

juni 2016

Handbok för *ipsogen*[®] JAK2 Muta *Screen* Kit

 10 (katalognr 673022)

 24 (katalognr 673023)

Version 1

IVD

Kvantitativ in vitro-diagnostisk

För användning med Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI
PRISM[®] och LightCycler[®]-instrument



REF 673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3 **MAT** 1072500 SV



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar framgång från prov till resultat.

QIAGEN sätter standarden för :

- rening av DNA, RNA och proteiner
- nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på www.qiagen.com.

Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring	4
Testprincip	6
Material som medföljer	7
Kitinnehåll	7
Material som behövs men inte medföljer	8
Varningar och försiktighet	9
Allmänna säkerhetsåtgärder	9
Förvaring och hantering av reagenser	10
Utförande	11
Beredning av prov-DNA	11
Förvaring av nukleinsyror	11
Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q-instrument med rotor med 72 rör	11
Protokoll: qPCR på tillämpade biosystem och ABI PRISM-instrument	21
Protokoll: qPCR på LightCycler 480-instrumentet	30
Protokoll: qPCR på LightCycler 2.0-instrumentet	38
Tolkning av resultat	43
Grafsk representation och kvalitetskontrollkriterier	43
Beräkning av normaliserad FAM-/VIC-kvot och genotyp	44
Felsökningsguide	47
Kvalitetskontroll	49
Begränsningar	49
Prestandaegenskaper	49
Icke-kliniska studier	49
Kliniska studier	51
Referenser	57
Symboler	58
Kontaktinformation	58
Beställningsinformation	59

Avsedd användning

*Ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* är avsedda för att detektera JAK2 V617F/G1849T-mutationer i genomiskt DNA hos personer med misstänkt myeloproliferativa neoplasmer. Frånvaro av JAK2 V617F/G1849T utesluter inte förekomst av andra JAK2-mutationer. Testet kan rapportera falska negativa resultat om andra mutationer förekommer i kodon 615 till 619 (1).

Obs! Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument. All användning av produkten tillsammans med andra märken och/eller ändring av komponenterna gör att QIAGENs garanti upphör att gälla.

Sammanfattning och förklaring

En återkommande somatisk mutation, V617F, som påverkar Janus-tyrosinkinas 2-genen (JAK2) identifierades 2005 (2–5), vilket ledde till ett stort genombrott när det gällde att förstå, klassificera och diagnostisera myeloproliferativa neoplasmer (MPN). JAK2 är en mycket viktig intracellulär signalmolekyl för ett antal cytokiner, inklusive erytropoietin.

JAK2 V617F-mutationen detekteras hos > 95 % av patienterna med polycytemia vera (PV), 50–60 % av patienterna med essentiell trombocytemi (ET) och hos 50 % av patienterna med primär myelofibros (PMF). I sällsynta fall har JAK2 V617F även detekterats i samband med myelomonocytisk leukemi, myelodysplastiskt syndrom, systemisk mastocytos och kronisk neutrofil leukemi, men till 0 % i samband med kronisk myeloisk leukemi (6).

Mutationen korresponderar till en enskild nukleotidförändring i JAK2-nukleotiden 1849 i exon 14, vilket resulterar i en unik substitution av valin (V) till fenylalanin (F) vid position 617 i proteinet (JH2-domänen). Detta leder till konstitutiv aktivering av JAK2, hematopoietisk transformering *in vitro* och erytropoietin-oberoende tillväxt av erytroidkolonier (EEC) hos alla patienter med PV och en stor andel av patienterna med ET och PMF (7). JAK2 V617F utgör en viktig drivkraft vid transformering av hematopoietiska celler i MPN, men de exakta patologiska mekanismer med samma unika mutation som leder till sådana olika kliniska och biologiska entiteter har ännu inte tydliggjorts fullt ut.

Traditionellt sett har diagnos av MPN-sjukdomar baserats på kliniska, benmargshistologiska och cytogenetiska kriterier. Upptäckten av en sjukdomsspecifik molekulär markör resulterade i både en förenklad process och förbättrad diagnostisk precision. Detektion av JAK2 V617F-mutationen är nu en del av referenskriterierna hos WHO 2008 för diagnos av BCR-ABL-negativ MPN (tabell 1), och förekomst av den här mutationen är ett huvudkriterium för bekräftad diagnos.

Tabell 1. WHO-kriterier för diagnos av MPN (med utgångspunkt från referens 8)

Kriterier för diagnos av polycytemia vera (PV)	
Huvudkriterier	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hemoglobin (Hgb) > 18,5 g.dl⁻¹ (män) eller > 16,5 g.dl⁻¹ (kvinnor) eller Hgb eller hematokrit (Hct) > 99:e percentilen av referensintervallet för ålder, kön eller boendehöjd över havet eller Hgb > 17 g.dl⁻¹ (män) eller > 15 g.dl⁻¹ (kvinnor) vid associering med en ihållande ökning på ≥ 2 g.dl⁻¹ från baslinjen som inte kan tillskrivas en korrigerig av järnbrist, eller förhöjd volymandel röda blodkroppar > 25 % över det <u>predikterade normala medelvärdet</u> 2. Förekomst av <u>JAK2V617F</u> eller liknande mutation
Underordnade kriterier	<ol style="list-style-type: none"> 1. Trilinjär myeloproliferation i benmärgen 2. Serumerythropoietinnivå under det normala 3. Tillväxt av endogen erytroidkoloni (ET)
Kriterier för diagnos av essentiell trombocytemi(ET)	
Huvudkriterier	<ol style="list-style-type: none"> 1. Antal trombocyter ≥ 450 × 10⁹ l⁻¹ 2. Megakaryocytproliferation med stor och mogen morfologi. Ingen eller liten granulocyt- eller erytroidproliferation 3. Uppfyller inte WHO-kriterierna för (chronic myeloid leukemia, CML), PV, primär myelofibros (PMF), myelodysplastiska syndrom (MDS) eller andra myeloida neoplasmer 4. Förekomst av <u>JAK2V617F</u> eller annan klonal markör, eller inga tecken på reaktiv trombocytos
Underordnade kriterier	-
Kriterier för diagnos av primär myelofibros (PMF)	
Huvudkriterier	<ol style="list-style-type: none"> 1. Megakaryocytproliferation och -atypi i samband med antingen retikulin- och/eller kollagenfibros. Eller, om inte retikulinfibros förekommer måste megakaryocytförändringarna åtföljas av ökad cellularitet för benmärgen, granulocytisk proliferaion och ofta minskad erythropoiesis (dvs. prefibrotisk PMF) 2. Uppfyller inte WHO-kriterierna för CML, PV, MDS eller annan myeloisk neoplasm 3. Förekomst av <u>JAK2V617F</u> eller annan klonal markör, eller inga tecken på reaktiv benmärgsfibros
Underordnade kriterier	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leukoerytoblastos 2. Förhöjt serumlaktatdehydrogenas (LDF) 3. Anemi 4. Palpabel splenomegali

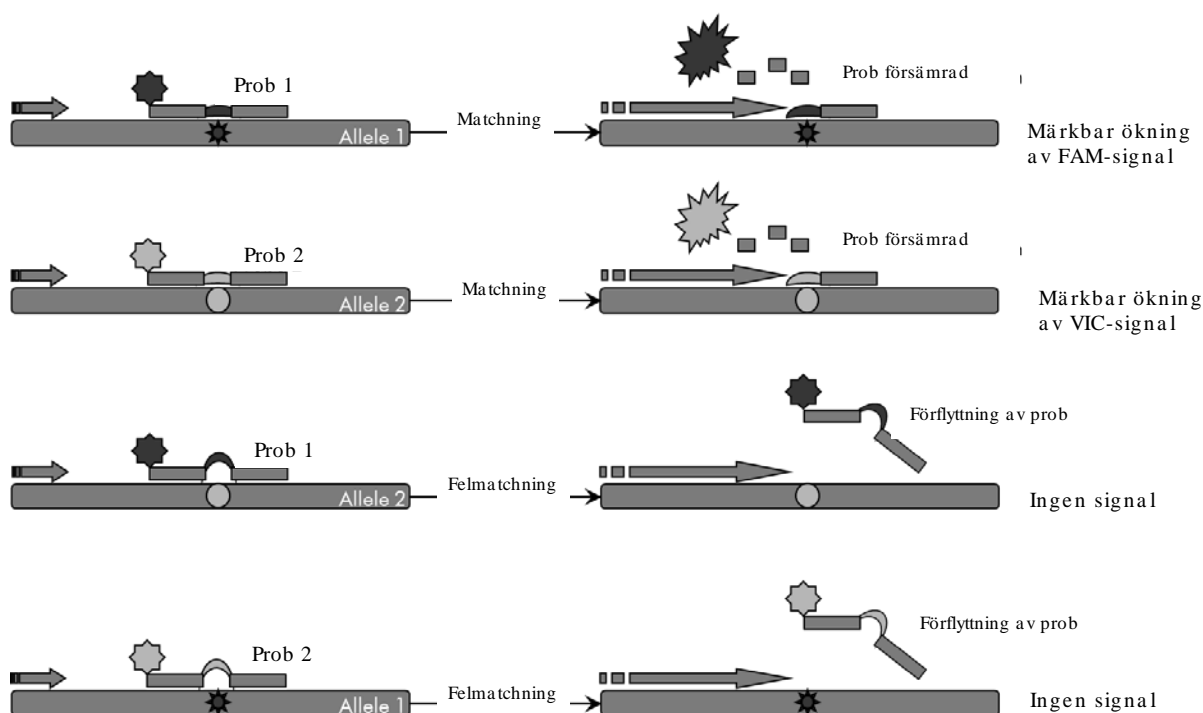
Internationella experter har nyligen föreslagit kriterier för behandlingsprövningar i PV och ET. Baserat på data om allogentransplantat, alfainterferon eller hydroxyurea har mängdbestämning med JAK2 V617F inkorporerats som ett möjligt användbart verktyg för att övervaka behandlingssvar (9). En minskning i JAK 2 V617F har observerats vid kliniska prövningar av läkemedel riktade mot JAK2 (10).

Testprincip

För allelskilningsassay används två TaqMan[®]-prober i en multiplex-assay. Den ena är en perfekt matchning för allel-2-sekvensen (t.ex. vildtypallelen) och den andra är en perfekt matchning för allel-1-sekvensen (t.ex. den muterade allelen). Varje prob har märkts med en distinkt fluorescent färg vid dess 5'-ände, rapportören, till exempel FAM[™] eller VIC[®] och innehåller en icke-fluorescerande quencher på 3'-änden. Proberna innehåller en minor groove binder (MGB[™]) som möjliggör användning av kortare prober med större stabilitet och därmed mer noggrann allelskilning.

Under PCR-körningens utökningsfas delas den perfekt matchade proben av 5'→3'-exonukleasaktiviteten i TaqDNA-polymeras, vilket skiljer rapportörfärgen från quenchern och därmed frigör urskilningsbar fluorescens. Proben som inte matchas perfekt kommer att förflyttas snarare än delas av TaqDNA-polymeras och rapportörfärg frigörs inte. Fluorescenssignalen (VIC eller FAM) som skapas samlas in vid slutet på PCR-körningen (slutpunkten) och indikerar omedelbart förekomst av målsekvensen/målsekvenserna i provet (vildtypallel, muterad allel eller båda) utan långa och arbetskrävande post-PCR-steg som ökar risken för kontaminering. Målsekvensens faktiska mängd bestäms inte.

*ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* använder denna teknik enligt illustrationen (se figur 1).



Figur 1. Multiplex-assay med TaqMan. *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* använder denna teknik för allelskilning.

Material som medföljer

Kitinnehåll

<i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit</i>		(10)	(24)
Katalognr.		673022	673023
Antal reaktioner		24	10
V617F Positive Control(V617F-positiv kontroll)*	PG-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control (V617F-negativ kontroll)†	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample Primers (Cut-off-prov)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix (Primers och sökfragment-blandning), JAK2 V617F‡	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
<i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit Handbook</i> (handbok för <i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit</i> , på engelska)		1	1

* Positiv kontroll: 100 % V617F DNA.

† Negativ kontroll: 100 % vildtyp-DNA, 0 % V617F.

‡ Blandning av specifika framåt- och bakåtriktade primers för *JAK2* genen, specifikt V617F FAM-prob och vildtypsprob VIC.

Obs! Centrifugera provrören snabbt före användning.

Obs! Analys av okända prover med *ipsogen JAK2 Muta Screen Kit* kräver extrahering av genomiskt DNA. Reagenser som behövs för att utföra DNA-extrahering (till exempel QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, katalognr 51304) ingår inte och måste valideras tillsammans med kitet.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Reagenser

- Nukleasfritt vatten (PCR-grade)
- Nukleasfri 1x TE-buffert, pH 8,0 (till exempel Thermo Fisher Scientific, katalognr 12090015)
- Buffert och *Taq*DNA-polymeras: De validerade reagenserna är TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc, kat.nr 4304437) och LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat.nr 04535286001)
- Reagenser för 0,8–1 % agarosgel i 0,5x TBE elektroforesbuffert

Förbrukningsartiklar

- Nukleasfria aerosolresistenta sterila PCR-pipettspetsar med hydrofobiskt filter
- 0,5 ml eller 0,2 ml RNase- och DNase-fria PCR-rör
- Is

Utrustning

- Pipetter* avsedda för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)
- Bänkcentrifug* med rotor för 0,2 ml/0,5 ml reaktionsrör (med kapacitet för 10 000 rpm)
- Spektrofotometer* för DNA-kvantifiering
- Realtids-PCR-instrument:* Rotor-Gene Q 5plex HRM eller andra Rotor-Gene-instrument; LightCycler 2.0 eller 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS eller ABI PRISM 7900HT SDS samt specifika tillhörande artiklar
- Utrustning* för pulsfältgelelektrofores

*Säkerställ att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Vid qPCR-tester krävs god labororiesed, inklusive utrustningsunderhåll, som är särskilt inriktad på molekylärbiologi och följer gällande regler och relevanta standarder.

Detta kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning. Reagenserna och instruktionerna som medföljer detta kit har validerats för optimal prestanda. Ytterligare spädning av reagenserna eller förändring av inkuberingstider och -temperaturer kan leda till felaktiga eller oförenliga data. PPM-VF-reagenser kan förändras om de utsätts för ljus. Alla reagenser är formulerade specifikt för användning med detta test. För att få en optimal testprestanda får inget ersättningsmaterial användas.

Var mycket försiktig för att förhindra:

- DNase-kontaminering som kan orsaka försämrad mall-DNA
- DNA- eller PCR-överföringskontaminering som leder till falsk positiv signal

Vi rekommenderar följande hantering:

- Använd nukleasfritt laboratiematerial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och bär handskar när du utför analysen.
- Använd nya aerosolresistanta pipettspetsar för alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser.
- Bered pre-PCR-masterblandningen med särskilt material (pipetter, spetsar osv.) i ett särskilt område där inga DNA-matriser (DNA, plasmid) förs in. Tillsätt mall i ett separat utrymme (helst i ett annat rum) med hjälp av specialanpassat material (pipetter, spetsar etc.).

