


August 2016

# Príručka k *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 MutaQuant<sup>®</sup> Kit

 12 (kat. č. 673522)

 24 (kat. č. 673523)

Verzia 1

IVD

Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s prístrojmi Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System a LightCycler<sup>®</sup>

CE

REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R3

MAT

1072501SK



Sample & Assay Technologies

## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

### **QIAGEN stanovuje normy v:**

- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a testov

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na stránke **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Obsah

<b>Účel použitia</b>	<b>4</b>
<b>Súhrn a vysvetlenie</b>	<b>4</b>
<b>Princíp postupu</b>	<b>6</b>
<b>Dodávané materiály</b>	<b>9</b>
Obsah súpravy	9
<b>Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú</b>	<b>10</b>
<b>Varovania a preventívne opatrenia</b>	<b>11</b>
Všeobecné bezpečnostné opatrenia	11
<b>Skladovanie a manipulácia s reagensiami</b>	<b>12</b>
<b>Postup</b>	<b>13</b>
Príprava vzorky DNA	13
Protokol: qPCR na prístrojoch Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor-Gene Q 5plex HRM so 72-skúmvkovým rotorom	14
Protokol: qPCR na prístroji ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480	18
Protokol: qPCR na prístroji LightCycler 1.2	24
<b>Interpretácia výsledkov</b>	<b>28</b>
Sprievodca riešením problémov	32
<b>Kontrola kvality</b>	<b>36</b>
<b>Obmedzenia</b>	<b>36</b>
<b>Charakteristiky účinnosti</b>	<b>37</b>
Neklinické štúdie	37
Klinické štúdie	38
<b>Referenčná literatúra</b>	<b>40</b>
<b>Symboly</b>	<b>41</b>
<b>Kontaktné informácie</b>	<b>41</b>
<b>Informácie o objednávaní</b>	<b>42</b>

## Účel použitia

Súprava *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* je kvantitatívny test in vitro určený na detekciu a kvantifikáciu alely JAK2 V617F/G1849T v genómovej DNA extrahovanej z periférnej krvi subjektov s podozrením na myeloproliferatívnu neoplazmu (myeloproliferative neoplasm, MPN).

Neprítomnosť mutácie JAK2 V617F/G1849T nevylučuje prítomnosť iných mutácií JAK2. Test môže hlásiť falošne negatívne výsledky v prípade ďalších mutácií lokalizovaných v nukleotidoch 88504 až 88622 (1).

**Poznámka:** Súprava by sa mala používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s validovanými reagensiami a nástrojmi. Používanie tohto produktu spôsobom, ktorý nie je v súlade s príručkou, a/alebo modifikácia komponentov ruší zodpovednosť spoločnosti QIAGEN.

## Súhrn a vysvetlenie

V roku 2005 bola identifikovaná recidivujúca somatická mutácia V617F, ktorá ovplyvňuje gén Janus tyrozínkinázy 2 (JAK2) (2-5), čo vedie k významnému prielomu v chápaní, klasifikácii a diagnostike myeloproliferatívnych novotvarov (myeloproliferative neoplasm, MPN). JAK2 je kritická intracelulárna signalizačná molekula pre množstvo cytokínov, vrátane erytropoetínu.

Mutácia JAK2 V617F bola zistená u >95 % pacientov s polycytémiou vera (polycythemia vera, PV), 50 – 60% pacientov s esenciálnou trombocytémiou (essential thrombocythemia, ET) a 50 % pacientov s primárnou myelofibrózou (primary myelofibrosis, PMF). JAK2 V617F bol zistený aj v zriedkavých prípadoch chronickej myelomonocytovej leukémie, myelodysplastického syndrómu, systémovej mastocytózy a chronickej neutrofilnej leukémie, ale v 0 % CML (6).

Mutácia zodpovedá jednonukleotidovej zmene JAK2 nukleotidu 1849 v exóne 14, čo vedie k jedinečnej substitúcii valínu (V) na fenylalanín (F) v pozícii 617 proteínu (doména JH2). Vedie ku konštitutívnej aktivácii JAK2, hematopoetickej transformácii in vitro a rastu erytroidných kolónií nezávislých od erytropoetínu (EHS) u všetkých pacientov s PV a veľkého podielu pacientov s ET a PMF (7). JAK2 V617F predstavuje kľúčovú hnaciu silu pri transformácii hematopoetických buniek v MPN, ale presné patologické mechanizmy vedúce pri rovnakej jedinečnej mutácii k takým rôznym klinickým a biologickým entitám je potrebné aj naďalej úplne objasniť.

Diagnóza MPN sa tradične zakladala na klinických kritériách, histológii kostnej drene a cytogenetických kritériách. Objavenie molekulárneho markera špecifického pre dané ochorenie malo za následok zjednodušenie postupu a zvýšenie diagnostickej presnosti. Detekcia mutácie JAK2 V617F je teraz súčasťou referenčných kritérií WHO 2008 na diagnostiku BCR-ABL negatívnych MPN (Tabuľka 1) a prítomnosť tejto mutácie je hlavným kritériom diagnostického potvrdenia.

**Tabuľka 1. Kritériá WHO pre diagnostiku MPN (upravené z referencie 8)**

<b>Kritériá pre diagnostiku polycytémie vera (polycythemia vera, PV)</b>	
Hlavné	1. Hemoglobín (Hgb) > 18,5 g.dl <sup>-1</sup> (muži) alebo > 16,5 g.dl <sup>-1</sup> (ženy) alebo Hgb alebo hematokrit (hematocrit, Hct) > 99. percentil referenčného rozsahu pre vek, pohlavie alebo nadmorskú výšku pobytu alebo Hgb > 17 g.dl <sup>-1</sup> (muži) alebo > 15 g.dl <sup>-1</sup> (ženy) ak je spojené s trvalým zvyšovaním ≥ 2 g.dl <sup>-1</sup> od základných údajov, čo nemožno pripísať korekcii nedostatku železa alebo Zvýšená hmotnosť červených krviniek >25 % nad priemernou normálnou predpokladanou hodnotou 2. Prítomnosť <i>JAK2V617F</i> alebo podobnej mutácie
Drobné	1. Trilineárna myeloproliferácia kostnej drene 2. Podnormálna hladina erytropoetínu v sére 3. Rast endogénnych erytroidných kolónií (Endogenous Erythroid Colony, EEC)
<b>Kritériá pre diagnostiku esenciálnej trombocytémie (essential thrombocythemia, ET)</b>	
Hlavné	1. Počet krvných doštičiek ≥ 450 x 10 <sup>9</sup> l <sup>-1</sup> 2. Proliferácia megakaryocytov s veľkou a zrelou morfológiou. Žiadna alebo malá proliferácia granulocytov alebo erytroidov 3. Nie sú splnené kritériá WHO pre chronickú myeloidnú leukémiu (chronic myeloid leukemia, CML), PV, primárnu myelofibrózu (primary myelofibrosis, PMF), myelodysplastický syndróm (myelodysplastic syndrome, MDS) alebo iný myeloidný nádor. 4. Preukázanie <i>JAK2V617F</i> alebo iného klonálneho markeru alebo Žiadny dôkaz reaktívnej trombocytózy
Drobné	-
<b>Kritériá pre diagnostiku primárnej myelofibrózy (primary myelofibrosis, PMF)</b>	
Hlavné	1. Proliferácia a atypia megakaryocytov sprevádzaná fibrózou retikulínu a/alebo kolagénu alebo Pri absencii retikulínovej fibrózy musia byť zmeny megakaryocytov sprevádzané zvýšenou celularitou drene, granulocytickou proliferáciou a často zníženou erytropoézou (t. j. prefibrotickou PMF). 2. Nie sú splnené kritériá WHO pre (CML), PV, MDS alebo iný myeloidný nádor 3. Preukázanie <i>JAK2V617F</i> alebo iného klonálneho markeru alebo Žiadny dôkaz reaktívnej fibrózy kostnej drene
Drobné	1. Leukoerytoblastóza 2. Zvýšená laktátdehydrogenáza (lactate dehydrogenase, LDH) v sére 3. Anémia 4. Hmatateľná splenomegália

