

Instrukcja zestawu *ipsogen*[®] JAK2 MutaSearch[®] Kit



Wersja 1

IVD

Jakościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®],
ABI PRISM[®] oraz LightCycler[®]



REF

673823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY

R4

MAT

1072502PL



Technologie badań i analizy firmy QIAGEN

Firma QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii oczyszczania próbek i ich analizy, umożliwiając izolację i wykrywanie zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane, wysokiej jakości produkty i usługi zapewniają sukces na każdym etapie - od chwili pobrania próbki do uzyskania wyniku.

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:

- ⊕ Oczyszczania DNA, RNA i białek
- ⊕ Analizy kwasów nukleinowych i białek
- ⊕ Badań nad mikroRNA oraz RNAi
- ⊕ Automatyzacji technologii obróbki próbek i ich analizy

Naszą misją jest umożliwienie Państwu osiągnięcie znakomitych i przełomowych wyników w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie **www.qiagen.com**.

Spis treści

| | |
|--|----|
| Przeznaczenie zestawu | 4 |
| Streszczenie i wyjaśnienia | 4 |
| Zasada procedury | 6 |
| Dostarczone materiały | 9 |
| Zawartość zestawu | 9 |
| Ostrzeżenia i uwagi | 11 |
| Uwagi ogólne | 11 |
| Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami | 12 |
| Procedura | 13 |
| Przygotowanie próbki DNA | 13 |
| Przechowywanie kwasów nukleinowych | 13 |
| Protokół: qPCR na aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem 72-probówkowym | 14 |
| Protokół: qPCR na aparatach Applied Biosystems7500, ABI PRISM 7900HT lub LightCycler 480 | 18 |
| Protokół: qPCR na aparacie LightCycler 1.2 | 22 |
| Interpretacja wyników | 26 |
| Obliczanie $\Delta\Delta C_T$ (lub $\Delta\Delta C_p$) i genotypowanie | 26 |
| Kontrole | 29 |
| Rozwiązywanie problemów | 29 |
| Kontrola jakości | 31 |
| Ograniczenia | 32 |
| Charakterystyka wydajności | 32 |
| Badania niekliniczne | 32 |
| Badania kliniczne | 34 |
| Literatura | 36 |
| Symbole | 37 |
| Informacje kontaktowe | 37 |
| Informacje dotyczące zamawiania | 38 |

Przeznaczenie zestawu

Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit jest przeznaczony do wykrywania mutacji JAK2 V617F/G1849T w DNA genomowym u pacjentów z podejrzeniem nowotworu mieloproliferacyjnego. Obecność JAK2 V617F/G1849T nie wyklucza obecności innych mutacji JAK2. Test może podawać fałszywie ujemne wyniki w przypadku dodatkowych mutacji zlokalizowanych w nukleotydach 88 504 do 88 622 (nr referencyjny NCBI NT_008413).

Uwaga: Zestaw powinien być używany zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawu, razem ze zwalidowanymi odczynnikami i aparatami. Jakiegokolwiek użycie tego produktu w inny sposób niż opisany i/lub dokonywanie modyfikacji składników zestawu skutkuje utratą gwarancji firmy QIAGEN.

Streszczenie i wyjaśnienia

Powtarzająca się mutacja somatyczna V617F wpływająca na gen kinazy tyrozynowej Janus 2 (JAK2) została zidentyfikowana w 2005 r. (1-4), co doprowadziło do znacznego przełomu w zrozumieniu, klasyfikacji i diagnozie nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN). JAK2 jest kluczową wewnątrzkomórkową cząsteczką sygnalizacyjną dla wielu cytokin, w tym erytropoetyny.

Mutacja JAK2 V617F jest wykrywana u >95% pacjentów z czerwienicą prawdziwą (PV), 50-60% pacjentów z nadpłytkowością samoistną (ET) oraz u 50% pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku (PMF). JAK2 V617F wykryto również w rzadkich przypadkach przewlekłej białaczki mielomonocytarnej, zespołu mielodysplastycznego, mastocytozy układowej i przewlekłej białaczki neutrofilowej, ale w 0% CML (5).

Mutacja odpowiada jednonucleotydowej zmianie nukleotydu JAK2 1849 w eksonie 14, dając w efekcie unikalną substytucję waliny (V) do fenyloalaniny (F) w pozycji 617 białka (domena JH2). Prowadzi to do konstytutywnej aktywacji JAK2, transformacji hematopoetycznej *in vitro* i wzrostu erytroidalnej kolonii erytropoetyno-niezależnej (ang. EEC) u wszystkich pacjentów z PV i dużej części pacjentów z ET i PMF (6). JAK2 V617F stanowi kluczowy czynnik w transformacji komórek krwiotwórczych w MPN, ale dokładne mechanizmy patologiczne prowadzące, z tą samą unikalną mutacją, do różnych jednostek klinicznych i biologicznych nie są w pełni wyjaśnione.

Tradycyjnie, diagnoza MPN była oparta na kryteriach klinicznych, cytogenetycznych i histologii szpiku. Odkrycie markera molekularnego specyficznego dla tej choroby spowodowało zarówno uproszczenie procesu, jak i zwiększenie dokładności diagnostycznej. Wykrywanie mutacji JAK2 V617F jest obecnie częścią referencyjnych kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) 2008 dla diagnozy MPN negatywnego dla MPN BCR-ABL (Tabela 1), a obecność tej mutacji jest głównym kryterium potwierdzenia diagnostycznego.

Tabela 1. Kryteria WHO dla diagnozy nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN), zaczerpnięte z punktu 7 literatury

| Kryteria diagnozy czerwienicy prawdziwej (PV) | |
|--|--|
| Główne | <p>1. Hemoglobina (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (mężczyźni) lub $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (kobiety) lub Hgb lub hematokryt (Hct) >99 percentyl zakresu odniesienia dla wieku, płci lub wysokości miejsca zamieszkania lub Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (mężczyźni) or $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (kobiety) jeśli związany z trwałym wzrostem $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ od poziomu podstawowego, którego nie można przypisać korekcji dla niedoboru żelaza lub Podwyższona masa czerwonych krwinek $>25\%$ powyżej średniej normalnej wartości przewidywalnej</p> <p>2. Obecność mutacji <i>JAK2V617F</i> lub mutacji podobnej</p> |
| Podrzędne | <p>1. Mieloproliferacja trójliniowa szpiku kostnego 2. Poziom erytropoetyny w surowicy poniżej normy 3. Wzrost endogennej kolonii erytroidalnej (EEC)</p> |
| Kryteria rozpoznania nadpłytkowości podstawowej (ET) | |
| Główne | <p>1. Liczba płytek krwi $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Proliferacja megakariocytów o dużej i dojrzałej morfologii. Brak lub mała proliferacja granulocytów lub erytrocytów 3. Nie spełnia kryteriów WHO dotyczących przewlekłej białaczki szpikowej (CML), PV, pierwotnego zwłóknienia szpiku (PMF), zespołu mielodysplastycznego (MDS) lub innego nowotworu mieloidowego.</p> <p>4. Obecność <i>JAK2V617F</i> lub innego markera klonalnego lub Brak dowodów na reaktywną trombocytozę</p> |
| Podrzędne | - |
| Kryteria rozpoznania pierwotnej mielofibrozy (PMF) | |
| Główne | <p>1. Proliferacja megakariocytów i atypia wraz z retykuliną oraz/lub zwłóknieniem kolagenu lub Przy braku zwłóknienia retykuliny zmianom megakariocytów musi towarzyszyć zwiększona komórkowość szpiku kostnego, proliferacja granulocytów i często zmniejszona erytropoeza (to znaczy prefibrotyczny PMF) 2. Nie spełnia kryteriów WHO dla (CML), PV, MDS lub innych nowotworów mieloidalnych</p> <p>3. Obecność <i>JAK2V617F</i> lub innego markera klonalnego lub Brak dowodów na zwłóknienie szpiku kostnego</p> |
| Podrzędne | <p>1. Leukoerytoblastoza 2. Zwiększony poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy 3. Anemia 4. Palpacyjnie wyczuwalne powiększenie śledziony</p> |

Ponadto, 1% wartości granicznej dla dodatniego wyniku klinicznego w testach opartych na PCR jest obecnie coraz częściej potwierdzane przez ekspertów z UE i USA (8-10).

Zasada procedury

qPCR (ilościowy PCR) pozwala na dokładną ocenę ilościową produktów PCR podczas fazy wykładniczej procesu amplifikacji PCR. Ilościowe dane PCR mogą być wygenerowane szybko, bez potrzeby dodatkowej obróbki danych, przez wykrywanie w czasie rzeczywistym sygnałów fluorescencyjnych podczas oraz/lub po cyklach PCR, tym samym drastycznie zmniejszając ryzyko kontaminacji produktu PCR. Obecnie dostępne są 3 główne rodzaje technik qPCR: analiza qPCR z użyciem barwnika SYBR® Green I, analiza qPCR z użyciem sond hydrolizujących i analiza qPCR z użyciem sond hybrydizacyjnych.

