

Εγχειρίδιο κιτ *ipsogen*[®] JAK2 *MutaQuant*[®]



12 (αρ. καταλόγου 673522)



24 (αρ. καταλόγου 673523)

Έκδοση 1

IVD

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το σύστημα Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®]
7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR και
τα όργανα LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Γερμανία

R3

MAT

1072501EL



QIAGEN: Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN ηγείται στο χώρο πρωτοποριακών τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα απομόνωσης και ανίχνευσης των περιεχομένων οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα προηγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και οι υπηρεσίες μας αποτελούν εγγύηση επιτυχίας - από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση **www.qiagen.com**.

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περίληψη και ερμηνεία	4
Αρχές της διαδικασίας	7
Υλικά που παρέχονται	11
Περιεχόμενα του kit	11
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	12
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	13
Γενικές προφυλάξεις	14
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	15
Διαδικασία	16
Προετοιμασία DNA δείγματος	16
πρωτόκολλα	
■ qPCR σε όργανα RotorGene Q MDx 5plex HRM ή Rotor	17
■ qPCR στο σύστημα ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480	22
■ qPCR στο όργανο LightCycler 1.2	29
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	34
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	38
Ποιοτικός έλεγχος	42
Περιορισμοί	42
Χαρακτηριστικά απόδοσης	43
Μη κλινικές μελέτες	43
Κλινικές μελέτες	44
Βιβλιογραφία	46
Σύμβολα	47
Πληροφορίες επικοινωνίας	47
Πληροφορίες παραγγελίας	48

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant είναι μια ποσοτική δοκιμασία *in vitro* που προορίζεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αλληλόμορφου JAK2 V617F/G1849T σε γονιδιωματικό DNA εγχυλισμένο από το περιφερικό αίμα ατόμων με υποψία μυελοϋπερπλαστικού νεοπλασματος (MPN).

Η απουσία της μετάλλαξης JAK2 V617F/G1849T δεν αποκλείει την παρουσία άλλων μεταλλάξεων JAK2. Η δοκιμασία μπορεί να αναφέρει ψευδή αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση πρόσθετων μεταλλάξεων στα νουκλεοτίδια 88504 έως 88622 (1).

Σημείωση: Το kit πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα. Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

Περίληψη και ερμηνεία

Μια επανεμφανιζόμενη σωματική μετάλλαξη, η V617F, που επηρεάζει το γονίδιο Janus τυροσινικής κινάσης 2 (JAK2), αναγνωρίστηκε το 2005 (2–5), οδηγώντας σε ένα σημαντικό επίτευγμα για την κατανόηση, την ταξινόμηση και τη διάγνωση των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (MPN). Το JAK2 είναι ένα κρίσιμο μόριο ενδοκυτταρικής σηματοδότησης για έναν αριθμό κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της ερυθροποιητίνης.

Η μετάλλαξη JAK2 V617F ανιχνεύεται στο >95% των ασθενών με αληθή πολυκυτταραιμία (*polycythemia vera*, PV), στο 50–60% των ασθενών με βασική θρομβοκυτταραιμία (*essential thrombocythemia*, ET) και στο 50% των ασθενών με πρωτοπαθή μυελοϊνώση (*primary myelofibrosis*, PMF). Η JAK2 V617F έχει επίσης ανιχνευθεί σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας, μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, συστηματικής μαστοκυττάρωσης και χρόνιας ουδετεροφιλικής λευχαιμίας, αλλά στο 0% της ΧΜΛ (6).

Η μετάλλαξη αντιστοιχεί σε αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου, του JAK2 νουκλεοτιδίου 1849 στο εξόνιο 14, με αποτέλεσμα μια μοναδική υποκατάσταση της βαλίνης (V) σε φαινυλαλανίνη (F) στη θέση 617 της πρωτεΐνης (περιοχή JH2). Οδηγεί σε συστατική ενεργοποίηση του JAK2, αιμοποιητικό μετασχηματισμό *in vitro*, αύξηση των ανεξάρτητων από την ερυθροποιητίνη ερυθροειδών αποικιών (EEC) σε όλους τους ασθενείς με PV και σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με ET και PMF (7). Η JAK2 V617F αντιπροσωπεύει ένα βασικό οδηγό στο μετασχηματισμό των αιμοποιητικών κυττάρων στο MPN, αλλά οι ακριβείς παθολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν, με την ίδια μοναδική μετάλλαξη, σε τόσο διαφορετικές κλινικές και βιολογικές οντότητες, μένει να διευκρινιστεί.

Παραδοσιακά, η διάγνωση των MPN βασιζόταν σε κλινικά κριτήρια, κριτήρια ιστολογίας του μυελού των οστών και κυτταρογενετικά κριτήρια. Η ανακάλυψη

του ειδικού για τη νόσο μοριακού δείκτη οδήγησε σε απλούστευση της διαδικασίας και αυξημένη διαγνωστική ακρίβεια. Η ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2 V617F είναι τώρα μέρος των κριτηρίων αναφοράς Π.Ο.Υ 2008 για τη διάγνωση του BCR-ABL αρνητικού MPN (Πίνακας 1), και η παρουσία αυτής της μετάλλαξης αποτελεί βασικό κριτήριο για διαγνωστική επιβεβαίωση.

Πίνακας 1. Κριτήρια Π.Ο.Υ. για τη διάγνωση του MPN (προσαρμογή από την παραπομπή 8)

Κριτήρια για διάγνωση της αληθούς πολυκυτταραιμίας (PV)	
Κύρια	<p>1. Αιμοσφαιρίνη (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (άνδρες) ή $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (γυναίκες) ή Hgb ή αιματοκρίτης (Hct) $>99\text{o}$ εκατοστημόριο του εύρους αναφοράς για ηλικία, φύλο ή υψόμετρο διαμονής ή Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (άνδρες) ή $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (γυναίκες) εάν συσχετίζεται με συνεχή αύξηση $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ από τη γραμμή βάσης, η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε διόρθωση της ανεπάρκειας σιδήρου ή Αυξημένη μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων $>25\%$ πάνω από τη μέση φυσιολογική προβλεπόμενη τιμή</p> <p>2. Παρουσία <i>JAK2V617F</i> ή παρόμοιας μετάλλαξης</p>
Δευτερεύοντα	<p>1. Μυελοϋπερπλασία τριών κυτταρικών σειρών μυελού των οστών 2. Υποφυσιολογικό επίπεδο ερυθροποιητίνης ορού 3. Αύξηση ενδογενών ερυθροειδών αποικιών (EEC)</p>
Κριτήρια για διάγνωση της βασικής θρομβοκυτταραιμίας (ET)	
Κύρια	<p>1. Αριθμός αιμοπεταλίων $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Πολλαπλασιασμός μεγακαρυοκυττάρων με μεγάλη και ώριμη μορφολογία. Κανένας ή μικρός πολλαπλασιασμός κοκκιοκυττάρων ή ερυθροειδών 3. Μη ικανοποίηση των κριτηρίων του Π.Ο.Υ. για χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ, CML), PV, πρωτοπαθή μυελοϊνωση (PMF), μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ, MDS), ή άλλο μυελοειδές νεόπλασμα</p> <p>4. Παρουσία <i>JAK2V617F</i> ή άλλου κλωνικού δείκτη ή Καμία παρουσία αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης</p>
Δευτερεύοντα -	
Κριτήρια για διάγνωση της πρωτοπαθούς μυελοϊνωσης (PMF)	
Κύρια	<p>1. Πολλαπλασιασμός μεγακαρυοκυττάρων και ατυπία συνοδευόμενη από ίνωση ρετικουλίνης ή/και κολλαγόνου ή Σε απουσία ίνωσης ρετικουλίνης, οι μεταβολές των μεγακαρυοκυττάρων πρέπει να συνοδεύονται από αυξημένη κυτταροβρίθεια του μυελού, κοκκιοκυτταρικό πολλαπλασιασμό και συχνά μειωμένη ερυθροποίηση (δηλ. προϊνώτικη PMF) 2. Μη ικανοποίηση των κριτηρίων του Π.Ο.Υ. για ΧΜΛ, PV, ΜΔΣ ή άλλο μυελοειδές νεόπλασμα</p> <p>3. Παρουσία <i>JAK2V617F</i> ή άλλου κλωνικού δείκτη ή Καμία παρουσία αντιδραστικής ίνωσης του μυελού</p>

Κριτήρια για διάγνωση της πρωτοπαθούς μυελοϊνώσεως (PMF)

- Δευτερεύοντα
1. Λευκοερυθροβλάστωση
 2. Αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) ορού
 3. Αναιμία
 4. Ψηλαφητή σπληνομεγαλία

Πρόσφατα, διεθνείς ειδικοί έχουν προτείνει κριτήρια για τις θεραπευτικές δοκιμές στην PV και ET. Με βάση τα δεδομένα σχετικά με τα αλλομοσχέυματα, την άλφα-ιντερφερόνη ή την υδροξουρία, η ποσοτικοποίηση της JAK2V617F ενσωματώθηκε ως δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (9). Μια μείωση στο φορτίο της JAK2 V617F παρατηρήθηκε σε ανταπόκριση σε ορισμένα από τα νέα στοχευμένα αντι-JAK2 φάρμακα στην κλινική ανάπτυξη (10).