Medzinárodní experti nedávno navrhli kritériá pre terapeutické pokusy v PV a ET. Na základe údajov o aloimplantáte, alfa-interferóne alebo hydroxymočovine bola kvantifikácia JAK2V617F začlenená ako potenciálne užitočný nástroj na monitorovanie reakcií na liečbu (9). V klinickom vývoji v reakcii na niektoré nové lieky zamerané proti JAK2 bolo pozorované zníženie zaťaženia JAK2 V617F (10).

## Princíp postupu

Na kvantitatívne stanovenie podielu jednonukleotidových polymorfizmov (single nucleotide polymorphisms, SNP) vo vzorkách DNA bolo navrhnutých niekoľko rôznych techník. Z nich sú preferované metódy založené na kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcii (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) v reálnom čase kvôli ich vyššej citlivosti umožňujúcej dlhodobé sledovanie alelovej záťaže. Mnohé z týchto techník majú strednú citlivosť 1 – 10 %, napríklad alelická diskriminácia TaqMan<sup>®</sup>, Pyrosequencing<sup>®</sup>, test krivky rozpúšťania a priame sekvenčné usporiadanie. Niektoré z nich, ako je krivka rozpúšťania a sekvenovanie, sú iba semikvantitatívne, zatiaľ čo iné, napríklad pyrosekvenovanie, vyžadujú spracovanie po PCR alebo prístroje, ktoré nie sú ľahko dostupné alebo majú neúmerne vysoké náklady na nastavenie rutinného laboratórneho testovania. Vysoko citlivý prístup s citlivosťou < 0,1 % vyžaduje použitie špecifického priméru SNP, ktorý umožňuje selektívnu amplifikáciu mutantnej alebo alely divého typu, ktorá je ľahko detegovateľná na prístroji real-time qPCR. Na tejto technike je založená súprava *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit*.

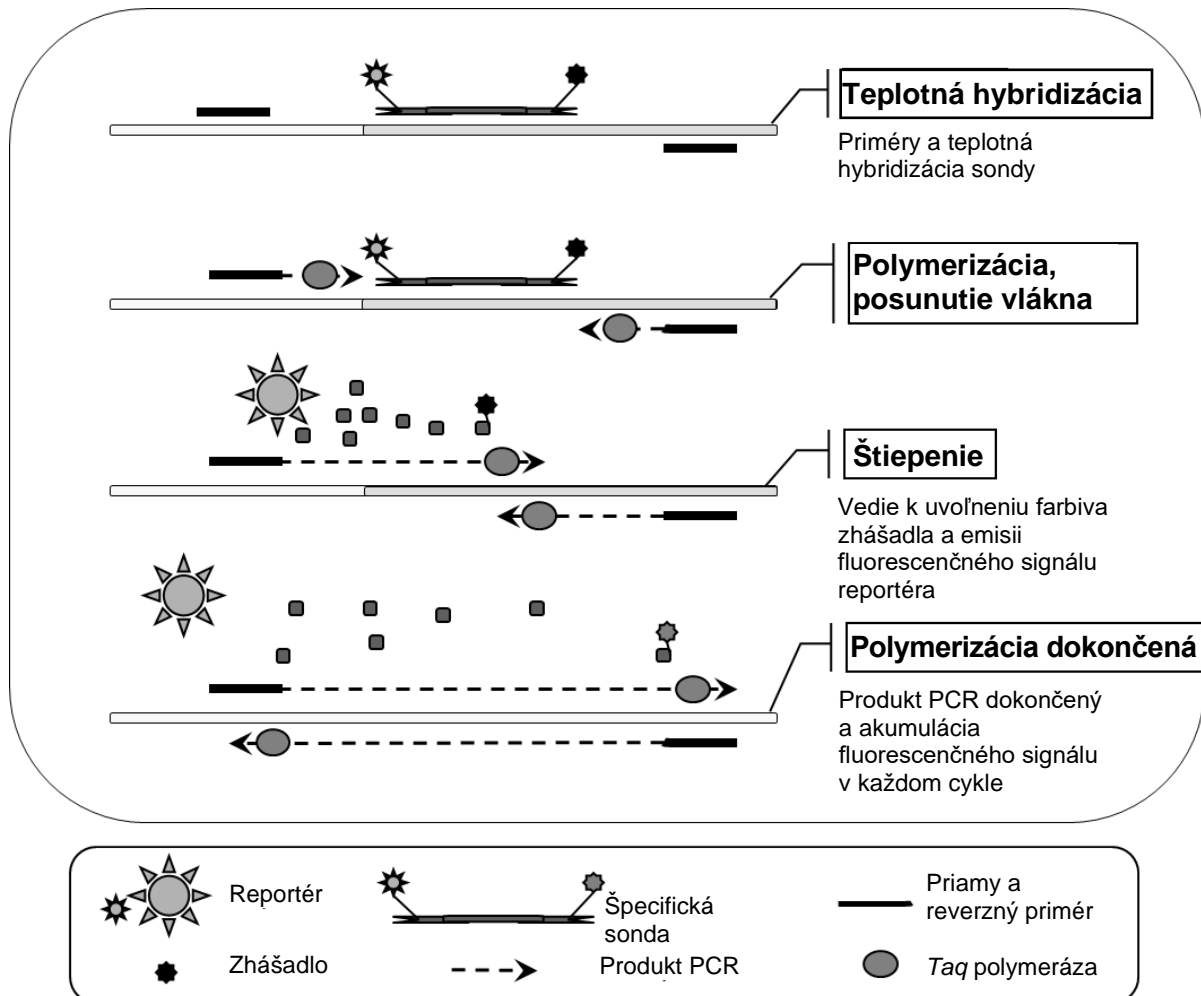
Použitie qPCR umožňuje presnú kvantifikáciu produktov PCR počas exponenciálnej fázy procesu amplifikácie PCR. Údaje kvantitatívnej PCR je možné rýchlo získať bez spracovania po PCR, a to detekciou fluorescenčných signálov v reálnom čase počas cyklovania PCR a/alebo po ňom, čím sa významne znižuje riziko kontaminácie produktu PCR. V súčasnosti sú k dispozícii 3 hlavné typy techník qPCR: analýza qPCR pomocou zeleného farbiva SYBR<sup>®</sup> Green I Dye, analýza qPCR pomocou hydrolyzačných sond a analýza qPCR pomocou hybridizačných sond.

