακα αναφοράς	6 x 2 αντιδράσεις (M1 έως M6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων στα όργανα Applied Biosystems 7300 και 7500, ABI PRISM 7000 και 7700 ή ABI PRISM 7900HT



Εικόνα 12. Συνιστώμενη διάταξη πλάκας για ένα πείραμα με το κιτ *ipsogen JAK2 MutaScreen RS*. MP: δείγμα θετικού ελέγχου, MN: δείγμα αρνητικού ελέγχου, M1 έως M6: διάλυμα για κλίμακα αναφοράς S: δείγμα DNA, H₂O: δείγμα ελέγχου καθαρού νερού.

qPCR στα όργανα Applied Biosystems 7300 και 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ή ABI PRISM 7900HT

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

- 1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.**

Τα συστατικά θα πρέπει να βγουν από τον καταψύκτη περίπου 10 λεπτά προτού ξεκινήσει η διαδικασία.

- 2. Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα όλα τα σωληνάρια (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).**
- 3. Παρασκευάστε το παρακάτω μείγμα qPCR ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.**

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 6 περιγράφει τη μέθοδο μεταφοράς με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 25 μl. Μπορείτε να παρασκευάσετε

ένα προμείγμα, ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών. Έχουν συμπεριληφθεί περίσσειες όγκου για να αντισταθμιστεί τυχόν σφάλμα μεταφοράς.

Στα όργανα Applied Biosystems 7300 και 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ή ABI PRISM 7900HT, το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση 19 δειγμάτων εις διπλούν σε ένα πείραμα (Εικόνα 12).

Πίνακας 6. Παρασκευή μείγματος qPCR

Συστατικό	Αριθμός αντιδράσεων (μl)		Τελική συγκέντρωση
	1	56+1*	
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	712,5	1x
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών, 10x	2,5	142,5	1x
Νερό ελεύθερο νουκλεασών, κατάλληλο για PCR	5	285	–
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	–

* 19 δείγματα, 1 πείραμα/κιτ.

4. Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα το μείγμα qPCR (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).
5. Μεταφέρετε 20 μl προμείγματος qPCR ανά βύθισμα.
6. Προσθέστε 5 μl από το υλικό δείγματος DNA ή το δείγμα ελέγχου στο αντίστοιχο βύθισμα (συνολικός όγκος 25 μl).
7. Αναμείξτε μαλακά με επανειλημμένη αναρρόφηση και έγχυση με την πιπέτα.
8. Κλείστε την πλάκα και φυγοκεντρήστε σύντομα (300 x g επί 10 δευτερόλεπτα περίπου).
9. Τοποθετήστε την πλάκα στον θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
10. Προγραμματίστε τον θερμοκυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικών κύκλων που φαίνεται στον Πίνακα 7 και ξεκινήστε την εκτέλεση της ανάλυσης.

Πίνακας 7. Προφίλ θερμοκρασίας για όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM

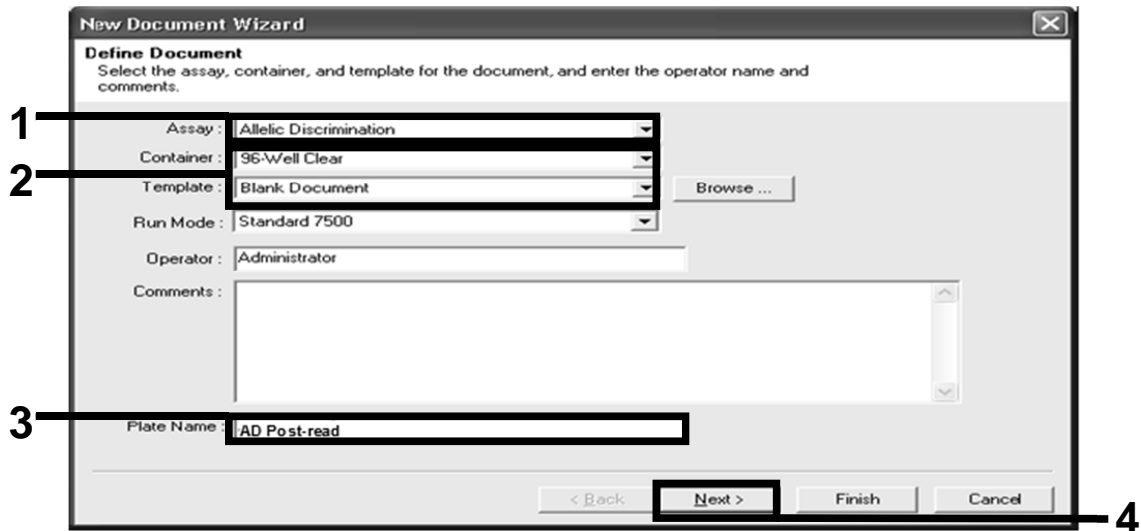
Hold (Διατήρηση)	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Cycling (Κύκλοι)	50 φορές 92°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό

Διαδικασία ανάλυσης αφαίρεσης φθορισμού αναφοράς για όργανα Applied Biosystems και ABI PRISM

Για λεπτομέρειες σχετικά με τον προγραμματισμό στα όργανα Applied Biosystems 7300 και 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ή ABI PRISM 7900HT ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Για καλύτερη επισκόπηση, οι ρυθμίσεις του λογισμικού περιβάλλονται από ένα έντονο μαύρο πλαίσιο.

11. Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, επιλέξτε «**Start/Program**» (Έναρξη/Πρόγραμμα) και κατόπιν «**File/New**» (Αρχείο/Νέο).
12. Στο πλαίσιο διαλόγου «**New Document Wizard**» (Οδηγός νέου εγγράφου) πατήστε στον αναπτυσσόμενο κατάλογο «**Assay**» (Μέθοδος ανάλυσης) και επιλέξτε «**Allelic Discrimination**» (Διάκριση αλληλομόρφων) (Εικόνα 13).

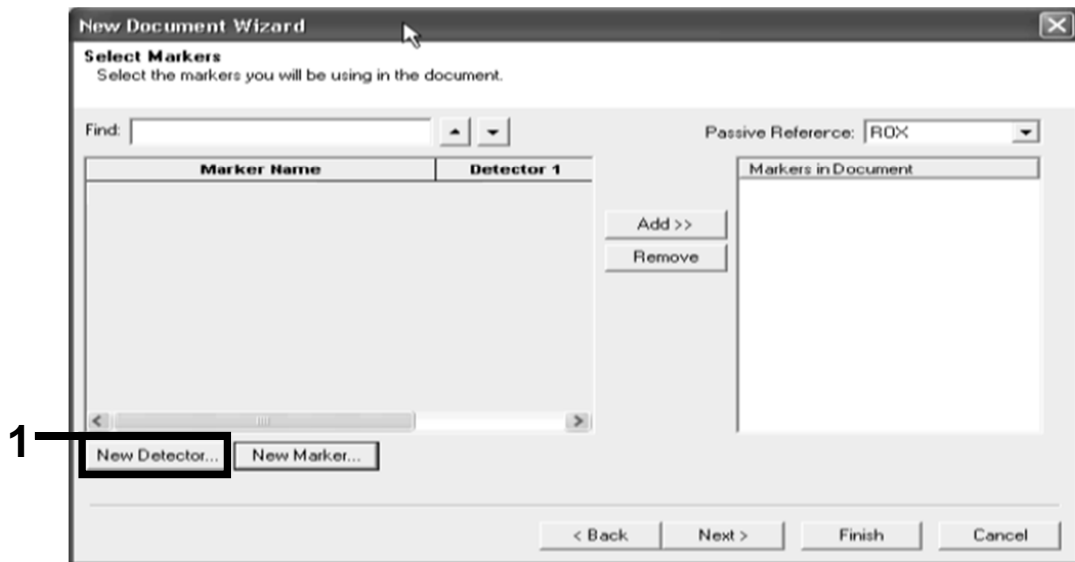
13. Αποδεχθείτε τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις για τα πεδία «Container» (Δοχείο) και «Template» (Μήτρα) [«96-Well Clear» (Διαφανής 96 βυθισμάτων) και «Blank Document» (Κενό έγγραφο), Εικόνα 13]. Στο πεδίο «Plate Name» (Όνομα πλάκας), πληκτρολογήστε *AD Post-read* (Διάκριση αλληλομόρφων - Αφαίρεση φθορισμού αναφοράς) (Εικόνα 13) και κατόπιν πατήστε «Next>» (Επόμενο) για να μεταβείτε στο πλαίσιο διαλόγου «Select Markers» (Επιλογή δεικτών).



Εικόνα 13. Προρρυθμίσεις για τη δημιουργία νέας αφαίρεσης φθορισμού αναφοράς [New Document Wizard (Οδηγός νέου εγγράφου)].

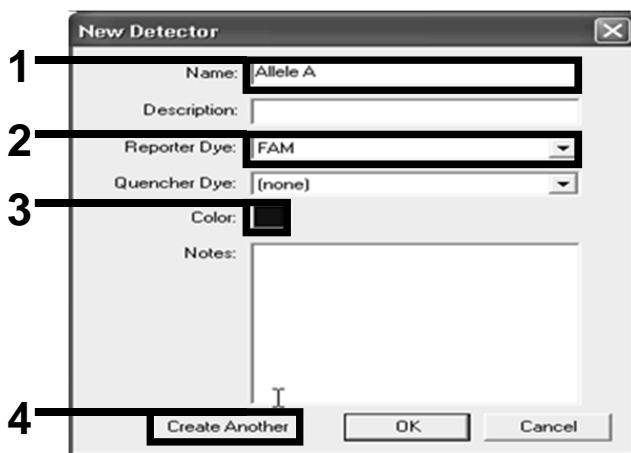
14. Εάν το τμήμα οθόνης «Markers in Document» (Δείκτες στο έγγραφο) στο πλαίσιο διαλόγου «Select Markers» (Επιλογή δεικτών) περιλαμβάνει έναν κατάλληλο δείκτη για την εφαρμογή σας, προχωρήστε στο βήμα 18. Διαφορετικά προχωρήστε στο βήμα 15.

15. Δημιουργήστε ανιχνευτές και δείκτες ως εξής. Πατήστε το «New Detector» (Νέος ανιχνευτής) (Εικόνα 14).



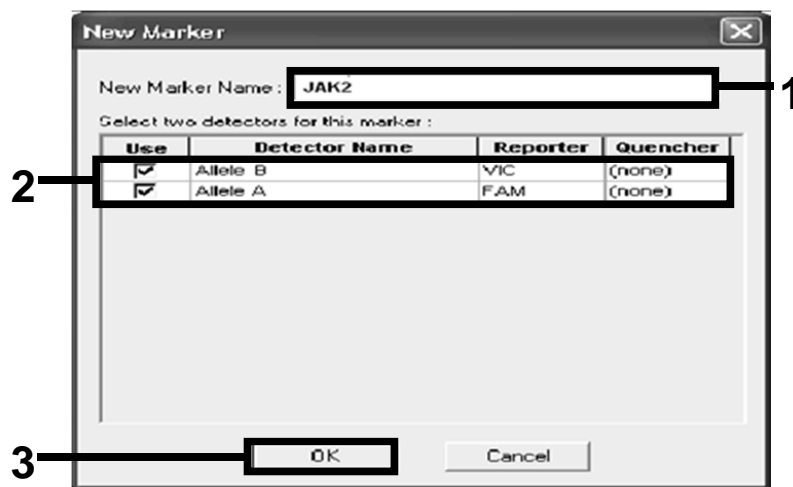
Εικόνα 14. Το τμήμα «Markers in Document» (Δείκτες στο έγγραφο) δεν περιέχει κατάλληλο δείκτη για την εφαρμογή σας.