Αρχές της διαδικασίας

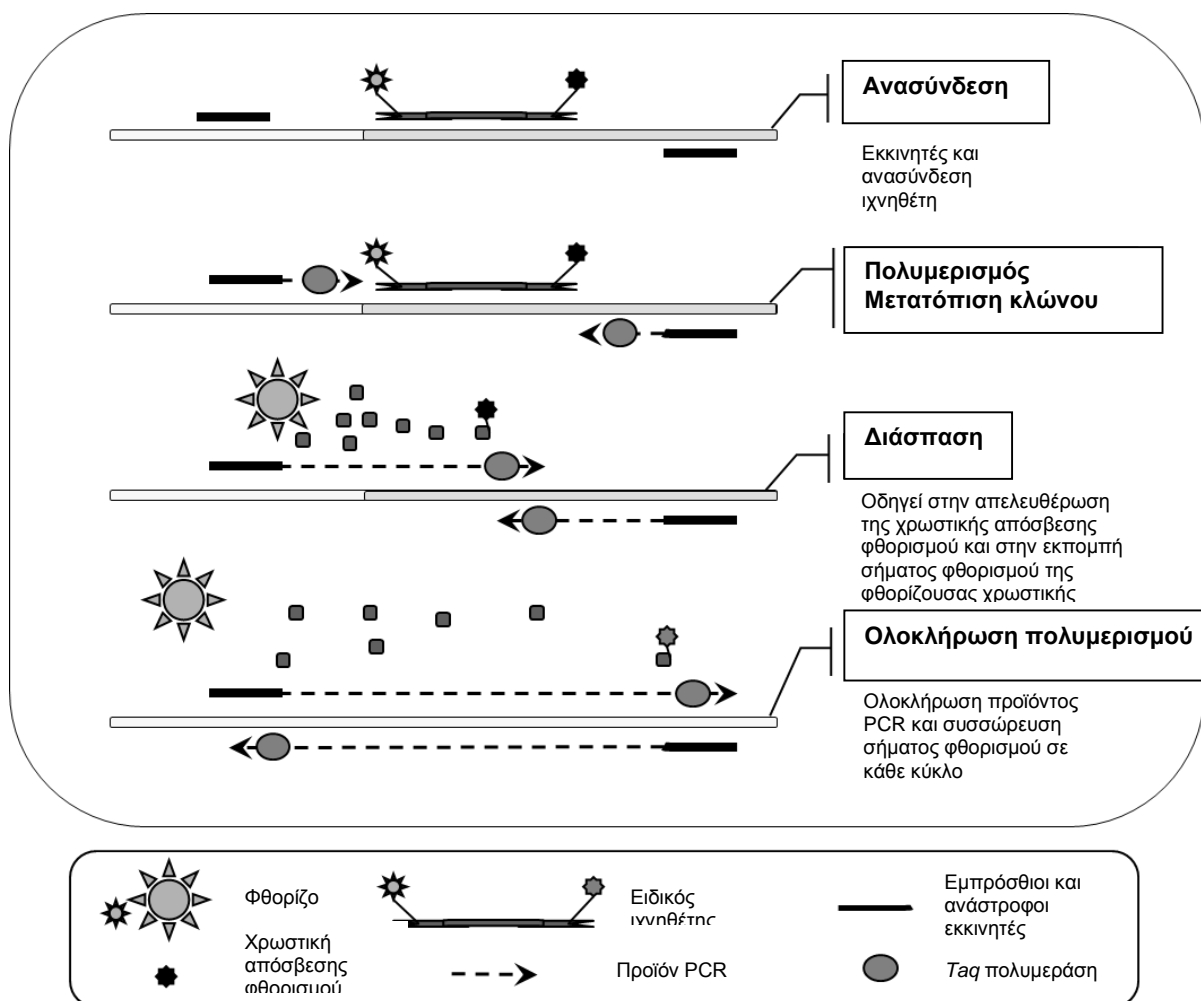
Έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναλογίας των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP) στα δείγματα DNA. Από αυτές, οι μέθοδοι που βασίζονται στην ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) πραγματικού χρόνου είναι προτιμητέες λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας τους, επιτρέποντας την παρακολούθηση του φορτίου αλληλόμορφων με διαμήκη τρόπο. Πολλές από αυτές τις τεχνικές έχουν μέτρια ευαισθησία της τάξης του 1–10%, για παράδειγμα, διάκριση αλληλόμορφων TaqMan[®], Pyrosequencing[®] (πυροαλληλούχιση), προσδιορισμός καμπύλης τήξης, και άμεση αλληλούχιση. Ορισμένες, όπως η καμπύλη τήξης και η αλληλούχιση, είναι μόνο ημι-ποσοτικές, ενώ άλλες, όπως η πυροαλληλούχιση, απαιτούν μετεπεξεργασία PCR ή χρειάζονται όργανα που δεν είναι άμεσα διαθέσιμα ή έχουν απαγορευτικά υψηλό κόστος εγκατάστασης για εργαστηριακές εξετάσεις ρουτίνας. Μια προσέγγιση υψηλής ευαισθησίας με ευαισθησία <0,1% απαιτεί τη χρήση ενός ειδικού για SNP εκκινητή (primer) που επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση του μεταλλαγμένου ή μη μεταλλαγμένου (άγριου τύπου) αλληλόμορφου, το οποίο είναι εύκολα ανιχνεύσιμο σε ένα όργανο qPCR πραγματικού χρόνου. Το kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* βασίζεται σε αυτήν την τεχνική.

Η χρήση qPCR επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της διεργασίας ενίσχυσης PCR. Τα ποσοτικά δεδομένα PCR μπορούν να ληφθούν γρήγορα, χωρίς μετεπεξεργασία PCR, μέσω ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο των σημάτων φθορισμού κατά τη διάρκεια ή/και μετά την κυκλοποίηση PCR, μειώνοντας έτσι δραστικά τον κίνδυνο επιμόλυνσης του προϊόντος PCR. Επί του παρόντος, υπάρχουν διαθέσιμοι 3 κύριοι τύποι τεχνικών qPCR: Ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί χρωστική SYBR[®] Green I, ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ιχνηθέτες υδρόλυσης, και ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ιχνηθέτες υβριδισμού.

Αυτός ο προσδιορισμός εκμεταλλεύεται την αρχή της ολιγονουκλεοτιδικής υδρόλυσης διπλής χρωστικής qPCR. Κατά τη διάρκεια της PCR, εμπρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές υβριδίζουν σε μια ειδική αλληλουχία. Ένα ολιγονουκλεοτίδιο διπλής χρώσης περιέχεται στο ίδιο μείγμα. Αυτός ο ιχνηθέτης, ο οποίος αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με μια φθορίζουσα χρωστική (reporter) στο 5' άκρο του και μια καθοδική χρωστική απόσβεσης φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο του, υβριδίζει σε μια αλληλουχία-στόχο εντός του προϊόντος PCR. Η ανάλυση qPCR με τους ιχνηθέτες υδρόλυσης εκμεταλλεύεται τη δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης από *Thermus aquaticus* (*Taq*). Όταν ο ιχνηθέτης είναι άθικτος, η εγγύτητα της φθορίζουσας χρωστικής με τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού οδηγεί σε καταστολή του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής κυρίως μέσω μεταφοράς ενέργειας τύπου Förster.

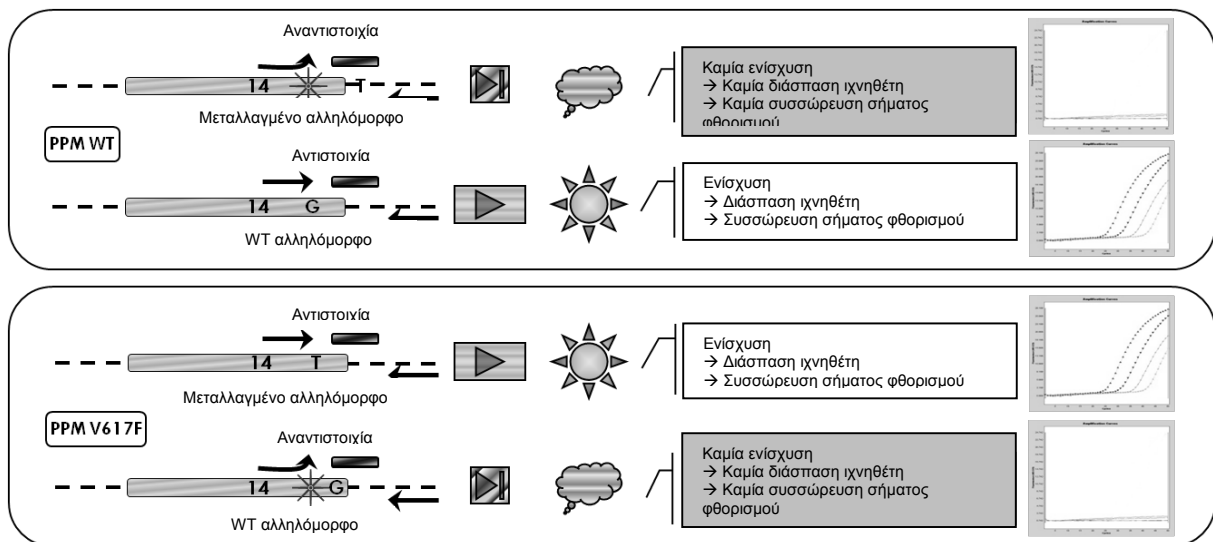
Κατά τη διάρκεια της PCR, εάν ο στόχος ενδιαφέροντος είναι παρών, ο ιχνηθέτης ανασυνδέεται ειδικά μεταξύ των θέσεων εμπρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών. Η δραστηριότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον ιχνηθέτη μεταξύ της φθορίζουσας χρωστικής και της χρωστικής απόσβεσης φθορισμού μόνο εάν ο ιχνηθέτης υβριδίζει στο στόχο. Τα θραύσματα του ιχνηθέτη στη συνέχεια μετατοπίζονται από το στόχο, και ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται. Το 3' άκρο του ιχνηθέτη μπλοκάρεται για να αποτραπεί η επέκταση του ιχνηθέτη κατά τη διάρκεια της PCR (Εικόνα 1). Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα σε κάθε κύκλο και δεν παρεμβαίνει στην εκθετική συσσώρευση του προϊόντος.