Förvaring och hantering av reagenser

Kiten skickas på kolsyreis och måste förvaras vid -30 °C till -15 °C efter leverans.

- Minimera primers och sökfragmentblandningars exponering för ljus (PPM-VF-rör).
- Blanda och centrifugera rören försiktigt innan de öppnas.
- Förvara alla kitkomponenter i originalbehållarna.

Dessa förvaringsvillkor gäller både öppnade och oöppnade komponenter. Komponenter som förvaras under andra villkor än de som anges på etiketterna fungerar eventuellt inte på rätt sätt och detta kan påverka analysresultaten negativt.

Utgångsdatum för reagenserna anges på etiketterna till varje enskild produkt. Under korrekta förvaringsvillkor behåller produkten sin prestanda fram till utgångsdatumet som står tryckt på etiketten.

Det finns inga uppenbara tecken som visar att denna produkt är instabil. Positiva och negativa kontroller ska dock köras samtidigt med okända patientprover.

Utförande

Beredning av prov -DNA

Genomiskt DNA bör insamlas från helblod, renade perifera blodlymfocyter, flerkärniga celler eller granulocyter. För att jämföra resultat rekommenderar vi att du använder samma metod för cellfraktionering och DNA-extrahering. DNA-extrahering bör utföras med hjälp av laboratoriets egen eller en allmänt vedertagen metod.

DNA-kvantiteten fastställs genom att mäta den optiska densiteten vid 260 nm. DNA-kvaliteten bör utvärderas med spektrofotometri eller gelelektrofores.

A_{260}/A_{280} -kvoten bör vara 1,7–1,9. Mindre kvoter indikerar vanligtvis kontaminering av protein eller organiska kemikalier. Elektroforesanalys på 0,8–1 % agarosgel bör tillåta visualisering av det isolerade DNA:et som ett distinkt band på cirka 20 kb. Viss utstrykning är godtagbart.

Det resulterande DNA:et späds till 5 ng/ μ l i TE-buffert. qPCR-reaktionen är optimerad för 25 ng renat genomiskt DNA.

Förvaring av nukleinsyror

För korttidsförvaring upp till 24 timmar rekommenderar vi en förvaring av nukleinsyror vid 2–8 °C. För längre tids förvaring än 24 timmar rekommenderar vi förvaring vid –20 °C.

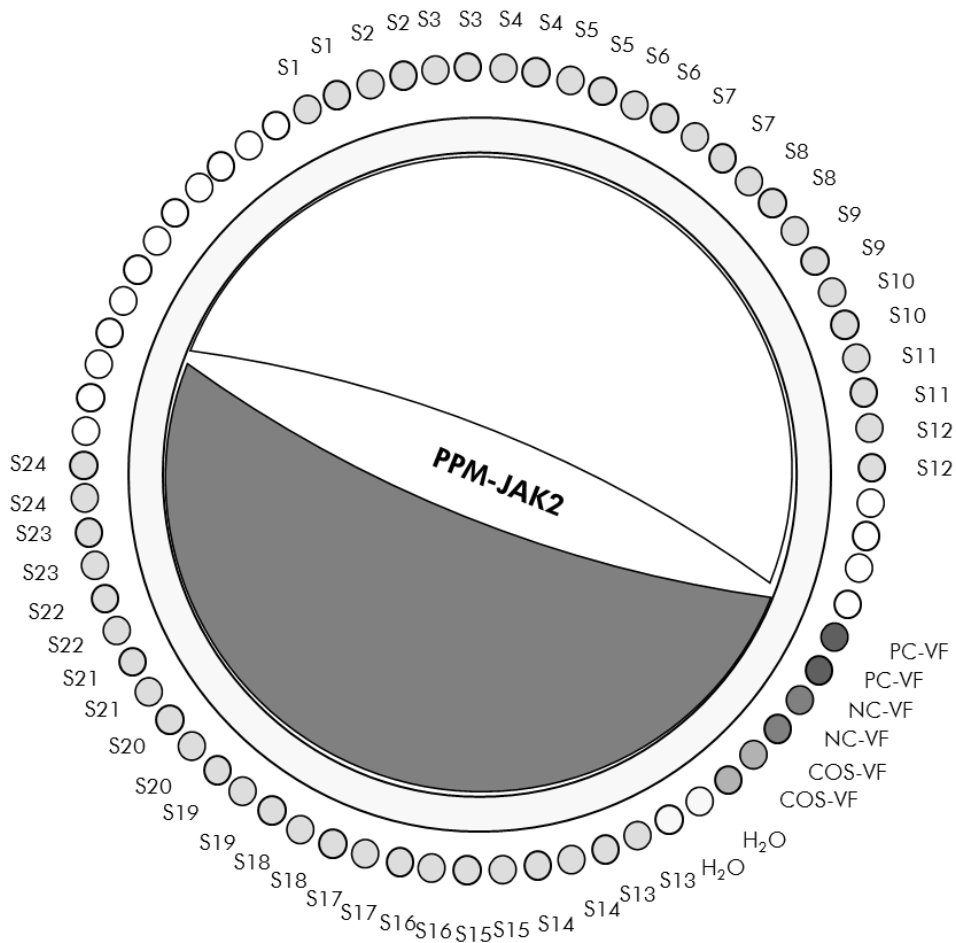
Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q-instrument med rotor med 72 rör

När detta instrument används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 2.

Tabell 2. Antal reaktioner på Rotor Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F primers och sökfragmentblandning (PPM-VF) (56 reaktioner)	
24 DNA-prover	24 x 2 reaktioner
3 DNA-kontroller	3 x 2 reaktioner (PC-VF, NC-VF och COS- VF, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor



Figur 2. Förslag på rotorkonfiguration för ett experiment med *ipsogen* JAK2 Muta Screen Kit. PC-VF: positiv kontroll; NC-VF: negativ kontroll; COS-VF: cut-off-prov; S: DNA-prov; H₂O: vattenkontroll.

Obs! Var noga med att alltid placera ett prov som ska testas i position 1 på rotorn. I annat fall utför instrumentet ingen kalibrering under kalibreringssteget och felaktiga fluorescensdata samlas in.

Fyll alla andra positioner med tomma rör.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrument med rotor med 72 rör

Obs! Utför alla steg på is.

Utförande

1. Tina alla komponenter som behövs och placera dem på is. Komponenterna bör tas fram från frysförvaring cirka 10 minuter innan proceduren påbörjas.

2. Vortexblanda och centrifugera alla provrör kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
3. Bered följande qPCR -mixar enligt det antal prover som ska bearbetas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

I tabell 3 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig volym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

På RotorGene-instrument kan *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit användas för analys av 24 prover i duplikat i ett experiment (figur 2), 20 prover i duplikat i två experiment eller 15 prover i duplikat i tre experiment.

Tabell 3. Beredning av qPCR -blandning

Komponent	Antal reaktioner (µl)				Slutlig koncentration
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Primers och probblandning, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Nukleasfritt vatten (PCR-grade)	5	285	145	95	–
Prov (som ska läggas till i steg 5)	5	5 i varje	5 i varje	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	25 i varje	25 i varje	–

* 24 prover, ett experiment/kit.

† 10 prover, två experiment/kit.

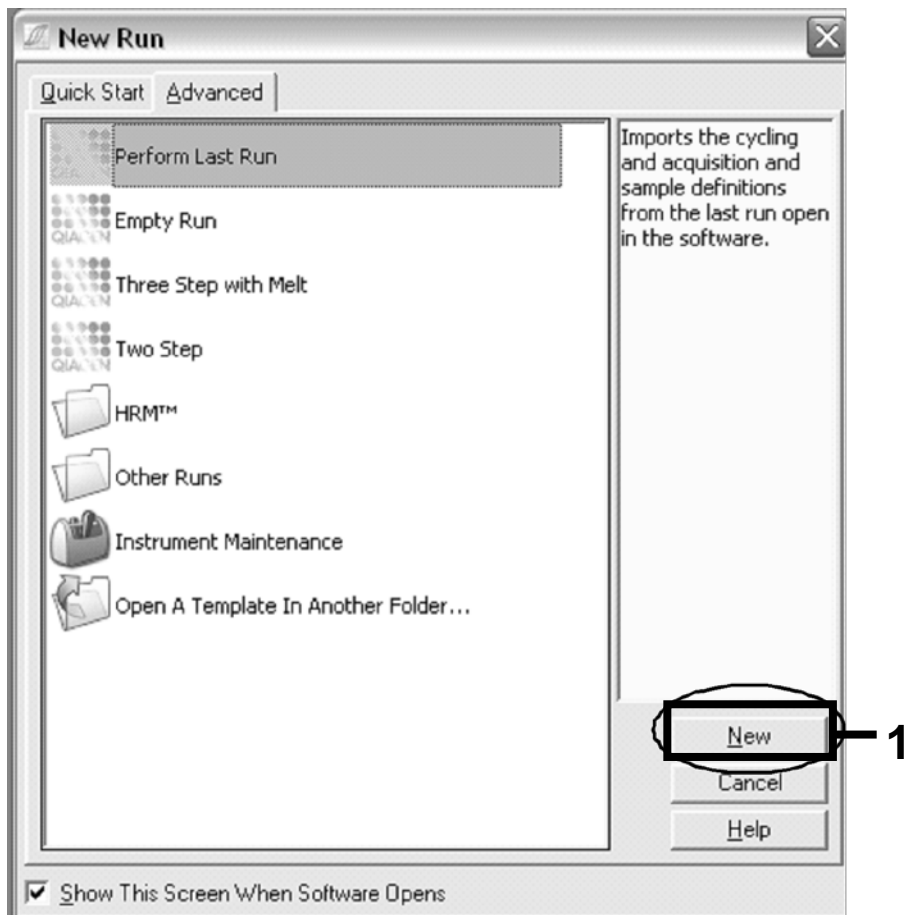
‡ 5 prover, tre experiment/kit.

4. Vortexblanda och centrifugera alla qPCR-blandningen kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
5. Dispensera 20 µl av qPCR-pre-mixen per rör.
6. Tillsätt 5 µl av prov-DNA eller kontroll det motsvarande röret (total volym 25 µl).
7. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
8. Stäng PCR-rören. Placera rören i 72-rörsrotorn enligt tillverkarens rekommendationer. Fyll alla andra positioner med tomma rör.
9. Kontrollera att låsringen (tillhör till Rotor-Gene-instrumentet) är placerad överst på rotorn för att förhindra att rören öppnas av misstag under körningen. Placera rotorn i RotorGene Q-instrumentet enligt tillverkarens rekommendationer.
10. Skapa en temperaturprofil för detektion av JAK2-DNA genom att utföra nedanstående steg.

Inställning av allmänna analysparametrar.	Figurer 3, 4
Amplifiering av DNA	Figur 5
Justering av fluorescenskanalsensitiviteten	Figur 6

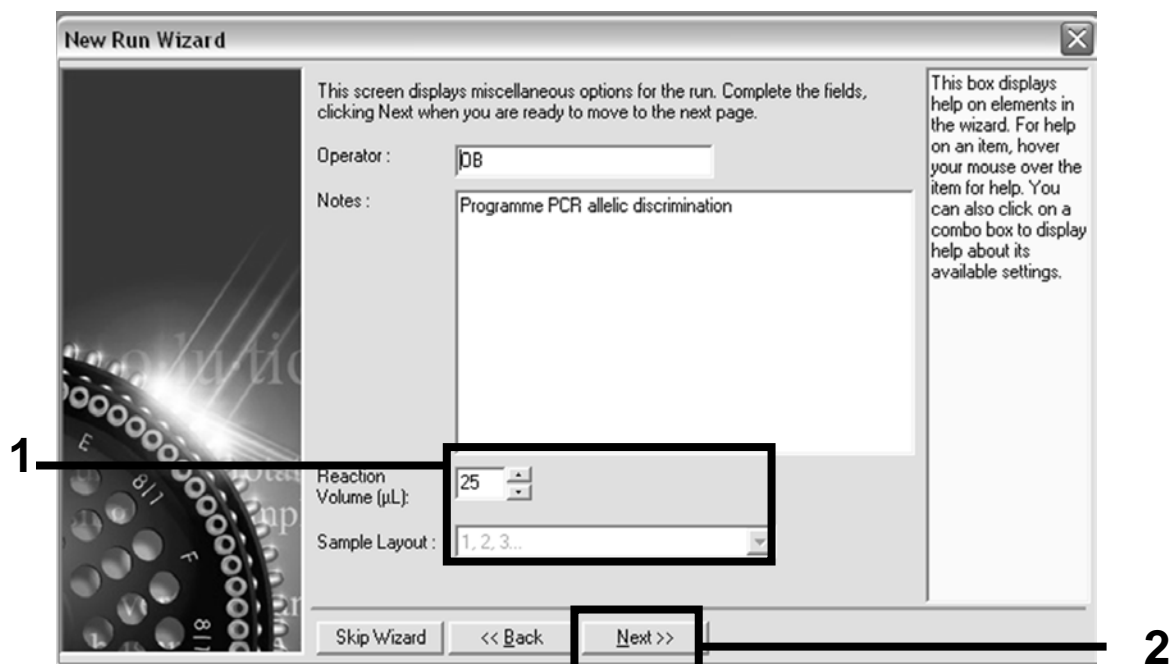
Mer information om hur du programmerar Rotor-Gene Q-instrumenten hittar du i användarhandboken till instrumentet. I bilderna har programvaruinställningarna ramats in i svart. Bilder är inkluderade för Rotor-Gene Q-instrument.

11. Starta programvaran för Rotor-Gene. I dialogrutan "New Run" (Ny körning) klickar du på "New" (Ny).



Figur 3. Dialogrutan "New Run" (Ny körning).

12. I "New Run Wizard" (Dialogrutan för ny körning) ställer du in volymen på 25 µl och klickar på "Next" (Nästa).

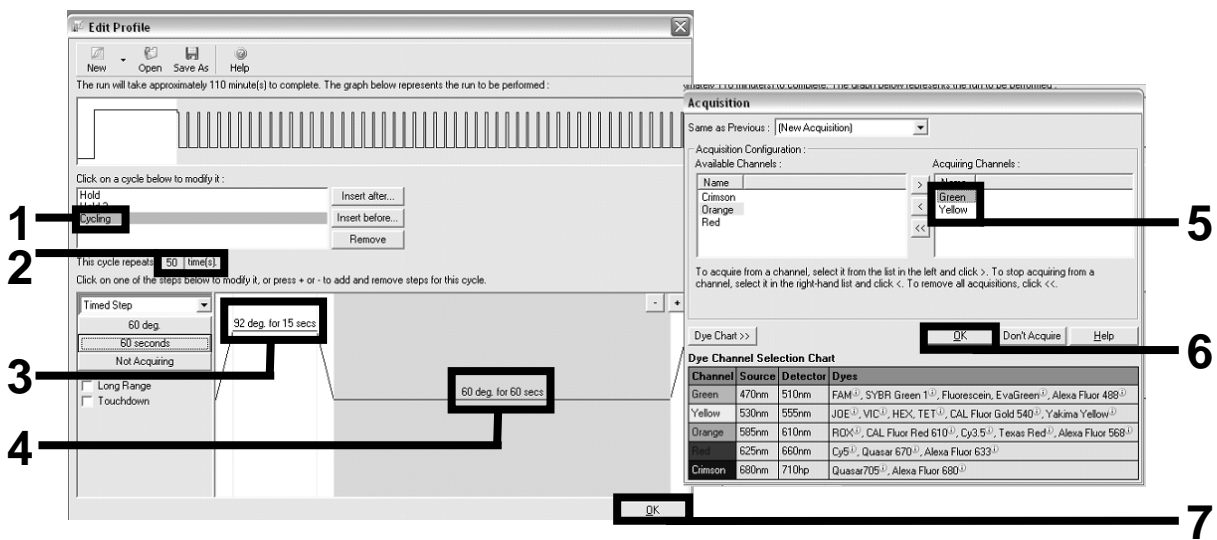


Figur 4. Inställning av allmänna analysparametrar.