16. Στο πλαίσιο διαλόγου «New Detector» (Νέος ανιχνευτής) πληκτρολογήστε *Allele A* (Αλληλόμορφο A) στο πεδίο «Name» (Όνομα) (Εικόνα 15). Αφήστε το πεδίο «Reporter Dye» (Χρωστική αναφοράς) στην τιμή «FAM». Πατήστε το κουμπί «Color» (Χρώμα), επιλέξτε ένα χρώμα και κατόπιν πατήστε «OK» (Εικόνα 15). Πατήστε το «Create Another» (Δημιουργία επόμενου) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Δημιουργία ανιχνευτών.

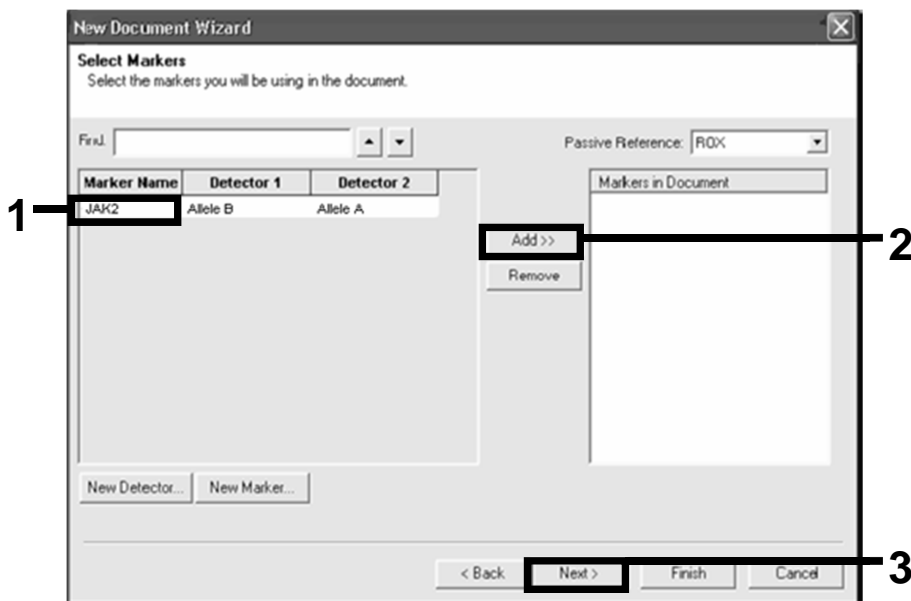
17. Στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου «New Detector» (Νέος ανιχνευτής) πληκτρολογήστε *Allele B* (Αλληλόμορφο Β) στο πεδίο «Name» (Όνομα). Επιλέξτε «VIC» στο πεδίο «Reporter Dye» (Χρωστική αναφοράς). Πατήστε το κουμπί «Color» (Χρώμα), επιλέξτε ένα χρώμα και κατόπιν πατήστε «OK».
18. Πατήστε το «New Marker» (Νέος δείκτης) στο πλαίσιο διαλόγου «Select Markers» (Επιλογή δεικτών) (βλ. Εικόνα 14).
19. Στο πλαίσιο διαλόγου «New Marker» πληκτρολογήστε *JAK2* στο πεδίο «New Marker Name» (Όνομα νέου δείκτη) (Εικόνα 16). Επιλέξτε τους ανιχνευτές «Allele A» και «Allele B» (Αλληλόμορφο Α και Αλληλόμορφο Β) που δημιουργήθηκαν στα βήματα 16 και 17 (ή είχαν οριστεί ήδη) και πατήστε «OK» (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Δημιουργία δεικτών.

20. Στο πλαίσιο διαλόγου «Select Markers» (Επιλογή δεικτών), επιλέξτε το «JAK2» που δημιουργήσατε προηγουμένως, ή κάποιον προκαθορισμένο δείκτη, και κατόπιν πατήστε «Add>>» (Προσθήκη) (Εικόνα 17).

Σημείωση: Για να αφαιρέσετε έναν δείκτη, επιλέξτε τον και κατόπιν πατήστε «Remove» (Αφαίρεση).

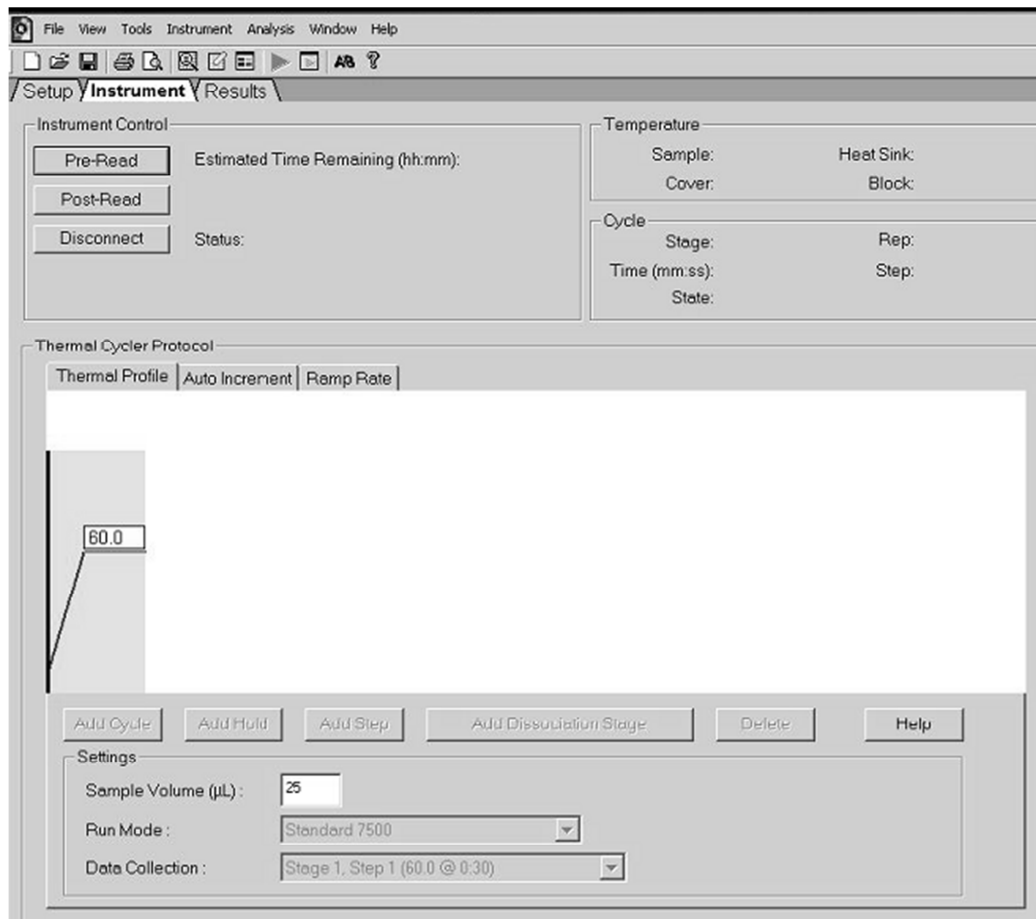


Εικόνα 17. Επιλογή δεικτών.

21. Πατήστε «Next>» (Επόμενο).
22. Στο πλαίσιο διαλόγου «Setup Sample Plate» (Διάταξη πλάκας δειγμάτων), κάντε κλικ και σύρετε για να επιλέξετε τον δείκτη για τα βυθίσματα που περιέχουν δείγματα. Πατήστε «Finish» (Τέλος).
23. Επιλέξτε την καρτέλα «Instrument» (Όργανο) και αλλάξτε τον όγκο του δείγματος σε 25 μλ.
24. Επιλέξτε «File/Save» (Αρχείο/Αποθήκευση) και κατόπιν πατήστε «Save» (Αποθήκευση) για να διατηρήσετε το όνομα που δώσατε όταν δημιουργήσατε την πλάκα.
25. Φορτώστε την πλάκα αντίδρασης στο όργανο σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

26. Ξεκινήστε την εκτέλεση αφαίρεσης φθορισμού αναφοράς. Πατήστε «Post-Read» (Αφαίρεση φθορισμού αναφοράς).

Το όργανο θα εκτελέσει 1 κύκλο επί 60 δευτερόλεπτα στους 60°C. Κατά την εκτέλεση αυτή, το όργανο συλλέγει τον φθορισμό FAM και VIC σε κάθε βύθισμα (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Εκτέλεση αφαίρεσης φθορισμού αναφοράς.

27. Επιλέξτε «File/Export» (Αρχείο/Εξαγωγή) και κατόπιν πατήστε «Results» (Αποτελέσματα) για να εξαγάγετε τα αποτελέσματα σε αρχείο Excel. Τα αποτελέσματα θα προβληθούν όπως φαίνεται στην Εικόνα 19.

		VIC, δείγμα 1						FAM, δείγμα 1				
12	Comments:											
13	SDS v1.2											
14												
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

Εικόνα 19. Παράδειγμα αποτελεσμάτων, σε αρχείο Excel.