Tento test využíva princíp hydrolýzy oligonukleotidu dvojitého farbiva qPCR. Počas PCR priame a reverzné priméry hybridizujú do špecifickej sekvencie. V rovnakej zmesi je obsiahnutý oligonukleotid dvojitého farbiva. Táto sonda, ktorá sa skladá z oligonukleotidu označeného farbivom 5' reportéra a za daným miestom farbivom 3' zhášadla, hybridizuje do cieľovej sekvencie v rámci produktu PCR. Analýza qPCR s hydrolyzačnými sondami využíva aktivitu exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Keď je sonda nedotknutá, blízkosť farbiva reportéra pri farbive zhášadla spôsobuje potlačenie fluorescence reportéra primárne prevodom energie Försterovho typu.

Ak je počas PCR prítomný cieľ záujmu, sonda špecificky hybridizuje medzi miestami priamych a reverzných primérov. Aktivita exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA štiepi sondu medzi reportéra a zhášadlo iba v prípade, keď

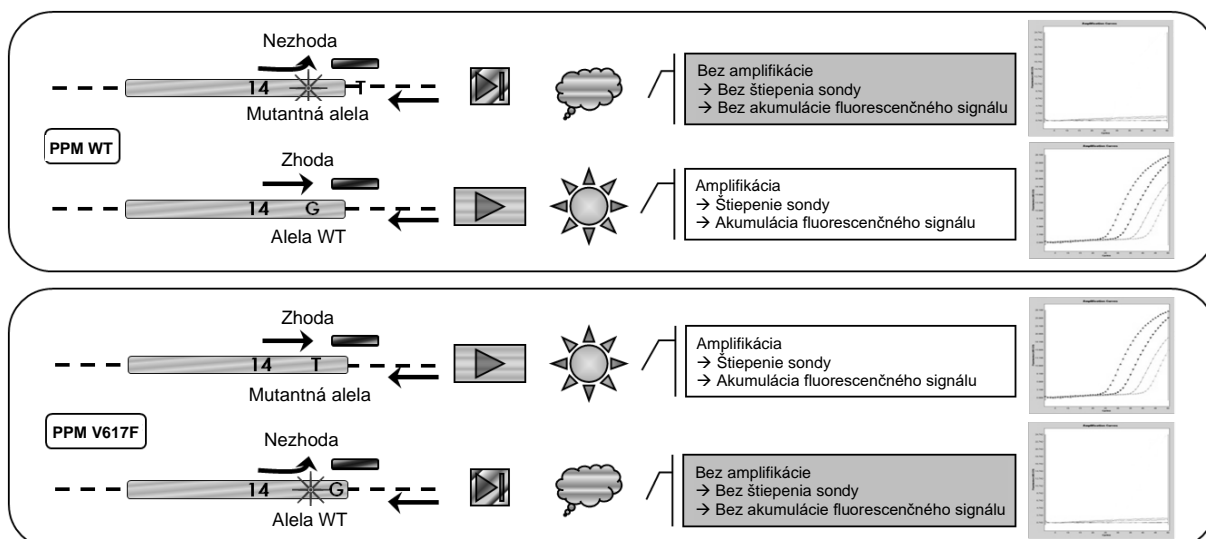
sonda hybridizuje na cieľ. Fragmenty sondy sú potom z cieľa vytlačené a polymerizácia vlákna pokračuje. Koniec sondy 3' je blokovaný, aby sa zabránilo extenzii sondy počas PCR (Obrázok 1). Tento proces nastane v každom cykle a nebude narušený exponenciálnou akumuláciou produktu.

Zvýšenie fluorescenčného signálu je detegované iba v prípade, že cieľová sekvencia bude komplementárna so sondou, a tým bude počas PCR amplifikovaná. Pre tieto požiadavky sa nedeteguje nešpecifickou amplifikáciou. Preto je zvýšenie fluorescence priamo úmerné cieľovej amplifikácii počas PCR.



**Obrázok 1. Princíp reakcie.**

Kvantitatívna technológia PCR špecifická pre alely použitá v tejto testovacej súprave umožňuje citlivú, presnú a vysoko reprodukovateľnú detekciu SNP. Táto technika je založená na použití špecifických priamych primérov pre alelu divokého typu a alelu V617F (11). Iba dokonalá zhoda medzi primérom a cieľovou DNA umožňuje predĺženie a amplifikáciu v PCR (Obrázok 2).



**Obrázok 2. PCR špecifický pre alelu.** Použitie divého typu alebo zmesi primérov alebo sond V617F umožňuje špecifickú detekciu divého typu alebo mutovanej alely v dvoch samostatných reakciách vykonávaných pomocou tej istej vzorky. Výsledky môžu byť vyjadrené ako percento kópií VF z celkového počtu kópií JAK2.



## Dodávané materiály

### Obsah súpravy

<i>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit</i>		(12)	(24)
Katalógové číslo		673522	673523
Počet reakcií		12	24
V617F positive control (Pozitívna kontrola V617F) (100 % alela V617F)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (Negatívna kontrola V617F) (100 % alela divého typu)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution (Štandardné riedenie M1-VF), 50 kópií (5 x 10 <sup>1</sup> V617F kópií/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution (Štandardné riedenie M2-VF), 500 kópií (5 x 10 <sup>2</sup> V617F kópií/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution (Štandardné riedenie M3-VF), 5000 kópií (5 x 10 <sup>3</sup> V617F kópií/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution (Štandardné riedenie M4-VF), 50 000 kópií (5 x 10 <sup>4</sup> kópií V617F/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution (Štandardné riedenie WT-1), 50 kópií (5 x 10 <sup>1</sup> kópií divého typu/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution (Štandardné riedenie WT-2), 500 kópií (5 x 10 <sup>2</sup> kópií divého typu/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution (Štandardné riedenie WT-3), 5000 kópií (5 x 10 <sup>3</sup> kópií divého typu/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution (Štandardné riedenie WT-4), 50 000 kópií (5 x 10 <sup>4</sup> kópií divého typu/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT (Priméry a zmes sond JAK2 WT)*	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F (Zmes primérov a sond JAK2 V617F)†	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
<i>Príručka k ipsogen JAK2 MutaQuant Kit (angličtina)</i>		1	1

\* Zmes špecifických reverzných a priamych primérov pre kontrolný gén JAK2 divého typu plus špecifická sonda FAM<sup>TM</sup>-TAMRA<sup>TM</sup>.