13. Klicka på knappen "Edit Profile" (Redigera profil) i nästa dialogruta "New Run Wizard" (Dialogrutan för ny körning) och programmera temperaturprofilen enligt tabell 4 och figur 5. Vara noga med att lägga till det sista hämtningssteget på 60 °C för varje cykel för såväl kanalen Green (FAM) som Yellow (VIC).

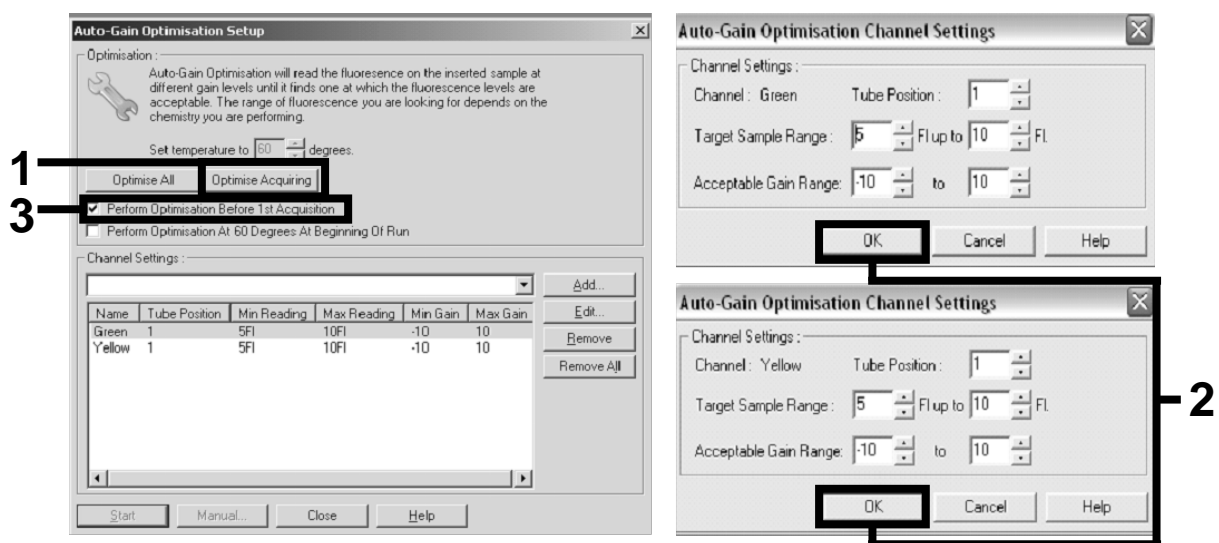
Tabell 4. Temperaturprofil

Hold (Håll)	Temperatur: 50 °C Tid: 2 min
Hold 2 (Håll 2)	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min
Cycling (Cykling)	50 gånger 92 °C i 15 s 60 °C i 1 minut, enkel Hämtning av FAM-fluorescens i kanalen Cycling A Green Hämtning av VIC-fluorescens i kanalen Cycling A Yellow



Figur 5. DNA-amplifiering.

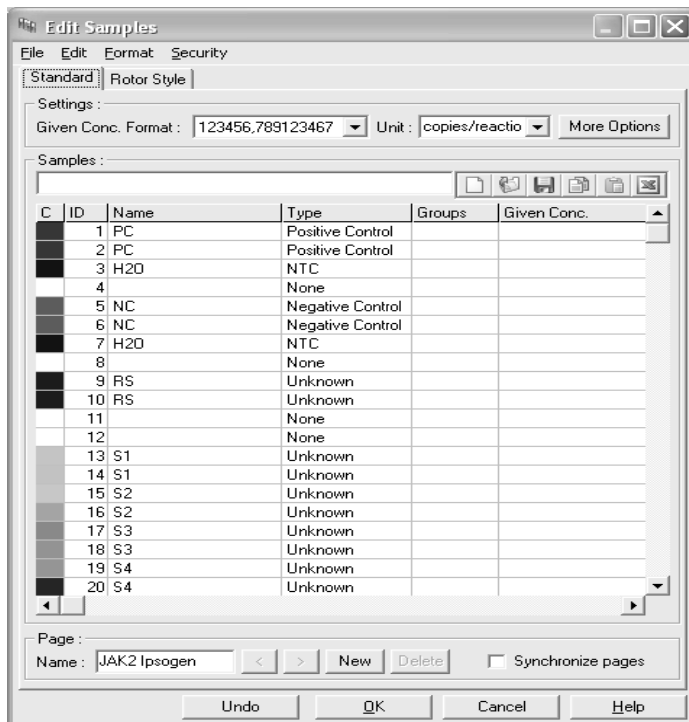
14. Upptäcktsintervallet för fluorescenskanalerna måste fastställas enligt fluorescensintensiteterna i polymeraskedjereaktionsrören. Klicka på "Gain Optimisation" (Optimering av förstärkning) i dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning) för att öppna dialogrutan "Auto-Gain Optimisation Setup" (Ställ in automatisk optimering av förstärkning). Klicka på "Optimise Acquiring" (Optimera hämtning) och klicka sedan på "OK" (OK) i dialogrutorna "Auto-Gain Optimisation Channel Settings" (Kanalinställning för automatisk optimering av förstärkning) för varje kanal (Green och Yellow, figur 6). Kontrollera att kryssrutan "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Utför optimering inför första hämtning) har markerats för varje kanal (figur 6).



Figur 6. Justering av fluorescenskanalsensitiviteten.

15. De förstärkningsvärden som fastställs av kanalkalibreringen sparas automatiskt och anges i det sista menyfönstret i programmeringsproceduren. Klicka på "Start Run" (starta körning) för att köra programmet.

16. Ange rotorinställningen i programvara för Rotor-Gene (figur 7).



Figur 7. Konfiguration av Rotor -Gene: "Edit samples" (Redigera prover).

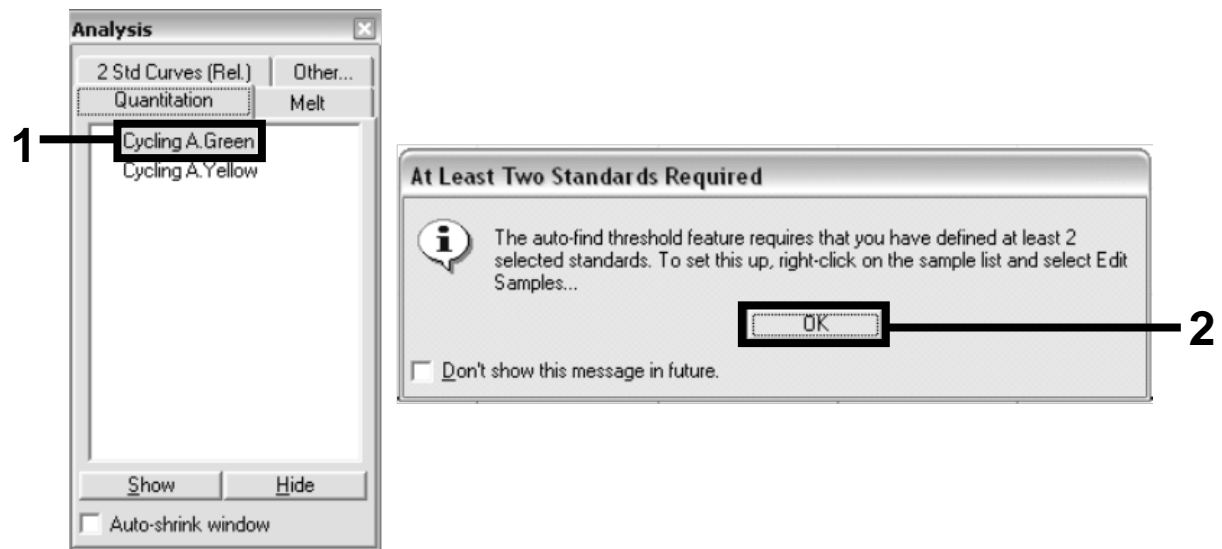
Inställning för procedur för slutpunktsanalys för Rotor -Gene Q 5plex
HRM-instrument

17. När PCR-programmet har slutförts klickar du på "Analysis" (Analys) i
verktygsfältet (figur 8).



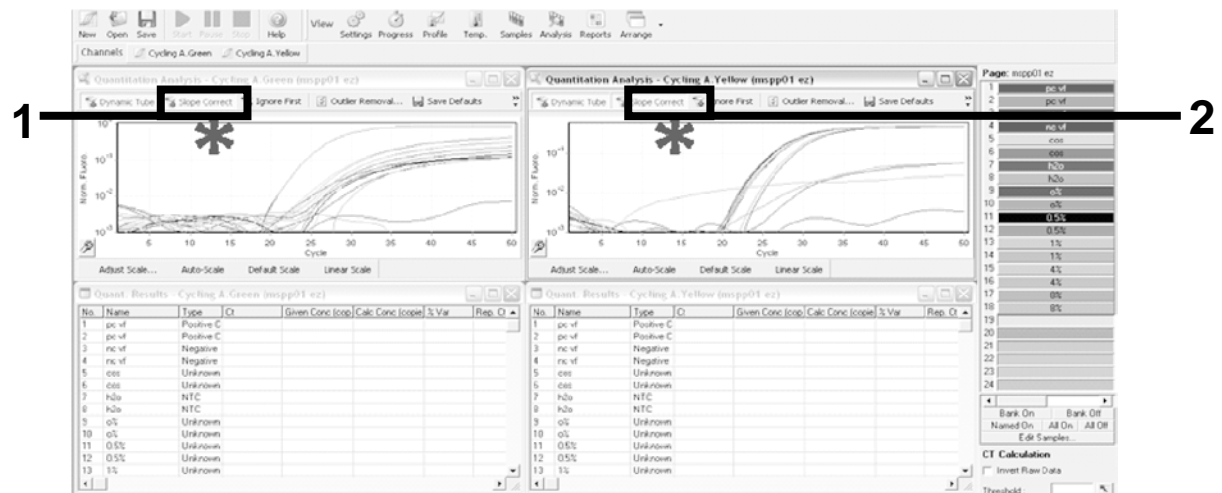
Figur 8. Analys.

18. Dubbelklicka på "Cycling A Green" (Cykling A grön) och sedan "OK" i dialogrutan "Analysis" (Analys) (figur 9). Upprepa för Cycling A Yellow (Cykling A gul).



Figur 9. Kvantifiering: "Cycling A. Green" (Cykling A grön)

19. Ett nytt fönster öppnas (figur 10). Klicka på "Slope Correct" (Lutning korrekt) i båda paneler enligt figur 10.



Figur 10. Inställningen "Slope Correct" (Lutning korrekt).

20. Spara som kalkylblad i Excel[®] för att exportera data. Klicka på "OK" (OK), ge exportfilen ett namn och spara textfilen (*.txt).

21. Öppna textfilen i Excel och markera kolumn A. Klicka på ” Data” (Data), ” Convert” (Omvandla) och ” Next” (Nästa). Välj ” Comma” (Komma) och klicka på ” End” (Slutför). Resultaten visas enligt figur 11.

Rådata

Standardiserade

PRC-körning 50

Provnamn

FAM-kolumn

VIC-kolumn

Figur 11. Resultatexempel, visas i Excel-filen.

Obs! Filen innehåller såväl rådata som standardiserade data. Endast standardiserade data bör betraktas.

Dessa data anges i den kvantitativa analysen för kanalen Cycling A Green och den kvantitativa analysen för kanalen Cycling A Yellow i tabellen. Data som avses för tolkning är de som insamlas under PCR-körning 50 (i cirklarna till höger).

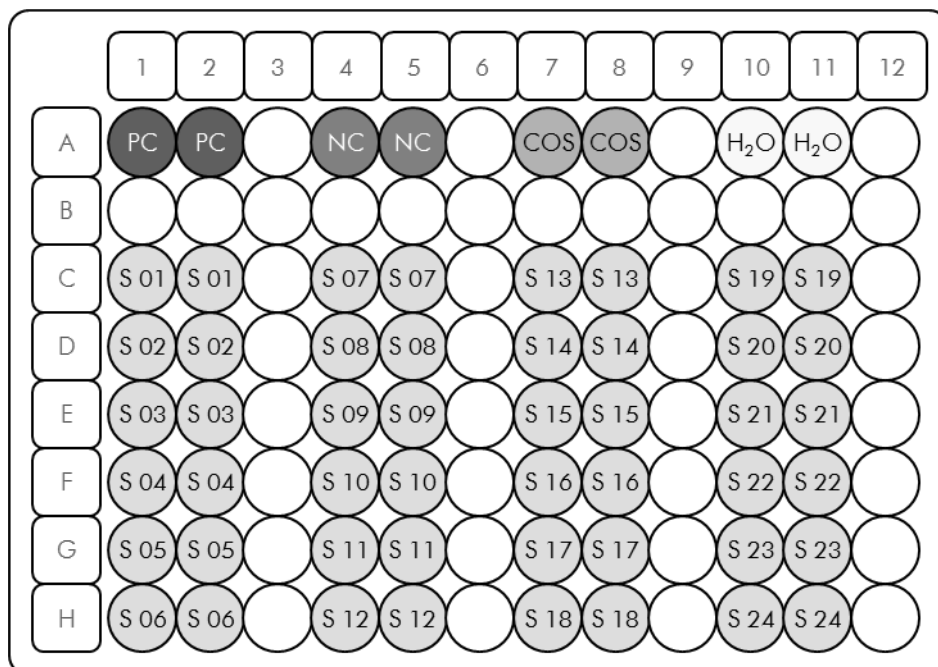
Protokoll: qPCR på tillämpade biosystem och ABI PRISM-instrument

När utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 5.

Tabell 5. Antalet reaktioner för instrumenten Applied Biosystems 7300 och 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 eller ABI PRISM 7900HT.

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F primers och sökfragmentblandning (PPM-VF) (56 reaktioner)	
24 DNA-prover	24 x 2 reaktioner
3 DNA-kontroller	3 x 2 reaktioner (PC-VF, NC-VF och COS- VF, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbearbetning på instrumenten Applied Biosystems 7300 och 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 eller ABI PRISM 7900HT.