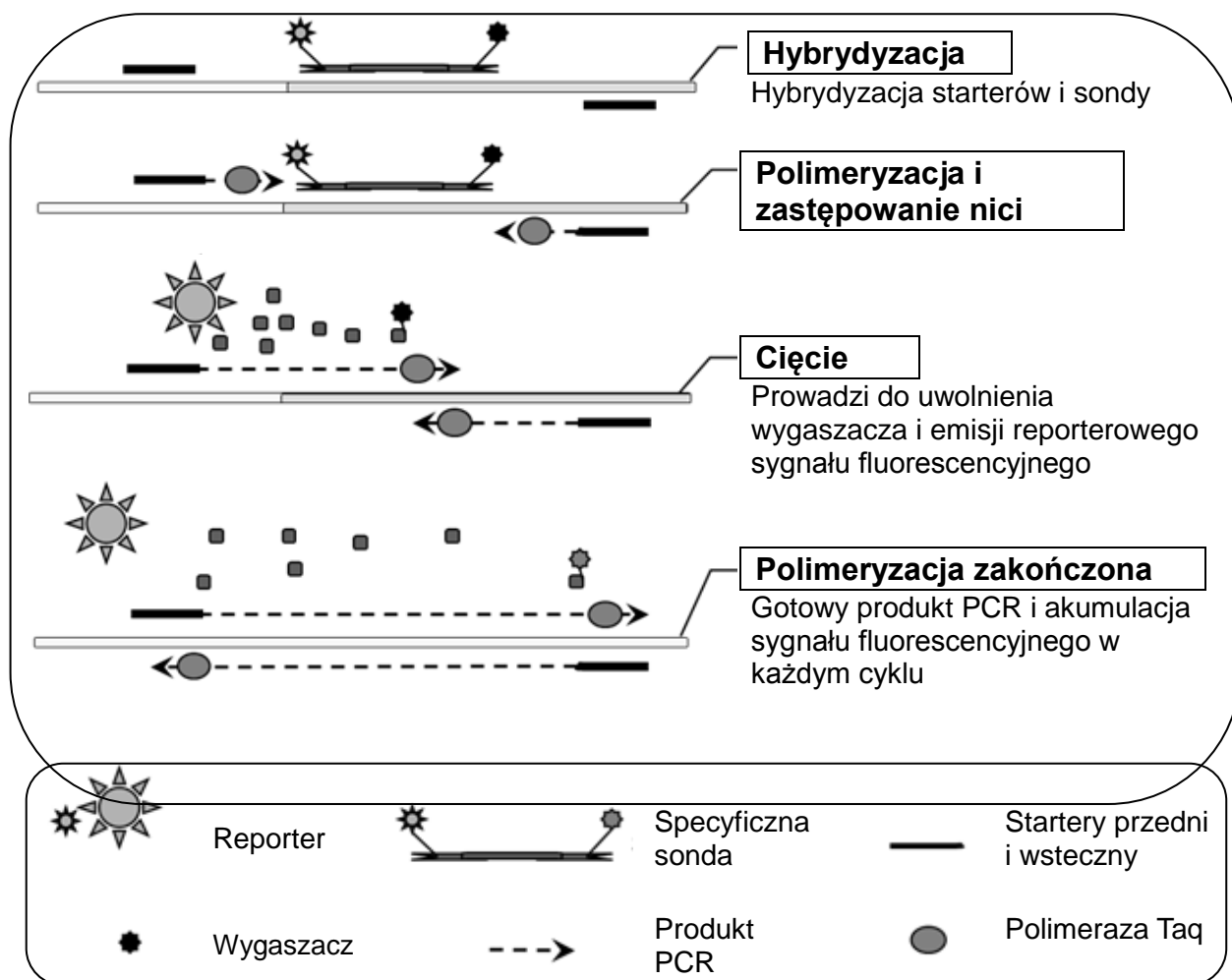
Niniejszy zestaw wykorzystuje technologię qPCR opartą na zasadzie hydrolizy oligonukleotydów qPCR znakowanych dwoma barwnikami.

Podczas PCR starter przedni (forward) i wsteczny (reverse) hybrydują do określonej sekwencji. Podwójnie barwiony oligonukleotyd jest zawarty w tej samej mieszaninie.

Sonda, która składa się z oligonukleotydu wyznakowanego barwnikiem reporterowym 5' i usytuowanym dalej 3' wygaszaczem (quencher), hybryduje z docelową sekwencją w produkcie PCR. Analiza qPCR z użyciem sond hydrolizy wykorzystuje aktywność egzonukleazy 5'→3' w polimerazie DNA *Thermus aquaticus* (Taq). Gdy sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika reporterowego do barwnika wygaszającego powoduje tłumienie fluorescencji reporterowej głównie przez transfer energii typu Förstera.

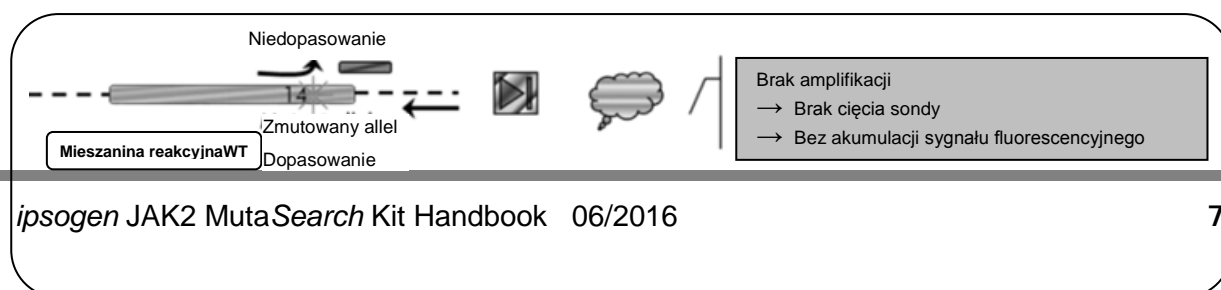
Podczas PCR, jeśli cel będący przedmiotem zainteresowania jest obecny, sonda specyficznie hybryduje między miejscem startera do przedniego i wstecznego. Aktywność egzonukleazy 5'→3' polimerazy DNA rozszczepia sondę pomiędzy reporterem i wygaszaczem tylko wtedy, gdy sonda hybryduje z sekwencją docelową. Fragmenty sondy są następnie usuwane, a polimeryzacja nici jest kontynuowana. Koniec 3' sondy jest zablokowany, aby zapobiec wydłużeniu sondy podczas PCR (Rysunek 1). Proces ten odbywa się w każdym cyklu i nie zakłóca wykładniczej akumulacji produktu.

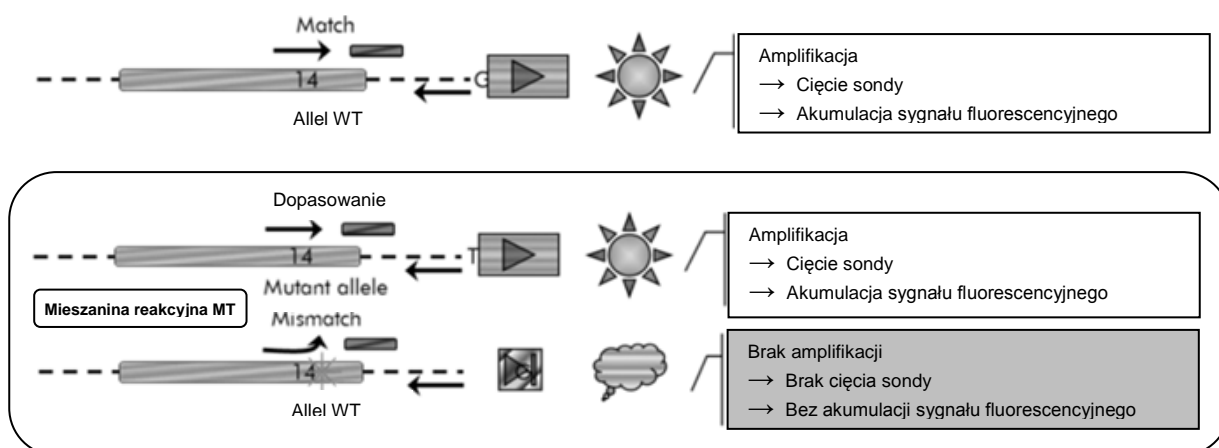
Wzrost sygnału fluorescencji wykrywa się tylko wtedy, gdy docelowa sekwencja jest komplementarna do sondy, a zatem amplifikowana podczas PCR. Z powodu tych wymagań nie wykryto niespecyficznego amplifikacji. Zatem wzrost fluorescencji jest wprost proporcjonalny do docelowej amplifikacji podczas PCR.



Rysunek 1. Zasada reakcji

Używana w tym zestawie specyficzna dla alleli technologia PCR, umożliwia czułe, dokładne i wysoce powtarzalne wykrywanie SNP (polimorfizm pojedynczych nukleotydów). Technika ta opiera się na użyciu specyficznych przednich starterów dla alleli typu dzikiego (wild-type) oraz V617F. Tylko idealne dopasowanie startera i docelowego DNA umożliwia wydłużanie i amplifikację w PCR (Rysunek 2).