† Zmes špecifických reverzných a priamych primérov pre mutáciu JAK2 V617F plus špecifická sonda FAM-TAMRA.

**Poznámka:** Pred použitím vortexujte a krátko odstred'te štandardné riedenia a zmesi primérov a sond.

## Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

### Reagencie

- Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy
- Polymeráza pufru a Taq DNA: Validované reagencie sú TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. č. 04535286001) alebo LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe<sup>®</sup> (Master Mix 5x) (Roche, kat. č. 03515567001)

### Spotrebný materiál

- Sterilné špičky PCR pipiet bez obsahu nukleáz odolné voči aerosólom s hydrofóbnymi filtrami
- 0,5 ml alebo 1,5 ml skúmavky PCR bez nukleázy
- Ľad

### Zariadenie

- Mikrolitrová pipeta\* určená na PCR (1 – 10 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl)
- Stolná odstredivka\* s rotorom pre reakčné skúmavky a mikrodoštičky s objemom 0,5 ml/1,5 ml (schopná dosiahnuť 13 000 – 14 000 ot/min)
- Prístroj na real-time PCR:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM alebo iné Rotor-Gene; LightCycler 1.2 alebo 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a súvisiaci špecifický materiál
- Biofotometer

\* Overte, či boli prístroje skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

## Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in vitro

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese

**[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

## Všeobecné bezpečnostné opatrenia

Použitie testov qPCR vyžaduje správne laboratórne postupy vrátane údržby zariadení, ktoré sú určené pre molekulárnu biológiu a sú v súlade s platnými predpismi a príslušnými normami.

Táto súprava je určená na diagnostické použitie in vitro. Reagencie a pokyny dodávané v tejto súprave boli validované pre optimálny výkon. Ďalšie riadenie reagensí alebo zmena inkubačných časov a teplôt môže viesť k chybným alebo nezhodným údajom. Ak sú reagencie PPM-WT a PPM-VF vystavené svetlu, môžu sa zmeniť. Všetky reagencie sú pripravené na špecifické použitie s týmto testom. Pre optimálny výkon testu by sa nemali robiť žiadne substitúcie.

Buďte mimoriadne opatrní, aby ste zabránili:

- Kontamináciu DNázy, ktorá by mohla spôsobiť degradáciu templátovej DNA
- Kontaminácia prenosom DNA alebo PCR vedie k falošne pozitívnemu signálu

Preto odporúčame nasledujúce.

- Pri vykonávaní testu používajte laboratórne vybavenie neobsahujúce nukleázy (napr. pipety, hroty pipiet, reakčné fľaštičky) a noste rukavice.
- Na všetky pipetovacie kroky používajte čerstvé pipetové hroty odolné voči aerosólom, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii vzoriek a reagensí.
- Pripravte predbežnú zmes PCR master s príslušným materiálom (pipety, hroty atď.) v príslušnej oblasti, kde nie sú zavedené žiadne matrice DNA (DNA, plazmid alebo produkty PCR). Šablónu pridajte do samostatnej zóny (najlepšie v samostatnej miestnosti) so špecifickým materiálom (pipety, hroty, atď.).

## Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Súpravy sa dodávajú na suchom ľade a po prijatí sa musia skladovať pri teplote  $-15^{\circ}\text{C}$  až  $-30^{\circ}\text{C}$ .

- Minimalizujte vystavenie zmesí primérov a sondy (skúmavky PPM-WT a PPM-VF) svetlu.
- Pred otvorením skúmavky jemne premiešajte a odstredíte.
- Všetky komponenty súpravy skladujte v pôvodných obaloch.

Tieto podmienky skladovania platia pre otvorené aj neotvorené komponenty. Komponenty skladované za iných podmienok, ako je uvedené na štítkoch, nemusia správne fungovať a môžu nepriaznivo ovplyvniť výsledky testu.

Dátum expirácie pre každú reagenciu je uvedený na štítkoch jednotlivých komponentov. Za správnych skladovacích podmienok si produkt zachová svoju výkonnosť až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku.

Neexistujú žiadne zjavné znaky naznačujúce nestabilitu tohto produktu. Pozitívne a negatívne kontroly by sa však mali vykonávať súčasne s neznámymi skúšobnými vzorkami.

# Postup

## Príprava vzorky DNA

Genomická DNA by sa mala získavať z plnej krvi, purifikovaných lymfocytov periférnej krvi z plnej krvi, polynukleárných buniek alebo granulocytov. Pre porovnateľné výsledky sa odporúča použiť rovnakú bunkovú frakciu a metódu extrakcie DNA. Extrakcia DNA sa môže vykonávať pomocou domácej metódy alebo komerčne dostupnej súpravy.

Množstvo DNA by sa malo určiť meraním optickej hustoty (optical density, OD) vzorky pri 260 nm a kvalita DNA sa môže určiť buď spektrofotometriou, alebo gélovou\* elektroforézou.

- Pomer  $OD_{260}/OD_{280}$  by mal byť 1,7 – 1,9 a menšie pomery, ktoré môže naznačovať kontamináciu bielkovinami alebo prítomnosť organických chemikálií.
- Elektroforetická analýza na 0,8 – 1,0 % agarózovom géli by mala umožniť vizualizáciu izolovanej DNA ako zreteľného pruhu cca 20 kb (mierne rozmazanie poskytne prijateľné výsledky).

Výsledná DNA sa bude musieť zriediť na koncentráciu 5 ng/μl v 1x TE pufrí\* pri pH 8,0 a potom skladovať pri teplote +4 až +8 °C počas 1 týždňa alebo pri teplote -20 °C, ak je potrebné dlhodobšie skladovanie.

Reakcia qPCR je optimalizovaná pre vzorky DNA obsahujúce 25 ng purifikovanej genómovej DNA.