Figur 12. Förslag på plattkonfiguration för ett experiment med *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit. PC: positiv kontroll; NC: negativ kontroll; COS: cut-off-prov; S: DNA-prov; H₂O: vattenkontroll.

qPCR för instrumenten Applied Biosystems 7300 och 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 eller ABI PRISM 7900HT.

Obs! Utför alla steg på is.

Utförande

1. Tina alla komponenter som behövs och placera dem på is.
Komponenterna bör tas fram från frysförvaring cirka 10 minuter innan proceduren påbörjas.
2. Vortexblanda och centrifugera alla provrör kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
3. Bered följande qPCR-mixar enligt det antal prover som ska bearbetas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

I tabell 6 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig volym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

På Applied Biosystems 7300 och 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 eller ABI PRISM 7900HT-instrument kan *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* användas för analys av 24 prover i duplikat i ett experiment (figur 12), 20 prover i duplikat i två experiment eller 15 prover i duplikat i tre experiment.

Tabell 6. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	Antal reaktioner (µl)				Slutlig koncentration
	1	56+ 1*	28+ 1†	18+ 1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1×
Primers och probblandning, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1×
Nukleasfritt vatten (PCR-grade)	5	285	145	95	–
Prov (som ska läggas till i steg 4)	5	5 i varje	5 i varje	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	25 i varje	25 i varje	–

* 24 prover, ett experiment/kit.

† 10 prover, två experiment/kit.

‡ 5 prover, tre experiment/kit.

- Vortexblanda och centrifugera alla qPCR-blandningen kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
- Dispensera 20 µl av qPCR-pre-mixen per brunn.
- Tillsätt 5 µl av prov-DNA eller kontroll i den motsvarande brunnen (total volym 25 µl).
- Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
- Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 sekunder).
- Placera plattan i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
- Programmera termocyklern med det termocykelprogram som anges i tabell 7 och starta körningen.

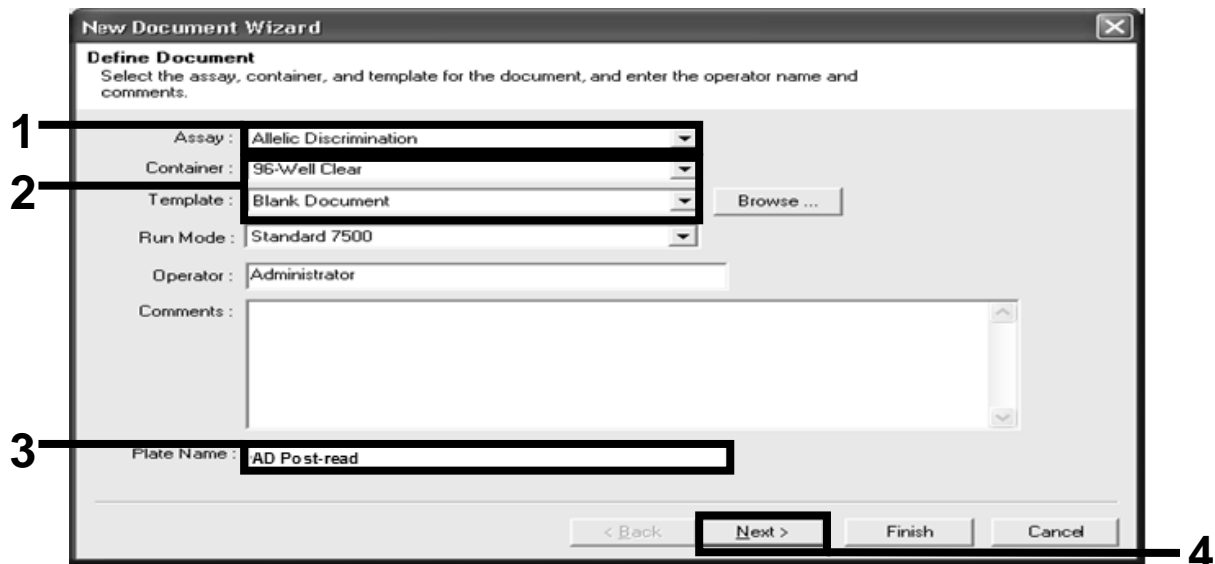
Tabell 7. Temperaturprofil för Applied Biosystems- och ABI PRISM-instrument

Hold (Håll)	Temperatur: 50 °C Tid: 2 min
Hold 2 (Håll 2)	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min
Cycling (Cykling)	50 gånger 92 °C i 15 s 60 °C i 1 min

Analysprocedur efter körning för Applied Biosystems- och ABI PRISM-instrument

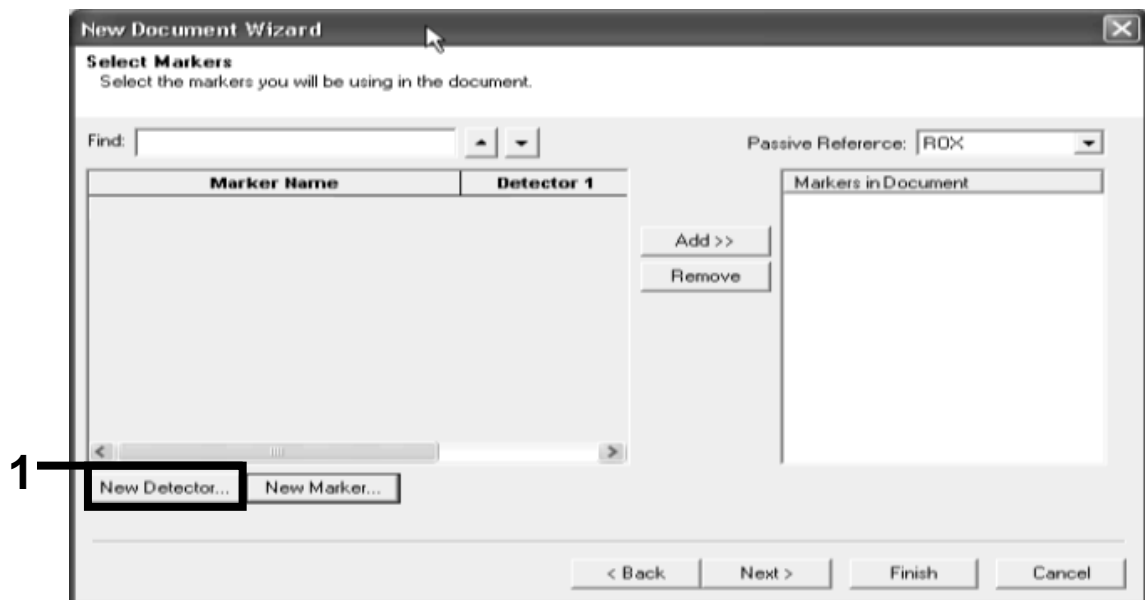
Se bruksanvisningen för instrumentet för programmeringsinformation om instrumenten Applied Biosystems 7300 och 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 eller ABI PRISM 7900HT. För att få en bättre översikt är programinställningarna markerade med en svart ram.

11. Välj "Start/Program" (Start/Program) och därefter "File/New" (Arkiv/Nytt) efter att körningen har slutförts.
12. Klicka på listrutan "Assay" (Analys) i dialogrutan "New Document Wizard" (Nytt dokument) och välj "Allelic Discrimination" (Allelsärskiljning) (figur 13).
13. Godkänn standardinställningarna för fälten "Container" (Behållare) och "Template" (Mall) ("96-Well Clear" (96 brunnar, transparent) och "Blank Document" (Tomt dokument), figur 13). I fältet "Plate Name" (Namn på plattan) anger du *AD Post-read* (figur 13) och klicka på "Next>" (Nästa) för att komma till dialogrutan "Select Markers" (Välj markörer).



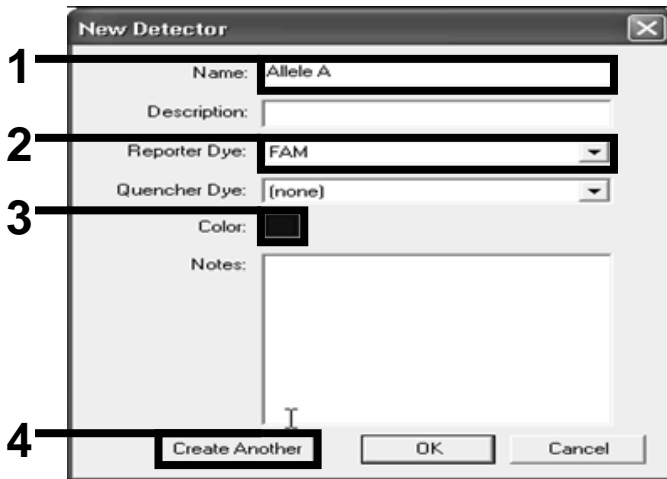
Figur 13. Förinställningar för att skapa en ny körning efter inläsning (New Document Wizard) (Nytt dokument).

14. Om panelen "Markers in Document" (markörer i dokument) i dialogrutan "Select Markers" (välj markörer) innehåller en lämplig markör för din tillämpning fortsätter du med steg 18. Annars fortsätter du med steg 15.
15. Skapa detektorer och markörer enligt följande. Klicka på "New Detector" (Ny detektor) (figur 14).



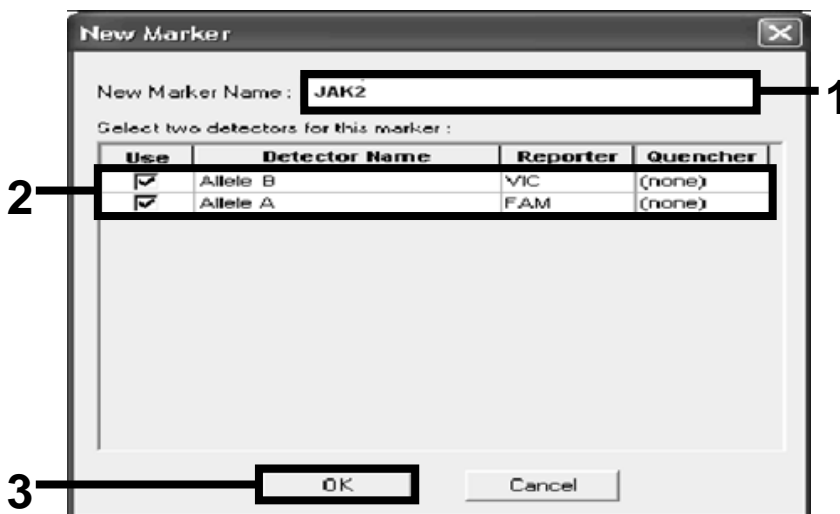
Figur 14. Panelen "Markers in Document" (markörer i dokument) innehåller inte en lämplig markör för din tillämpning.

16. Skriv *Allele A* i fältet "Name" (Namn) i dialogrutan "New Detector" (Ny detektor) (figur 15). Lämna "Reporter Dye" (Rapportörfärg) på "FAM" (FAM). Klicka på knappen "Color" (Färg), välj en färg och klicka på "OK" (OK) (bild 15). Klicka på "Create another" (Skapa en till) (figur 15).



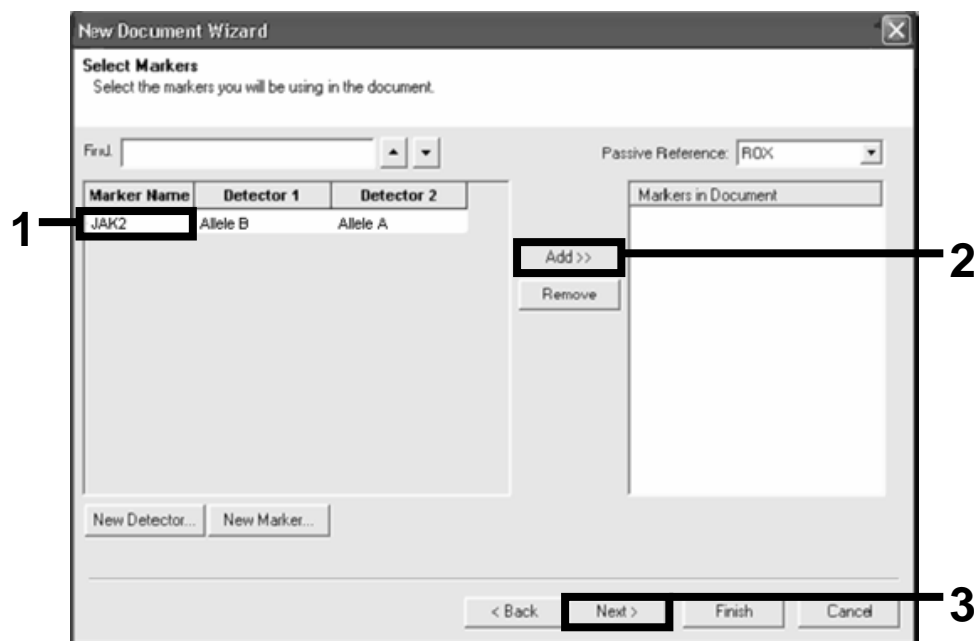
Figur 15. Skapar detektorer.

17. Skriv *Allele B* i fältet "Name" (namn) i dialogrutan "New Detector" (ny detektor). Välj "VIC" (VIC) i fältet "Reporter Dye" (rapportörfärg). Klicka på knappen "Color" (färg), välj en färg och klicka på "OK" (OK).
18. Klicka på "New Marker" (ny markör) i dialogrutan "Select Markers" (välj markörer) (se figur 14).
19. Skriv *JAK2* i fältet "Name" (namn) i dialogrutan "New Marker" (ny markör) (figur 16). Välj detektorerna "Allele A" (Allele A) och "Allele B" (Allele B) som du skapade i steg 16 och 17 (eller som redan har definierats) och klicka på "OK" (OK) (figur 16).



Figur 16. Skapa markörer.

20. I dialogrutan "Select Markers" (välj markörer) väljer du "JAK2" (JAK2) som du skapade tidigare eller en lämplig fördefinierad markör. Klicka sedan på "Add>>" (Lägg till) (figur 17).
Obs! Välj en markör och klicka på "Remove" (Ta bort) för att ta bort den.