Rysunek 2. PCR specyficzny dla alleli. Użycie starterów dla sekwencji typu dzikiego lub dla V617F i mieszaniny sond pozwala na specyficzne wykrywanie alleli typu dzikiego lub zmutowanego w dwóch oddzielnych reakcjach z użyciem tej samej próbki.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

| | | |
|--|-----------------------|---------------|
| Zestaw <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit | | (24) |
| Nr katalogowy | | 673823 |
| Liczba reakcji | | 24 |
| V617F Positive Control (kontrola pozytywna) | PC-VF JAK2 | 40 µl |
| V617F Negative Control (kontrola negatywna) | NC-VF JAK2 | 40 µl |
| Cut-Off Sample (próbka graniczna) (1% allelu V617F) | COS-VF JAK2 | 40 µl |
| Primers and probe mix JAK2 V617F* (Startery i mieszanina sond JAK2 V617F*) | PPM-JAK2 V617F 25x | 68 µl |
| Primers and probe mix JAK2 V617F† (Startery i mieszanina sond JAK2 V617F†) | PPM-JAK2 WT 25x | 68 µl |
| Instrukcja zestawu <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit (w języku angielskim) | | 1 |

* Mieszanka specyficznych wstecznych i przednich starterów dla genu JAK2, sonda V617F specyficzna dla FAM™ -TAMRA™.

† Mieszanka specyficznych wstecznych i przednich starterów dla genu JAK2, sonda specyficzna dla FAM-TAMRA typu dzikiego.

Uwaga: Zwiruj szybko próbki przed użyciem.

Uwaga: Analiza nieznanymi próbek za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit wymaga ekstrakcji genomowego DNA. Odczynniki potrzebne do przeprowadzenia ekstrakcji DNA nie są dostarczane i muszą zostać walidowane w połączeniu z zestawem.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy z chemikaliami należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami charakterystyki bezpieczeństwa (SDS), dostępnymi u dostawcy produktu.

Odczynniki

- ☉ Woda do PCR wolna od nukleaz (Nuclease-free PCR grade water)
- ☉ Bufor TE (1x), wolny od nukleaz, pH 8,0 (Nuclease-free 1x TE buffer, pH 8.0)
- ☉ Bufor i polimeraza DNA *Taq*: zwalidowane odczynniki to TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., cat. no. 4304437) i LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat. no. 04535286001) lub LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (Master Mix 5x) (Roche, cat. no. 03515567001)
Uwaga: Ten Master Mix może być używany tylko dla aparatu LightCycler 1.2
- ☉ Odczynniki do 0,8-1% żelu agarozowego w 0,5x stężonym buforze do elektroforezy TBE

Materiały eksploatacyjne

- ☉ Końcówki do pipet PCR z filtrami hydrofobowymi, wolne od nukleaz i odporne na działanie aerozoli
- ☉ Probówki do PCR 0,5 ml lub 1,5 ml wolne od RNaz i DNaz
- ☉ Lód

Sprzęt

- ☉ Pipety mikrolitrowe* przeznaczone do PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- ☉ Wirówka stołowa* z rotorem do probówek reakcyjnych 0,5 ml / 1,5 ml (zdolna do osiągnięcia 10.000 rpm)
- ☉ Spektrofotometr* do pomiaru ilościowego DNA
- ☉ Termocykler do PCR w czasie rzeczywistym:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub inny aparat Rotor-Gene Q; LightCycler 1.2 lub 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System lub ABI PRISM 7900HT SDS; wraz z dedykowanymi materiałami

* Upewnij się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z rekomendacjami producenta.

Ostrzeżenia i uwagi

Do użytku diagnostycznego in vitro

Podczas pracy ze środkami chemicznymi zawsze należy nosić odpowiednią odzież laboratoryjną, jednorazowe rękawice i okulary ochronne. Więcej informacji na ten temat zamieszczono w odpowiednich kartach charakterystyki bezpieczeństwa (SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty dla każdego zestawu QIAGEN® oraz poszczególnych komponentów zestawu.

Usuń odpady próbek i analiz zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Uwagi ogólne

Testy qPCR wymagają dobrej praktyki laboratoryjnej, włączając w to utrzymanie sprzętu dedykowanego do biologii molekularnej i będących w zgodzie z odpowiednimi przepisami i standardami.

Niniejszy zestaw jest przeznaczony do użytku diagnostycznego in vitro. Odczynniki i instrukcje dostarczone wraz z zestawem zostały zwalidowane dla zapewnienia optymalnej wydajności. Rozcieńczanie odczynników większe od zalecanego lub zmiana czasów i temperatur inkubacji może prowadzić do błędnych lub nieważnych wyników. Odczynniki PPM-JAK2 mogą ulec zmianie pod wpływem ekspozycji na światło. Wszystkie odczynniki są dostosowane wyłącznie do użycia w tym teście i dla zapewnienia optymalnej wydajności testu nie należy zastępować żadnych jego składników.

Zachowaj szczególną ostrożność, aby zapobiec:

Zanieczyszczeniu DNazą, co może skutkować degradacją matrycowego DNA

Przenoszeniu zanieczyszczeń DNA lub reakcji PCR co może skutkować uzyskaniem fałszywie pozytywnych sygnałów

W związku z tym zalecamy następujące środki ostrożności:

Podczas wykonywania testu używaj akcesoriów laboratoryjnych wolnych od nukleaz (np. pipet, końcówek do pipet, fiolek reakcyjnych) i noś rękawice.

Do wszystkich etapów pipetowania należy używać świeżych końcówek pipet odpornych na działanie aerozoli, aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych próbek i odczynników.

Przygotuj mieszaninę master mix przed reakcją PCR przy użyciu materiałów dedykowanych do tego celu (pipety, końcówki itp.) w pomieszczeniu do tego przeznaczonym, gdzie nie są wprowadzane żadne matryce DNA (DNA,

produkty PCR). Dodawaj matryce w oddzielnej strefie (najlepiej w oddzielnym pomieszczeniu) z użyciem dedykowanych materiałów (pipety, końcówki itp.).

Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami

Zestawy są transportowane w suchym lodzie i po dostarczeniu muszą być przechowywane w temperaturze od -30 ° C do -15 ° C.

Zminimalizuj ekspozycję na światło mieszanin i starterów sond (próbówki PPM-JAK2).

Delikatnie wymieszaj i zwiruj próbówki przed otwarciem.

Przechowuj wszystkie komponenty zestawu w oryginalnych pojemnikach.

Powyższe warunki przechowywania dotyczą zarówno otwartych, jak i nieotwieranych komponentów. Odczynniki przechowywane w warunkach innych niż określone na etykietach mogą nie funkcjonować prawidłowo i mogą znacząco zaburzyć wyniki testu.

Daty ważności każdego z odczynników są podane na indywidualnych etykietach na każdym ze składników zestawu. W prawidłowych warunkach przechowywania produkt zachowuje swoje właściwości do daty ważności znajdującej się na etykiecie.

Nie ma wyraźnych wskazówek wskazujących na brak stabilności tego produktu, jednakże kontrole pozytywne i negatywne powinny być analizowane jednocześnie z próbkami badanymi (nieznanymi).

Procedura

Przygotowanie próbki DNA

Genomowe DNA można pozyskiwać z krwi pełnej, oczyszczonych limfocytów krwi obwodowej, komórek wielojądrzastych lub granulocytów. W celu porównania wyników zaleca się przyjęcie tej samej frakcji komórkowej oraz tej samej metody ekstrakcji. Ekstrakcję DNA powinny być wykonywane za pomocą metody własnej lub komercyjnej.

Ilość DNA określa się przez pomiar gęstości optycznej przy 260 nm. Jakość DNA należy oceniać za pomocą spektrofotometrii lub elektroforezy żelowej.

Stosunek A260 / A280 powinien mieścić się w przedziale 1,7-1,9. Mniejszy stosunek zwykle wskazuje na zanieczyszczenie białkami lub organicznymi substancjami chemicznymi. Analiza elektroforetyczna w 0,8-1% żelu agarozowym powinna umożliwić wizualizację wyizolowanego DNA, jako odrębnego prążka o wielkości około 20 kb. Dopuszcza się lekki rozmaz.

Powstałe DNA należy rozcieńczyć do 5 ng/μl w buforze TE. Reakcja qPCR jest zoptymalizowana dla 25 ng oczyszczonego genomowego DNA.

Przechowywanie kwasów nukleinowych

W przypadku krótkotrwałego przechowywania, do maksymalnie 24 godzin, zaleca się przechowywanie oczyszczonych kwasów nukleinowych w temperaturze 2-8 ° C. W przypadku długotrwałego przechowywania, przez ponad 24 godziny, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20 ° C.