Η αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνο εάν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική στον ιχνηθέτη και ως εκ τούτου ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR. Λόγω αυτών των απαιτήσεων, δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Συνεπώς, η αύξηση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με την ενίσχυση του στόχου κατά τη διάρκεια της PCR.



Εικόνα 1. Γενική αρχή της αντίδρασης.

Η ειδική για αλληλόμορφα τεχνολογία ποσοτικής PCR που χρησιμοποιείται σε αυτό το κιτ προσδιορισμού επιτρέπει την ευαίσθητη, ακριβή και ιδιαίτερα αναπαραγώγιμη ανίχνευση των SNP. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη χρήση ειδικών εμπρόσθιων εκκινητών, για το μη μεταλλαγμένο και το V617F αλληλόμορφο (11). Μόνο η τέλεια αντιστοιχία μεταξύ εκκινητή και DNA-στόχου επιτρέπει την επέκταση και ενίσχυση στην PCR (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Ειδική για αλληλόμορφα PCR. Η χρήση μη μεταλλαγμένου τύπου ή των εκκινητών και του μείγματος ιχνηθετών V617F επιτρέπει την ειδική ανίχνευση του μη μεταλλαγμένου ή μεταλλαγμένου αλληλόμορφου σε δύο ξεχωριστές αντιδράσεις που διεξάγονται με χρήση του ίδιου δείγματος. Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφράζονται ως ποσοστό των αντιγράφων VF μεταξύ των συνολικών αντιγράφων JAK2.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του KIT

<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Αρ. καταλόγου		673522	673523
Αριθμός αντιδράσεων		12	24
V617F positive control (Θετικός μάρτυρας V617F) (100% αλληλόμορφο V617F)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Μίνι	40 μl	60 μl
V617F negative control (Αρνητικός μάρτυρας V617F) (100% μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Μίνι	40 μl	60 μl
M1-VF Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα M1-VF), 50 αντίγραφα (5×10^1 V617F αντίγραφα/5 μl)	M1-VF M1-VF Μίνι	20 μl	30 μl
M2-VF Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα M2-VF), 500 αντίγραφα (5×10^2 V617F αντίγραφα/5 μl)	M2-VF M2-VF Μίνι	20 μl	30 μl
M3-VF Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα M3-VF), 5.000 αντίγραφα (5×10^3 V617F αντίγραφα/5 μl)	M3-VF M3-VF Μίνι	20 μl	30 μl
M4-VF Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα M4-VF), 50.000 αντίγραφα (5×10^4 V617F αντίγραφα/5 μl)	M4-VF M4-VF Μίνι	20 μl	30 μl
WT-1 Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα WT-1), 50 αντίγραφα (5×10^1 αντίγραφα μη μεταλλαγμένου τύπου/5 μl)	WT-1 WT-1 Μίνι	20 μl	30 μl
WT-2 Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα WT-2), 500 αντίγραφα (5×10^2 αντίγραφα μη μεταλλαγμένου τύπου/5 μl)	WT-2 WT-2 Μίνι	20 μl	30 μl

<i>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit</i>		(12)	(24)
Αρ. καταλόγου		673522	673523
Αριθμός αντιδράσεων		12	24
WT-3 Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα WT-3), 5.000 αντίγραφα (5 x 10 ³ αντίγραφα μη μεταλλαγμένου τύπου/5 µl)	WT-3 WT-3 Μίνι	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα WT-4), 50.000 αντίγραφα (5 x 10 ⁴ αντίγραφα μη μεταλλαγμένου τύπου/5 µl)	WT-4 WT-4 Μίνι	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT (Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 WT)*	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Μίνι 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F (Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 V617F)†	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Μίνι 25x	52 µl	95 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook</i> (Αγγλικά)		1	1

* Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για το μη μεταλλαγμένο γονίδιο-μάρτυρα JAK2 συν ειδικός ιχνηθέτης FAM™–TAMRA™.

† Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για τη μετάλλαξη JAK2 V617F συν ειδικός ιχνηθέτης FAM–TAMRA.

Σημείωση: Στροβολίστε και φυγοκεντρίστε σύντομα τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα και τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών πριν τη χρήση.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση
- Ρυθμιστικό διάλυμα και *Taq* DNA πολυμεράση: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι TaqMan Universal PCR Master Mix (κύριο μείγμα PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, αριθμός καταλόγου 4304437) και LightCycler TaqMan Master (κύριο μείγμα PCR 5x) (Roche, αριθμός καταλόγου 04535286001) ή LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (κύριο μείγμα 5x) (Roche, αριθμός καταλόγου 03515567001)

Αναλώσιμα

- Ανθεκτικά στα αερολύματα αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας PCR χωρίς νουκλεάση με υδρόφοβα φίλτρα
- Σωληνάρια PCR χωρίς νουκλεάση 0,5 ml ή 1,5 ml
- Πάγος

Εξοπλισμός

- Πιπέτα μικρολίτρων* αποκλειστική για PCR (1–10 μl, 10–100 μl, 100–1.000 μl)
- Φυγόκεντρος πάγκου* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml/1,5 ml και μικροπλακίδια (με δυνατότητα επίτευξης 13.000–14.000 rpm)
- Όργανο PCR πραγματικού χρόνου:* σύστημα Rotor-Gene Q 5plex HRM® ή άλλο Rotor Gene, LightCycler 1.2, 2.0 ή 480, ABI PRISM 7000, 7700 ή 7900HT SDS, ή όργανο SmartCycler, και σχετικό ειδικό υλικό
- Βιοφωτόμετρο

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

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

Γενικές προφυλάξεις

Η χρήση δοκιμασιών qPCR απαιτεί καλές εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του εξοπλισμού, οι οποίες είναι αποκλειστικές για τη μοριακή βιολογία, και πρέπει να συμμορφώνεται με τους ισχύοντες κανονισμούς και τα σχετικά πρότυπα.

Αυτό το kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται σε αυτό το kit έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση. Η περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων ή η αλλαγή των χρόνων και θερμοκρασιών επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασύμβατα δεδομένα. Τα αντιδραστήρια PPM-WT και PPM-VF μπορεί να αλλοιωθούν εάν εκτεθούν στο φως. Όλα τα αντιδραστήρια είναι μορφοποιημένα ειδικά για χρήση με αυτήν τη δοκιμασία. Για βέλτιστη απόδοση της δοκιμασίας, δεν επιτρέπεται να γίνουν υποκαταστάσεις.

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί:

- Επιμόλυνση DNA που μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση της μήτρας DNA
- Επιμόλυνση από μεταφορά DNA ή PCR με αποτέλεσμα ψευδές θετικό σήμα

Συνεπώς, συνιστούμε τα ακόλουθα.

- Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) χωρίς νουκλεάση και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπέτων για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Παρασκευάζετε το κύριο προ-μείγμα PCR με αποκλειστικά για το σκοπό αυτό υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν έχουν εισαχθεί μήτρες DNA (DNA, πλασμίδιο ή προϊόντα PCR). Προσθέτετε τη μήτρα σε ξεχωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε ξεχωριστό δωμάτιο) με ειδικά υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.).

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

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

- Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των εκκινήτων και μειγμάτων ιχνηθετών στο φως (σωληνάρια PPM-WT και PPM-VF).
- Αναμείξτε απαλά και φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια πριν το άνοιγμα.
- Φυλάσσετε όλα τα συστατικά του κιτ στους αρχικούς περιέκτες.

Αυτές οι συνθήκες φύλαξης ισχύουν τόσο για τα ανοιγμένα όσο και τα μη ανοιγμένα συστατικά. Συστατικά που φυλάσσονται σε συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που αναφέρονται στις ετικέτες ενδέχεται να μην έχουν σωστή απόδοση και να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Οι ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο υποδεικνύονται στις ετικέτες των επιμέρους συστατικών. Σε σωστές συνθήκες φύλαξης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του μέχρι την ημερομηνία λήξης που είναι τυπωμένη στην ετικέτα.

Δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια που να υποδεικνύουν τυχόν αστάθεια αυτού του προϊόντος. Εντούτοις, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα με άγνωστα δείγματα.

Διαδικασία

Προετοιμασία DNA δείγματος

Το γονιδιωματικό DNA πρέπει να λαμβάνεται είτε από ολικό αίμα, κεκαθαρμένα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος από ολικό αίμα, πολυπύρηννα κύτταρα, ή κοκκιοκύτταρα. Για συγκρίσιμα αποτελέσματα, συνιστάται να χρησιμοποιείται το ίδιο κυτταρικό κλάσμα και μέθοδος εκχύλισης DNA. Η εκχύλιση DNA μπορεί να διενεργηθεί χρησιμοποιώντας μια μέθοδο παρασκευής στο εργαστήριο ή ένα εμπορικώς διαθέσιμο kit.

Η ποσότητα του DNA πρέπει να καθορίζεται μετρώντας την οπτική πυκνότητα (OD) του δείγματος στα 260 nm και η ποιότητα του DNA μπορεί να καθοριστεί μέσω φασματοφωτομετρίας ή ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα*.

- Η αναλογία OD_{260}/OD_{280} πρέπει να είναι 1,7–1,9 και μικρότερες αναλογίες από αυτήν ενδέχεται να υποδεικνύουν επιμόλυνση πρωτεΐνης ή παρουσία οργανικών χημικών ουσιών.
- Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8–1,0%* θα πρέπει να επιτρέψει την οπτικοποίηση του απομονωμένου DNA ως διακριτή ζώνη περίπου 20 kb (ένα μικρό επίχρισμα θα δώσει αποδεκτά αποτελέσματα).

Το DNA που προκύπτει θα χρειαστεί να αραιωθεί σε μια συγκέντρωση 5 ng/μl σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TE* με pH 8,0 και στη συνέχεια να αποθηκευθεί στους +4 έως +8°C για 1 εβδομάδα ή στους –20°C εάν απαιτείται πιο μακροχρόνια φύλαξη.