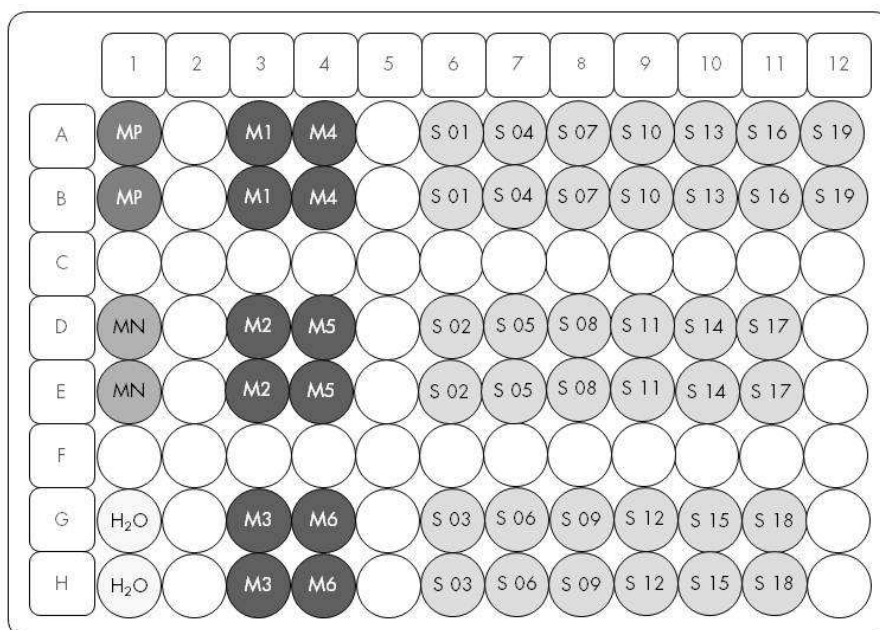
Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο LightCycler 480

Εάν χρησιμοποιείται εξοπλισμός qPCR με πλάκες των 96 βυθισμάτων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν όπως αναφέρεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο LightCycler 480

Δείγματα	Αντιδράσεις
Μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών JAK2 V617F (PPM-VF) (56 αντιδράσεις)	
19 δείγματα DNA	19 x 2 αντιδράσεις
2 δείγματα ελέγχου DNA	2 x 2 αντιδράσεις (MP-VF, MN-VF, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Κλίμακα αναφοράς	6 x 2 αντιδράσεις (M1 έως M6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων στο όργανο LightCycler 480



Εικόνα 20. Συνιστώμενη διάταξη πλάκας για ένα πείραμα με το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS. MP: δείγμα θετικού ελέγχου, MN: δείγμα αρνητικού ελέγχου, M1 έως M6: διάλυμα για κλίμακα αναφοράς S: δείγμα DNA, H₂O: δείγμα ελέγχου καθαρού νερού.

qPCR στο όργανο LightCycler 480

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

- 1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.**

Τα συστατικά θα πρέπει να βγουν από τον καταψύκτη περίπου 10 λεπτά προτού ξεκινήσει η διαδικασία.

- 2. Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα όλα τα σωληνάρια (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).**

- 3. Παρασκευάστε το παρακάτω μείγμα qPCR ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.**

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 9 περιγράφει τη μέθοδο μεταφοράς με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 25 μ l. Μπορείτε να παρασκευάσετε ένα προμείγμα, ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών. Έχουν συμπεριληφθεί περισσειες όγκου για να αντισταθμιστεί τυχόν σφάλμα μεταφοράς.

Στα όργανα Applied Biosystems 7300 και 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ή ABI PRISM 7900HT, το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση 19 δειγμάτων εις διπλούν σε ένα πείραμα (Εικόνα 20).

Πίνακας 9. Παρασκευή μείγματος qPCR

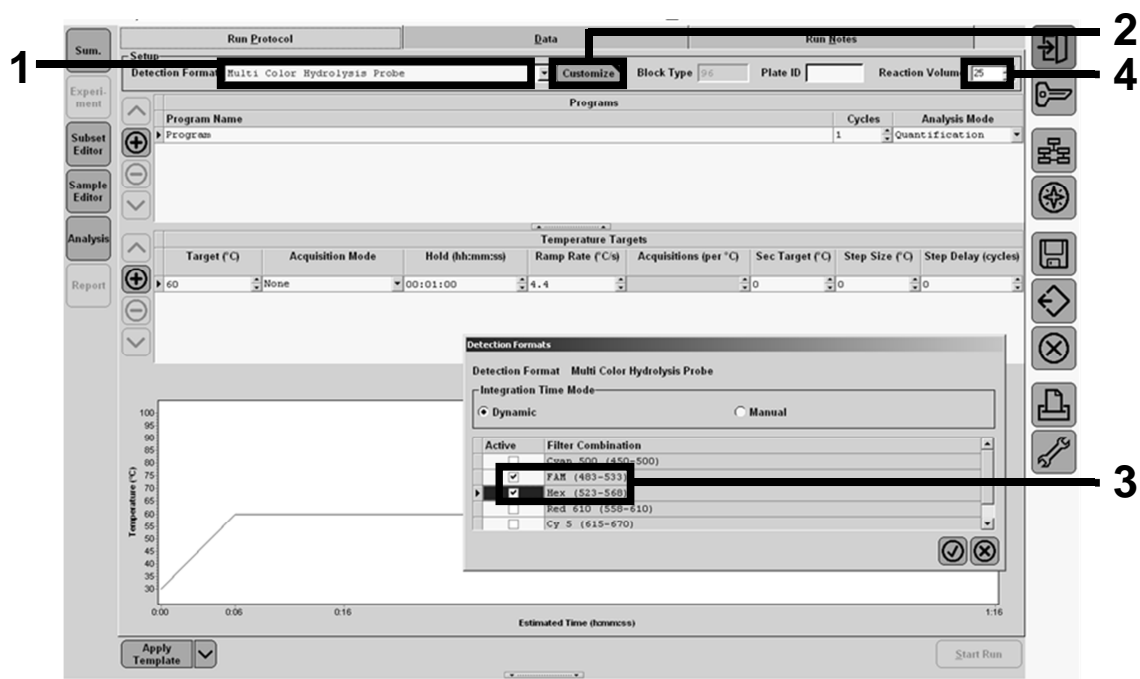
Συστατικό	Αριθμός αντιδράσεων (μ l)		Τελική συγκέντρωση
	1	56+1*	
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	712,5	1x
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών, 10x	2,5	142,5	1x
Νερό ελεύθερο νουκλεασών, κατάλληλο για PCR	5	285	—
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	—
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	—

* 19 δείγματα, 1 πείραμα/κιτ.

4. **Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα το μείγμα qPCR (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).**
5. **Μεταφέρετε 20 μl προμείγματος qPCR ανά βύθισμα.**
6. **Προσθέστε 5 μl από το υλικό δείγματος DNA ή το δείγμα ελέγχου στο αντίστοιχο βύθισμα (συνολικός όγκος 25 μl).**
7. **Αναμείξτε μαλακά με επανειλημμένη αναρρόφηση και έγχυση με την πιπέτα.**
8. **Κλείστε την πλάκα και φυγοκεντρήστε σύντομα (300 x g επί 10 δευτερόλεπτα περίπου).**
9. **Τοποθετήστε την πλάκα στον θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.**
10. **Από την αρχική σελίδα, επιλέξτε «New Experiment» (Νέο πείραμα).**
11. **Για το LightCycler 480 I, εκτελέστε το βήμα 11α. Για το LightCycler 480 II, εκτελέστε το βήμα 11β.**

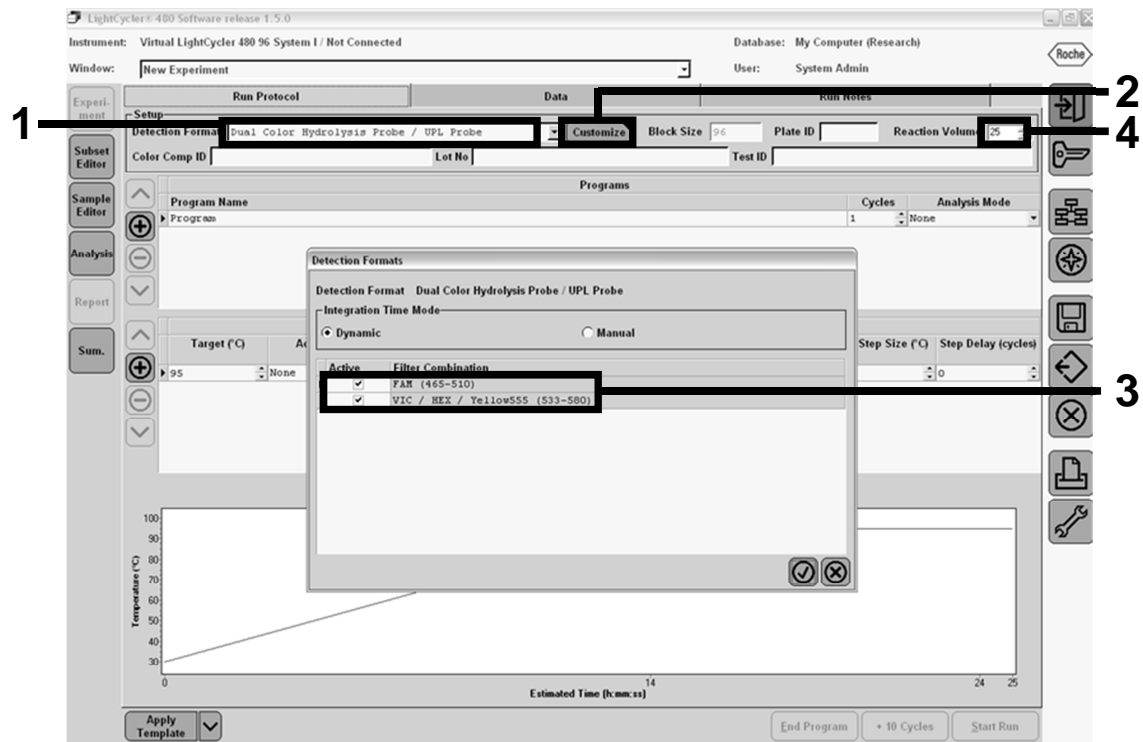
Για λεπτομέρειες σχετικά με τον προγραμματισμό στο όργανο Light-Cycler 480, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Για καλύτερη επισκόπηση, οι ρυθμίσεις του λογισμικού περιβάλλονται από ένα έντονο μαύρο πλαίσιο.

11α. LightCycler 480 I: Επιλέξτε «Multi Color Hydrolysis Probe» (Πολυχρωματικός ανιχνευτής υδρόλυσης), πατήστε «Customize» (Προσαρμογή) και κατόπιν βεβαιωθείτε ότι έχουν επιλεγεί τα κανάλια «FAM (483–533)» και «Hex (533–568)» (δηλαδή VIC) (Εικόνα 21). Ρυθμίστε τον όγκο αντίδρασης σε 25 µl (Εικόνα 21) και προχωρήστε στο βήμα 12.



Εικόνα 21. LightCycler 480 I: Ρύθμιση της μορφής ανίχνευσης.

11β. LightCycler 480 II: Επιλέξτε «Dual Color Hydrolysis Probe» (Διχρωματικός ανιχνευτής υδρόλυσης), πατήστε «Customize» (Προσαρμογή) και κατόπιν βεβαιωθείτε ότι έχουν επιλεγεί τα κανάλια «FAM (465-510)» και «VIC / HEX / (533-580)» (Εικόνα 22). Ρυθμίστε τον όγκο αντίδρασης σε 25 µl (Εικόνα 22) και προχωρήστε στο βήμα 12.



Εικόνα 22. LightCycler 480 II: Ρύθμιση της μορφής ανίχνευσης.

12. Προγραμματίστε τον θερμοκυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικών κύκλων που φαίνεται στον Πίνακα 10 και ξεκινήστε την εκτέλεση της ανάλυσης.