Protokół: qPCR na aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem 72-probówkowym

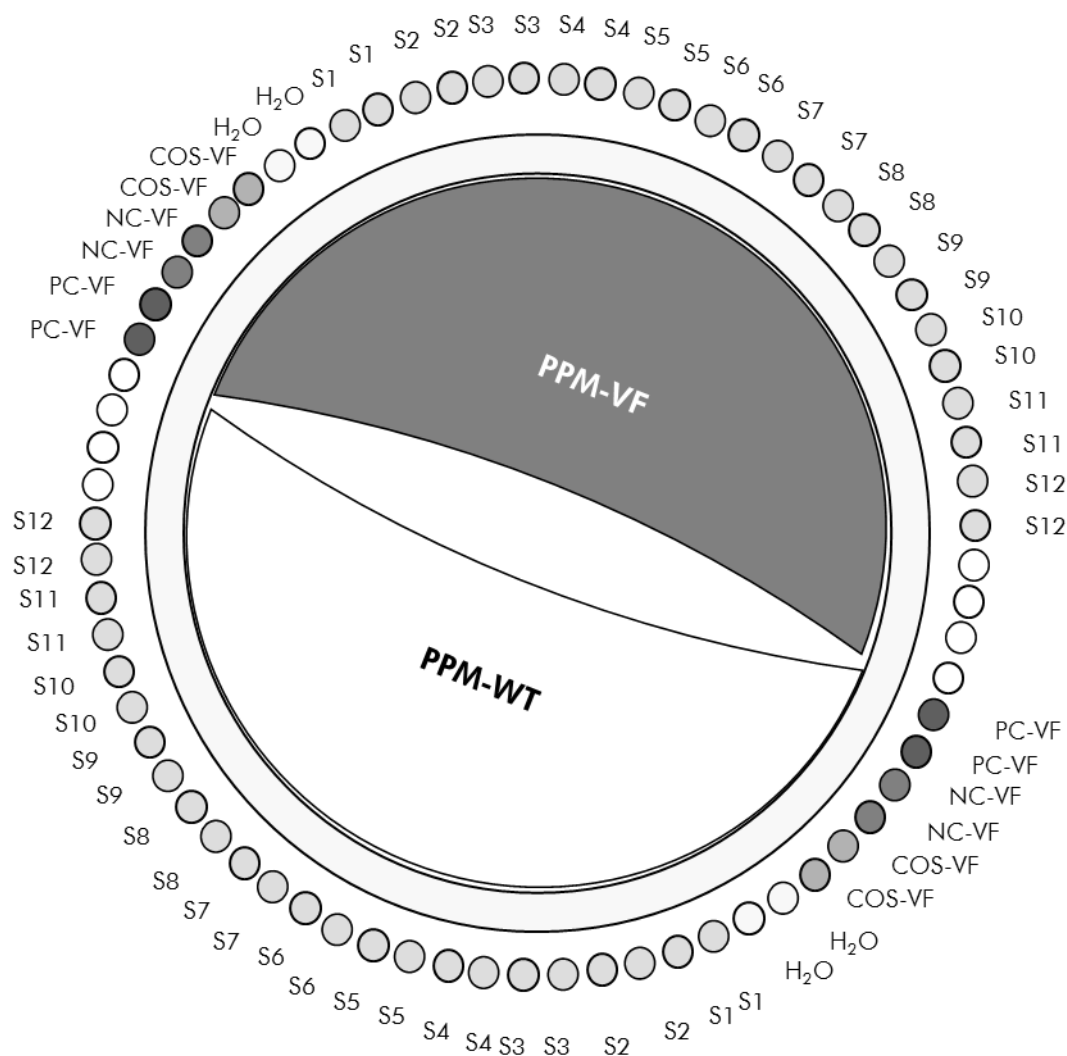
Korzystając z tego aparatu, zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach, zgodnie z tabelą 2.

Tabela 2. Ilość reakcji dla Aparatów Rotor-Gene Q z rotorem 72-próbkowym

| Próbki | Reakcje |
|---|---|
| Mix starterów i sond JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F) | |
| n próbek DNA | n x 2 reakcje |
| 3 kontrole DNA | 6 reakcji (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda w duplikacie) |
| Kontrola z wodą | 2 reakcje |
| Mix starterów i sond JAK2 WT (PPM-JAK2 WT) | |
| n próbek DNA | n x 2 reakcje |
| 3 kontrole DNA | 6 reakcji (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda w duplikacie) |
| Kontrola z wodą | 2 reakcje |

Analiza próbki na aparatach Rotor-Gene Q z rotorami 72-próbkowymi

Zalecamy przetestowanie co najmniej 12 próbek DNA w tym samym eksperymencie, aby zoptymalizować zużycie standardów oraz mieszanin starterów i sond. Schemat rotora na Rysunku 3 (następna strona) pokazuje przykład takiego eksperymentu.



Rysunek 3. Sugerowane ustawienia rotora dla eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen JAK2 MutaSearch*. PC-VF: kontrola pozytywna (positive control); NC-VF: kontrola negatywna (negative control); COS-VF: próbka graniczna; S: próbka DNA; H₂O: kontrola z wodą.

Uwaga: Zawsze umieszczaj próbkę pozytywną w pozycji 1 rotora. W przeciwnym wypadku aparat nie wykona kalibracji i nastąpi nieprawidłowy odczyt danych fluorescencji.

Puste miejsca wypełnij pustymi probówkami.

Analiza qPCR na aparatach Rotor-Gene Q z rotorem 72-probówkowym

Uwaga: Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.

Składniki należy wyjąć z zamrażarki na około 10 minut przed rozpoczęciem procedury.

2. Zworteksuj i zwiruj szybko wszystkie probówki (przez około 10 s, 10.000 rpm celem zebrania płynu na dnie probówki).
3. Przygotuj następujące mieszaniny qPCR zgodne z liczbą przetwarzanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

Tabela 3 opisuje schemat pipetowania przy przygotowaniu jednej mieszaniny odczynnikowej, obliczonej do otrzymania końcowej objętości reakcji 25 μ l. Wstępną mieszaninę można przygotować, zgodnie z ilością reakcji, przy użyciu tej samej mieszaniny starterów i sond. Dodatkowe objętości kompensujące błędy pipetowania zostały uwzględnione.

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR

| Składnik zestawu | 1 reakcja (μ l) | VF: 32+1 reakcje (μ l) | WT: 32+1 reakcje (μ l) | Stężenie końcowe |
|---|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x | 12,5 | 412,5 | 412,5 | 1x |
| Mieszanina starterów i sond, 25x (VF lub WT, odpowiednio) | 1 | 33 | 33 | 1x |
| Wolna od nukleaz woda do PCR | 6,5 | 214,5 | 214,5 | – |
| Próbka (do dodania w kroku 6) | 5 | 5 każda | 5 każda | – |
| Całkowita objętość | 25 | 25 każda | 25 każda | – |

4. Zworteksuj i zwiruj szybko każdą mieszaninę qPCR (VF i WT) przez około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki .
5. Dodaj 20 μ l odpowiedniej mieszaniny wstępnej (pre-mix) qPCR (VF lub WT) na każdą probówkę.
6. Dodaj 5 μ l próbki materiału DNA lub kontroli do odpowiednich probówek (objętość całkowita 25 μ l).
7. Delikatnie wymieszaj przez pipetowanie.

8. Zamknij próbki PCR i umieść je w 72-probówkowym rotorze zgodnie z zaleceniami producenta. Wypełnij wszystkie pozostałe pozycje pustymi próbkami.
9. Ustaw na aparacie Rotor-Gene Q program cyklu termicznego zgodnie z wytycznymi w Tabeli 4.

Tabela 4. Profil temperaturowy

| | |
|-----------------------------|--|
| Typ analizy | Ilościowa |
| Inkubacja (hold) | Temperatura: 50°C Czas: 2 min |
| Inkubacja 2 (hold 2) | Temperatura: 95°C Czas: 10 min |
| Cykle | 50 razy 95°C przez 15 s 62°C przez 1 min z odczytem danych (acquisition) fluorescencji FAM w pojedynczym kanale zielonym (channel Green: Single) |

10. Zaczynij program cyklu termicznego, zgodnie z Tabelą 4
11. Dla aparatów Rotor-Gene Q przy analizie danych wybierz opcję 'Slope Correct'. Zalecamy ustawienie progu odcięcia (threshold) na 0,03.