Η αντίδραση qPCR είναι βελτιστοποιημένη για δείγματα DNA που περιέχουν 25 ng κεκαθαρμένου γονιδιωματικού DNA.

* Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα RotorGene Q MDx 5plex HRM ή Rotor

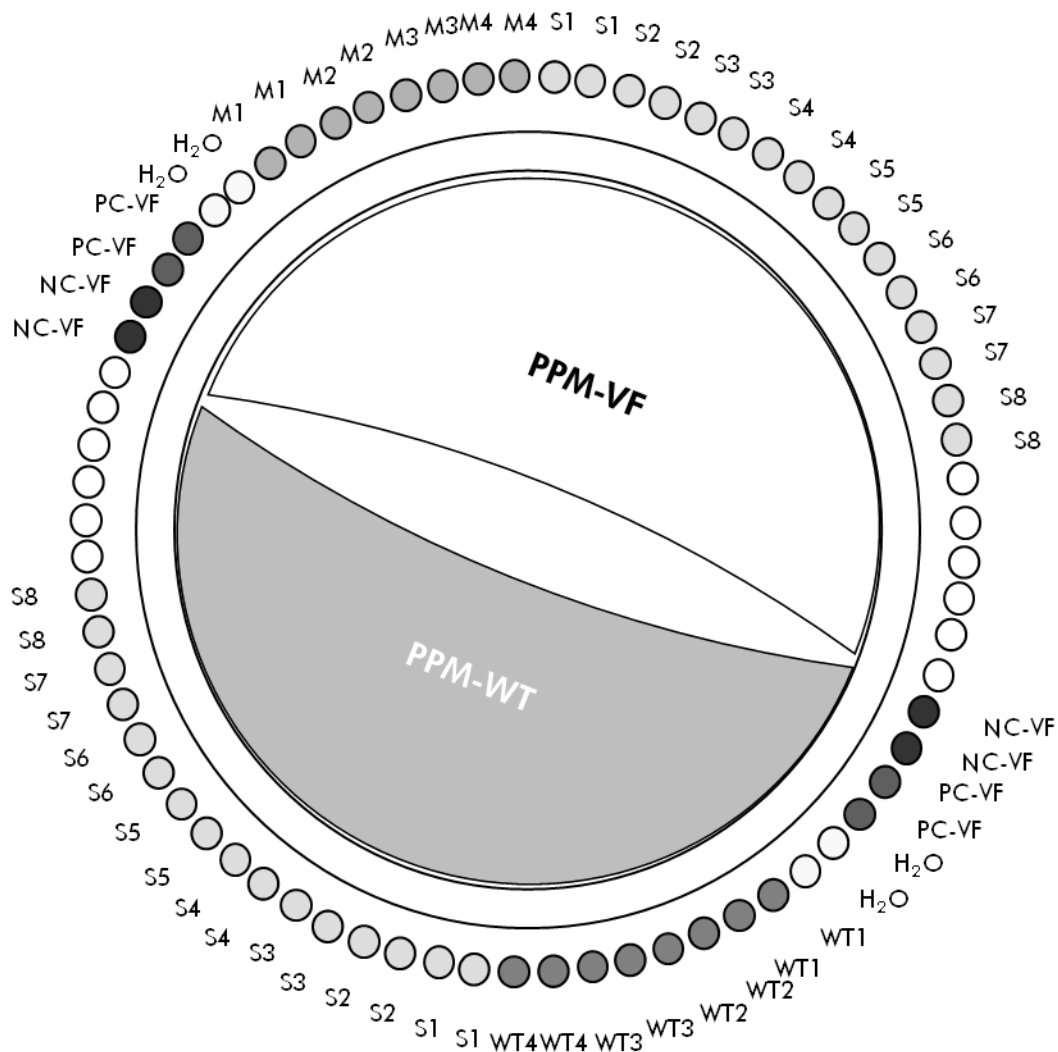
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αριθμός αντιδράσεων για όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 πρότυπα M-VF	8 αντιδράσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
n δείγματα DNA	n x 2 αντιδράσεις
2 μάρτυρες DNA	4 αντιδράσεις: θετικός μάρτυρας (PC-VF) και αρνητικός μάρτυρας (NC-VF), έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου (PPM-WT)	
4 πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου	8 αντιδράσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
n δείγματα DNA	n x 2 αντιδράσεις
2 μάρτυρες DNA	4 αντιδράσεις: PC-VF και NC-VF, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

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

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων DNA με το kit 24 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673523) και τουλάχιστον 6 δειγμάτων DNA με το kit 12 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673522) στο ίδιο πείραμα, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η χρήση των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών.



Εικόνα 3. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το kit *ipsogen JAK2 MutaQuant 24* δειγμάτων. **PC-VF: θετικός μάρτυρας V617F, **NC-VF**: αρνητικός μάρτυρας V617F, **M-VF**: πρότυπα V617F, **M-WT**: πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου, **S**: δείγμα DNA, **H₂O**: μάρτυρας νερού.**

Σημείωση: Φροντίστε έτσι ώστε να τοποθετείτε πάντοτε ένα δείγμα προς εξέταση στη θέση 1 του στροφέα. Διαφορετικά, κατά τη διάρκεια του βήματος βαθμονόμησης, το όργανο δεν θα εκτελέσει βαθμονόμηση, και θα ληφθούν εσφαλμένα δεδομένα φθορισμού.

Γεμίστε όλες τις άλλες θέσεις με κενά σωληνάρια.

qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Οι Πίνακες 3 και 4 περιγράφουν το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPM-VF είτε PPM-WT). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 3. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	Προ-μείγμα V617F 30 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	387,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	201,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25,0	25 έκαστο	–

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	Προ-μείγμα WT 30 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	387,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	201,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25,0	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR (VF ή WT) ανά σωληνάριο.
4. Προσθέστε 5 μl από το υλικό προς ποσοτικοποίηση (25 ng γονιδιωματικού DNA δείγματος ή μάρτυρας) στο αντίστοιχο φιαλίδιο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Προγραμματίστε το όργανο Rotor-Gene Q με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 62°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM στο κανάλι Green: Μονό

8. Για όργανα Rotor-Gene Q, επιλέξτε «Slope Correct» (διόρθωση κλίσης) για την ανάλυση. Συνιστούμε τη ρύθμιση του κατωφλίου στο 0,03. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πρωτόκολλο: qPCR στο σύστημα ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480

Κατά τη χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αριθμός αντιδράσεων με χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων

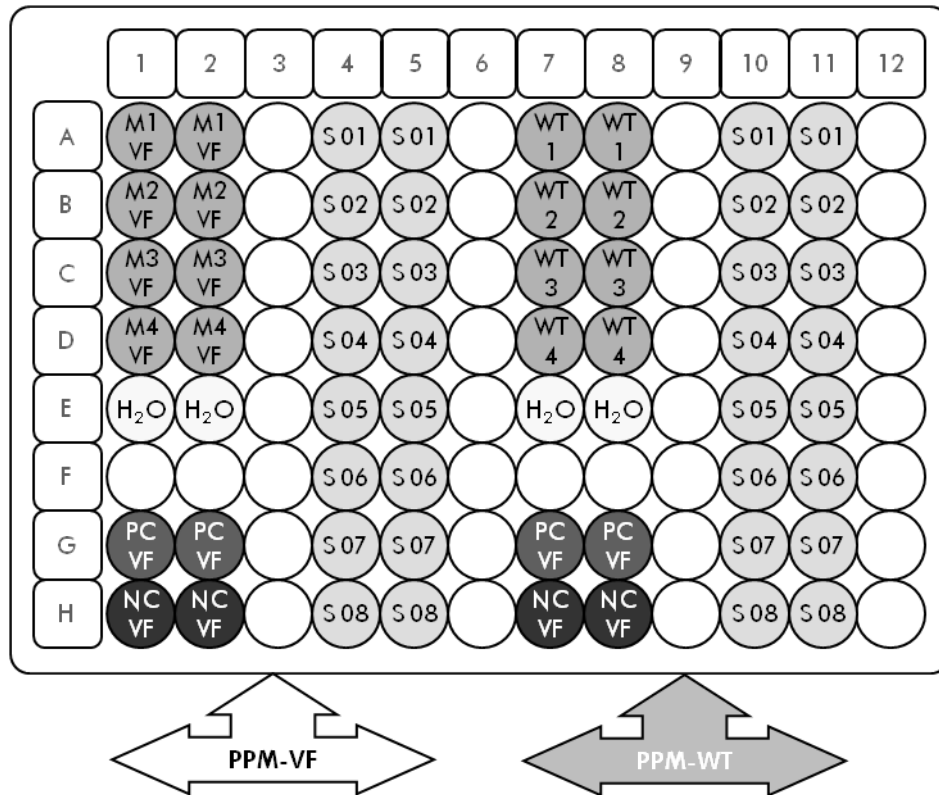
Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 πρότυπα M-VF	8 αντιδράσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
n δείγματα DNA	n x 2 αντιδράσεις
2 μάρτυρες DNA	4 αντιδράσεις: PC-VF και NC-VF, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου (PPM-WT)	
4 πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου	8 αντιδράσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
n δείγματα DNA	n x 2 αντιδράσεις
2 μάρτυρες DNA	4 αντιδράσεις: PC-VF και NC-VF, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων στο σύστημα ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480