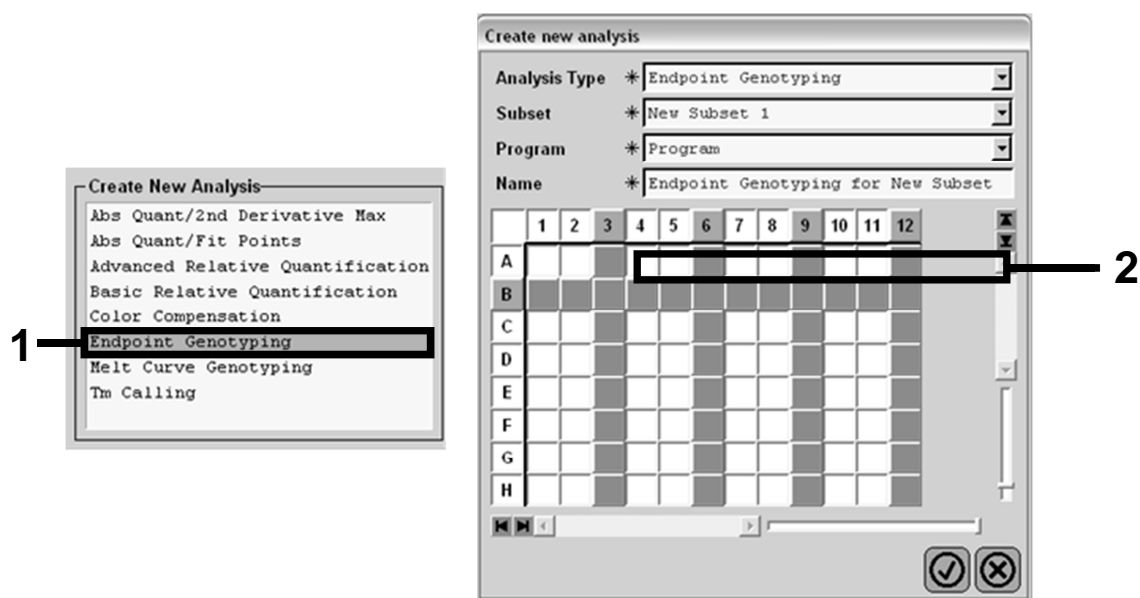
Σημείωση: Κατά την περιγραφή της διάταξης πλάκας στο όργανο, επιλέξτε «Endpt Geno» (Γονοτυπική ανάλυση τελικού σημείου) στο τμήμα «Step 1: select workflow» (Βήμα 1: επιλογή ροής εργασιών).

Πίνακας 10. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

Hold (Διατήρηση)	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Cycling (Κύκλοι)	50 φορές 92°C για 15 δευτερόλεπτα, μία φορά 60°C για 1 λεπτό, μία φορά
Hold 3 (Διατήρηση 3)	60°C για 1 λεπτό, μία φορά

Διαδικασία ανάλυσης τελικού σημείου για το όργανο LightCycler 480

13. Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, πατήστε «Analysis» (Ανάλυση).
14. Στο πλαίσιο διαλόγου «Create New Analysis» (Δημιουργία νέας ανάλυσης), επιλέξτε «Endpoint Genotyping» (Γονοτυπική ανάλυση τελικού σημείου) και κατόπιν επιλέξτε το προς ανάλυση υποσύνολο στο μενού «Subset» (Υποσύνολο) (Εικόνα 23).



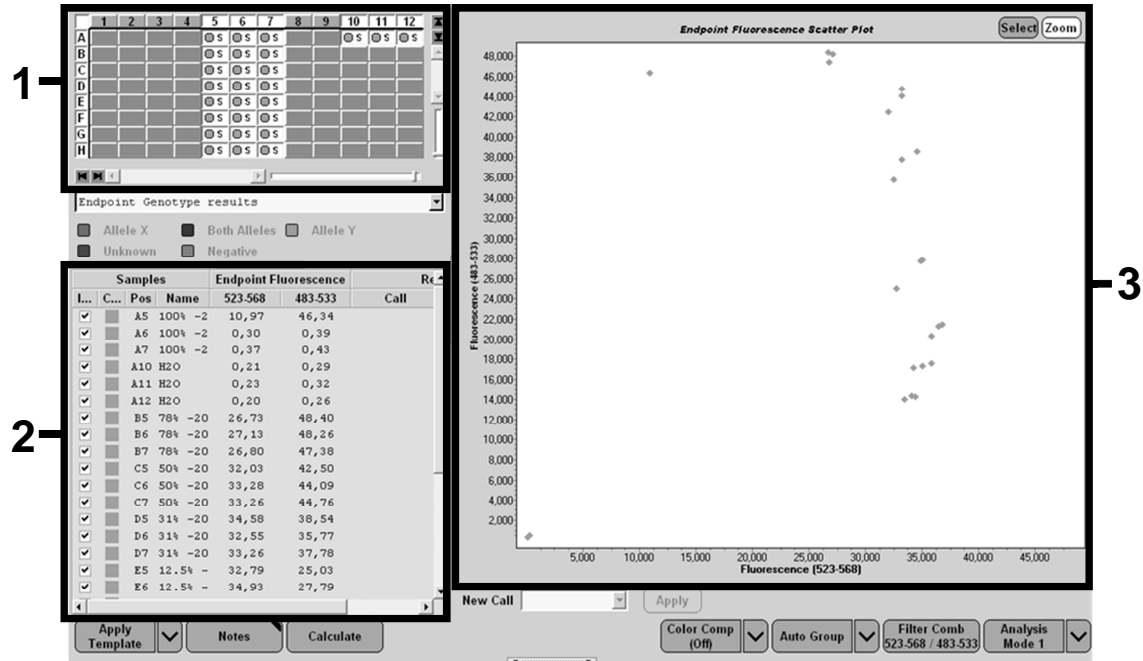
Εικόνα 23. Επιλογή τύπου ανάλυσης και υποσυνόλου προς ανάλυση.

15. Στο επόμενο παράθυρο επιλέξτε φθορισμό «Hex» (δηλαδή VIC) για το «Allele X» (Αλληλόμορφο X) και φθορισμό «FAM» για το «Allele Y» (Αλληλόμορφο Y) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Επιλογή φθορισμού για τα «Allele X» και «Allele Y» (Αλληλόμορφο X και Αλληλόμορφο Y).

16. Το επόμενο παράθυρο (Εικόνα 25) δείχνει τη διάταξη πλάκας (1, επάνω αριστερά), τα αποτελέσματα φθορισμού για κάθε δείγμα (2, κάτω αριστερά) και το διάγραμμα διασποράς με διάκριση αλλομόρφων (3, δεξιά, μέτρηση φθορισμού FAM και VIC στον 50^ο κύκλο PCR).



Εικόνα 25. Περίληψη δεδομένων.

17. Για να εξαγάγετε δεδομένα, κάντε δεξί κλικ στη φόρμα αποτελεσμάτων δειγμάτων και επιλέξτε «Export Table» (Εξαγωγή πίνακα). Το αρχείο θα αποθηκευτεί σε μορφή αρχείου κειμένου (.txt).

18. Για να δείτε και να αναλύσετε τα αποτελέσματα, ανοίξτε το αρχείο με το Excel. Τα αποτελέσματα θα προβληθούν όπως φαίνεται στην Εικόνα 26.

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

Εικόνα 26. Παράδειγμα αποτελεσμάτων, σε αρχείο Excel.

Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο LightCycler 2.0

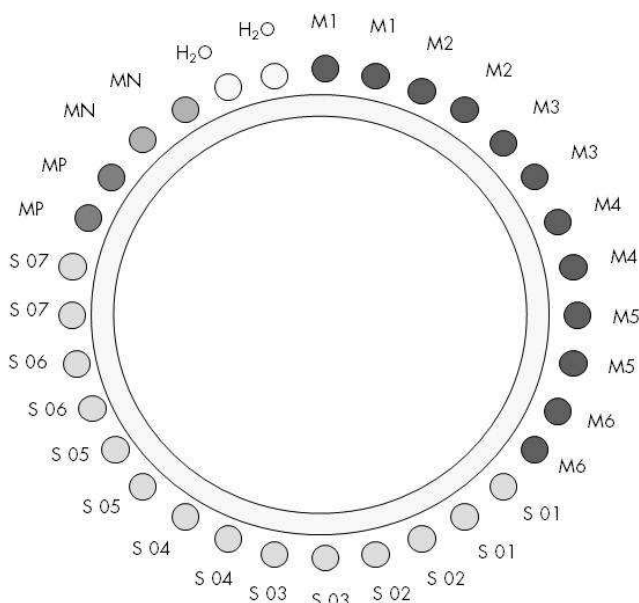
Σημείωση: Λόγω των ιδιαίτερων τεχνολογικών απαιτήσεων, τα πειράματα στο LightCycler 2.0 πρέπει να εκτελούνται με συγκεκριμένα αντιδραστήρια. Συνιστούμε τη χρήση του κύριου μείγματος LightCycler TaqMan Master. Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για να παρασκευάσετε το κύριο μείγμα Master Mix 5x.

Εάν χρησιμοποιείται ρότορας 32 τριχοειδών, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν όπως αναφέρεται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο LightCycler 2.0

Δείγματα	Αντιδράσεις
Μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών JAK2 V617F (PPM-VF) (32 αντιδράσεις)	
7 δείγματα DNA	7 x 2 αντιδράσεις
2 δείγματα ελέγχου DNA	2 x 2 αντιδράσεις (MP-VF, MN-VF, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Κλίμακα αναφοράς	6 x 2 αντιδράσεις (M1 έως M6, καθένα από αυτά εξεταζόμενο εις διπλούν)
Δείγμα ελέγχου καθαρού νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων στο όργανο LightCycler 2.0



Εικόνα 27. Συνιστώμενη διάταξη ρότορα για ένα πείραμα με το κιτ *ipsogen JAK2 MutaScreen RS*. MP: δείγμα θετικού ελέγχου, MN: δείγμα αρνητικού ελέγχου, M1 έως M6: διάλυμα για κλίμακα αναφοράς S: δείγμα DNA, H₂O: δείγμα ελέγχου καθαρού νερού.

qPCR στο όργανο LightCycler 2.0

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα μέσα σε πάγο.

Διαδικασία

- 1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.**
Τα συστατικά θα πρέπει να βγουν από τον καταψύκτη περίπου 10 λεπτά προτού ξεκινήσει η διαδικασία.
- 2. Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα όλα τα σωληνάρια (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).**
- 3. Παρασκευάστε το παρακάτω μείγμα qPCR ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.**

Όλες οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στον τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης.

Ο Πίνακας 12 περιγράφει τη μέθοδο μεταφοράς με πιπέτα για την παρασκευή ενός μείγματος αντιδραστηρίων, με ποσότητες υπολογισμένες για τελικό όγκο διαλύματος αντίδρασης 20 μl. Μπορείτε να παρασκευάσετε ένα προμείγμα, ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών. Έχουν συμπεριληφθεί περίσσειες όγκου για να αντισταθμιστεί τυχόν σφάλμα μεταφοράς.

Στο όργανο LightCycler 2.0, το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση 7 δειγμάτων εις διπλούν σε ένα πείραμα (Εικόνα 27).