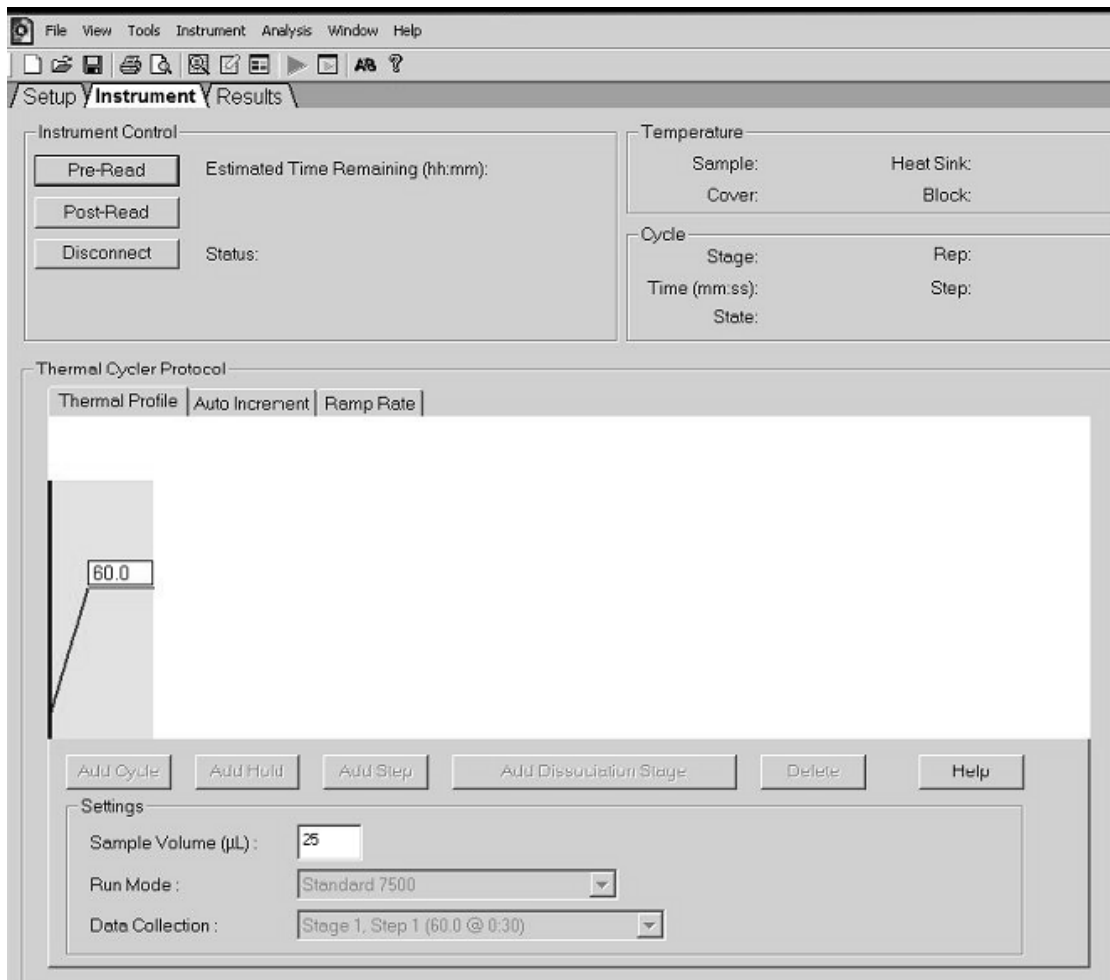


Figur 17. Välja markörer.

21. Klicka på "Next>" (Nästa>).
22. Klicka och dra markören i dialogrutan "Setup Sample Plate" (konfigurera provplattan) för att välja markören för brunnarna som innehåller prov. Klicka på "Finish" (slutför).
23. Klicka på fliken "Instrument" (Instrument) och ändra provvolymen till 25 µl.
24. Välj "File/Save" (Arkiv/Spara) och klicka på "Save" (Spara) för att spara namnet som du valde när du skapade plattan.
25. Ladda reaktionsplannat in i instrumentet enligt tillverkarens rekommendationer.

26. Starta körningen efter inläsningen. Klicka på "Post-Read" (efter inläsning).

Instrumentet kommer att utföra en körning på 1 cykel i 60 s vid 60 °C. Under den här körningen samlar instrumentet in FAM- och VIC-fluorescens i varje brunn (figur 18).



Figur 18. Körning efter inläsning.

27. Välj ”File/Export” (Arkiv/Exportera) och klicka på ”Results” (Resultat) för att exportera resultaten till en Excel-fil. Resultaten visas enligt figur 19.

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

Figur 19. Exempel på resultat i en Excel-fil.

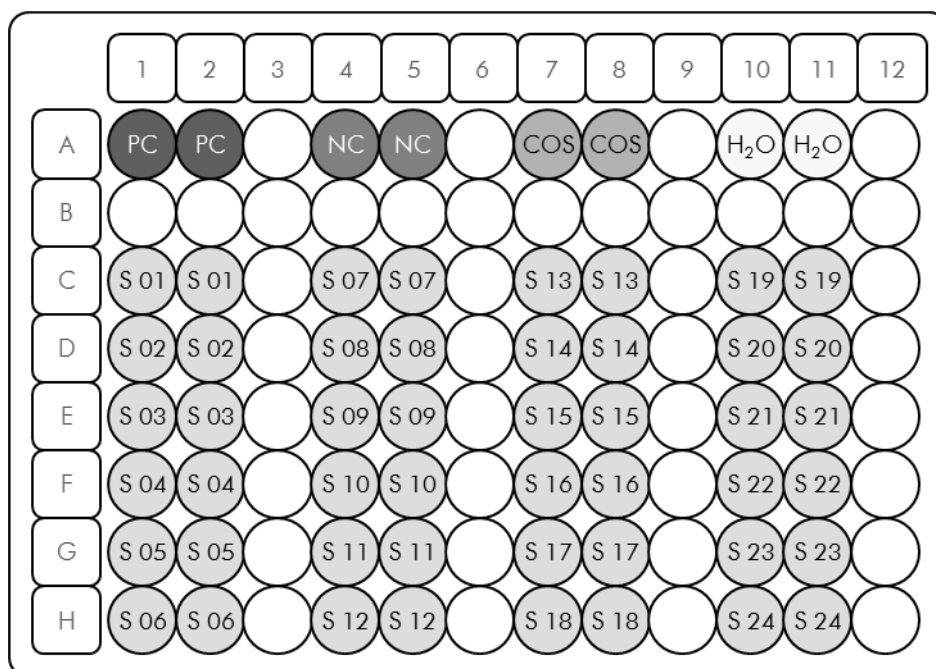
Protokoll: qPCR på LightCycler 480-instrumentet

När utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 8.

Tabell 8. Antal reaktioner för LightCycler 480-instrumentet

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F-primers och sökfragmentblandningar (PPM-JAK2)	
24 DNA-prover	24 x 2 reaktioner
3 DNA-kontroller	3 x 2 reaktioner (PC-VF, NC-VF och COS- VF, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på LightCycler 480-instrumentet



Figur 20. Förslag på plattkonfiguration för ett experiment med *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit. OC: positive control (positiv kontroll); NC: negative control (negativ kontroll); COS: cut-off sample (cut-off-prov); S: DNA sample (DNA-prov); H₂O: water control (vattenkontroll).

qPCR på LightCycler 480 -instrumentet

Obs! Utför alla steg på is.

Utförande

1. Tina alla komponenter som behövs och placera dem på is.
Komponenterna bör tas fram från frysförvaring cirka 10 minuter innan proceduren påbörjas.
2. Vortexblanda och centrifugera alla provrör kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
3. Bered följande qPCR -mixar enligt det antal prover som ska bearbetas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

I tabell 9 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig volym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

På LightCycler 480-instrument kan *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit användas för analys av 24 prover i duplikat i ett experiment (figur 20), 20 prover i duplikat i två experiment eller 15 prover i duplikat i tre experiment.

Tabell 9. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	Antal reaktioner (µl)				Slutlig koncentration
	1	56+ 1*	28+ 1 [†]	18+ 1 [‡]	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1×
Primers och probblandning, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1×
Nukleasfritt vatten (PCR-grade)	5	285	145	95	–
Prov (som ska läggas till i steg 6)	5	5 i varje	5 i varje	5 i varje	–
Total volym	25	25 i varje	25 i varje	25 i varje	–

* 24 prover, ett experiment/kit.

[†] 10 prover, två experiment/kit.

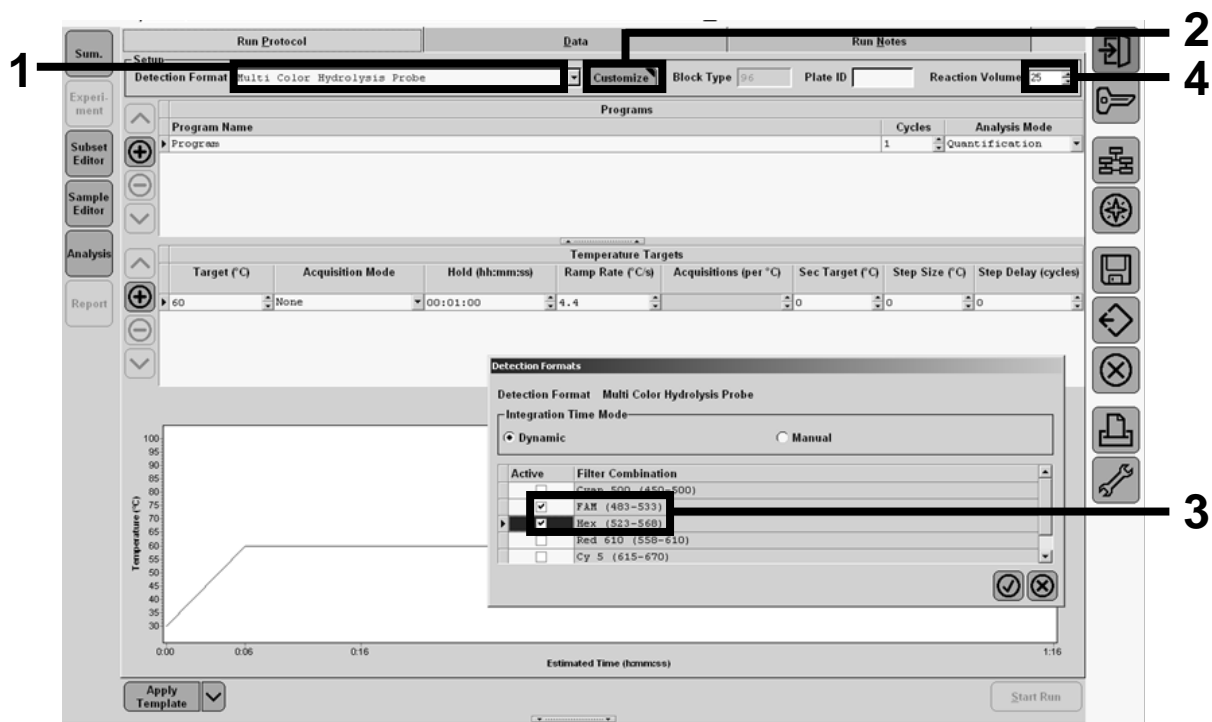
[‡] 5 prover, tre experiment/kit.

4. Vortexblanda och centrifugera alla qPCR-blandningen kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
5. Dispensera 20 µl av qPCR-pre-mixen per brunn.
6. Tillsätt 5 µl av prov-DNA eller kontroll i den motsvarande brunnen (total volym 25 µl).
7. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
8. Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 sekunder).
9. Placera plattan i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
10. Välj "New Experiment" (Nytt experiment) på startsidan.

11. För LightCycler 480 I, följ steg 11a. För LightCycler 480 II, följ steg 11b.

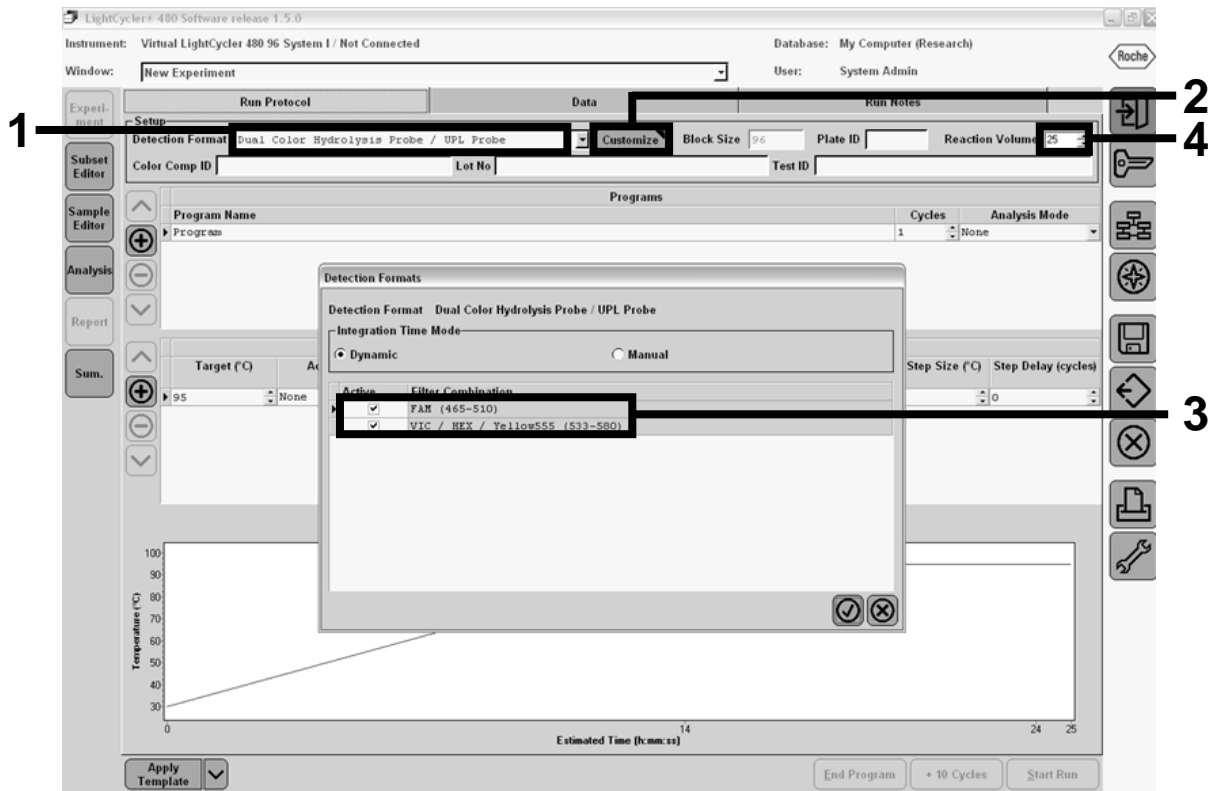
Se bruksanvisningen för LightCycler 480-instrumentet för programmeringsanvisningar. För att få en bättre översikt är programinställningarna markerade med en svart ram.

11a. LightCycler 480 I: Välj "Multi Color Hydrolysis Probe" (Hydrolyssökfragment med flera färger) och klicka på "Customize" (Anpassa). Kontrollera sedan att kanalerna "FAM (483 –533)" och "Hex (533 –568)" (d.v.s. VIC) har markerats (figur 21). Ställ in reaktionsvolymen på "25" µl (figur 21) och fortsätt med steg 12.



Figur 21. LightCycler 480 I: Ställ in detektionsformat.

11b. LightCycler 480 II: Välj ”Dual Color Hydrolysis Probe” (Hydrolyssökfragment med två färger) och klicka på ”Customize” (Anpassa). Kontrollera sedan att kanalerna ”FAM (465-510)” och ”VIC / HEX / (533-580)” (d.v.s. 533-580) har markerats (figur 22). Ställ in reaktionsvolymen på ”25” µl (figur 22) och fortsätt med steg 12.