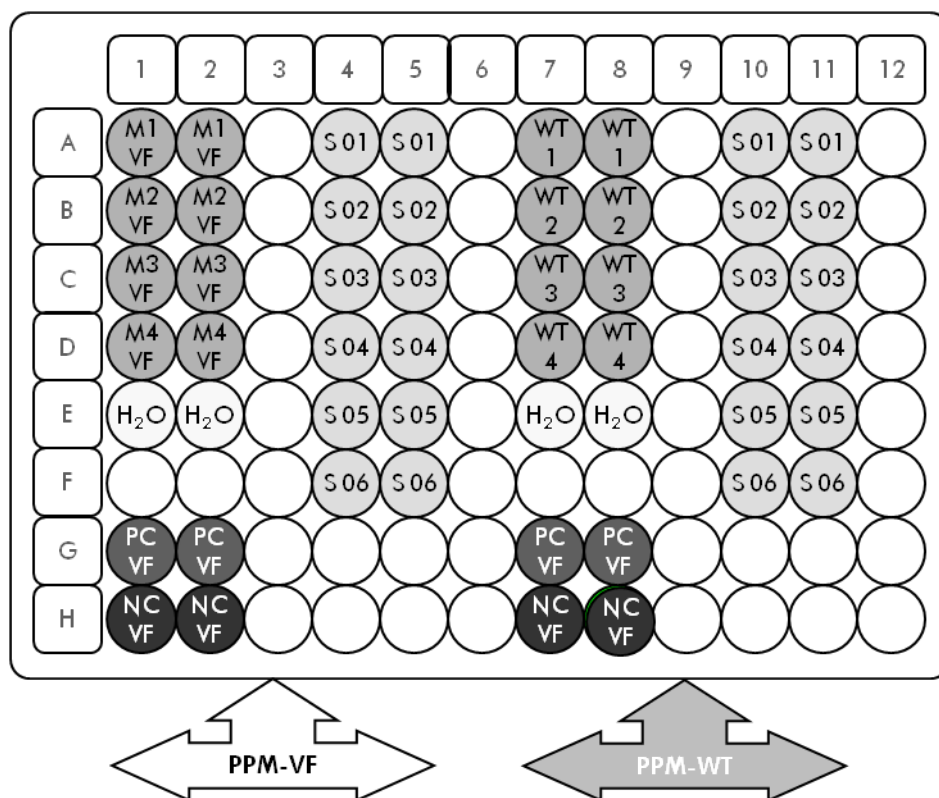
Συνιστούμε την εξέταση 8 δειγμάτων DNA με το κιτ 24 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673523) και τουλάχιστον 6 δειγμάτων DNA με το κιτ 12 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673522) στο ίδιο πείραμα, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η χρήση των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών.

Η διάταξη πλακιδίου στην Εικόνα 4 δείχνει ένα παράδειγμα ενός τέτοιου πειράματος χρησιμοποιώντας το κιτ 24 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673523),

και στην Εικόνα 5 δείχνει ένα παράδειγμα ενός τέτοιου πειράματος χρησιμοποιώντας το κιτ 12 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673522).



Εικόνα 4. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα χρησιμοποιώντας το κιτ 24 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673523). PC-VF: θετικός μάρτυρας V617F, **NC-VF:** αρνητικός μάρτυρας V617F, **M-VF:** πρότυπα V617F, **M-WT:** πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου, **S:** δείγμα DNA, **H₂O:** μάρτυρας νερού



Εικόνα 5. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα χρησιμοποιώντας το κιτ 12 αντιδράσεων (αρ. καταλόγου 673522). **PC-VF:** θετικός μάρτυρας V617F, **NC-VF:** αρνητικός μάρτυρας V617F, **M-VF:** πρότυπα V617F, **M-WT:** πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου, **S:** δείγμα DNA, **H₂O:** μάρτυρας νερού

qPCR στο σύστημα ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Οι Πίνακες 7 και 8 περιγράφουν το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστήριων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPM-VF είτε PPM-WT). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	Προ-μείγμα V617F			Τελική συγκέντρωση
	1 αντίδραση (μl)	26 + 1 αντιδράσεις (μl)	30 + 1 αντιδράσεις (μl)	
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	175,5	201,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25,0	25 έκαστο	25 έκαστο	–

Πίνακας 8. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	Προ-μείγμα WT			Τελική συγκέντρωση
	1 αντίδραση (μl)	26 + 1 αντιδράσεις (μl)	30 + 1 αντιδράσεις (μl)	
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	175,5	201,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25,0	25 έκαστο	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR (VF ή WT) ανά φρεάτιο.
4. Προσθέστε 5 μl από το υλικό προς ποσοτικοποίηση (25 ng γονιδιωματικού DNA δείγματος ή μάρτυρας) στο αντίστοιχο φρεάτιο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Κλείστε το πλακίδιο και φυγοκεντρίστε σύντομα (300 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Τοποθετήστε το πλακίδιο στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης και ρυθμίστε το όργανο για τη λήψη φθορίζοντος ιχνηθέτη FAM διπλής σήμανσης, όπως υποδεικνύεται

στον Πίνακα 9 για το σύστημα ABI PRISM 7900HT SDS και Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, ή στον Πίνακα 10 για το όργανο LightCycler 480.

Πίνακας 9. Προφίλ θερμοκρασίας για το σύστημα ABI PRISM 7900HT SDS και Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR

Λειτουργία ανάλυσης	Πρότυπη καμπύλη — Απόλυτη ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 63°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα με λήψη φθορισμού FAM, χρωστική απόσβεσης φθορισμού: TAMRA

Πίνακας 10. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

Λειτουργία ανάλυσης	Απόλυτη ποσοτικοποίηση («Abs Quant»)
Μορφές ανίχνευσης	Επιλέξτε «Simple Probe» (απλός ιχνηθέτης) στο παράθυρο Detection formats (μορφές ανίχνευσης)
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 63°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα με λήψη φθορισμού FAM που αντιστοιχεί σε (483–533 nm) για LC έκδοση 01 και (465–510 nm) για LC έκδοση 02

9. Για το σύστημα ABI PRISM 7900HT και Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, ακολουθήστε το βήμα 8α. Για το όργανο LightCycler 480, ακολουθήστε το βήμα 8β.
- 9α. Σύστημα ABI PRISM 7900HT και Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 0,1. Ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9.
- 9β. LightCycler 480: Συνιστούμε μια λειτουργία ανάλυσης Fit point (σημεία προσαρμογής) με υπόβαθρο στο 2,0 και κατώφλι στο 2,0. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 10.

Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο LightCycler 1.2

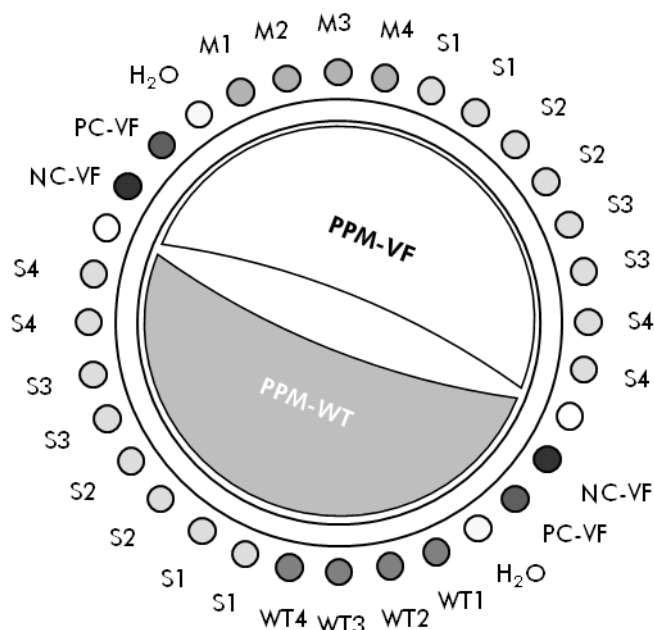
Κατά τη χρήση τριχοειδών οργάνων, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο LightCycler 1.2

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 πρότυπα M-VF	4 αντιδράσεις, ένα εκάστο εξεταζόμενο εις απλούν
n δείγματα DNA	n x 2 αντιδράσεις
2 μάρτυρες DNA	2 αντιδράσεις: PC-VF και NC-VF, ένα εκάστο εξεταζόμενο εις απλούν
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου (PPM-WT)	
4 πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου	4 αντιδράσεις, ένα εκάστο εξεταζόμενο εις απλούν
n δείγματα DNA	n x 2 αντιδράσεις
2 μάρτυρες DNA	2 αντιδράσεις: PC-VF και NC-VF, ένα εκάστο εξεταζόμενο εις απλούν
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στο όργανο LightCycler 1.2

Συνιστούμε την εξέταση 4 δειγμάτων DNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών. Η διάταξη των τριχοειδών στην Εικόνα 6 δείχνει ένα παράδειγμα πειράματος.



Εικόνα 6. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*. PC-VF: θετικός μάρτυρας V617F, NC-VF: αρνητικός μάρτυρας V617F, M-VF: πρότυπα V617F, M-WT: πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου, S: δείγμα DNA, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR στο όργανο LightCycler 1.2

Σημείωση: Λόγω ιδιαίτερων τεχνολογικών απαιτήσεων, τα πειράματα στο LightCycler πρέπει να πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια. Συνιστούμε τη χρήση του LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe και την τήρηση των οδηγιών του κατασκευαστή για την προετοιμασία του κύριου μείγματος 5x.