Πίνακας 12. Παρασκευή του μίγματος qPCR για το όργανο LightCycler 2.0

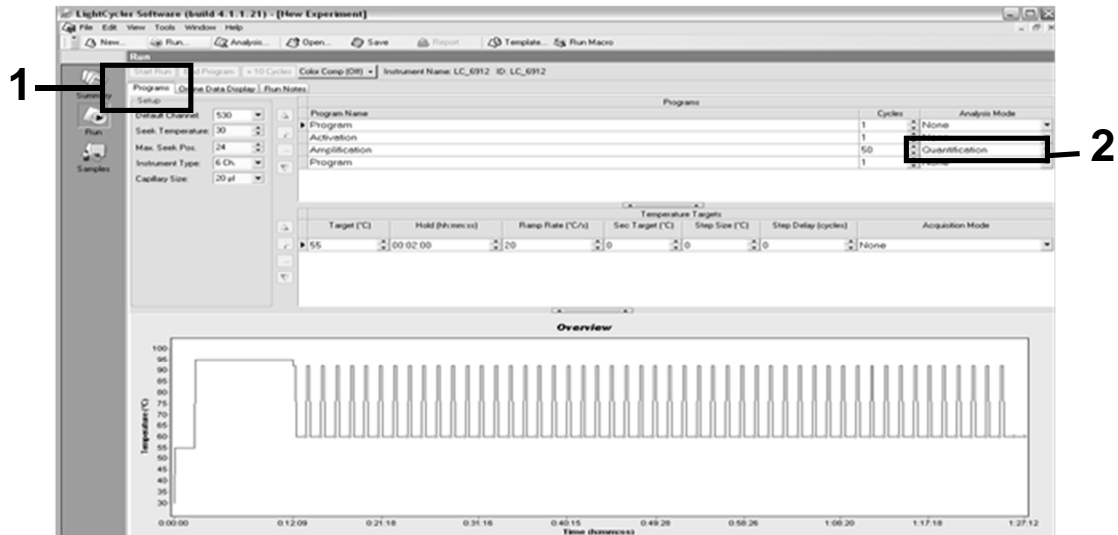
Συστατικό	Αριθμός αντιδράσεων (μl)		Τελική συγκέντρωση
	1	32+1*	
Κύριο μείγμα LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών, 10x	2	66	1x
Νερό ελεύθερο νουκλεασών, κατάλληλο για PCR	9	297	–
Δείγμα (θα προστεθεί στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	20	20 έκαστο	–

* 14 δείγματα, 2 πειράματα/κιτ.

4. **Αναδεύστε σε vortex και φυγοκεντρήστε σύντομα το μείγμα qPCR (περίπου 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου).**
5. **Μεταφέρετε 15 μl προμείγματος qPCR ανά τριχοειδές.**
6. **Προσθέστε 5 μl από το υλικό δείγματος DNA ή τα δείγματα ελέγχου στο αντίστοιχο τριχοειδές (συνολικός όγκος 20 μl).**
7. **Αναμείξτε μαλακά με επανειλημμένη αναρρόφηση και έγχυση με την πιπέτα.**
8. **Τοποθετήστε τα τριχοειδή στον προσαρμογέα που παρέχεται με το όργανο και φυγοκεντρήστε σύντομα (700 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).**
9. **Φορτώστε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.**
10. **Προγραμματίστε τον θερμοκυκλοποιητή (Εικόνα 28) με το πρόγραμμα που αναφέρεται στον Πίνακα 13.**

Για λεπτομέρειες σχετικά με τον προγραμματισμό στο όργανο LightCycler 2.0, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Για καλύτερη επισκόπηση, οι ρυθμίσεις του λογισμικού περιβάλλονται από ένα έντονο μαύρο πλαίσιο.

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι έχει επιλεγεί η ρύθμιση Quantification (Ποσοτικός προσδιορισμός) και μια λήψη φθορισμού FAM και μια λήψη φθορισμού VIC τόσο στο βήμα ενίσχυσης/κύκλων όσο και στο τελευταίο βήμα διατήρησης στους 60°C.



Εικόνα 28. Οθόνη προγραμματισμού για το LightCycler 2.0.

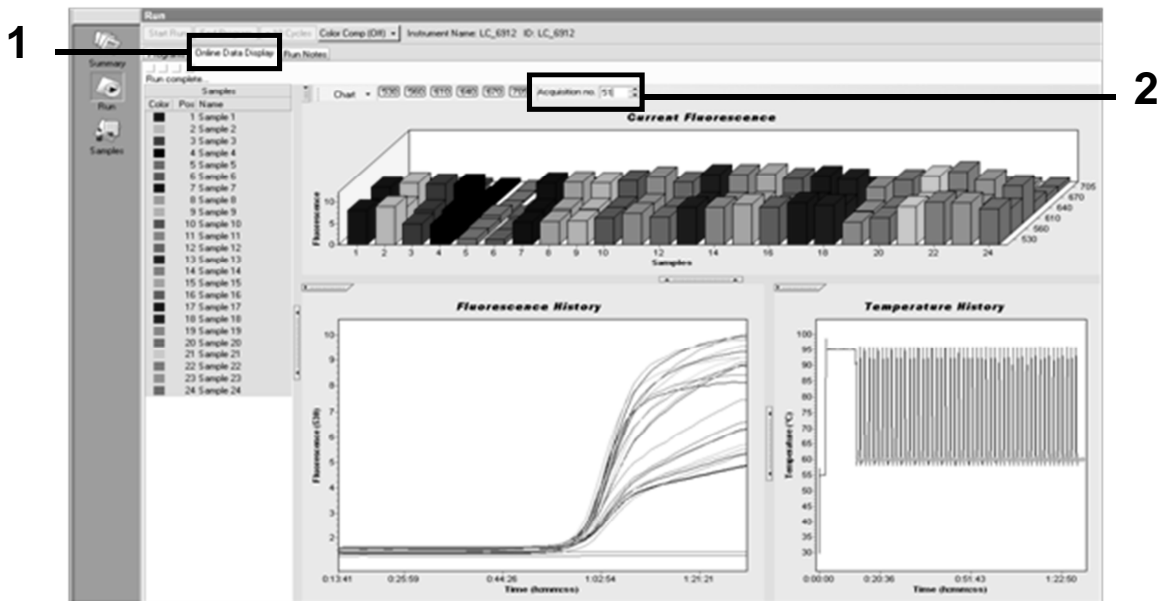
Πίνακας 13. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 2.0

Hold (Διατήρηση)	Θερμοκρασία: 55°C Χρόνος: 2 λεπτά Κλιμάκωση: 20
Hold 2 (Διατήρηση 2)	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά Κλιμάκωση: 20
Cycling (Κύκλοι)	50 φορές 92°C για 15 δευτερόλεπτα, κλιμάκωση: 20 60°C για 1 λεπτό, κλιμάκωση: 20
Hold 3 (Διατήρηση 3)	60°C για 1 λεπτό, κλιμάκωση: 20


Διαδικασία ανάλυσης τελικού σημείου για το όργανο LightCycler 2.0

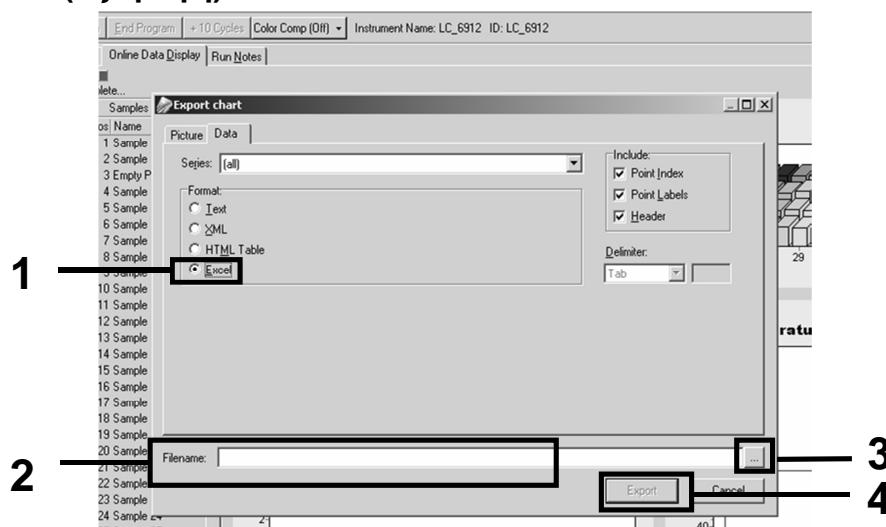
11. Στο τέλος της ενίσχυσης, πατήστε την καρτέλα «Online Data Display» (Προβολή δεδομένων σε σύνδεση) (Εικόνα 29). Ανοίξτε το μενού

προβολής επάνω αριστερά στο παράθυρο «Current Fluorescence» (Τρέχων φθορισμός) και κατόπιν πληκτρολογήστε 51 στο «Acquisition no.» (Αρ. λήψης).



Εικόνα 29. Αποτελέσματα και ιστορικό στην προβολή δεδομένων σε σύνδεση

12. Κάντε δεξί κλικ κοντά στο διάγραμμα «Current Fluorescence» (Τρέχων φθορισμός) και επιλέξτε «Export» (Εξαγωγή).
13. Σημειώστε το πλαίσιο «Excel» στο πλαίσιο διαλόγου «Export chart» (Εξαγωγή διαγράμματος) (Εικόνα 30). Πληκτρολογήστε ένα όνομα στο πεδίο «Filename» (Όνομα αρχείου). Επιλέξτε έναν προορισμό εξαγωγής του αρχείου αποτελεσμάτων με το κουμπί . Πατήστε «Export» (Εξαγωγή).



Εικόνα 30. Επιλογή μορφής εξαγωγής και προορισμός αρχείου δεδομένων

14. Για να δείτε και να αναλύσετε τα αποτελέσματα, ανοίξτε το αρχείο με το Excel.
 Τα αποτελέσματα του LightCycler 2.0 θα εμφανιστούν όπως φαίνεται εδώ.

Θέση

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	
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

Εικόνα 31. Παράδειγμα αποτελεσμάτων LightCycler 2.0, σε αρχείο Excel.

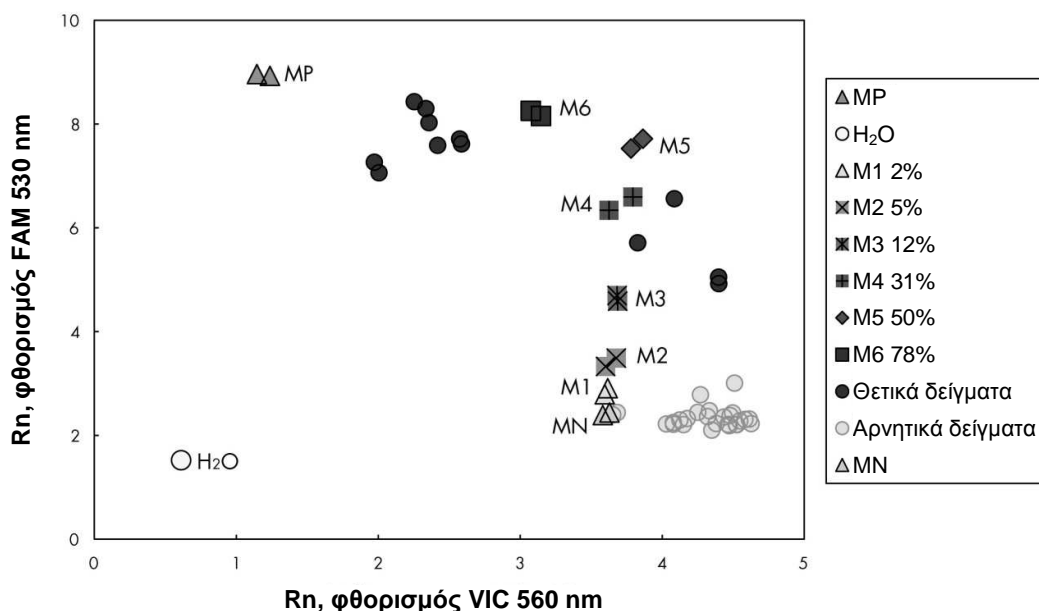
Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Λάβετε ένα αρχείο κατάλληλο για τη λήψη των εξαγόμενων δεδομένων για όλα τα όργανα: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή άλλο όργανο Rotor-Gene, LightCycler 2.0 ή 480, Applied Biosystems 7300 ή 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS ή 7900HT SDS, και ελέγξτε τα επίπεδα φθορισμού (θα πρέπει να συμφωνούν μεταξύ των επαναλήψεων).