Protokół: qPCR na aparatach Applied Biosystems7500, ABI PRISM 7900HT lub LightCycler 480

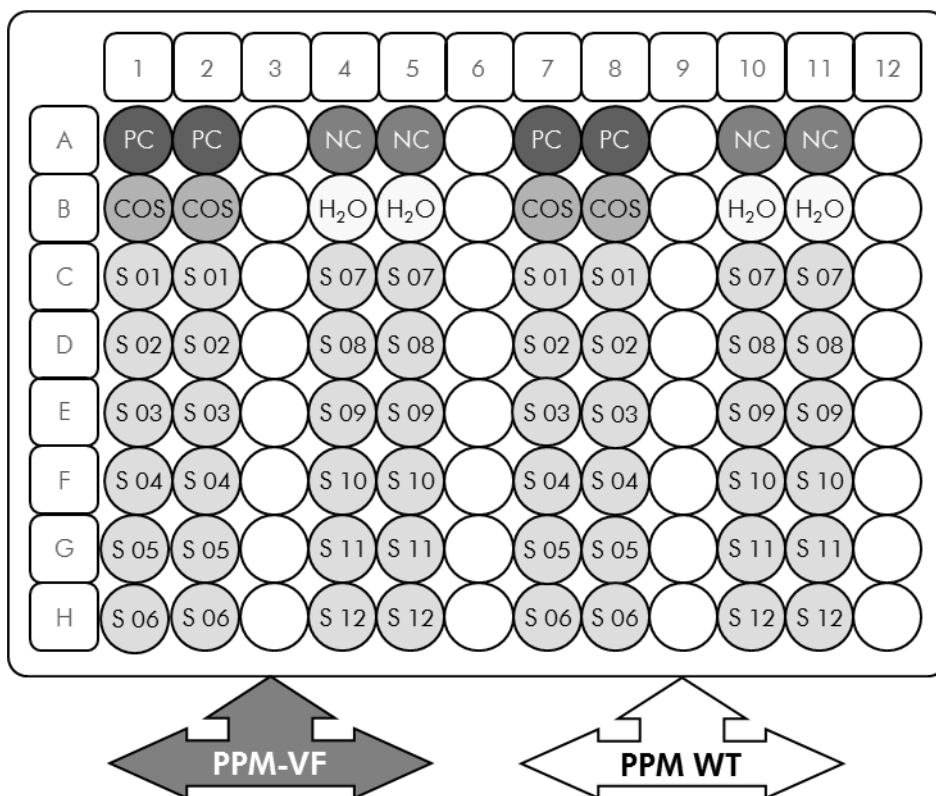
Używając sprzętu qPCR o formacie 96-dołkowym, zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w duplikatach, jak pokazano w Tabeli 5.

Tabela 5. Ilość reakcji dla aparatów Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT lub LightCycler 480

| Próbki | Reakcje |
|--|--|
| Z użyciem mieszaniny starterów i sond JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F) | |
| n próbek DNA | n x 2 reakcje |
| 3 kontrole DNA | 6 reakcji (PC-VF, NC-VF, i COS-VF, każda w duplikacie) |
| Kontrola z wodą | 2 reakcje |
| Z użyciem mieszaniny starterów i sond JAK2 WT (PPM-JAK2 WT) | |
| n próbek DNA | n x 2 reakcje |
| 3 kontrole DNA | 6 reakcji (PC-VF, NC-VF, i COS-VF, każda w duplikacie) |
| Kontrola z wodą | 2 reakcje |

Analiza próbek na aparatach Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT lub LightCycler 480

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz miksu starterów i sond zalecamy testowanie przynajmniej 12 próbek DNA w tym samym eksperymencie. Schemat płytki pokazany na rysunku 4 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Rysunek 4. Sugerowane ustawienia w bloku dla eksperymentu z użyciem zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit . PC: kontrola pozytywna; NC: kontrola negatywna; COS: próbka graniczna; S: próbka DNA ; H₂O: kontrola z wodą

qPCR na aparatach Applied Biosystems 7500, ABI PRISM 7900HT lub LightCycler 480.

Uwaga: wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

Procedura

- 1. Rozmroź wszystkie wymagane komponenty i umieść je na lodzie.**
Składniki powinny zostać wyjęte z zamrażalnika na około 10 minut przed rozpoczęciem procedury.
- 2. Zworteksuj i zwiruj krótko wszystkie probówki (przez około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).**
- 3. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR zgodnie z ilością analizowanych próbek.**
Wszystkie podane stężenia dotyczą końcowej objętości reakcji.

Tabela 6 opisuje schemat pipetowania dla przygotowania jednej mieszaniny odczynników, obliczonej dla uzyskania końcowej objętości reakcji 25 µl. Wstępną mieszaninę można przygotować, w zależności od liczby reakcji,

stosując tę samą mieszaninę starterów i sond. Dodatkowe objętości są uwzględniane, aby zrekompensować błąd pipetowania.

Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny qPCR

| Składnik | 1 reakcja (µl) | VF: 32+1 reakcje (µl) | WT: 32+1 reakcje (µl) | Stężenie końcowe |
|--|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x | 12,5 | 412,5 | 412,5 | 1x |
| Mieszanina starterów i sond (Primers and probe mix), 25x (VF lub WT odpowiednio) | 1 | 33 | 33 | 1x |
| Woda do PCR wolna od nukleaz (Nuclease-free PCR grade water) | 6,5 | 214,5 | 214,5 | – |
| Próbka (do dodania w kroku 6) | 5 | 5 każda | 5 każda | – |
| Całkowita objętość | 25 | 25 każda | 25 każda | – |

4. Zworteksuj i zwiruj szybko każdą mieszaninę qPCR (VF i WT) (przez około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dole próbki).
5. Dodaj po 20 µl odpowiedniej mieszaniny wstępnej (pre-mix) qPCR (VF lub WT) do każdego dołka.
6. Dodaj 5 µl próbki materiału DNA lub kontroli do odpowiedniego dołka (całkowita objętość 25 µl).
7. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
8. Zamknij płytkę i zwiruj krótko (300 x g, przez około 10 s).
9. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Ustaw termocykler na program cyklu termicznego zgodnie z wytycznymi przestawionymi w Tabeli 7 dla aparatów Applied Biosystems 7500 i ABI PRISM 7900HT SDS lub w Tabeli 8 dla aparatu LightCycler 480

Tabela 7. Profil temperaturowy dla aparatów Applied Biosystems 7500 i ABI PRISM 7900HT SDS

| | |
|-----------------------------|--|
| Typ analizy | Standard curve – absolute quantitation |
| Inkubacja (Hold) | Temperatura: 50°C Czas: 2 min |
| Inkubacja 2 (Hold 2) | Temperatura: 95°C Czas: 10 min |
| Cykle | 50 razy 95°C przez 15 s 63°C przez 1 min 30 s z odczytem fluorescencji FAM: Single (pojedynczy); Quencher (wygaszacz): TAMRA |

Tabela 8. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 480

| | |
|-----------------------------|--|
| Typ analizy | Absolute quantitation ('Abs Quant') |
| Formaty wykrywania | Wybierz 'Simple Probe' w oknie 'Detection formats' |
| Inkubacja (Hold) | Temperatura: 50°C Czas: 2 min |
| Inkubacja 2 (Hold 2) | Temperatura: 95°C Czas: 10 min |
| Cykle | 50 razy 95°C przez 15 s 63°C przez 1 min 30 s z odczytem fluorescencji FAM odpowiadającej (483–533 nm) dla LC wersja 01 i (465–510 nm) dla LC wersji 02: Single (pojedynczy) |

11. Dla aparatów Applied Biosystems 7500 i ABI PRISM 7900HT SDS, przejdź do kroku 11a. Dla aparatu LightCycler 480, przejdź do kroku 11b.

11a. Aparaty Applied Biosystems 7500 i ABI PRISM 7900HT SDS: Zalecamy ustawienie progu na 0,1 w fazie analizy. Rozpocznij program cyklu jak podano w Tabeli 7.

11b. Aparat LightCycler 480: Zalecamy tryb analizy punktów dopasowania (Fit point analysis mode) z tłem o wartości 2,0 i progami odcięcia (threshold) o wartości 2,0. Rozpocznij cykl termiczny zgodny z wytycznymi w Tabeli 8.

Protokół: qPCR na aparacie LightCycler 1.2

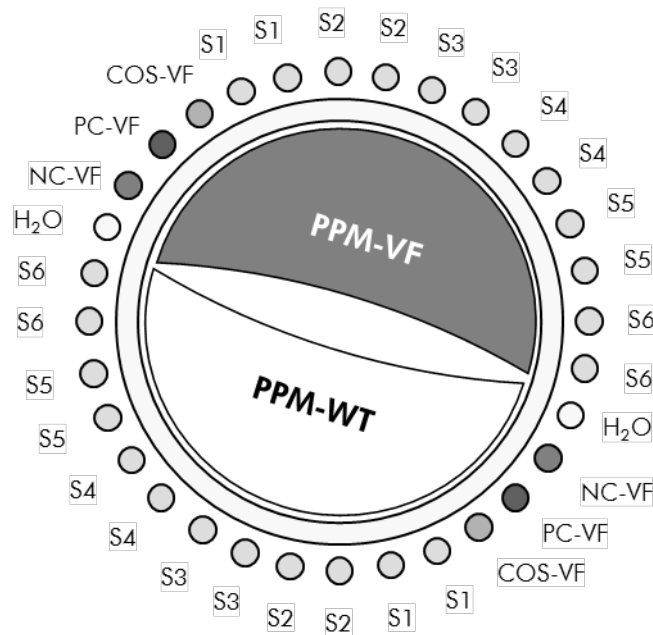
Korzystając z instrumentów kapilarnych, zalecamy analizę dla próbek w duplikatach i dla kontroli tylko jednokrotnie, jak pokazano w Tabeli 9.