Σημείωση: Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Οι Πίνακες 12 και 13 περιγράφουν το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 20 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPM-VF είτε PPM-WT). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 12. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	Προ-μείγμα V617F 15 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Φρέσκο προετοιμασμένο μείγμα LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x	4,0	64,0	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	10,2	163,2	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	20,0	20 έκαστο	–

Πίνακας 13. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	Προ-μείγμα WT 15 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Φρέσκο προετοιμασμένο μείγμα LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x	4,0	64,0	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, PPM- WT 25x	0,8	12,8	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	10,2	163,2	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	20,0	20 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 15 μl από το προ-μείγμα qPCR (VF ή WT) ανά τριχοειδές.
4. Προσθέστε 5 μl από το υλικό προς ποσοτικοποίηση (25 ng γονιδιωματικού DNA δείγματος ή μάρτυρας) στο αντίστοιχο φιαλίδιο (συνολικός όγκος 20 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα τριχοειδή στους προσαρμογείς που παρέχονται με τη συσκευή, και φυγοκεντρίστε σύντομα (700 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Φορτώστε τα τριχοειδή στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Προγραμματίστε το όργανο LightCycler 1.2 με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση 1	Θερμοκρασία: 55°C Χρόνος: 2 λεπτά Ράμπα: 20
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά Ράμπα: 20
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα, ράμπα: 20 66°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20, με λήψη φθορισμού FAM: Μονό

9. Για το LightCycler 1.2, συνιστάται η λειτουργία F1/F2 και «2nd derivative analysis» (ανάλυση 2ης παραγώγου). Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 14.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αρχή της ανάλυσης δεδομένων

Τα δεδομένα για τον κύκλο κατωφλίου (C_T) και οι τιμές σημείου διασταύρωσης (C_P) μπορούν να εξαχθούν από το όργανο qPCR και να επικολληθούν σε ένα αρχείο Excel[®] για ανάλυση. Αυτές οι τιμές μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της μέσης τιμής για C_P και C_T και οι τυπικές μέσες τιμές C_T μπορούν να σχεδιαστούν για τη λήψη μιας πρότυπης καμπύλης τόσο για τα πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου όσο και για τα πρότυπα V617F χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση και τον Πίνακα 15.

$y = \text{Μέση } C_P, x = \log_{10} \text{ CN}$ όπου CN= αριθμός αντιγράφων γονιδίου στο δείγμα 5 μl

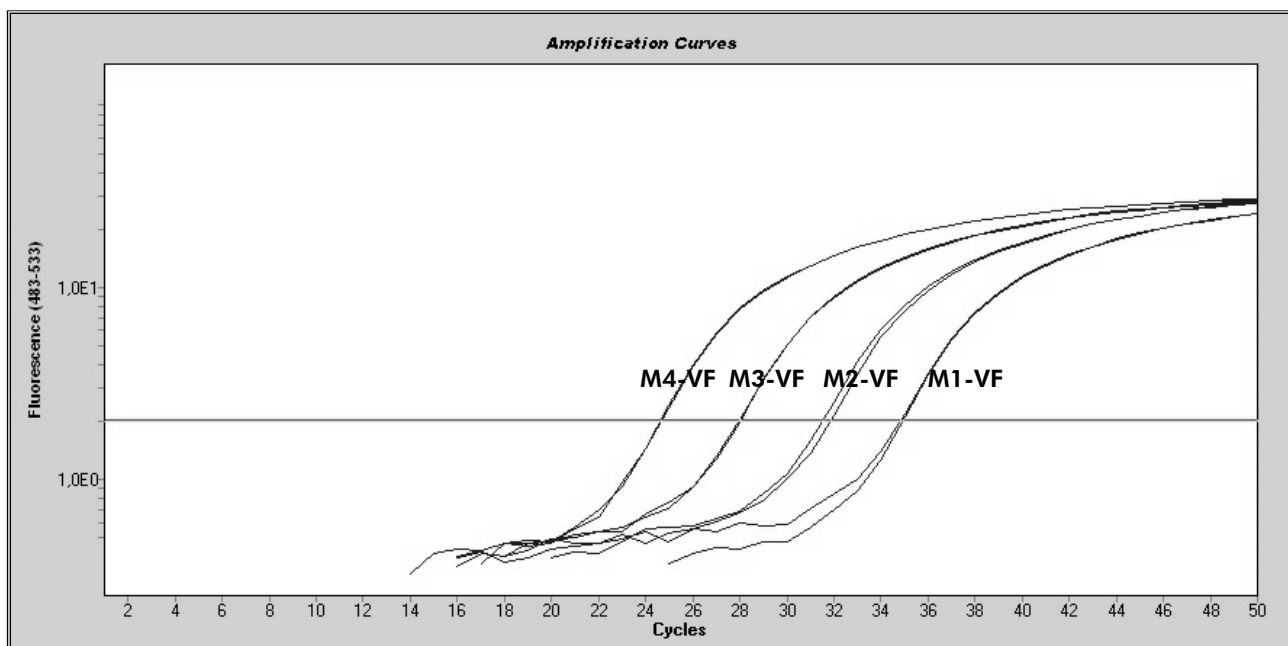
Πίνακας 15. Ποσοτικά δεδομένα για τα πρότυπα μη μεταλλαγμένου τύπου και τα πρότυπα V617F

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

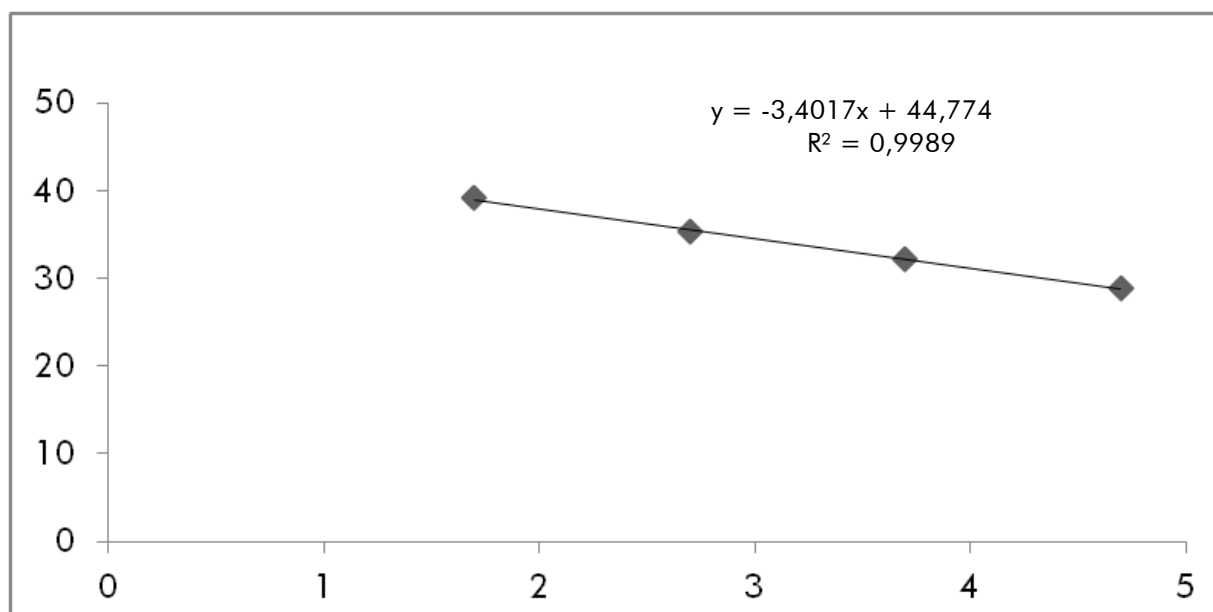
Σημείωση: Κάθε χρήστης πρέπει να μετρά τη δική του επαναληψιμότητα στο εκάστοτε εργαστήριο.

Πρότυπη καμπύλη και κριτήρια ποιότητας

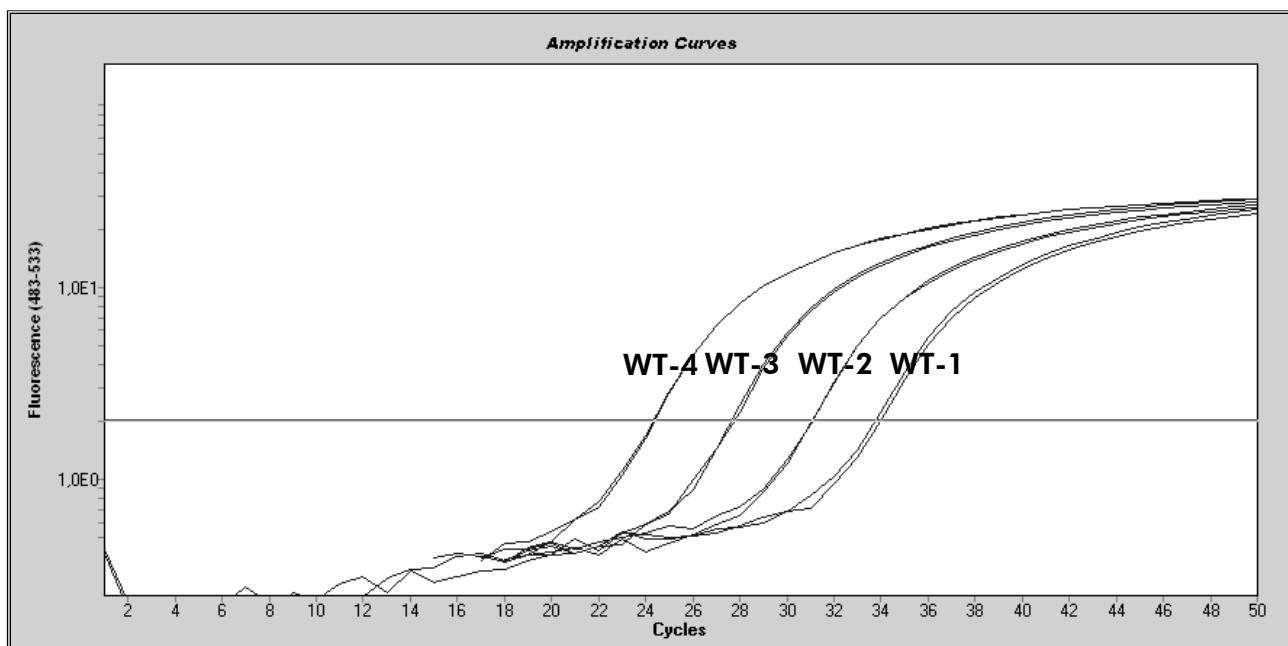
Οι Εικόνες 7 και 9 δείχνουν παραδείγματα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με το kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant και οι Εικόνες 8 και 10 δείχνουν ένα παράδειγμα της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται με βάση 4 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.