Σχεδιάστε μια γραφική αναπαράσταση (διάγραμμα διασποράς) των δεδομένων φθορισμού. Ο άξονας x είναι ο φθορισμός VIC και ο άξονας y είναι ο φθορισμός FAM.

Γραφική αναπαράσταση και κριτήρια ελέγχου ποιότητας

Ένα παράδειγμα διαγράμματος διασποράς φαίνεται στην Εικόνα 32.



Εικόνα 32. Διάγραμμα διασποράς ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος διάκρισης αλληλομόρφων. Όργανα: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM και LightCycler 480.

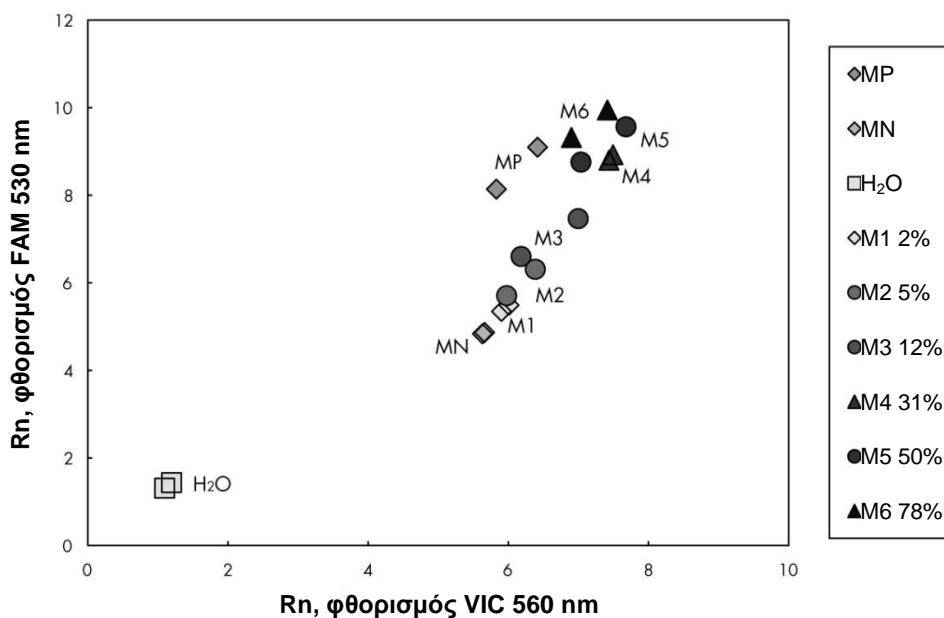
Τα δείγματα θα πρέπει να βρίσκονται πάνω στο τόξο που συνδέει τα δείγματα αρνητικού ελέγχου (MN) με τα δείγματα θετικού ελέγχου (MP).

Η λανθασμένη θέση ενός δείγματος ελέγχου ίσως υποδεικνύει πειραματικό σφάλμα.

- Τα δείγματα θετικού ελέγχου θα πρέπει να βρίσκονται επάνω αριστερά.
- Τα δείγματα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να βρίσκονται κάτω δεξιά.
 - Η κακή θέση ενός δείγματος αρνητικού ελέγχου ίσως υποδηλώνει επιμόλυνση.

- Το δείγμα ορίου αποκοπής (M1 στην κλίμακα αναφοράς) πρέπει να εμφανίζεται πάνω από τα δείγματα αρνητικού ελέγχου.
- Τα δείγματα ελέγχου καθαρού νερού θα πρέπει να βρίσκονται κάτω αριστερά.
 - Η κακή θέση ενός δείγματος ελέγχου νερού (ψηλότερα από το MN για τη μέτρηση FAM ή ψηλότερα από το MP για τη μέτρηση VIC) ίσως υποδηλώνει επιμόλυνση.

Σημείωση: Η θέση των δειγμάτων ελέγχου ίσως διαφέρει κατά την ανάλυση των δεδομένων με το όργανο LightCycler 2.0 (βλ. Εικόνα 33). Τα δείγματα ελέγχου νερού θα πρέπει και πάλι να βρίσκονται κάτω αριστερά.



Εικόνα 33. Διάγραμμα διασποράς ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος διάκρισης αλληλομόρφων. Όργανο: LightCycler 2.0.

Υπολογισμός κανονικοποιημένου λόγου FAM/VIC και γονοτυπική ανάλυση

Υπολογίστε τους λόγους FAM/VIC για όλα τα δείγματα. Υπολογίστε τους λόγους FAM/VIC για το δείγμα θετικού ελέγχου (MP), το δείγμα ορίου αποκοπής (M1), το δείγμα αρνητικού ελέγχου (MN) και την κλίμακα αναφοράς (M2 έως M6). Οι λόγοι πρέπει να συμφωνούν μεταξύ των επαναλήψεων. Υπολογίστε τον μέσο λόγο όλων των επαναλήψεων.

Υπολογίστε τον κανονικοποιημένο λόγο (κ-λόγος) για το δείγμα ορίου αποκοπής (M1) και για όλα τα δείγματα:

$$\text{κ-λόγος}_{\text{δείγμα}} = \frac{\text{λόγος}_{\text{δείγμα}}}{\text{λόγος}_{\text{MN}}}$$

Σημείωση: Η γκριζα ζώνη (ΓΖ) μιας εξέτασης ορίζεται ως η περιοχή τιμών στην οποία η ικανότητα διάκρισης είναι ανεπαρκής. Οι τιμές μέσα στην γκριζα ζώνη υποδηλώνουν ότι ο συγκεκριμένος δείκτης δεν μπορεί να χαρακτηριστεί παρών ή απών. Η γκριζα ζώνη πρέπει να υπολογίζεται για κάθε πείραμα.

Υπολογίστε την γκριζα ζώνη (περιοχή αβεβαιότητας) γύρω από τον κανονικοποιημένο λόγο του δείγματος ορίου αποκοπής (M1) (κ-λόγος_{M1}):

$$\text{ΓΖ: } [(\text{κ-λόγος}_{M1} \times 0,94), (\text{κ-λόγος}_{M1} \times 1,06)]$$

Συγκρίνετε τον κανονικοποιημένο λόγο κάθε δείγματος με την ΓΖ για τον κ-λόγος_{M1}. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων περιγράφεται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων γονοτυπικής ανάλυσης με χρήση κανονικοποιημένων λόγων

Αποτελέσματα	Ερμηνεία
κ-λόγος _{δείγμα} > κ-λόγος _{M1} x 1,06	Ανιχνεύτηκε η V617F στο JAK2
κ-λόγος _{δείγμα} < κ-λόγος _{M1} x 0,94	Δεν ανιχνεύτηκε η V617F στο JAK2
κ-λόγος _{δείγμα} εντός της ΓΖ του κ-λόγου _{M1}	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα

Μπορεί να υπολογιστεί ένα ημιποσοτικό αποτέλεσμα για το φορτίο μετάλλαξης μέσω σύγκρισης της τιμής του λόγου κάθε άγνωστου δείγματος (λόγος_{δείγμα}) με τις μέσες τιμές λόγου για την κλίμακα αναφοράς (λόγος_{M1-6}) (βλ. Πίνακα 15).

Πίνακας 15. Ημιποσοτικές τιμές για το φορτίο μετάλλαξης JAK2 V617F με χρήση της κλίμακας αναφοράς

Αποτελέσματα	Φορτίο μετάλλαξης
λόγος _{M1} < λόγος _{δείγμα} < λόγος _{M2}	2–5% JAK2 V617F
λόγος _{M2} < λόγος _{δείγμα} < λόγος _{M3}	5-12,5% JAK2 V617F
λόγος _{M3} < λόγος _{δείγμα} < λόγος _{M4}	12,5-31% JAK2 V617F
λόγος _{M4} < λόγος _{δείγμα} < λόγος _{M5}	31-50% JAK2 V617F
λόγος _{M5} < λόγος _{δείγμα} < λόγος _{M6}	50-78% JAK2 V617F
λόγος _{M6} < λόγος _{δείγμα}	78-100% JAK2 V617F

Ένα παράδειγμα υπολογισμού και ερμηνείας δεδομένων δίνεται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Παράδειγμα υπολογισμού και ερμηνείας δεδομένων φθορισμού με χρήση της κλίμακας αναφοράς

Δείγμα	VIC	FAM	Λόγος	Μέσος λόγος	κ- λόγος	Ερμηνεία
MN	49,613	3,8	0,077			
MN	49,797	3,976	0,08	0,078	1,000	Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
MP	12,516	37,037	2,959			
MP	12,958	38,121	2,942	2,951	37,722	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
M1	54,394	6,39	0,117			
M1	58,266	6,973	0,12	0,119	1,516	Δείγμα ορίου αποκοπής
M2	61,798	10,882	0,176			
M2	54,814	9,231	0,168	0,172	2,202	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
M3	57,364	16,604	0,289			
M3	59,742	18,192	0,305	0,297	3,797	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
M4	56,965	28,99	0,509			
M4	58,077	29,158	0,502	0,505	6,462	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
M5	54,251	37,221	0,686			
M5	54,979	36,125	0,657	0,672	8,586	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
M6	46,185	44,498	0,963			
M6	45,077	42,598	0,945	0,954	12,2	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
S 1	13,47	37,409	2,777			
S 1	14,559	42,616	2,927	2,852	36,464	Μετάλλαξη (78–100%)
S 2	50,432	24,958	0,495			
S 2	53,797	27,746	0,516	0,505	6,46	Μετάλλαξη (12,5-31%)
S 3	52,038	5,995	0,115			
S 3	54,01	6,364	0,118	0,117	1,49	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα
S 4	50,811	4,842	0,095			
S 4	0,01	–	0	0,048	0,609	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα
ΓΖ	1,425	1,607				

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες του τμήματος Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. «Πληροφορίες επικοινωνίας», σελίδα 64).