Tabela 9. Liczba reakcji dla aparatu LightCycler 1.2

| Próbki | Reakcje |
|--|--|
| Z użyciem mieszaniny starterów i sond JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F) | |
| n próbek DNA | n x 2 reakcje |
| 3 kontrole DNA | 3 reakcje (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda testowana raz) |
| Kontrola z wodą | 1 reakcja |
| Z użyciem mieszaniny starterów i sond JAK2 WT (PPM-JAK2 WT) | |
| n próbek DNA | n x 2 reakcje |
| 3 kontrole DNA | 3 reakcje (PC-VF, NC-VF i COS-VF, każda testowana raz) |
| Kontrola z wodą | 1 reakcja |

Analiza próbek na aparacie LightCycler 1.2

Celem optymalizacji zużycia standardów oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie 6 próbek DNA w tym samym eksperymencie. Schemat kapilarny na Rysunku 5 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Rysunek 5. Sugerowane ustawienie rotora do eksperymentu z zestawem *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit. PC-VF: kontrola pozytywna (positive control); **NC-VF:** kontrola negatywna (negative control); **COS:** próbka graniczna (cut-off) ; **S:** próbka DNA; **H₂O:** kontrola z wodą

qPCR na aparacie LightCycler 1.2

Uwaga: Ze względu na szczególne wymagania technologiczne, analizy na aparacie LightCycler 1.2 muszą być wykonywane przy użyciu specyficznych odczynników. Zalecamy użycie mieszaniny LightSPCler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe i postępowanie zgodnie z instrukcjami producenta, celem przygotowania mieszaniny Master Mix 5x.

Uwaga: Wykonuj wszystkie kroki na lodzie.

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.

Składniki powinny być wyjęte z zamrażalnika na około 10 minut przed rozpoczęciem procedury.

2. Zworteksuj i zwiruj szybko próbki (przez około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki).

3. Przygotuj następującą mieszaninę qPCR zgodnie z ilością analizowanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

Tabela 10 opisuje schemat pipetowania dla przygotowania jednej mieszaniny odczynników, obliczonej dla uzyskania końcowej objętości reakcji 20 µl. Mieszaninę wstępną można przygotować, w zależności od liczby reakcji,

stosując tę samą mieszaninę starterów i sond. Dodatkowe objętości kompensujące błędy pipetowania zostały uwzględnione.

Tabela 10. Przygotowanie mieszaniny (pre-mix) qPCR

| Składnik | 1 reakcja (μl) | VF: 16+1 reakcje(μl) | WT: 16+1 reakcje(μl) | Końcowe stężenie |
|--|--|--|--|-----------------------------|
| LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x | 4 | 68 | 68 | 1x |
| Mieszanina sond i starterów (Primers and probe mix), 25x (VF lub WT, odpowiednio) | 0,8 | 13,6 | 13,6 | 1x |
| Woda do PCR wolna od nukleaz (Nuclease-free PCR grade water) | 10,2 | 173,4 | 173,4 | – |
| Próbka (do dodania w kroku 6) | 5 | 5 każda | 5 każda | – |
| Objętość całkowita | 20 | 20 każda | 20 każda | – |

4. Zworteksuj i szybko zwiruj mieszankę qPCR (VF i WT) przez około 10 s, 10.000 rpm, celem zebrania płynu na dnie probówki.
5. Dodaj 15 μ l odpowiedniej mieszaniny wstępnej (pre-mix) qPCR (VF lub WT) na kapilarę.
6. Dodaj 5 μ l materiału próbki DNA lub kontroli do odpowiedniej kapilary (całkowita objętość 20 μ l).
7. Wymieszaj delikatnie przez pipetowanie.
8. Zamknij kapilary i szybko zwiruj (500 x g, przez około 5 s).
9. Włóż kapilary do termocyklera zgodnie z zaleceniami producenta.
10. Zaprogramuj aparat LightCycler 1.2 na cykl programu termicznego zgodnie z wytycznymi w Tabeli 11.

Tabela 11. Profil temperaturowy

| Tryb analizy | Quantification |
|-------------------------|--|
| Inkubacja (Hold) | Temperatura: 95°C Czas: 10 min |
| Cykle | 50 razy 95°C przez 15 s 66°C przez 1 min; z odczytem fluorescencji FAM: Single (pojedynczy) |

11. Dla LightCycler 1.2, F1/F2 zalecany jest tryb analizy drugiej pochodnej (2nd derivative analysis). Uruchom program cyklu termicznego, jak pokazano w Tabeli 11.

Interpretacja wyników

Obliczanie $\Delta\Delta C_T$ (lub $\Delta\Delta C_p$) i genotypowanie

Wyodrębnij wyeksportowane dane z analizowanego pliku eksportu wygenerowanego przez system i przeanalizuj wyniki zgodnie z opisem poniżej.

Uwaga: Wartości C_T są wynikami uzyskanymi z systemów Rotor-Gene, Applied Biosystems i ABI PRISM. Wartości C_p , otrzymane z systemów LightCycler, można zastąpić wartościami C_T w poniższym opisie. Obliczenia są prezentowane dla wartości C_T i mogą być zastosowane do wartości C_p w ten sam sposób.

WAŻNE: Jeśli nie zaobserwowano żadnej amplifikacji (np. 'undetected', $C_T > 45$ lub $C_p > 45$, w zależności od zastosowanego aparatu) zarówno dla PPM-JAK2 WT, jak i dla PPF-JAK2 VF, wyniki nie mogą być analizowane. Wyniki te wskazują, że stężenie DNA w próbce nie mieściło się w dopuszczalnym zakresie lub że matryca DNA została pominięta. W przeciwnym razie kontynuuj analizę zgodnie z opisem poniżej.

Procedura

1. **Oblicz średnią wartość CT uzyskaną dla PPM-JAK2 V617F (średnia CT VF) i PPM-JAK2 WT (średnia CT WT) dla każdej próbki (kontrola, próbka graniczna i próbki nieznane).**

Jeśli jeden z duplikatów dla próbki ma wartość nieokreśloną (undetermined), nie bierz tego pod uwagę: używaj tylko wartości uzyskanej dla drugiego duplikatu. W takim przypadku zalecamy ponowne przetestowanie próbki.

Jeśli oba duplikaty są nieokreślone, ustaw wartość próbki na 45.

2. **Oblicz limit wejściowy (IL) zgodnie ze schematem poniżej.**

Limit wejściowy (IL) = średni CT WT dla COS + 3,3

Uwaga: Limit wejściowy umożliwia sprawdzenie, czy próbka DNA pacjenta użyta do testu została prawidłowo przygotowana, aby zagwarantować uzyskanie ostatecznych wyników statusu JAK2 V617F.

3. Sprawdź jakość próbki dla każdej nieznannej próbki zgodnie z wytycznymi w Tabeli 12

Tabela 12. Kryteria jakości próbki

| Jeśli: | Wówczas: |
|---|-------------------------------|
| Średnie C_T VF <40 | Przejdź do kroku 4. |
| Średnie C_T VF \geq 40 i średnie C_T WT <IL | Przejdź do kroku 4. |
| Średnie C_T VF \geq 40 i średnie C_T WT \geq IL | Próbki nie można analizować.* |

* Stężenie DNA w próbce nie mieściło się w dopuszczalnym zakresie lub matryca DNA została pominięta.

4. Oblicz wartość ΔC_T dla wszystkich ważnych próbek ($\Delta C_{T \text{ Próbki}}$) i kontroli ($\Delta C_{T \text{ PC-VF}}$, $\Delta C_{T \text{ NC-VF}}$ i $\Delta C_{T \text{ COS}}$) zgodnie ze wzorem poniżej

$$\Delta C_T = \text{Średnia } C_T \text{ VF} - \text{Średnia } C_T \text{ WT}$$

5. Oblicz wartość $\Delta\Delta C_T$ dla każdej nieznannej próbki ($\Delta\Delta C_{T \text{ Próbki}}$) i dla każdej kontroli ($\Delta\Delta C_{T \text{ PC-VF}}$) i ($\Delta\Delta C_{T \text{ NC-VF}}$) zgodnie ze wzorami poniżej

$$\Delta\Delta C_{T \text{ Próbki}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ Próbki}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ PC-VF}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ PC-VF}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ NC-VF}} = \Delta C_{T \text{ COS}} - \Delta C_{T \text{ NC-VF}}$$

6. Oblicz szarą strefę (strefa niepewności), wokół COS-VF zgodnie ze wzorem poniżej.

Uwaga: Szara strefa (GZ) testu jest definiowana jako obszar wartości, gdzie wydajność rozróżnienia jest niewystarczająco precyzyjna. Wartość w szarej strefie wskazuje, że marker docelowy nie może być oceniony ani jako obecny ani jako nieobecny. Szara strefa musi być obliczona dla każdego eksperymentu. Na podstawie odchyłeń zaobserwowanych podczas badań precyzji oznaczeń (patrz 'Charakterystyka wydajności', strona 32) GZ zdefiniowano jako $\pm 7\%$ wartości $\Delta C_T \text{ COS}$. To obliczenie jest prawidłowe dla wszystkich eksperymentów i na wszystkich rekomendowanych aparatach.

$$\text{GZ: } [(-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0.07); (+\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0.07)]$$

7. Ustal genotyp nieznanych próbek zgodnie z Tabelą 13.

Tabela 14 podaje przykład obliczeń i interpretacji wyników dla reprezentatywnego eksperymentu.