\* Po as práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

## Protokol: qPCR na prístrojoch Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor-Gene Q 5plex HRM so 72-skúmavkovým rotorom

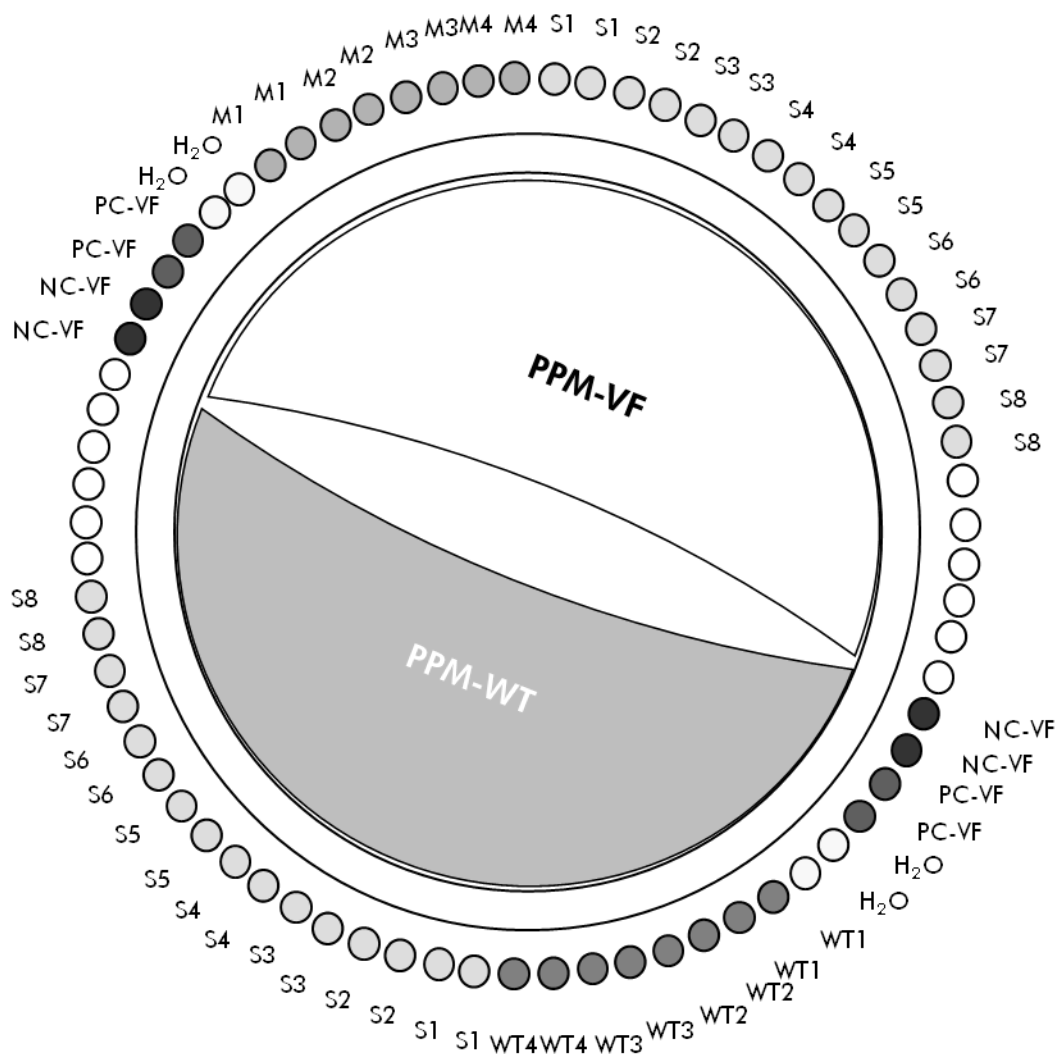
Pri použití tohto prístroja sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 2.

**Tabuľka 2. Počet reakcií pre prístroje Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom**

Vzorky	Reakcie
<b>So zmesou primérov JAK2 V617F a sond (PPM-VF)</b>	
4 štandardy M-VF	8 reakcií, každá testovaná dvakrát
n vzoriek DNA	n x 2 reakcie
2 DNA kontroly	4 reakcie: pozitívna kontrola (PC-VF) a negatívna kontrola (NC-VF), každá testovaná dvakrát
Kontrola vody	2 reakcie
<b>So zmesou primérov JAK2 divého typu a sond (PPM-WT)</b>	
4 štandardy divého typu	8 reakcií, každá testovaná dvakrát
n vzoriek DNA	n x 2 reakcie
2 DNA kontroly	4 reakcie: PC-VF a NC-VF, každý testovaný dvakrát
Kontrola vody	2 reakcie

### Spracovanie vzoriek prístrojmi Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

Odporúčame testovať najmenej osem vzoriek DNA s 24-reakčnou súpravou (kat. č. 673523) a najmenej šesť vzoriek DNA s 12-reakčnou súpravou (kat. č. 673522) v rovnakom experimente, aby sa optimalizovalo použitie štandardov a zmesi primérov a sondy.



**Obrázok 3. Navrhované nastavenie rotora pre každý experiment so súpravou *ipsogen* 24 sample JAK2 MutaQuant Kit. PC-VF:** Pozitívna kontrola V617F; **NC- VF:** Negatívna kontrola V617F; **M- VF:** Štandardy V617F; **M-WT:** štandardy divého typu; **S:** Vzorka DNA; **H<sub>2</sub>O:** kontrola vody.

**Poznámka:** Vzorku, ktorá sa má testovať, vždy umiestnite do polohy 1 rotora. Inak počas kalibračného kroku prístroj nevykoná kalibráciu a získajú sa nesprávne údaje o fluorescencii.

Vypĺňte všetky ostatné polohy prázdnyimi skúmavkami.

### qPCR na prístroje Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

**Poznámka:** Vykonajte všetky kroky na ľade.

#### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľky 3 a 4 opisujú schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi priméra a sond (PPM-VF alebo PPM-WT). Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 3. Príprava zmesi qPCR**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakcia (µl)</b>	<b>Predbežná zmes V617F, 30 + 1 reakcií (µl)</b>	<b>Konečná koncentrácia</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Zmes primérov a sond, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	201,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	–
Celkový objem	25,0	25 každá	–

**Tabuľka 4. Príprava zmesi qPCR**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakcia (µl)</b>	<b>Predbežná zmes WT, 30 + 1 reakcií (µl)</b>	<b>Konečná koncentrácia</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Zmes primérov a sond, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	201,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	–
Celkový objem	25,0	25 každá	–



3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR (VF alebo WT) na skúmavku.
4. Pridajte 5 µl materiálu, ktorý sa má kvantifikovať (25 ng vzorky genómovej DNA alebo kontroly) do zodpovedajúcej skúmavky (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Skúmavku umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
7. Naprogramujte prístroj Rotor-Gene Q a program tepelného cyklovača, ako je uvedené v Tabuľke 5.