Σχόλια και συστάσεις

Αρνητικό σήμα δείγματος θετικού ελέγχου

- α) Σφάλμα μεταφοράς με πιπέτα
- Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.
Επαναλάβετε την εκτέλεση της ανάλυσης PCR.
- β) Λανθασμένη φύλαξη των συστατικών του κιτ
- Φυλάξτε το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS σε θερμοκρασία -15 έως -30°C και φυλάξτε το μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών (PPM) προστατευμένο από το φως.
Βλ. «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 12.
Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη.
Χωρίστε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα για φύλαξη.

Θετικό αποτέλεσμα από τα δείγματα αρνητικού ελέγχου

- Διασταυρούμενη μόλυνση
- Αντικαταστήστε όλα τα αντιδραστήρια κρίσιμης σημασίας.
Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.
Όλοι οι χειρισμοί δειγμάτων, συστατικών του κιτ και αναλώσιμων θα πρέπει να γίνονται σύμφωνα με τις γενικώς αποδεκτές πρακτικές ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση λόγω μεταφοράς.

Σχόλια και συστάσεις

Απουσία σήματος ακόμα και από τα δείγματα θετικού ελέγχου

- | | |
|--|--|
| α) Σφάλμα μεταφοράς με πιπέτα ή παράλειψη προσθήκης αντιδραστηρίων | Ελέγξτε τη μέθοδο μεταφοράς με την πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.
Επαναλάβετε την εκτέλεση της ανάλυσης PCR. |
| β) Ανασταλτική δράση του υλικού του δείγματος λόγω ανεπαρκούς καθαρισμού | Επαναλάβετε την παρασκευή του DNA. |
| γ) LightCycler: Επελέγη λανθασμένο κανάλι ανίχνευσης | Επιλέξτε τη ρύθμιση καναλιού F1/F2 ή 530 nm/640 nm. |
| δ) LightCycler: Δεν προγραμματίστηκε λήψη δεδομένων | Ελέγξτε τα προγράμματα κύκλων.
Επιλέξτε τη λειτουργία λήψης «single» (μία φορά) στο τέλος κάθε τμήματος υβριδοποίησης του προγράμματος PCR. |

Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα από τα δείγματα αλλά τα δείγματα θετικού ελέγχου είναι εντάξει

- | | |
|--|--|
| Κακή ποιότητα ή χαμηλή συγκέντρωση DNA | Να ελέγχετε πάντοτε την ποιότητα και τη συγκέντρωση του DNA προτού ξεκινήσετε. |
|--|--|

LightCycler: Πολύ χαμηλή ένταση φθορισμού

- | | |
|---|---|
| α) Λανθασμένη φύλαξη των συστατικών του κιτ | Φυλάξτε το κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen RS σε θερμοκρασία -15 έως -30°C και φυλάξτε το μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών (PPM) προστατευμένο από το φως. Βλ. «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 12.
Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη.
Χωρίστε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα για φύλαξη. |
| β) Πολύ χαμηλή αρχική ποσότητα DNA-στόχου | Αυξήστε την ποσότητα του DNA του δείγματος.
Σημείωση: Ανάλογα με την επιλεγμένη μέθοδο παρασκευής του DNA, πιθανόν να εκδηλωθούν φαινόμενα αναστολής. |

Σχόλια και συστάσεις

LightCycler: Η ένταση του φθορισμού ποικίλλει

- | | |
|---|---|
| α) Σφάλμα μεταφοράς με πιπέτα | Η μεταβλητότητα που οφείλεται στο λεγόμενο «σφάλμα μεταφοράς» (pipetting error) μπορεί να μειωθεί εάν τα δεδομένα αναλυθούν στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm. |
| β) Ανεπαρκής φυγοκέντρηση των τριχοειδών | Το παρασκευασμένο μείγμα PCR ίσως βρίσκεται ακόμη στο επάνω μέρος του τριχοειδούς ή ενδέχεται να έχει παγιδευτεί μια φυσαλίδα αέρα στο άκρο του τριχοειδούς.
Φυγοκεντρείτε πάντοτε τα τριχοειδή στα οποία έχει φορτωθεί το μείγμα αντίδρασης όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο χρήσης του συγκεκριμένου συστήματος. |
| γ) Ακάθαρτη εξωτερική επιφάνεια του άκρου του τριχοειδούς | Να φοράτε πάντοτε γάντια όταν χειρίζεστε τα τριχοειδή. |

Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του κιτ *ipsogen JAK2 MutaScreen* ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση της ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων. Τα πιστοποιητικά ανάλυσης διατίθενται κατόπιν αιτήματος στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/support/.

Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι και εξοικειωμένοι με την τεχνολογία αυτή προτού χρησιμοποιήσουν τη συσκευή αυτή. Το κιτ θα πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο αυτό, μαζί με ένα από τα επικυρωμένα όργανα που αναφέρονται στην παράγραφο «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται», σελίδα 10.

Οποιαδήποτε διαγνωστικά αποτελέσματα προκύπτουν πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα. Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επικυρώνει την απόδοση του συστήματος για οποιοσδήποτε διαδικασίες χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες απόδοσης της QIAGEN.

Πρέπει να δίνεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Μη κλινικές μελέτες

Διεξήχθησαν μη κλινικές μελέτες προκειμένου να εξακριβωθεί η αναλυτική απόδοση του kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen.

Ακρίβεια

Δοκιμάστηκαν τρία επίπεδα αραιώσης γονιδιωματικού DNA από κυτταρικές σειρές που έφεραν τη μετάλλαξη JAK2 V617F σε DNA φυσικού τύπου. Οι αραιώσεις ισοδυναμούσαν με φορτίο μετάλλαξης 1%, 2% και 3%. Παρασκευάστηκαν ανεξάρτητες παρτίδες αραιώσης για κάθε επίπεδο και επαναλήψεις των αραιώσεων αυτών δοκιμάστηκαν σε 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι λόγοι που μετρήθηκαν για κάθε δείγμα DNA (λόγος_{δείγμα}) συγκρίθηκαν με τον λόγο του δείγματος αρνητικού ελέγχου (DNA JAK2 100% φυσικού τύπου, λόγος_{NC}). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Δεδομένα ακρίβειας από μη κλινικές μελέτες.

Επίπεδο μετάλλαξης	λόγος _{δείγμα} > λόγος _{NC}	%CV (λόγος)
1% V617F DNA	100% (n = 183)	6,8
2% V617F DNA	100% (n = 72)	4,5
3% V617F DNA	100% (n = 135)	5,1

Δεδομένα από αναλύσεις μεταξύ εργαστηρίων

Διεξήχθη μια πολυκεντρική μελέτη με τη συμμετοχή 13 εργαστηρίων. Συγκεντρώθηκαν δεδομένα ανάλυσης αραιώσεων γονιδιωματικού DNA που έφερε τη μετάλλαξη JAK2 V617F σε DNA φυσικού τύπου. Εκτελέστηκαν τρία πειράματα σε κάθε εργαστήριο. Σε κάθε πείραμα εξετάστηκαν τα εξής δείγματα DNA από κυτταρικές σειρές:

- 1 δείγμα αρνητικού ελέγχου (NC) 0% V617F
- 1 δείγμα θετικού ελέγχου (PC) 100% V617F
- 1 δείγμα ορίου αποκοπής (COS) 2% V617F
- 3 δείγματα με ενδιάμεσα φορτία μετάλλαξης (20%, 50% και 80%)

Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε 7 διαφορετικά μοντέλα οργάνων:

- 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®

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Δεδομένα από αναλύσεις μεταξύ εργαστηρίων με αραιώσεις γονιδιωματικού DNA από κυτταρικές σειρές που έφεραν τη μετάλλαξη JAK2 V617F σε DNA φυσικού τύπου

Ανίχνευση δείγματος	Θετικά δείγματα	Αρνητικά δείγματα
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 φυσικού τύπου	0	36

* Τα θετικά δείγματα περιλάμβαναν 36 δείγματα θετικού ελέγχου (PC), 36 δείγματα ορίου αποκοπής (COS, 2% V617F), 34 δείγματα που έφεραν 20% JAK2 V617F, 35 δείγματα που έφεραν 50% JAK2 V617F και 36 δείγματα που έφεραν 80% JAK2 V617F.

Κλινικές μελέτες

Σύγκριση του κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen με τη μέθοδο ARMS®

Δείγματα DNA από 141 ασθενείς με πιθανολογούμενο MYN δοκιμάστηκαν παράλληλα με το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen και με μια μέθοδο qPCR βασισμένη στο σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (amplification refractory mutation system, ARMS) (11). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης φαίνονται στον Πίνακα 19 (πίνακας συνάφειας 2 x 3) και στον Πίνακα 20 (ποσοστό συμφωνίας).

Πίνακας 19. Σύγκριση μεταξύ μεθόδων: *ipsogen* JAK2 MutaScreen και ARMS

		Αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης ARMS		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 V617F <2%	Σύνολο
Αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	91	0	91
	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα	1	2	3
	JAK2 φυσικού τύπου Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	1	46	47
Σύνολο		93	48	n = 141

Πίνακας 20. Σύγκριση μεταξύ μεθόδων: *ipsogen* JAK2 MutaScreen και ARMS

	Συμφωνία (%)	95% ΔΕ* (%)
Θετικά δεδομένα Συμφωνία μεταξύ του κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen και της μεθόδου ARMS	98,9	94,1-99,8
Αρνητικά δεδομένα Συμφωνία μεταξύ του κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen και της μεθόδου ARMS	100	92,3-100
Συνολική συμφωνία	99,3	96,0-99,9

* Τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία του ινστιτούτου CLSI, έκδοση EP12-A, «User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline» (Πρωτόκολλο χρήστη για την αξιολόγηση της απόδοσης ποιοτικών αναλύσεων).

Σύγκριση μεταξύ του kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen και της αλληλούχησης

Δείγματα DNA από 51 ασθενείς με πιθανολογούμενο MYN δοκιμάστηκαν παράλληλα με το kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen και με την τεχνική αναφοράς (πρότυπη τεχνική), την άμεση αλληλούχηση. Σε ένα δείγμα, η ερμηνεία ήταν αδύνατη λόγω αποτυχίας της αλληλούχησης. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των 50 ερμηνεύσιμων δειγμάτων συνοψίζεται στον Πίνακα 21 (πίνακας συνάφειας 2 x 3) και στον Πίνακα 22 (ποσοστό συμφωνίας).

Πίνακας 21. Σύγκριση μεταξύ μεθόδων: Kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen και αλληλούχηση

		Αποτελέσματα άμεσης αλληλούχησης		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 V617F <2%	Σύνολο
Αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	26	1	27
	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα	0	1	1
	JAK2 φυσικού τύπου Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	2	20	22
Σύνολο		28	22	n = 50

Πίνακας 22. Σύγκριση μεταξύ μεθόδων: Κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen και αλληλούχηση

	Συμφωνία (%)	95% ΔΕ* (%)
Θετικά δεδομένα Συμφωνία μεταξύ του κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen και της αλληλούχησης	92,9	77,4-98,0
Αρνητικά δεδομένα Συμφωνία μεταξύ του κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen και της αλληλούχησης	95,2	77,3-99,2
Συνολική συμφωνία	93,9	83,5-97,9

* Τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία του ινστιτούτου CLSI, έκδοση EP12-A, «User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline» (Πρωτόκολλο χρήστη για την αξιολόγηση της απόδοσης ποιοτικών αναλύσεων).