Tabela 13. Interpretacja wyników genotypowania.

| Wyniki | Interpretacja |
|---|--------------------------------|
| Próbka $\Delta\Delta C_T > +\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$ | Wykryto mutację JAK2 V617F |
| Próbka $\Delta\Delta C_T < -\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$ | Nie wykryto mutacji JAK2 V617F |
| Próbka $\Delta\Delta C_{T \text{ w GZ}}$ ($-\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07 \leq \text{Próbka } \Delta\Delta C_T \leq +\Delta C_{T \text{ COS}} \times 0,07$) | Wynik niejednoznaczny |

Tabela 14. Przykład obliczeń i interpretacja wyników dla reprezentatywnego eksperymentu

| Próbka | $C_T \text{ VF}$ | Średnie $C_T \text{ VF}$ | $C_T \text{ WT}$ | Średnie $C_T \text{ WT}$ | ΔC_T | $\Delta\Delta C_T$ | Kwalifikacja |
|----------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|---|--------------------|-------------------------------------|
| PC | 27,82 | 27,74 | 40,27 | 40,24 | -12,50 | 20,1 2 | Pozytywna |
| PC | 27,66 | | 40,20 | | | | |
| NC | 41,23 | 41,10 | 26,66 | 26,76 | 14,34 | - 6,72 | Negatywna |
| NC | 40,96 | | 26,85 | | | | |
| COS | 35,04 | 34,85 | 27,28 | 27,23 | 7,62 | 0 | IL = 30,53 GZ: -0,53 do +0,53 |
| COS | 34,66 | | 27,17 | | | | |
| Próbka 1 | 42,15 | 41,63 | 28,86 | 28,80 | 12,83 | - 5,21 | Negatywna |
| Próbka 1 | 41,10 | | 28,73 | | | | |
| Próbka 2 | 30,54 | 30,73 | 28,99 | 29,10 | 1,63 | 5,99 | Pozytywna |
| Próbka 2 | 30,92 | | 29,20 | | | | |
| Próbka 3 | 37,31 | 37,71 | 30,11 | 30,22 | 7,49 | 0,13 | Niejasna (w GZ) |
| Próbka 3 | 38,11 | | 30,33 | | | | |
| Próbka 4 | 45 | 45 | 39,25 | 38,85 | Niemożliwe do analizy (Średnie $C_T \text{ VF} > 40$ i średnie $C_T \text{ WT} > \text{IL}$) | | |
| Próbka 4 | 45 | | 38,45 | | | | |

Kontrole

Kontrola z wodą nie powinna dawać wartości C_T (lub C_p), zarówno z JAK2 V617F jak i z JAK2 WT. Wartość C_T (C_p) dla kontroli wody może wskazywać na zanieczyszczenie krzyżowe. Zobacz 'Rozwiązywanie problemów' poniżej.

PC-VF powinna być interpretowana jako próbka, dla której wykrywana jest mutacja JAK2 V617F.

NC-VF powinna być interpretowana jako próbka, dla której nie wykryto mutacji JAK2 V617F.

Zobacz 'Rozwiązywanie problemów' poniżej w celu interpretacji niewłaściwych wyników.

Rozwiązywanie problemów

Ten przewodnik może być pomocny w rozwiązywaniu ewentualnych problemów. Więcej informacji można uzyskać klikając w odnośnik Często zadawane pytania (FAQ) w naszym Centrum pomocy technicznej: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z Działu Technicznego QIAGEN z chęcią odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące zarówno informacji jak i protokołów zawartych w niniejszym podręczniku lub próbek i technologii testowania (aby uzyskać informacje kontaktowe, patrz 'Informacje kontaktowe', strona 39).

Komentarze i sugestie

Kontrola pozytywna sygnał negatywny

- | | |
|--|--|
| a) Błąd pipetowania | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji. Powtórz PCR. |
| b) Niewłaściwe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit w temperaturze od -30 do -15 °C Przechowuj mieszaninę starterów i sond (PPM) z dala od światła. Zobacz 'Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami', strona 13. Unikaj wielokrotnego zamrażania i rozmrażania. Rozdozuj odczynniki do przechowywania. |

Komentarze i sugestie

Ujemne kontrole wychodzą pozytywnie lub pozytywne kontrole wychodzą pozytywnie ze złym PPM.

| | |
|---------------------------|---|
| Zanieczyszczenie krzyżowe | Wymień wszystkie istotne odczynniki. Powtórz eksperyment z nowymi porcjami wszystkich odczynników. Aby uniknąć przenoszenia zanieczyszczeń zawsze używaj próbek, elementów zestawu i materiałów eksploatacyjnych zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami laboratoryjnymi. |
|---------------------------|---|

Brak sygnału, nawet dla kontroli pozytywnych

| | |
|---|---|
| a) Błąd pipetowania lub pominięte odczynniki | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji. Powtórz reakcję PCR. |
| b) Efekt inhibicji próbki spowodowany niedostatecznym oczyszczeniem | Powtórz przygotowanie DNA. |
| c) LightCycler: Wybrano niewłaściwy kanał detekcji | Ustaw kanał (Channel Setting) na F1/F2 lub 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: nie zaprogramowano odczytu danych | Sprawdź program cyklu. Wybierz tryb odczytu 'Single' (pojedynczy) na końcu każdego etapu hybrydyzacji PCR. |

Brak sygnału lub niski sygnał w próbkach, gdy kontrole pozytywne są w prawidłowe

| | |
|--------------------------------------|--|
| Słaba jakość lub niskie stężenie DNA | Zawsze sprawdzaj jakość i stężenie DNA przed rozpoczęciem. |
|--------------------------------------|--|

Komentarze i sugestie

LightCycler: Zbyt niska intensywność fluorescencji

- a) Niewłaściwe przechowywanie składników zestawu Przechowuj zestaw *ipsogen* JAK2 *MutaSearch* Kit w temperaturze -30 do -15°C i trzymaj mieszaninę starterów i sond (PPM) z dala od światła. Zobacz 'Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami', strona 13.
Unikaj wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.
Przygotuj jednakową objętość odczynników do dłuższego przechowywania.
- b) Bardzo niska wyjściowa ilość DNA Zwiększenie ilości próbki DNA.
Uwaga: W zależności od metody przygotowania DNA, może wystąpić efekt inhibicji.

LightCycler: intensywność fluorescencji zmienia się

- a) Błąd pipetowania Zmienność spowodowana błędem pipetowania może zostać zredukowana poprzez analizę danych w trybie F1 / F2 lub 530/640 nm.
- b) Niewystarczające zwirowanie kapilar Przygotowana mieszanina PCR może nadal pozostawać w górnej części kapilary lub kapilara została zatkana pęcherzykiem powietrza.
Zawsze wiruj kapilary zawierające mieszaninę reakcyjną zgodnie z opisem w instrukcji obsługi danego aparatu.
- c) Zewnętrzna powierzchnia kapilary jest zanieczyszczona Zawsze noś rękawiczki podczas pracy z kapilarami.

Kontrola jakości

Zgodnie z wymaganiami certyfikatu zarządzania jakością ISO firmy QIAGEN, każda partia produktu *ipsogen* JAK2 *MutaSearch* Kit jest testowana pod względem predeterminowanych specyfikacji, celem zapewnienia stałej jakości produktu.

Certyfikaty analizy dostępne są na żądanie na stronie www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Wszystkie odczynniki mogą być używane wyłącznie w diagnostyce in vitro.

Produkt powinien być używany wyłącznie przez personel specjalnie w tym celu poinstruowany i przeszkolony w procedurach diagnostyki in vitro.

Aby uzyskać optymalne wyniki PCR, wymagane jest postępowanie zgodnie z instrukcją użytkownika.

Należy zwrócić uwagę na daty ważności wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie należy stosować przeterminowanych składników.

Wszelkie wygenerowane wyniki diagnostyczne należy interpretować w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych lub laboratoryjnych. Sprawdzenie wydajności systemu jest odpowiedzialnością użytkownika w kontekście procedur stosowanych w jego laboratorium, a które nie są objęte testami wykonywanymi przez firmę QIAGEN.

Charakterystyka wydajności

Badania niekliniczne

Badania niekliniczne zostały przeprowadzone w celu ustalenia wydajności analitycznej zestawu *ipsogen JAK2 MutaSearch Kit*.

Precyzja w pobliżu wartości granicznej

Trzy niezależne próbki odpowiadające niskim poziomom mutacji były mierzone 38 razy z użyciem 3 partii zestawu *ipsogen JAK2 MutaSearch Kit* na aparacie Applied Biosystems 7500. Wyniki są podsumowane w Tabelach 15 i 16.

Tabela 15. Wartości ΔC_T i dane precyzji dla badań nieklinicznych

| Próbka (% allele V617F) | ΔC_T [minimum ; maksimum] | Współczynnik zmienności (%) |
|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 0,5% | [7,8 ; 10,9] | 7,2% |
| 1% | [6,7 ; 8,8] | 5,6% |
| 2% | [5,9 ; 7,7] | 5,5% |
| COS-VF | [6,9 ; 8,8] | 6,2% |

Tabela 16. Wyniki genotypowania, zgodnie z obliczeniami $\Delta\Delta C_T$ dla badań nieklinicznych

| Próbka (% allele V617F) | Powtórzenia | Wykryta mutacja | Wynik niejasny | Mutacja nie wykryta |
|------------------------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 0,5% | 38 | 0 | 3 | 35 |
| 1% | 38 | 3 | 27 | 4 |
| 2% | 38 | 33 | 5 | 0 |

Dla 92% z 0,5% JAK2 V617F próbek, mutacja nie została wykryta.