**Tabuľka 5. Teplotný profil**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Kvantifikácia
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 50 stup. Čas: 2 min.
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95°C Čas: 10 min.
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 s 62 °C na 1 min. so získaním fluorescencie FAM v kanáli Green: Jednotlivý

8. V prípade prístrojov Rotor-Gene Q zvolte na analýzu možnosť „Slope Correct“ (Sklon správny). Odporúčame nastaviť prah na hodnotu 0,03. Program teplotného cyklovania spustite podľa Tabuľky 5.

## Protokol: qPCR na prístroji ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

Pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 6.

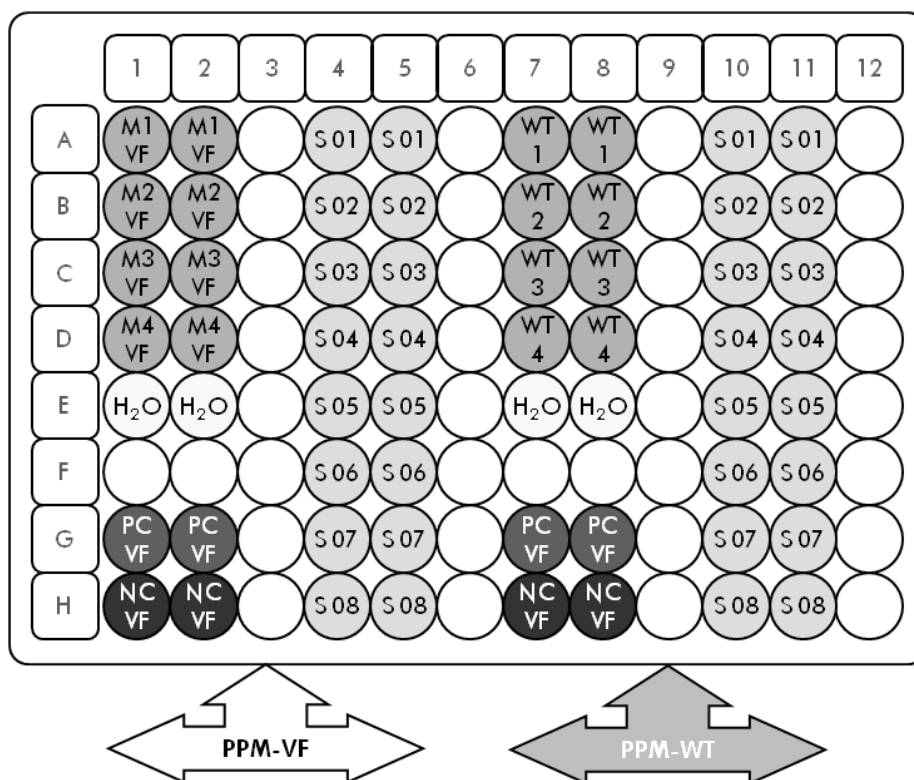
**Tabuľka 6. Počet reakcií pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami**

Vzorky	Reakcie
<b>So zmesou primérov JAK2 V617F a sond (PPM-VF)</b>	
4 štandardy M-VF	8 reakcií, každá testovaná dvakrát
n vzoriek DNA	n x 2 reakcie
2 DNA kontroly	4 reakcie: PC-VF a NC-VF, každý testovaný dvakrát
Kontrola vody	2 reakcie
<b>So zmesou primérov JAK2 divého typu a sond (PPM-WT)</b>	
4 štandardy divého typu	8 reakcií, každá testovaná dvakrát
n vzoriek DNA	n x 2 reakcie
2 DNA kontroly	4 reakcie: PC-VF a NC-VF, každý testovaný dvakrát
Kontrola vody	2 reakcie

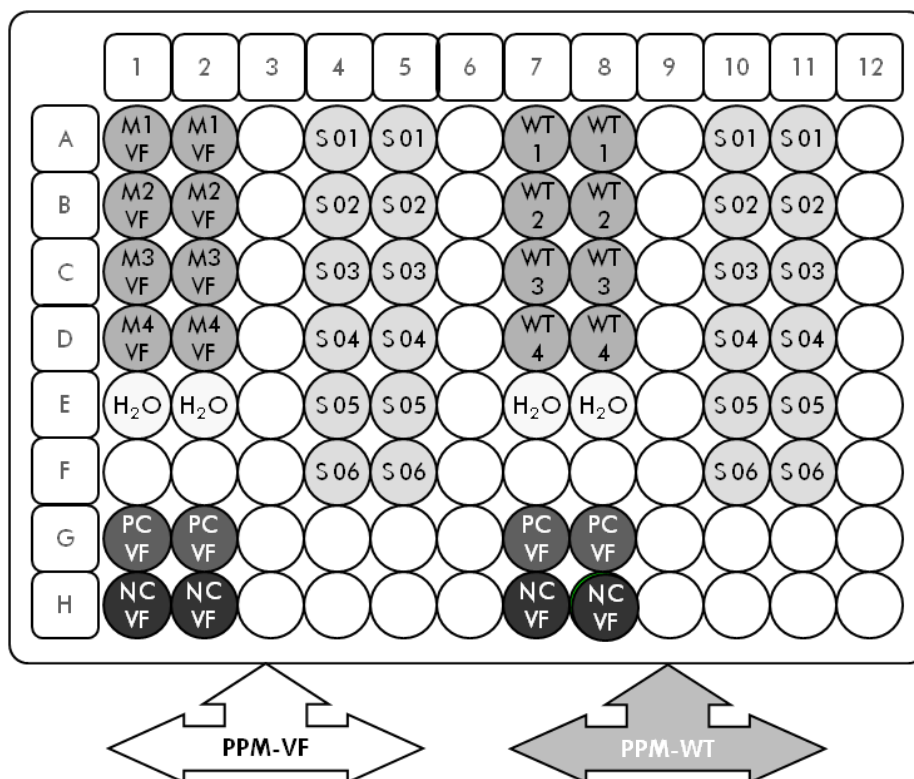
### Spracovanie vzoriek na prístroji ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

Odporúčame testovať osem vzoriek DNA s 24-reakčnou súpravou (kat. č. 673523) a najmenej šesť vzoriek DNA s 12-reakčnou súpravou (kat. č. 673522) v rovnakom experimente, aby sa optimalizovalo použitie štandardov a zmesi primérov a sond.

Schéma doštičiek na Obrázku 4 znázorňuje príklad takéhoto experimentu s použitím 24-reakčnej súpravy (kat. č. 673523) a na Obrázku 5 je uvedený príklad takéhoto experimentu s použitím 12-reakčnej súpravy (kat. č. 673522).