Figur 22. LightCycler 480 II: Ställ in detektionsformat.

12. Programmera termocyklern med det termocykelprogram som anges i tabell 10 och starta körningen.

Obs! När du beskriver plattans konfiguration för instrumentet ska du välja ”Endpt Geno” (Slutpunkt genom) i avsnittet ” Step 1 : select workflow” (Steg 1: välj arbetsflöde).

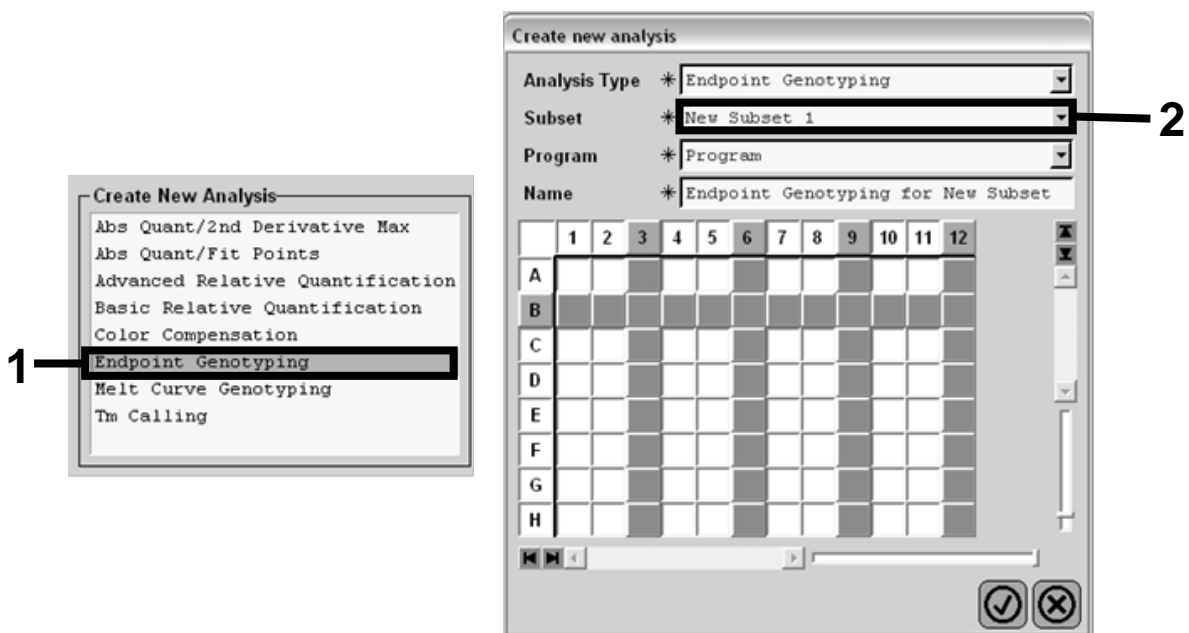
Tabell 10. Temperaturprofil för LightCycler 480-instrument

Hold (Håll)	Temperatur: 50 °C Tid: 2 min
Hold 2 (Håll 2)	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min
Cycling (Cykling)	50 gånger 92 °C i 15 s; enkel 60 °C i 1 minut, enkel
Hold 3 (Håll 3)	60 °C i 1 minut, enkel

Slutpunktsanalysprocedur för LightCycler 480-instrumentet

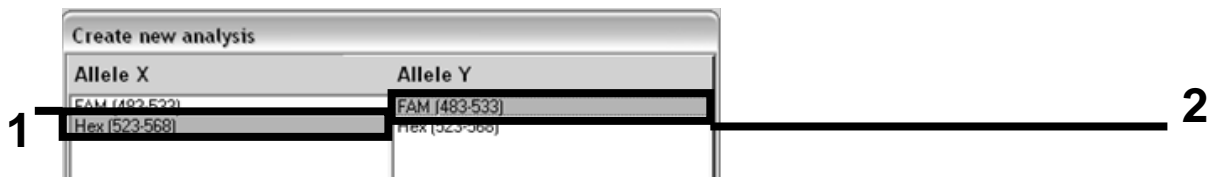
13. Klicka på ”Analysis” (Analys) när körningen har slutförts.

14. Gå till dialogrutan ”Create New Analysis” (Skapa ny analys), välj ”Endpoint Genotyping” (Slutpunktsgentypning) och ställ in undergruppen att analysera i menyn ”Subset” (Undergrupp) (figur 23).



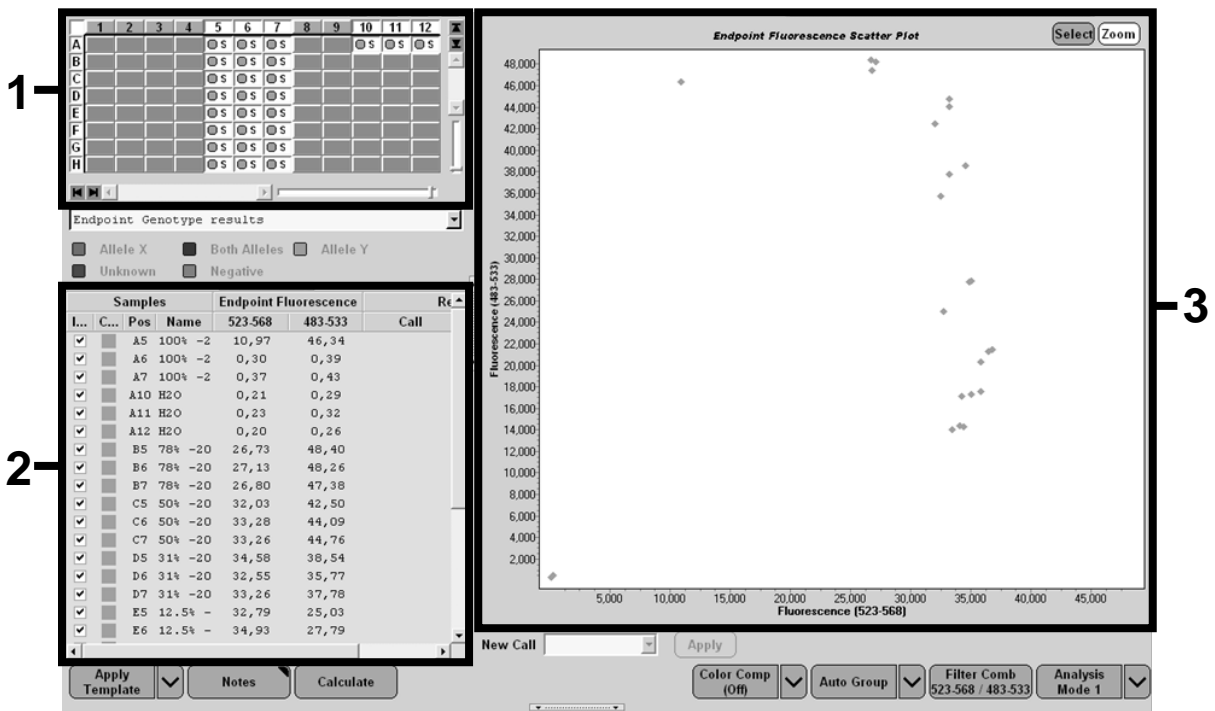
Figur 23. Välj analystyp och undergrupp som ska analyseras.

15. I nästa fönster väljer du “Hex”-fluorescens (d.v.s. VIC) för “Allele X” och “FAM”-fluorescens för “Allele Y” (figur 24).



Figur 24. Välja fluorescens för “Allele X” och “Allele Y”.

16. Nästa fönster (figur 25) visar plattans konfiguration (1, övre vänstra), fluorescensresultat för varje prov (2, nedre vänstra) och punktdiagram med allelurskiljning (3, höger, FAM- och VIC-fluorescens som har uppmätts under den 50:e PCR-cykeln).



Figur 25. Data sammanfattning.

17. Om du exporterar data högerklickar du på matten med exempelresultat. Klicka sedan på ”Export Table” (exportera tabell). Filen kommer att sparas i textformat (.txt).

18. Om du vill visa och analysera resultaten öppnar du filen i Excel. Resultaten visas enligt figur 26.

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

VIC
FAM

Figur 26. Exempel på resultat i en Excel-fil.

Protokoll: qPCR på LightCycler 2.0-instrumentet

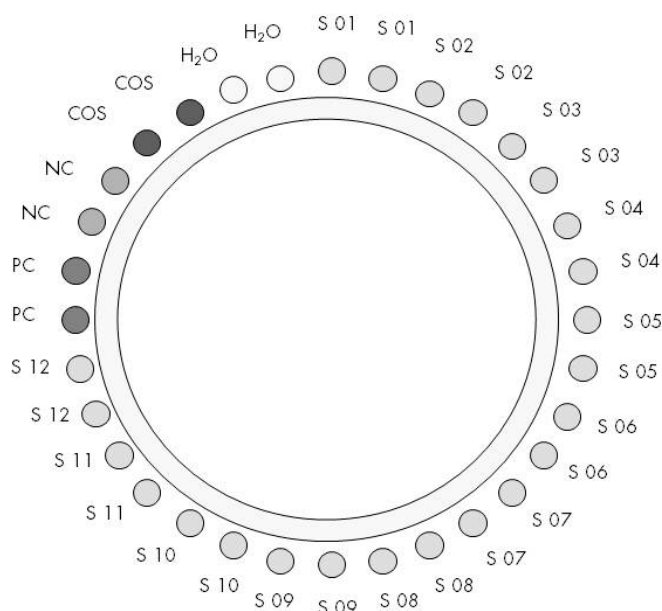
Obs! På grund av särskilda tekniska krav måste LightCycler 2.0-experiment utföras med specifika reagenser. Vi rekommenderar att Light Cycler TaqMan Master används. Följ tillverkarens anvisningar för att förbereda Master Mix, 5x.

När en 32-kapillärrotor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat så som anges i tabell 11.

Tabell 11. Antal reaktioner för LightCycler 2.0-instrumentet

Prover	Reaktioner
Med JAK2 V617F primers och sökfragmentblandning (PPM-VF) (32 reaktioner)	
12 DNA-prover	12 x 2 reaktioner
3 DNA-kontroller	3 x 2 reaktioner (PC-VF, NC-VF och COS- VF, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på LightCycler 2.0-instrumentet



Figur 27. Förslag på rotorkonfiguration för ett experiment med *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit. PC: positiv kontroll; NC: negativ kontroll; COS: cut-off-prov; S: DNA-prov; H₂O: vattenkontroll.

qPCR på LightCycler 2.0-instrumentet

Obs! Utför alla steg på is.

Utförande

1. Tina alla komponenter som behövs och placera dem på is.
Komponenterna bör tas fram från frysförvaring cirka 10 minuter innan proceduren påbörjas.
2. Vortexblanda och centrifugera alla provrör kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
3. Bered följande qPCR-mixar enligt det antal prover som ska bearbetas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

I tabell 12 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig volym på 20 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

På LightCycler 2,0-instrument kan *ipsogenJAK2* Muta *ScreenKit* användas för analys av 12 prover i duplikat i ett experiment (figur 27).

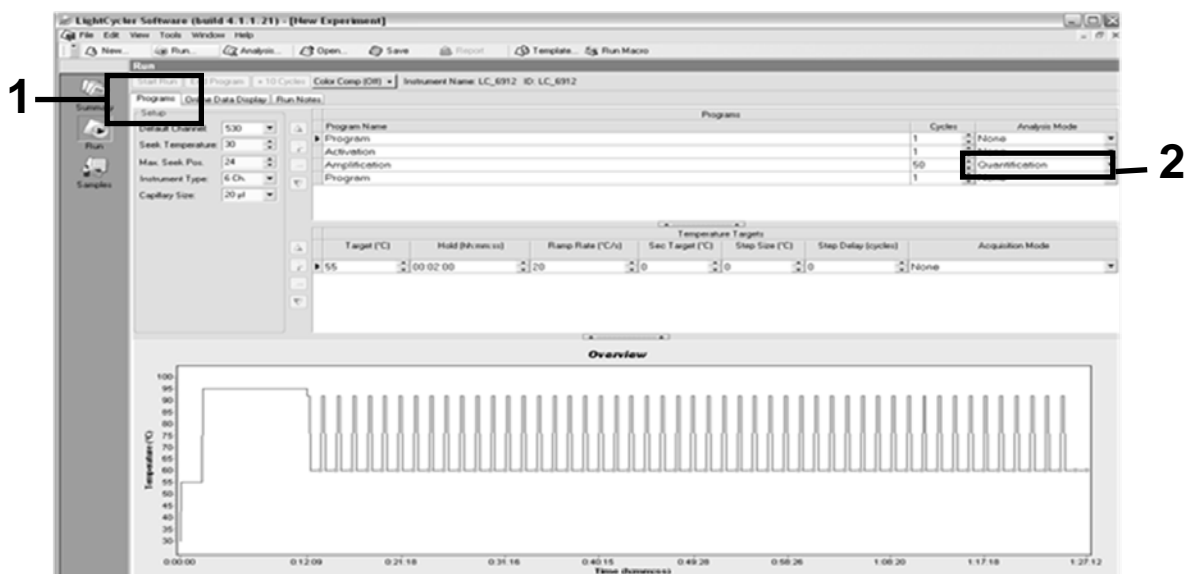
Tabell 12. Beredning av qPCR-blandning för LightCycler 2.0-instrument

Komponent	Antal reaktioner (µl)		Slutlig koncentration
	1	32+ 1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1×
Primers och probblandning, 10x	2	66	1×
Nukleasfritt vatten (PCR-grade)	9	297	–
Prov (som ska läggas till i steg 4)	5	5 i varje	–
Total volym	20	20 i varje	–

4. Vortexblanda och centrifugera alla qPCR-blandningen kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10.000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret.
5. Dispensera 15 µl av qPCR-pre-mixen per kapillär.
6. Tillsätt 5 µl av prov-DNA-material eller kontroll i det motsvarande röret (total volym 20 µl).
7. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
8. Placera kapillärerna i adaptrarna som medföljde instrumentet och centrifugera kortvarigt (700 x g, cirka 10 sekunder).
9. Ladda proverna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
10. Programmera termocykeln (figur 28) med programmet som anges i tabell 13.

Se bruksanvisningen för LightCycler 2,0-instrumentet för programmeringsanvisningar. För att få en bättre översikt är programinställningarna markerade med en svart ram.

Obs! Kontrollera att instrumentet är inställt på kvantifiering och enkel hämtning av FAM-fluorescens och enkel hämtning av VICfluorescens i såväl förstärkning- som cyklingssteget och sluttemperatur på 60 °C.