Dla 87% z 2% JAK2 V617F próbek, mutacja nie została wykryta.

Ograniczenia ilości wejściowej

Zalecany wkład genomowego DNA wynosi 25 ng. Badano różne ilości wejściowe DNA w celu sprawdzenia czy ilość genomowego DNA może wpłynąć na interpretację wyników próbki. Wyniki badań podsumowano w Tabeli 17.

Tabela 17. Wpływ ilości wejściowej genomowego DNA

| Próbka (% allela V617F) | Ilość wejściowa (ng) | Powtórzenia | Wykryta mutacja | Niejasny wynik | Niewykryta mutacja |
|----------------------------|----------------------|-------------|---------------------------------------|----------------|--------------------|
| <1% | 2,5 | 6 | Próbki nie analizowane (wartości >IL) | | |
| | 10 | 6 | 0 | 1 | 5 |
| | 25 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| | 100 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| | 250 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| Suma <1% | | 30 | 0 | 1 | 23 |
| 1% | 2,5 | 3 | Próbki nie analizowane (wartości >IL) | | |
| | 10 | 3 | 0 | 1 | 2 |
| | 25 | 3 | 0 | 2 | 1 |
| | 100 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| | 250 | 3 | 0 | 2 | 1 |
| Suma 1% | | 15 | 0 | 8 | 4 |
| 2%, 4%, 50%, 78%, lub 100% | 2,5 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| | 10 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| | 25 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| | 100 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| | 250 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| Suma | | 75 | 75 | 0 | 0 |

Analiza rozcieńczonych lub wysoko stężonych próbek (np. <5 ng/μl DNA lub >5 ng/μl DNA, odpowiednio) wykazała, że takie stężenia mogą wpływać na wartości $\Delta\Delta C_T$ (lub $\Delta\Delta C_p$). To z kolei nie prowadzi do wyników fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich, ale tylko do wyników niejednoznacznych przy bardzo niskich ilościach procentowych JAK2 V617F.

Badania kliniczne

Próbki DNA pochodzące od 81 osób z podejrzeniem nowotworu mieloproliferacyjnego (uzyskane z krwi lub szpiku kostnego) i uprzednio scharakteryzowane przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (QIAGEN, nr kat. 673223) analizowano razem z 9 próbkami DNA od zdrowych

dawców przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit za pomocą aparatu Applied Biosystems 7500. Wyniki podsumowano w Tabeli 18.

Tabela 18. Wyniki próbek przy użyciu zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit i zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ

| | | Zestaw <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ | | |
|-----------------------|--------------------|--|----------------|---------------------|
| | | Wykryta mutacja | Wynik niejasny | Nie wykryto mutacji |
| Zestaw <i>ipsogen</i> | Próbki | | | |
| | Wykryta mutacja | 37 | 1 | 1 |
| | Wynik niejasny | 0 | 0 | 1 |
| | Niewykryta mutacja | 0 | 0 | 50 |

Ogólna zgodność wyniosła 98,9% (95% przedział ufności: 93,8–99,8%).

Pozytywna zgodność wyniosła 100,00% (95% przedział ufności: 90,6–100,00%).

Negatywna zgodność wyniosła 98,0% (95% przedział ufności: 89,7–99,7%).

Literatura

1. James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144.
2. Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387.
3. Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779.
4. Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 36, 1054.
5. Tefferi, A., Skoda, R., Vardiman, J.W. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 627.
6. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 290, 1382.
7. 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.
8. Martinaud, C., Brisou, P., Mozziconacci, M.J. (2010) Is the JAK2 V617F mutation detectable in healthy volunteers? *Am. J. Hematol.* 85, 287.
9. Tefferi, A., et al. (2011) Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms. *J. Mol. Diagn.* 13, 461.
10. Lippert, E., Mansier, O., Migeon, M., Denys, B., Nilsson, A., Rosmond, C., et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1–2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica.* 99, e98.

Symbole

Następujące symbole mogą pojawić się na opakowaniach i etykietach:



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające na <N> ilość testów



Użyj do



Do medycznego użytku diagnostycznego in vitro



Numer katalogowy



Numer partii (lot)



Numer materiału



Globalny Numer Handlowy Produktu (Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe



Producent



Zapoznaj się z instrukcją użytkowania

Informacje kontaktowe

Aby uzyskać pomoc techniczną i znaleźć więcej informacji, zapraszamy do naszego Centrum Pomocy Technicznej www.qiagen.com/Support lub do kontaktu z Serwisem Pomocy Technicznej QIAGEN bądź z lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub odwiedź www.qiagen.com).

Informacje dotyczące zamawiania

| Produkt | Zawartość | Nr kat. |
|---|---|---------|
| Zestaw <i>ipsogen</i> JAK2 MutaSearch Kit (24) | Na 24 reakcje: kontrola pozytywna V617F (Positive Control), kontrola negatywna V617F (Negative Control), Próbkę graniczną V617F (Cut-Off), Mieszanina starterów i sond (Primer and Probe Mix) JAK2 i JAK2 V617F | 673823 |
| Rotor-Gene Q MDx — do oceny PCR w czasie rzeczywistym w zastosowaniach klinicznych (IVD) | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Termocykler typu real-time PCR z wysokorozdzielczym analizatorem topnienia (High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, karmazynowy) plus kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera roczną gwarancję na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone. | 9002032 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Termocykler typu real-time PCR z wysokorozdzielczym analizatorem topnienia (High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, karmazynowy) plus kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera roczną gwarancję na części i robociznę, w cenie wliczona jest instalacja i szkolenie. | 9002033 |
| Zestaw QIAamp® DNA Blood Maxi — do oczyszczania genomowego DNA z krwi | | |
| QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10) | Na 10 DNA izolacji (maxipreps): 10 QIAamp Maxi Spin Columns (kolumny), QIAGEN Protease (proteaza), bufory, próbówki (50 ml) | 51192 |
| QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50) | Na 50 DNA izolacji (maxipreps): 50 QIAamp Maxi Spin Columns (kolumny), QIAGEN Protease (proteaza), bufory, próbówki (50 ml) | 51194 |

W celu uzyskania aktualnych informacji o licencjach i wyłączeniach specyficznych produktów, zapoznaj się z odpowiednim podręcznikiem zestawu QIAGEN lub podręcznikiem użytkownika. Podręczniki zestawu QIAGEN i instrukcje obsługi są dostępne na stronie www.qiagen.com lub można je zamówić w dziale pomocy technicznej QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Strona celowo pozostawiona pustą

Ten produkt jest przeznaczony do użytku diagnostycznego in vitro. Produkty *ipsogen* nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży lub użytkowane do produkcji komercyjnych produktów bez pisemnej zgody firmy QIAGEN.

Informacje zawarte w tym dokumencie mogą ulec zmianie bez wcześniejszego powiadomienia. Firma QIAGEN nie ponosi odpowiedzialności za jakiegokolwiek błędy, jakie mogą pojawić się w tym dokumencie. Niniejszy dokument jest uważany za kompletny i poprawny w momencie publikacji. W żadnym wypadku firma QIAGEN nie ponosi odpowiedzialności za przypadkowe, specjalne, wielokrotne lub istotne szkody w związku lub wynikające z używania tego dokumentu.

Produkty *ipsogen* posiadają gwarancję tak, aby sprostać podanym specyfikacjom. Wyłącznym obowiązkiem firmy QIAGEN i jedynym możliwym rozwiązaniem dla klienta jest bezpłatna wymiana produktów w przypadku, gdy nie spełnią one oczekiwań gwarancji.

Mutacje JAK2 V617F i ich użycie są chronione przez prawa patentowe, w tym europejskim patentem EP1692281, amerykańskimi patentami 7,429,456 i 7,781,199, amerykańskimi zgłoszeniami patentowymi US20090162849 i US20120066776 oraz zagranicznymi odpowiednikami.

Zakup tego produktu nie przenosi żadnych praw umożliwiających jego wykorzystanie w badaniach klinicznych leków ukierunkowanych na JAK2 V617F. Firma QIAGEN opracowuje specjalne programy licencyjne dla takich zastosowań. Skontaktuj się z naszym działem prawnym pod adresem jak2licenses@qiagen.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Próbka to Insight®, QIAamp®, *ipsogen*®, MutaSearch®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); HybProbe®, LightCycler®, TaqMan® (Roche Group).

Ograniczona Umowa Licencyjna

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit na następujące warunki:

1. Zestawu *ipsogen*JAK2 MutaSearch Kit można używać wyłącznie zgodnie z instrukcją obsługi zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit i tylko razem z elementami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników, które nie są częścią tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w Instrukcji obsługi zestawu *ipsogen* JAK2 MutaSearch Kit oraz dodatkowych protokołów dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodjęcie ani niepozwolenie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.qiagen.com.

HB-1354-004 © 2013–2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com