**Obrázok 4. Navrhované nastavenie doštičiek pre jeden experiment s použitím 24-reakčnej súpravy (kat. č. 673523).** PC-VF: Pozitívna kontrola V617F; NC- VF: Negatívna kontrola V617F; M- VF: Štandardy V617F; M-WT: štandardy divého typu; S: Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody



**Obrázok 5. Navrhované nastavenie doštičiek pre jeden experiment s použitím 12-reakčnej súpravy (kat. č. 673522).** PC-VF: Pozitívna kontrola V617F; NC- VF: Negatívna kontrola V617F; M- VF: Štandardy V617F; M-WT: štandardy divého typu; S: Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody

## qPCR na prístroji ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

**Poznámka:** Vykonajte všetky kroky na ľade.

### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľky 7 a 8 opisujú schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi priméra a sond (PPM-VF alebo PPM-WT). Zahnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 7. Príprava zmesi qPCR**

Komponent	Predbežná zmes V617F			Konečná koncentrácia
	1 reakcia (µl)	26 + 1 reakcií (µl)	30 + 1 reakcií (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Zmes primérov a sond, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	175,5	201,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25,0	25 každá	25 každá	–

**Tabuľka 8. Príprava zmesi qPCR**

Komponent	Predbežná zmes WT			Konečná koncentrácia
	1 reakcia (µl)	26 + 1 reakcií (µl)	30 + 1 reakcií (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Zmes primérov a sond, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	6,5	175,5	201,5	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	5 každá	–
Celkový objem	25,0	25 každá	25 každá	–

3. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR (VF alebo WT) na jednu jamku.
4. Pridajte 5 µl materiálu, ktorý sa má kvantifikovať (25 ng vzorky genómovej DNA alebo kontroly) do príslušnej jamky (celkový objem 25 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Zatvorte doštičku a krátko odstred'ujte (300 x g, približne 10 sekúnd).
7. Doštičku umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
8. Naprogramujte tepelný cyklovač pomocou programu tepelného cyklovania a nastavte prístroj na získanie fluorescenčnej sondy FAM s dvojitým označením, ako je uvedené v Tabuľke 9 pre prístroj ABI PRISM 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System alebo Tabuľke 10 pre prístroj LightCycler 480.

**Tabuľka 9. Teplotný profil pre prístroj ABI PRISM 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Štandardná krivka – absolútna kvantifikácia
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 50°C Čas: 2 min.
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95°C Čas: 10 min.
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 63 °C počas 1 minúty a 30 sekúnd so získaním fluorescencie FAM; zhášadlo: TAMRA

**Tabuľka 10. Teplotný profil pre prístroj LightCycler 480**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Absolútna kvantifikácia („Abs Quant“)
<b>Detection formats (Formáty detekcie)</b>	V okne Formáty detekcie vyberte možnosť „Simple Probe“ (Jednoduchá sonda)
<b>Hold (Výdrž)</b>	Teplota: 50°C Čas: 2 min.
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95°C Čas: 10 min.
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 sekúnd 63°C počas 1 minúty a 30 sekúnd so získaním fluorescencie FAM, čo zodpovedá (483 – 533 nm) pri LC verzii 01 a (465 – 510 nm) pri LC verzii 02

9. V prípade prístroja ABI PRISM 7900HT a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System postupujte podľa kroku 8a. V prípade prístroja LightCycler 480 postupujte podľa kroku 8b.
- 9a. ABI PRISM 7900HT a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Odporúčame prah nastavený na hodnotu 0,1. Spustíte program cyklovania podľa údajov v Tabuľke 9.

**9b. LightCycler 480: Odporúčame režim analýzy Fit point s pozadím nastaveným na hodnotu 2.0 a prahovou hodnotou 2.0. Program teplotného cyklovania spustite podľa Tabuľky 10.**

## Protokol: qPCR na prístroji LightCycler 1.2

Odporúčame merať vzorky dvakrát pomocou kapilárnych prístrojov a kontrolovať ich len raz, ako je uvedené v Tabuľke 11.

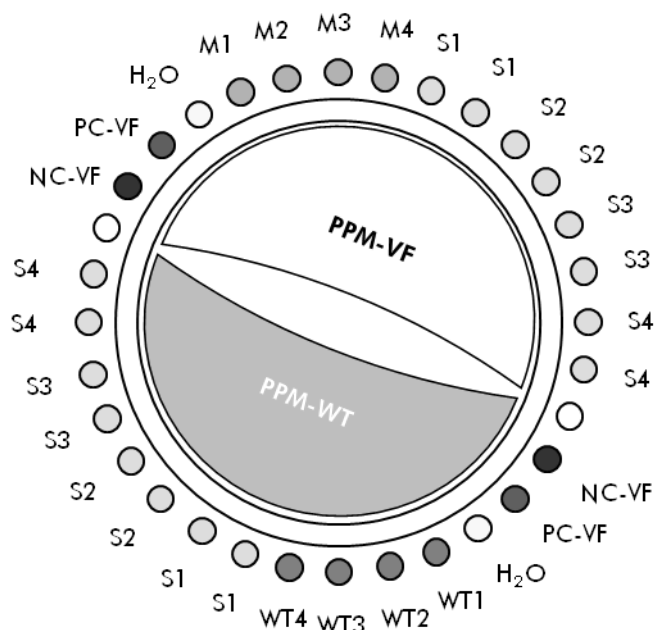
**Tabuľka 11. Počet reakcií pre prístroj LightCycler 1.2**

Vzorky	Reakcie
<b>So zmesou primérov JAK2 V617F a sond (PPM-VF)</b>	
4 štandardy M-VF	4 reakcie, každá testovaná raz
n vzoriek DNA	n x 2 reakcie
2 DNA kontroly	2 reakcie: PC-VF a NC-VF, každá testovaná raz
Kontrola vody	1 reakcia
<b>So zmesou primérov JAK2 divého typu a sond (PPM-WT)</b>	
4 štandardy divého typu	4 reakcie, každá testovaná raz
n vzoriek DNA	n x 2 reakcie
2 DNA kontroly	2 reakcie: PC-VF a NC-VF, každá testovaná raz
Kontrola vody	1 reakcia

### Spracovanie vzorky v prístroji LightCycler 1.2

V rámci jedného experimentu odporúčame testovať štyri vzorky DNA na optimalizovanie používania štandardov a zmesí primérov a sond. Kapilárna schéma na obrázku 6 znázorňuje príklad experimentu.





**Obrázok 6. Navrhované nastavenie rotora pre každý experiment so súpravou *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit*. PC-VF: Pozitívna kontrola V617F; NC-VF: Negatívna kontrola V617F; M-VF: Štandardy V617F; M-WT: štandardy divého typu; S: Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.**

## qPCR na prístroji LightCycler 1.2

**Poznámka:** Pre osobitné technologické požiadavky sa musia experimenty na nástroji LightCycler vykonávať s použitím špecifických reagensí. Odporúčame použiť LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe a pri príprave Master Mix 5x postupujte podľa odporúčaní výrobcu.