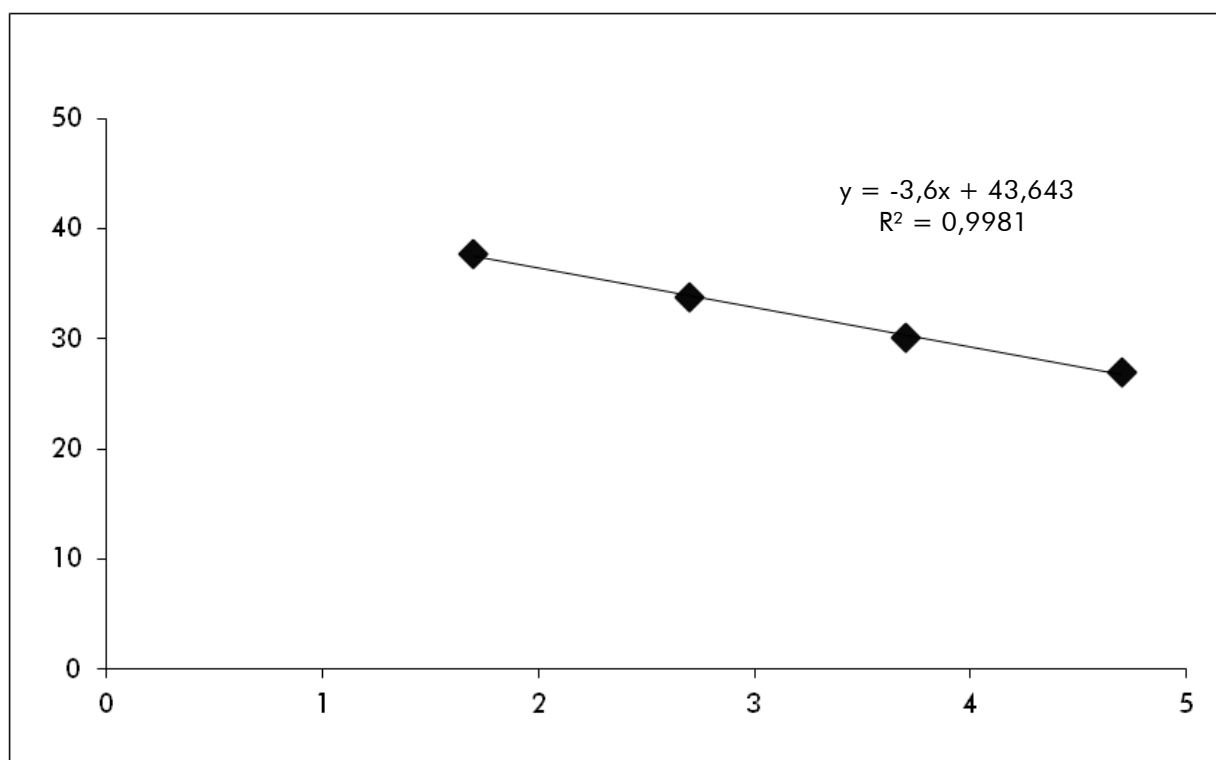
Εικόνα 7. Διάγραμμα ενίσχυσης 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 και 5×10^4 αντιγράφων του πλασμιδίου JAK2 V617F (μάρτυρες M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF, αντίστοιχα).



Εικόνα 8. Πρότυπη καμπύλη για JAK2 V617F.



Εικόνα 9. Διάγραμμα ενίσχυσης 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 και 5×10^4 αντιγράφων του πλασμιδίου JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου (μάρτυρες WT-1, WT-2, WT-3 και WT-4, αντίστοιχα).



Εικόνα 10. Πρότυπη καμπύλη για JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου.

Καθώς τα πρότυπα είναι 10-πλάσιες αραιώσεις, η θεωρητική κλίση της καμπύλης είναι $-3,32$. Μια κλίση μεταξύ $-3,0$ και $-3,9$ είναι αποδεκτή εφόσον

R² είναι >0,95 (12). Ωστόσο, μια τιμή για R² >0,98 είναι επιθυμητή για ακριβή αποτελέσματα (13).

Οι εξισώσεις πρότυπης καμπύλης μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των αριθμών αντιγράφων V617F και WT log₁₀ στα άγνωστα δείγματα.

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης V617F πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των ακατέργαστων μέσων όρων των τιμών C_P/C_T (που λαμβάνονται με PPM-VF) για τα άγνωστα δείγματα και τα δείγματα μαρτύρων, σε αριθμούς αντιγράφων JAK2 V617F (CN_{V617F}).

$$\log_{10} \text{CN}_{V617F} = \frac{(\text{Μέση } C_{pV617F} - \text{Τομή πρότυπης καμπύλης}_{V617F})}{\text{Κλίση πρότυπης καμπύλης}_{V617F}}$$

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης μη μεταλλαγμένου τύπου πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μετατροπή της ακατέργαστης μέσης τιμής C_P/C_T (που λαμβάνεται με PPM-WT) για τα άγνωστα δείγματα και τα δείγματα μαρτύρων, σε αριθμούς αντιγράφων JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου (CN_{WT}).

$$\log_{10} \text{CN}_{WT} = \frac{(\text{Μέση } C_{pWT} - \text{Τομή πρότυπης καμπύλης}_{WT})}{\text{Κλίση πρότυπης καμπύλης}_{WT}}$$

Έκφραση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα είναι σε σχέση προς 25 ng συνολικού γονιδιωματικού DNA και πρέπει να εκφράζονται ως το ποσοστό του JAK2 V617F ως εξής.

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

Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ θυγατρικών κλώνων

Τα λαμβανόμενα δεδομένα πρέπει να είναι συναφή μεταξύ των εις διπλούν εκτελέσεων.

Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Ο θετικός μάρτυρας ή PC-VF θα πρέπει να δώσει ποσοστό JAK2 V617F που να είναι υψηλότερο από 99,9%.

Ο αρνητικός μάρτυρας ή NC-VF θα πρέπει να δώσει ποσοστό JAK2 V617F που να είναι χαμηλότερο από 0,1%.

Εάν αυτοί οι μάρτυρες δεν λειτουργήσουν σωστά, ανατρέξτε στην ενότητα «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», σελίδα 38, για να βρείτε μια λύση.

Μάρτυρες νερού

Οι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να δώσουν μηδενικό CN τόσο για την ανίχνευση JAK2 V617F όσο και για την ανίχνευση JAK2 μη μεταλλαγμένου τύπου.

Ένας θετικός μάρτυρας νερού προκύπτει από διασταυρούμενη μόλυνση. Βλ. «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», παρακάτω, για να βρείτε μια λύση.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι/-ες να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και το πρωτόκολλο αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. «Πληροφορίες επικοινωνίας», σελίδα 47).

Σχόλια και προτάσεις

Η πρότυπη καμπύλη για μη μεταλλαγμένο τύπο ή V617F δεν είναι γραμμική

Αναστροφή φιαλιδίου, αναστροφή κατά τη διάρκεια της διανομής, διασταυρούμενη μόλυνση, μερική αποικοδόμηση του προτύπου, αντιδραστήριο RQPCR, μη ειδική ενίσχυση, ή σφάλμα προγράμματος PCR

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaQuant στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών προστατευμένα από το φως. Βλ. «

Φύλαξη και χειρισμός **αντιδραστηρίων**», σελίδα 15.

Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

Σχόλια και προτάσεις

Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα για ένα πρότυπο

Δεν έγινε διανομή του προτύπου, ή έγινε χρήση του ίδιου μείγματος PPM

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.
Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.

Ο αρνητικός (H₂O) μάρτυρας είναι θετικός

Διασταυρούμενη μόλυνση, επιμόλυνση αντιδραστηρίου, σφάλμα οργάνου, αναστροφή φρεατίου ή τριχοειδούς, ή αποικοδόμηση ιχνηθέτη

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.

Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του kit και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

Διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών προστατευμένα από το φως.

Ελέγξτε για ψευδή θετικά στις καμπύλες φθορισμού.

Απουσία σήματος, ακόμα και στον πρότυπο μάρτυρα

a) Επιλέχθηκε λανθασμένο κανάλι ανίχνευσης

Ρυθμίστε το κανάλι σε F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

b) Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή παράλειψη αντιδραστηρίων

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.
Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.

c) Απουσία προγράμματος λήψης δεδομένων

Ελέγξτε το πρόγραμμα κύκλων.
Επιλέξτε τη λειτουργία λήψης «Single» (μονό) στο τέλος κάθε τμήματος ανασύνδεσης του προγράμματος PCR.

Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα στα δείγματα αλλά οι πρότυποι μάρτυρες είναι εντάξει

Ανασταλτικές επιδράσεις του υλικού του δείγματος προκαλούμενες από ανεπαρκή καθαρισμό

Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του DNA (OD_{260}/OD_{280}) και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Επαναλάβετε την προετοιμασία DNA.

Σχόλια και προτάσεις

Η ένταση του φθορισμού είναι πολύ χαμηλή

a) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ

Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.

Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* JAK2 MutaQuant στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών προστατευμένα από το φως. Βλ. «

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 15.

Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

b) Πολύ χαμηλή αρχική ποσότητα DNA-στόχου

Ελέγξτε την ποσότητα του DNA δείγματος.

Σημείωση: Ανάλογα με την επιλεγμένη μέθοδο προετοιμασίας DNA, ενδέχεται να υπάρξουν ανασταλτικές επιδράσεις.

Οι αρνητικοί μάρτυρες είναι θετικοί

Επιμόλυνση από μεταφορά

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.

Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.

Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του κιτ και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

Η ένταση φθορισμού ποικίλλει

a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα

Στροβιλίστε και περιδινίστε όλα τα αντιδραστήρια μετά την απόψυξη.