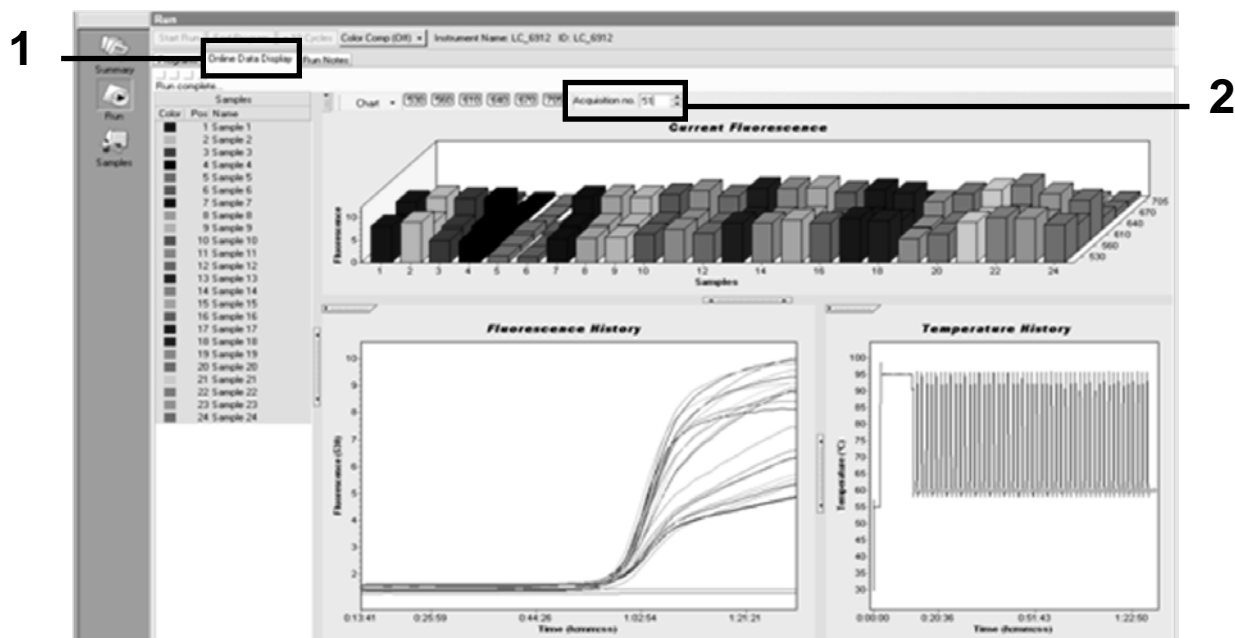
Figur 28. Programmeringsskärm för LightCycler 2.0.

Tabell 13. Temperaturprofil för LightCycler 2.0-instrument


Hold (Håll)	Temperatur: 55 °C Tid: 2 min Ramp: 20
Hold 2 (Håll 2)	Temperatur: 95 °C Tid: 10 min Ramp: 20
Cycling (Cykling)	50 gånger 92 °C i 15 sekunder; ramp: 20 60 °C i 1 minut; ramp 20
Hold 3 (Håll 3)	60 °C i 1 minut; ramp 20

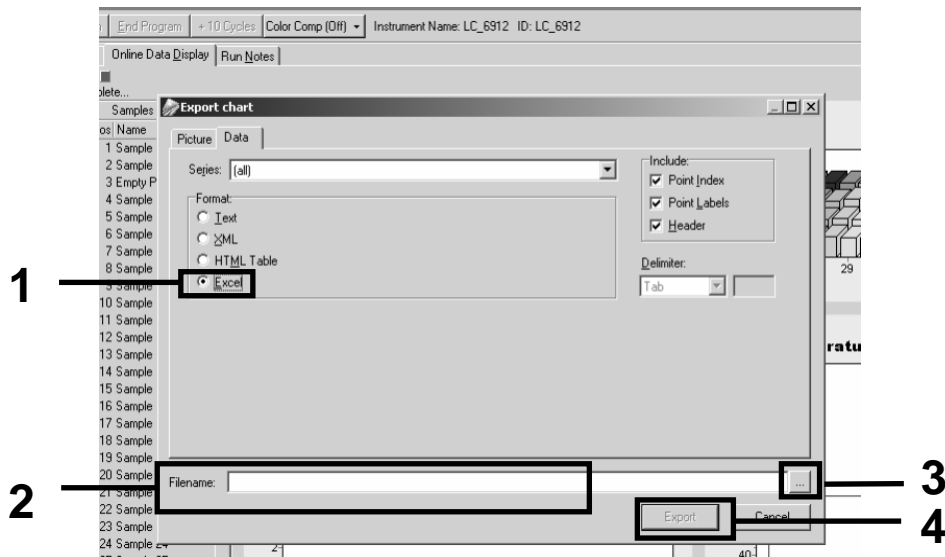
Slutpunktsanalysprocedur för LightCycler 2.0-instrumentet

- Vid förstärkningskörningens slut klickar du på fliken "Online Data Display" (Onlinedatavy) (figur 29). Öppna visningsmenyn längst upp till vänster i fönstret "Current Fluorescence" (Aktuell fluorescens) och skriv 51 i "Acquisition no." (Hämtningsnr).



Figur 29. Resultat och historik i onlinedatavy.

12. Högerklicka nära diagrammet "Current Fluorescence" (Aktuell fluorescens) och välj "Export" (Exportera).
13. Klicka på rutan "Excel" i dialogrutan "Export chart" (Exportera diagram) (figur 30). Ange ett namn i dialogrutan "Filename" (Filnamn). Följ en exportdestination för resultatfilen med knappen . Klicka på "Export" (Exportera).



Figur 30. Välj exportformat och datafilmål.

14. Om du vill visa och analysera resultaten öppnar du filen i Excel. Resultaten för LightCycler 2.0 visas enligt följande.

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

Figur 31. Exempel på LightCycler 2.0 resultat i en Excel-fil.

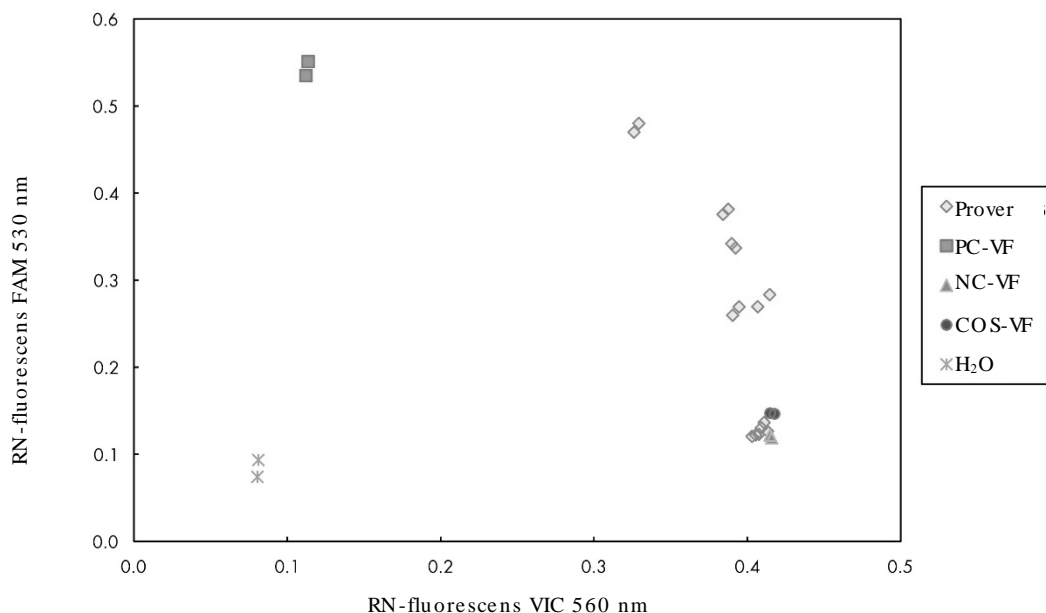
Tolkning av resultat

Hämta en fil som är lämplig för att extrahera exporterade data för alla instrument. RotorGene Q MDx 5plex HRM eller andra RotorGene-instrument, LightCycler 2.0 eller 480; Applied Biosystems 7300 eller 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS, eller 7900HT SDS och kontrollera fluorescensnivåerna (dessa måste vara konsekventa mellan dubletter).

Förbered ett diagram (punktdiagram) av fluorescensdata. X-axeln är VIC-fluorescens och y-axeln är FAM-fluorescens.

Grafisk representation och kvalitetskontrollkriterier

Ett exempel på ett punktdiagram visas i figur 32.



Figur 32. Punktdiagram över experiment med representativ allelurskiljning. Instrument: RotorGene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM och LightCycler 480.

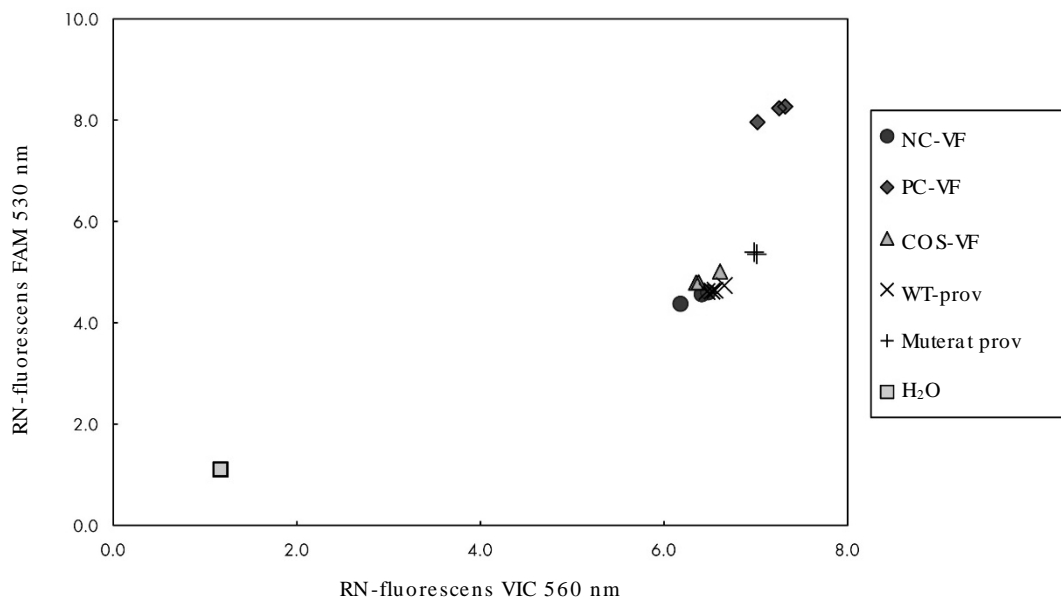
Prover bör placeras på grafen som förbinder de negativa kontrollerna (NC) och de positiva kontrollerna (PC).

Felaktig placering av en kontroll kan indikera ett experimentfel.

- Positiva kontroller bör hamna längst upp till vänster.
- Negativa kontroller bör hamna längst ner till höger.
- Felaktig placering av en negativ kontroll kan vara ett tecken på kontaminering.
- Cut-off-provet bör hamna över de negativa kontrollerna.

- Vattenkontroller bör hamna längst ner till vänster.
- Felaktig placering av en vattenkontroll (högre än NC för FAM-mätning eller högre än PC för VIC) kan vara ett tecken på kontaminering.

Obs! Kontrollernas placering kan vara annorlunda vid analys av data från LightCycler 2.0-instrumentet (se figur 33). Vattenkontroller bör fortfarande hamna längst ner till vänster.



Figur 33. Punktdiagram över experiment med representativ allelskiljning. Instrument LightCycler 2.0.

Beräkning av normaliserad FAM-/VIC-kvot och genotyp

Beräkna FAM-/VIC-kvoter för alla prover. Beräkna FAM-/VIC-kvoter för den positiva kontrollen (PC), cut-off-provet (COS) och den negativa kontrollen (NC). Kvoterna måste vara konsekventa mellan duplikat. Beräkna genomsnittskvot för samtliga duplikat.

Beräkna normaliserad kvot (NRatio) för cut-off-provet (COS) och för alla prover:

$$NRatio_{Prov} = \frac{Ratio_{Prov}}{Ratio_{NC}}$$

Obs! Gråzonen (gray zone, GZ) för ett test definieras som ett område med värden där urskiljningen inte är tillräckligt exakt. Ett värde i gråzonen indikerar att målmarkören inte kan beräknas som närvarande eller frånvarande.

Gråzonen måste beräknas för varje experiment.

Beräkna gråzonen, eller osäkerhetsområdet, baserat på den normaliserade kvoten för COS ($NRatio_{COS}$):

$$GZ: [(NRatio_{COS} \times 0,94); (NRatio_{COS} \times 1,06)]$$

Jämför den normaliserade kvoten för varje prov med $NRatio_{COS}$ GZ. Tolkning av resultat visas i tabell 14 med ett exempel på databeräkning och tolkning i tabell 15.

Tabell 14. Tolkning av genotypresultat med normaliserade kvoter

Resultat	Tolkning
$NRatio_{Prov} > NRatio_{COS} \times 1.06$	JAK2 V617F har påträffats
$NRatio_{Prov} < NRatio_{COS} \times 0.94$	JAK2 V617F har inte påträffat
$NRatio_{Prov}$ inom $NRatio_{COS}$ GZ	Resultatet är ofullständigt

Tabell 15. Ett exempel på beräkning och tolkning av fluorescentdata

Prov	VIC	FAM	Kvot	Genomsnittskvot	Nratio	Tolkning
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutation inte detekterad
NC	2,46	1,861	0,757			
Persondator	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Mutation detekterad
Persondator	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Cut-off-prov
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutation inte detekterad
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Mutation detekterad
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	O fullständigt resultat
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	O fullständigt resultat
S 4	2,322	2,191	0,944			
GZ	1,205	1,359				

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet från QIAGENs tekniska service gärna på frågor om antingen informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se "Kontaktinformation", sida 58).

Kommentarer och förslag

Positiva kontroller, negativ signal

- | | |
|---|---|
| a) Pipetteringsfel | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.

Upprepa PCR-körningen. |
| b) Felaktig förvaring av kitkomponenter | Förvara <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>ScreenKit</i> vid -30 till -15°C och skydda primers och sökfragmentblandningar (primers and probes mix, PPM) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagenser", sidan 10.

Undvik att tina och frysa upprepade gånger.

Alikvotera reagenser för förvaring. |

Negativa kontroller är positiva

- | | |
|-------------------|---|
| Korskontamination | Byt ut alla kritiska reagenser.

Upprepa experimentet med nya portioner av alla reagenser.

Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratorised för att undvika överföring av smitta. |
|-------------------|---|

Ingen signal, inte ens i positiva kontroller

- | | |
|---|---|
| a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.

Upprepa PCR-körningen. |
| b) Effekter av hämmare i provmaterialet, orsakat av otillräcklig rening | Upprepa beredning av DNA. |

Kommentarer och förslag

- c) LightCycler: Felaktig detektionskanal vald
Ställ in kanalinställningen på F1/F2 eller 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Ingen datainsamling är programmerad
Kontrollera cykelprogrammen.
Välj hämtningsläget "Single" (Enskild) i slutet av varje hybridiseringssegment i PCR-programmet.

Ingen eller låg signal i prover men positiva kontroller är utan anmärkning

Dålig DNA-kvalitet eller låg koncentration
Kontrollera alltid DNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.