Πολυκεντρική μελέτη σε 228 δείγματα ασθενών

Δείγματα DNA από ασθενείς αναλύθηκαν με αυτοσχέδιες τεχνικές σε 13 εργαστήρια που συμμετείχαν σε μια μελέτη σύγκρισης μεταξύ εργαστηρίων. Σε κάθε εργαστήριο εκτελέστηκαν 3 πειράματα με χρήση DNA από κυτταρικές σειρές, όπως περιγράφεται για τα δεδομένα ακρίβειας από μη κλινικές μελέτες (βλ. παραπάνω), και με DNA από 10 ασθενείς που ήταν διαθέσιμο στο εργαστήριο.

Τα 228 δείγματα με γνωστό γονότυπο JAK2 αναλύθηκαν παράλληλα με το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen και με αυτοσχέδιες μεθόδους, όπως ποιοτική PCR, αλληλομορφοειδική PCR, μεταφορά ενέργειας φθορισμού μέσω συντονισμού (FRET), αλληλούχηση, αλληλομορφοειδική ολιγονουκλεοτιδική PCR, RFLP και διάκριση αλληλομόρφων. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης φαίνονται στον Πίνακα 23 (πίνακας συνάφειας 2 x 3) και στον Πίνακα 24 (ποσοστό συμφωνίας).

Πίνακας 23. Σύγκριση μεταξύ μεθόδων: Κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen και αυτοσχέδιες μέθοδοι

		Αποτελέσματα των αυτοσχέδιων αναλύσεων		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 V617F <2%	Σύνολο
Αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	139	3	142
	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα	5	17	22
	JAK2 φυσικού τύπου Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	3	61	64
Σύνολο		147	81	n = 228

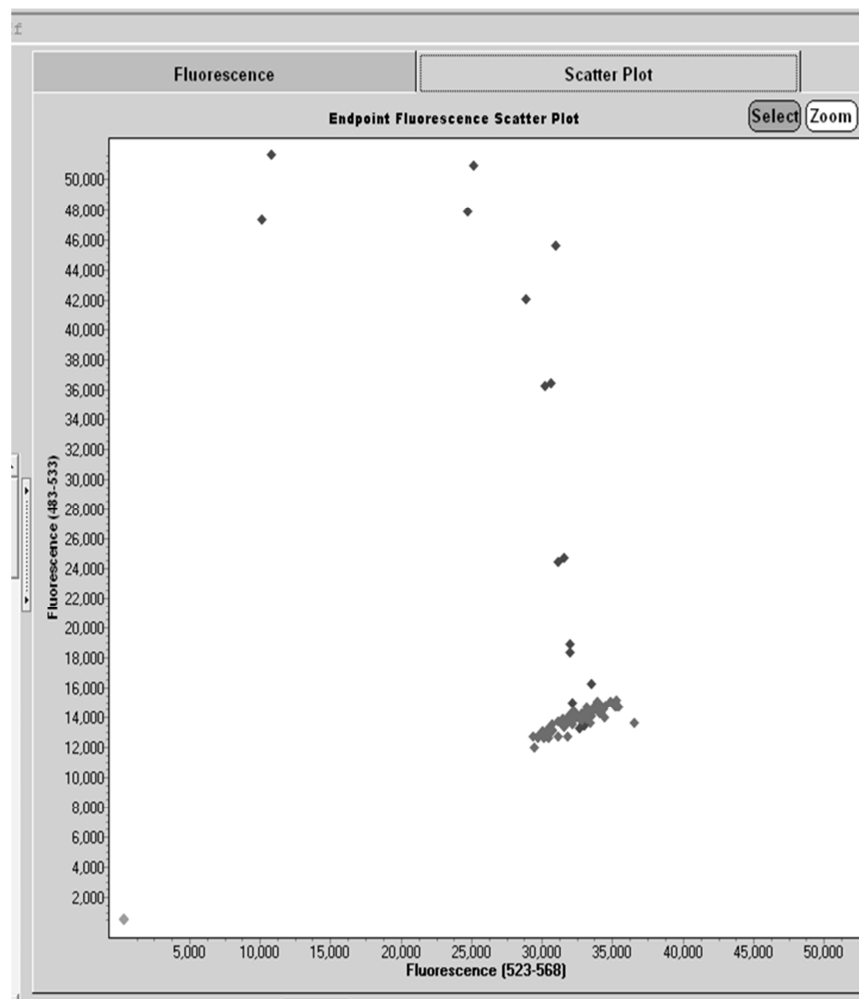
Πίνακας 24. Σύγκριση μεταξύ μεθόδων: Κιτ JAK2 MutaScreen και αυτοσχέδιες μέθοδοι

	Συμφωνία (%)	95% ΔΕ* (%)
Θετικά δεδομένα Συμφωνία μεταξύ του κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen και των αυτοσχέδιων μεθόδων	97,9	94,0-99,3
Αρνητικά δεδομένα Συμφωνία μεταξύ του κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen και των αυτοσχέδιων μεθόδων	95,3	87,1-98,4
Συνολική συμφωνία	97,1	93,8-98,7

* Τα διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία του ινστιτούτου CLSI, έκδοση EP12-A, «User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline» (Πρωτόκολλο χρήστη για την αξιολόγηση της απόδοσης ποιοτικών αναλύσεων).

Ανθεκτικότητα: εξέταση δειγμάτων από υγιείς δότες

Δείγματα DNA από 103 υγιείς αιμοδότες αναλύθηκαν με το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν να είναι φυσικού τύπου ως προς το JAK2. Η ανάλυση 38 δειγμάτων με το όργανο LightCycler 480 φαίνεται στην Εικόνα 34.



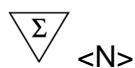
Εικόνα 34. Ανάλυση υγιών δοτών. Ανάλυση 38 υγιών δοτών (◆) με το όργανο LightCycler 480 και το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS (αρ. κατ. 673123). Τα θετικά αποτελέσματα εις διπλούν (◆) αντιστοιχούν σε μια κλίμακα αναφοράς που παρέχεται μαζί με το κιτ. Οι τιμές φθορισμού VIC σχεδιάζονται στον άξονα x και οι τιμές FAM στον άξονα y.

Βιβλιογραφία

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.

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στην συσκευασία και την επισήμανση.



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/Support, καλέστε το 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή τους κατά τόπους αντιπροσώπους (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Κιτ <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen RS (19)	Για 19 αντιδράσεις: V617F Positive Control, V617F Negative Control, V617F Reference Scale, Primers and Probes Mix JAK2 φυσικού τύπου και JAK2 V617F	673123
Rotor-Gene Q MDx — για αναλύσεις PCR πραγματικού χρόνου επικυρωμένες για σκοπούς IVD σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Θερμοκυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, βυσσινί) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, εξαρτήματα, εγγύηση 1 έτους για τα μέρη και τα εργατικά. Η εγκατάσταση και η εκπαίδευση δεν συμπεριλαμβάνονται.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Θερμοκυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, βυσσινί) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, εξαρτήματα, εγγύηση 1 έτους για ανταλλακτικά και εργασία, εγκατάσταση και εκπαίδευση	9002033

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας και δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του αντίστοιχου κιτ QIAGEN ή στο εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των κιτ QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα **www.qiagen.com**. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Το προϊόν αυτό προορίζεται για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Τα προϊόντα *ipsogen* δεν επιτρέπεται να επαναπωληθούν, να τροποποιηθούν για επαναπώληση ή να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων χωρίς τη γραπτή έγκριση της QIAGEN.

Οι πληροφορίες του παρόντος εγγράφου υπόκεινται σε αλλαγή χωρίς ειδοποίηση. Η QIAGEN δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για τυχόν σφάλματα που ενδέχεται να υπάρχουν στο παρόν έγγραφο. Το παρόν έγγραφο θεωρείται πλήρες και ακριβές κατά τη στιγμή της δημοσίευσής του. Σε καμία περίπτωση η QIAGEN δεν φέρει ευθύνη για τυχόν θετικές, ειδικές, πολλαπλές ή αποθετικές ζημιές που σχετίζονται ή προκύπτουν από τη χρήση του εγγράφου αυτού.

Τα προϊόντα *ipsogen* ικανοποιούν εγγυημένα τις δηλωμένες προδιαγραφές. Η μόνη υποχρέωση της QIAGEN και η μόνη αποζημίωση του αγοραστή περιορίζονται στη δωρεάν αντικατάσταση των προϊόντων στην περίπτωση που αυτά δεν αποδίδουν σύμφωνα με την εγγύηση.

Το προϊόν αυτό πωλείται με βάση μια συμφωνία αδειοδότησης με την Epoch Biosciences για χρήση αποκλειστικά στην *in vitro* διάγνωση και δεν επιτρέπεται η χρήση του για οποιαδήποτε άλλη έρευνα, εμπορικό σκοπό, κλινική έρευνα ή άλλη χρήση εκτός του τομέα της *in vitro* διάγνωσης.

Η μετάλλαξη JAK2 V617F και οι χρήσεις της προστατεύονται από διπλώματα κατοχύρωσης ευρεσιτεχνίας, μεταξύ αυτών και την ευρωπαϊκή ευρεσιτεχνία EP1692281, τις ευρεσιτεχνίες ΗΠΑ 7.429.456 και 7.781.199, τις αιτήσεις ευρεσιτεχνίας ΗΠΑ US20090162849 και US20120066776, και τις αντίστοιχες άλλων χωρών.

Με την αγορά του προϊόντος αυτού δεν μεταβιβάζεται κανένα δικαίωμα χρήσης του σε κλινικές δοκιμές για φάρμακα που στοχεύουν τη μετάλλαξη JAK2 V617F. Η QIAGEN αναπτύσσει προγράμματα ειδικής άδειας για τέτοιες χρήσεις. Επικοινωνήστε με το νομικό μας τμήμα, στη διεύθυνση jak2licenses@qiagen.com.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group), ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, VIC® (Thermo Fisher Scientific Inc.), ARMS® (AstraZeneca Ltd.), Excel® (Microsoft Corporation), iCycler® (Bio-Rad Laboratories, Inc.), LightCycler®, TaqMan® (Roche Group), MGB™ (Epoch Biosciences).

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος υποδηλώνει αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή χρήστη του kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS των εξής όρων:

1. Το kit *ipsogen*JAK2 MutaScreen RS πρέπει να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο του kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS και αποκλειστικά με τα συστατικά που περιέχονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit με οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο εγχειρίδιο του kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS και στα πρόσθετα πρωτόκολλα που διατίθενται στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε κανέναν να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις ανακριτικές και δικαστικές δαπάνες, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.

HB-1372-003 © 2013–2016 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

www.qiagen.com