Η μεταβλητότητα του LightCycler που προκαλείται από το επανομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

Σχόλια και προτάσεις

- b) Ανεπαρκής φυγοκέντριση του πλακιδίου, των σωληναρίων ή των τριχοειδών, ή το προετοιμασμένο μείγμα PCR μπορεί ακόμα να βρίσκεται στο επάνω δοχείο του τριχοειδούς, ή φυσαλίδα αέρα εγκλωβισμένη στο άκρο του τριχοειδούς
- Πάντοτε να φυγοκεντρίζετε τα τριχοειδή φορτωμένα με το μείγμα της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στο ειδικό εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής.
- c) Η εξωτερική επιφάνεια του άκρου του τριχοειδούς είναι βρώμικη
- Πάντοτε να φοράτε γάντια όταν χειρίζεστε τα τριχοειδή.

Σήμα θετικών μαρτύρων μη μεταλλαγμένου τύπου ή V617F χρησιμοποιώντας το αμοιβαίο PPM

Διασταυρούμενη μόλυνση, επιμόλυνση αντιδραστήριου, ή αναστροφή φρεατίου ή τριχοειδούς

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.

Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.

Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του kit και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Αντεστραμμένη ανίχνευση θετικού μάρτυρα

Κατανεμημένη αναστροφή του PPM στο φρεάτιο ή τριχοειδές ή στο προ-μείγμα

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Απουσία σήματος για ένα θετικό μάρτυρα ή και τους δύο

Παράλειψη PPM ή DNA μάρτυρα

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Υψηλό υπόβαθρο

Λεύκανση του φθορισμοφόρου

Φυλάσσετε και χειρίζεστε τον ιχνηθέτη προστατευμένο από το φως.

Κακή αναπαραγωγικότητα για τα εις διπλούν δείγματα

Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή διασταυρούμενη μόλυνση

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Ποιοτικός έλεγχος

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

Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να έχουν εκπαιδευτεί και εξοικειωθεί με την τεχνολογία πριν από τη χρήση αυτής της συσκευής. Αυτό το kit πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με ένα επικυρωμένο όργανο που αναφέρεται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 12.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων. Η επαλήθευση της απόδοσης του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες που εφαρμόζονται στο εκάστοτε εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες αξιολόγησης απόδοσης της QIAGEN αποτελούν ευθύνη του χρήστη.

Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Μη κλινικές μελέτες

Ακρίβεια

Μια μελέτη ακρίβειας διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας 12 δείγματα DNA εγχυλισμένου από κυτταρικές σειρές που αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά φορτία αλληλόμορφων JAK2 V617F. Ένα σύνολο 80 μετρήσεων διενεργήθηκε σε κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικές παρτίδες του kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Αυτή η μελέτη ακρίβειας χρησιμοποίησε ένα σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR.

Τα αναλυτικά δεδομένα συνοψίζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Δεδομένα ακρίβειας δειγμάτων DNA

Δείγμα	Θεωρητικό JAK2 V617F (%)	n*	Μέσος όρος (%)	ΣΔ (%)	Εκατοστημόριο	
					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

* Τιμές εκτός ορίων αποκλείστηκαν. Αυτές καθορίστηκαν ως τιμές μικρότερες από το κατώτερο τεταρτημόριο μείον 3 φορές το διατεταρτημοριακό εύρος ή μεγαλύτερες από το ανώτερο τεταρτημόριο συν 3 φορές το διατεταρτημοριακό εύρος σε ένα σχηματικό (Box and Whisker) διάγραμμα.

n = αριθμός των επικυρωμένων δειγμάτων, ΣΔ = καθολικός συντελεστής διακύμανσης.

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το επίπεδο υποβάθρου ή το επίπεδο τυφλού (LOB) προσδιορίστηκε σε αρνητικά δείγματα (8 δείγματα, 76 μετρήσεις). Αυτό βρέθηκε ότι είναι 0,014%.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστά ως θετικά, αλλά με χαμηλή έκφραση (7 δείγματα, 68 μετρήσεις). Αυτό βρέθηκε ότι είναι 0,061%, με άνω όριο 90% διαστήματος εμπιστοσύνης στα 0,091%.

Αυτή η βέλτιστη ευαισθησία μπορεί να ληφθεί σε δείγματα που περιέχουν τουλάχιστον 10.000 αντίγραφα του γονιδίου JAK2 (μη μεταλλαγμένου τύπου ή μετάλλαξη V617F).

Τα δεδομένα ποσοτικοποίησης πρέπει να αναφέρονται ως εξής.

- JAK2 V617F $\leq 0,014\%$ μπορεί να ερμηνευθεί ως ότι η μετάλλαξη JAK2 V617F δεν ανιχνεύθηκε.
- JAK2 V617F είναι $>0,014\%$ αλλά $<0,091\%$ μπορεί να ερμηνευθεί ως αμφίβολο αποτέλεσμα (γκρίζα ζώνη).
- JAK2 V617F $\geq 0,091\%$ μπορεί να ερμηνευθεί ως θετικό αποτέλεσμα και ότι η μετάλλαξη JAK2 V617F ανιχνεύθηκε.

Γραμμικότητα

Μελέτες γραμμικότητας διενεργήθηκαν σε 12 δείγματα, το καθένα από τα οποία ελήφθη από ένα διαφορετικό μείγμα DNA εγχυλισμένο από κυτταρικές σειρές που ήταν θετικές και αρνητικές για τη μετάλλαξη JAK2 V617F. Κάθε δείγμα εξετάστηκε 5 φορές. Τα δεδομένα από αυτήν τη μελέτη έδειξαν ότι το kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant έδωσε γραμμικά αποτελέσματα σε όλο το δυναμικό εύρος.

Κλινικές μελέτες

DNA από αίμα ή μυελό των οστών εκχυλίστηκε από 87 δείγματα ασθενών και αναλύθηκε με χρήση του kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Επιπροσθέτως, το ποσοστό των μεταλλάξεων JAK2 V617F ποσοτικοποιήθηκε και συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα των εξετάσεων διαλογής που ελήφθησαν με το kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ (αρ. καταλόγου 673223). Τα ληφθέντα δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Πίνακας συσχέτισμού που δείχνει τη συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με το kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* και το kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ*

		Αποτελέσματα από το kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ</i>			n
		Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	Αμφίβολο αποτέλεσμα	Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	
Αποτελέσματα από το kit <i>ipsogen JAK2 MutaQuant</i>	Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	40	2	7	49
	Αμφίβολο αποτέλεσμα	0	0	21	21
	Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Συμφωνία θετικών		100% (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 91%, 100%)			
Συμφωνία αρνητικών		71% (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 51%, 85%)			
Συνολική συμφωνία		89% (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 79%, 95%)			

Βιβλιογραφία

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.

Σύμβολα

Τα ακόλουθα σύμβολα μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και στην 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



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support, καλέστε 00800-22-44-6000 ή επικοινωνήστε με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Για 12 αντιδράσεις: Μη μεταλλαγμένο γονίδιο-μάρτυρας JAK2, γονίδιο-μάρτυρας JAK2 V617F, εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών PPM-WT, εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Μη μεταλλαγμένο γονίδιο-μάρτυρας JAK2, γονίδιο-μάρτυρας JAK2 V617F, εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών PPM-WT, εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx - για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπροντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνει εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπροντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από τις Τεχνικές Υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Αυτό το προϊόν προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα προϊόντα *ipsogen* δεν επιτρέπεται να μεταπωληθούν, να τροποποιηθούν για μεταπώληση ή να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή εμπορικών προϊόντων χωρίς την έγγραφη έγκριση της QIAGEN.

Οι πληροφορίες στο παρόν έγγραφο μπορεί να αλλάξουν χωρίς προειδοποίηση. Η QIAGEN δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για τυχόν σφάλματα που μπορεί να περιέχονται σε αυτό το έγγραφο. Αυτό το έγγραφο θεωρείται ότι είναι πλήρες και ακριβές κατά το χρόνο της δημοσίευσης. Σε καμία περίπτωση η QIAGEN δεν ευθύνεται για τυχαίες, ειδικές, πολλαπλές ή επακόλουθες ζημιές σε σχέση με, ή που προκύπτουν από τη χρήση αυτού του εγγράφου.

Τα προϊόντα *ipsogen* είναι εγγυημένα ότι πληρούν τις δηλωμένες προδιαγραφές τους. Η αποκλειστική υποχρέωση της QIAGEN και η αποκλειστική αποκατάσταση του πελάτη περιορίζονται στην αντικατάσταση των προϊόντων δωρεάν σε περίπτωση που η απόδοση των προϊόντων αυτών δεν είναι η προβλεπόμενη.

Η μετάλλαξη JAK2 V617F και οι χρήσεις αυτής προστατεύονται από δικαιώματα πνευματικής ιδιοκτησίας, συμπεριλαμβανομένου του Ευρωπαϊκού διπλώματος ευρεσιτεχνίας EP 1692281, των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας Η.Π.Α. 7,429,456 και 7,781,199, των εφαρμογών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας Η.Π.Α. US20090162849 και US20120066776, και αντιστοίχων άλλων χωρών.

Η αγορά αυτού του προϊόντος δεν διαβιβάζει κανένα δικαίωμα για τη χρήση του για κλινικές δοκιμές για φάρμακα στοχευμένα στην JAK2V617F. Η QIAGEN αναπτύσσει ειδικά προγράμματα άδειας για τέτοιες χρήσεις. Παρακαλούμε επικοινωνήστε με το νομικό τμήμα της εταιρείας μας στο jak2licenses@qiagen.com.

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

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ *ipsogen* JAK2 MutaQuant των εξής όρων:

1. Η χρήση του κιτ *ipsogen* JAK2 MutaQuant επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο κιτ ipsogen JAK2 MutaQuant* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το κιτ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του κιτ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο κιτ ipsogen JAK2 MutaQuant* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το κιτ και/ή η χρήση/-εις του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του κιτ συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις 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 δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοσδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

www.qiagen.com