LightCycler: Fluorescensintensiteten för låg

- a) Felaktig förvaring av kitkomponenter
Förvara *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* vid -30 till -15°C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPM) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagenser", sidan 10.

Undvik att tina och frysa upprepade gånger.

Alikvotera reagenser för förvaring.

- b) Mycket låg initial mängd av mål-DNA
Öka mängden prov-DNA.
Obs! Beroende på vilken metod som valts för DNA-beredning kan hämmande effekter uppstå.

LightCycler: Fluorescensintensiteten varierar

- a) Pipetteringsfel
Variabilitet som orsakas av så kallat "pipetteringsfel" kan reduceras om data analyseras i läget F1/F2 eller 530 nm/640 nm.
- b) Otillräcklig centrifugering av kapillärerna
Den beredda PCR-blandningen kan fortfarande vara kvar i kapillärens övre kärl, eller en luftbubbla kan sitta kvar i kapillärspetsen.
Centrifugera alltid kapillärer som laddats med reaktionsblandningen så som beskrivs i den specifika användarhandboken till apparaten.

- c) Utsidan på kapillärspetsen är smutsig Använd alltid handskar vid hantering av kapillärerna.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på www.qiagen.com/support/.

Begränsningar

Användarna måste vara utbildade i och förtrogna med denna teknologi innan produkten används. Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med ett validerat instrument som omnämns i ”Material som behövs men inte medföljer”, sida 8.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd. Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENs egenskapsstudier.

Var noga med att uppmärksamma de utgångsdatum som är angivna på kartongen och etiketterna för alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

Prestandaegenskaper

Icke-kliniska studier

Icke-kliniska studier har utförts för att fastställa den analytiska prestandan för *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit*.

Precision

Tre spädningsnivåer av genomiskt DNA från cellinjer med JAK2 V617F-mutation i vildtyp-DNA har testats med *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit*. Spädningarna motsvarar mutationsbelastningar på 1 %, 2 % och 3 %. Oberoende spädningsbatchar inhämtades för varje nivå och replikat av spädningarna testades i 3 oberoende experiment. Kvoter som inhämtades för varje DBA-prov (Ratio_{Prov}) jämfördes med kvoten för negativ kontroll (JAK2 100 % vildtyp-DNA, Ratio_{NC}). Resultaten sammanfattas i tabell 16.

Tabell 16. Precisionsdata för icke-kliniska studier

Mutationsnivå	Ratio _{Prov} > Ratio _{NC}	%CV (ratio)
1 % V617F DNA	100 % (n = 183)	6,8
2 % V617F DNA	100 % (n = 72)	4,5
3 % V617F DNA	100 % (n = 135)	5,1

Analysdata mellan laboratorier

En studie över flera anläggningar utfördes med 13 laboratorier. Analytiska data har inhämtats för spädnings med genomiskt DNA med JAK2 V617F-mutationer i vildtyp-DNA. Tre experiment har utförts i varje laboratorium. För varje experiment har följande DNA-prover testats från cellinjer:

- 1 negativ kontroll (NC) 0 % V617F
- 1 positiv kontroll (PC) 100 % V617F
- 1 cut-off-prov (COS) 2 % V617F
- 3 prover med mellanliggande mutationsbelastningar (20 %, 50 % och 80 %)

Experimenten har utförts på sju olika instrumentmodeller:

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

Resultaten sammanfattas i tabell 17.

Tabell 17. Analysdata mellan laboratorier som inhämtats från spädningar av genomiskt DNA från cellinjer med JAK2 V617F-mutationen i vildtyp-DNA

Provdetektion	Positiva prov	Negativa prover
JAK2 V617F	177*	0
JAK2-vildtyp	0	36

*Positiva prover inklusive 36 positiva kontroller (PC-VF), 36 cut-off-prover (COS-VF; 2 % V617F), 34 prover med 20 % JAK2 V617F, 35 prover med 50 % JAK2 V617F och 36 prover med 80 % JAK2 V617F.

Kliniska studier

Jämförelse mellan metoderna *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och ARMS®

DNA-prover från 141 patienter med misstänkt MPN har testats parallellt med *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och en qPCR-assay baserat på ARMS-principen (Amplification Refractory Mutation System) (11). Resultaten för jämförelsen visas i tabell 18 (2x3 kontingenstabell) och tabell 19 (procentöverensstämmelse).

Tabell 18. Jämförelse mellan metoder: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och ARMS

		Resultat från testmetoden ARMS		
		JAK2 V617F >2 %	JAK2-vildtyp (JAK2 V617F <2 %)	Totalsumma
Resultat från testmetoden <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i>	JAK2 V617F Mutation har påträffats	91	0	91
	Ofullständigt resultat	1	2	3
	JAK2 WT Mutation har inte detekterats	1	46	47
Totalsumma		93	48	n = 141

Tabell 19. Jämförelse mellan metoder: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och ARMS

	Överensstämmelse (%)	95 % KI* (%)
Positiva data		
Överensstämmelse mellan <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit och ARMS	98,9	94,1–99,8
Negativa data		
Överensstämmelse mellan <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit och ARMS	100	92,3–100
Total överensstämmelse	99,3	96,0–99,9

* Konfidensintervallen beräknades enligt CLSI EP12A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Användarprotokoll för utvärdering av kvalitativ testprestanda, godkänd riktlinje).

Jämförelse mellan metoderna *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och sekvensering

DNA-prover från 51 patienter med misstänkt MPN har testats parallellt med *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit och referenstekniken direktsekvensering (guldstandard). Ett prov kunde inte tolkas på grund av sekvenseringsfel. Resultaten för jämförelsen från 50 tolkningsbara prover visas i tabell 20 (2x3 kontingenstabell) och tabell 21 (procentöverensstämmelse).

Tabell 20. Jämförelse mellan metoder: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och sekvensering

		Resultat från direktsekvensering		
		JAK2 V617F >2 %	JAK2-vildtyp (JAK2 V617F <2 %)	Totalsumma
Resultat från testmetoden <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i>	JAK2 V617F Mutation har påträffats	26	1	27
	Ofullständigt resultat	0	1	1
	JAK2 WT Mutation har inte detekterats	2	20	22
Totalsumma		28	22	n = 50

Tabell 21. Jämförelse mellan metoder: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och sekvensering

	Överensstämmelse (%)	95 % KI* (%)
Positiva data Överensstämmelse mellan <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit och sekvensering	92,9	77,4–98,0
Negativa data Överensstämmelse mellan <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit och sekvensering	95,2	77,3–99,2
Total överensstämmelse	93,9	83,5–97,9

* Konfidensintervallen beräknades enligt CLSI EP12A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Användarprotokoll för utvärdering av kvalitativ testprestanda, godkänd riktlinje).

Multicenterstudie med 228 patientprover

DNA-prover från patienter analyserades med lokala tekniker på 13 laboratorier i en laboratorieöverskridande studie. 3 experiment utfördes i varje laboratorium med DNA från cellinjer enligt beskrivningen för icke-klinisk precisionsdata (se ovan) och med DNA från 10 patienter som fanns tillgängliga i laboratoriet.

De 228 proverna med en känd JAK2-genotyp testades parallellt med *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* och med den lokala metoden, inklusive kvalitativ PCR, allelspecifik PCR, FRET (fluorescens energy resonance transfer), sekvensering, allelspecifik oligonukleotid-PCR, RFLP och allelskiljning. Resultaten för jämförelsen visas i tabell 22 (2x3 kontingenstabell) och tabell 23 (procentöverensstämmelse).

Tabell 22. Jämförelse mellan metoder: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen Kit* och lokala metoder

		Resultat från lokala metoder		
		Mutation detekterad JAK2 V617F	Mutation har inte detekterats, JAK2-vildtyp	Totalsumma
Resultat från testmetoden <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i>	JAK2 V617F Mutation har påträffats	139	3	142
	Ofullständigt resultat	5	17	22
	JAK2- WT Ingen mutation detekterad	3	61	64
Totalsumma		147	81	n = 228

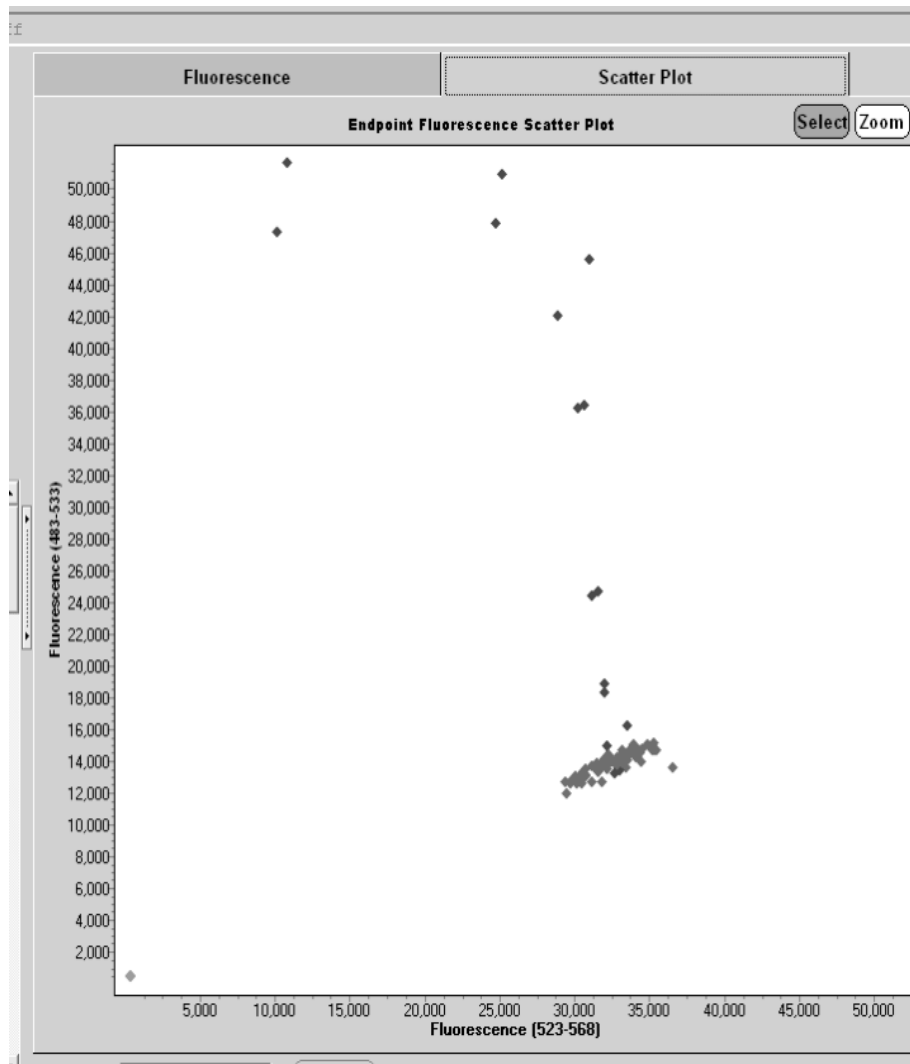
Tabell 23. Jämförelse mellan metoder: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit och lokala metoder

	Överensstämmelse (%)	95 % KI* (%)
Positiva data Överensstämmelse mellan <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit och lokala metoder	97,9	94,0–99,3
Negativa data Överensstämmelse mellan <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit och lokala metoder	95,3	87,1–98,4
Total överensstämmelse	97,1	93,8–98,7

* Konfidensintervallen beräknades enligt CLSEP12A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Användarprotokoll för utvärdering av kvalitativ testprestanda, godkänd riktlinje).

Motståndskraft: test av prover från friska blodgivare

DNA-prover från 103 friska blodgivare analyserades med *ipsogen* JAK2 Muta *Screen*RS Kit. Alla prover detekterades som JAK2 wildtyp. Analysen av 38 prover med LightCycler 480-instrumentet visas i figur 34.













Figur 34. Analys av friska blodgivare. LightCycler 480-analys av 38 friska blodgivare (◆) med *ipsogenJAK2 Muta ScreenRS* Kit (katalognr 673123). Positiva resultat i duplikat (◆) motsvarar referensskalan som medföljer kitet. VIC-fluorescensvärden markeras på x-axeln och FAM-värden markeras på y-axeln.

Referenser

1. Ma, W. et al. (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diagn.* 11, 49.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144.
3. Levine, R.L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779.
5. Baxter, E.J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 36, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 290, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 113, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 29, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 108, 1865.

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

 Σ < N >	Innehåller tillräckligt med reagenser för < N > reaktioner
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	GS-artikelnummer
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Läs bruksanvisningen innan användning

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreenKit (10)	För 10 reaktioner: V617F positiv kontroll, V617F negativ kontroll, V617F cut-off-prov, primers och sökfragmentblandning, JAK2-vildtyp och JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreenKit (24)	För 24 reaktioner: V617F positiv kontroll, V617F negativ kontroll, V617F cut-off-prov, primers och sökfragmentblandning, JAK2-vildtyp och JAK2 V617F	673023
Rotor-Gene Q MDx – för IVD -validerad realtids -PCR-analys i kliniska tillämpningar		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	RealtidsPCRcykler och HRM analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCRcykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN Kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala återförsäljare.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här produkten är avsedd för in vitro-diagnostisk användning. *ipsogen*-produkter får inte säljas vidare, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan föregående skriftligt medgivande från QIAGEN.

Informationen i detta dokument kan ändras utan föregående meddelande. QIAGEN ansvarar inte för eventuella fel i detta dokument. Det här dokumentet förväntas vara fullständigt och korrekt vid tidpunkten för publicering. Under inga omständigheter ska QIAGEN hållas ansvarigt för oavsiktliga, särskilda, multipla eller påföljande skador som uppstår i samband med eller genom användning av det här dokumentet.

ipsogen-produkter uppfyller garanterat sina angivna specifikationer. QIAGENs enda skyldighet och kundens enda rättighet är begränsad till ersättande av produkter kostnadsfritt om produkterna inte fungerar som utlovat.

Den här produkten säljs enligt ett licensavtal med Epoch Biosciences och endast för in vitro-diagnostik. Den får inte användas för annan akademisk, kommersiell eller klinisk forskning, eller på annat sätt som faller utanför in vitro-diagnostik.

JAK2 V617F-mutationen och användningen därav skyddas av patenträttigheter, inklusive europeiska patent EP1692281, amerikanska patent 7,429,456 och 7,781,199, amerikanska patentansökningar US20090162849 och US20120066776 och utländska motparter.

Köpet av den här produkten medför inga rättigheter till användning vid kliniska prövningar för läkemedel som är riktade mot JAK V617F. QIAGEN utvecklar specifika licensprogram för sådana användningsområden. Kontakta gärna vår juridiska avdelning på jak2licenses@qiagen.com.

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

Begränsat licensavtal

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* godkänner följande villkor:

1. *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* får endast användas i enlighet med handboken till *ipsogen* JAK2 Muta *Screen Kit* och endast med de komponenter som finns i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i handboken till *ipsogen* JAK2 Muta *Screen Kit* och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckligen eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

HB-1371-003 © 2013-2016 QIAGEN, med ensamrätt.

www.qiagen.com