**Poznámka:** Vykonajte všetky kroky na ľade.

## Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.
2. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľky 12 a 13 opisujú schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagensí, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 20 µl. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi priméra a sond (PPM-VF alebo PPM-WT). Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

**Tabuľka 12. Príprava zmesi qPCR**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakcia (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Predbežná zmes V617F, 15 + 1 reakcií (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Konečná koncentrácia</b>
Čerstvo pripravený LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Zmes primérov a sond, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	10,2	163,2	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	–
Celkový objem	20,0	20 každá	–

**Tabuľka 13. Príprava zmesi qPCR**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakcia (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Predbežná zmes WT, 15 + 1 reakcií (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Konečná koncentrácia</b>
Čerstvo pripravený LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Zmes primérov a sond, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	10,2	163,2	–
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5,0	5 každá	–
Celkový objem	20,0	20 každá	–

**3. Dispenzujte 15  $\mu$ l predbežnej zmesi qPCR (VF alebo WT) na kapiláru.**

4. Pridajte 5 µl materiálu, ktorý sa má kvantifikovať (25 ng vzorky genómovej DNA alebo kontroly) do zodpovedajúcej skúmavky (celkový objem 20 µl).
5. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
6. Vložte kapiláry do adaptérov dodaných s prístrojom a krátko odstredíte (700 x g, približne 10 sekúnd).
7. Vložte kapiláry do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
8. Naprogramujte prístroj LightCycler 1.2 a program tepelného cyklovača podľa Tabuľky 14.

**Tabuľka 14. Teplotný profil**

<b>Mode of analysis (Režim analýzy)</b>	Kvantifikácia
<b>Hold 1 (Výdrž 1)</b>	Teplota: 55°C Čas: 2 min. Sklon: 20
<b>Hold 2 (Výdrž 2)</b>	Teplota: 95°C Čas: 10 min. Sklon: 20
<b>Cycling (Cyklovanie)</b>	50-krát 95 °C na 15 sekúnd; sklon: 20 66°C 1 minútu; sklon: 20; so získaním fluorescencie FAM: Jednotlivý

9. Pre LightCycler 1.2 sa odporúča F1/F2 a režim „2<sup>nd</sup> derivative analysis“ (analýza založená na 2. derivácii). Program teplotného cyklovania spustíte podľa Tabuľky 14.

# Interpretácia výsledkov

## Princíp analýzy údajov

Údaje o hodnotách prahového cyklu ( $C_T$ ) bodu kríženia ( $C_P$ ) je možné exportovať z prístroja qPCR a vložiť ich do súboru Excel<sup>®</sup> na analýzu. Tieto hodnoty sa potom môžu použiť na výpočet priemerných hodnôt  $C_P$  a  $C_T$  a štandardných priemerných hodnôt  $C_T$  sa môžu vyniesť do grafu, aby sa získala štandardná krivka pre štandardy divého typu aj V617F pomocou nasledujúcej rovnice a Tabuľky 15.

$y$  = Stredná hodnota  $C_P$ ;  $x$  =  $\log_{10}$  CN, kde CN = počet kópií génov v 5  $\mu$ l vzorke

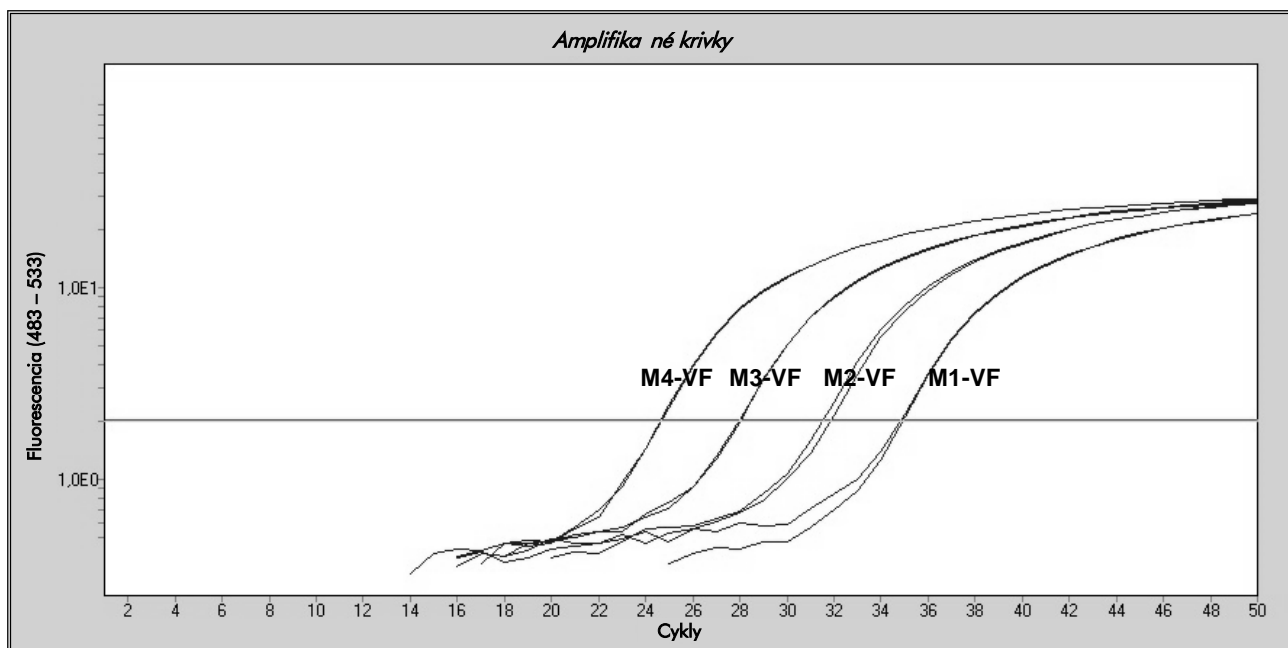
**Tabuľka 15. Kvantitatívne údaje pre štandardy divého typu a V617F**

Štandard	Počet kópií (Copy number, CN)	$\log_{10}$ CN
M1-VF	$5 \times 10^1$ VF	1,7
M2-VF	$5 \times 10^2$ VF	2,7
M3-VF	$5 \times 10^3$ VF	3,7
M4-VF	$5 \times 10^4$ VF	4,7
WT-1	$5 \times 10^1$ WT	1,7
WT-2	$5 \times 10^2$ WT	2,7
WT-3	$5 \times 10^3$ WT	3,7
WT-4	$5 \times 10^4$ WT	4,7

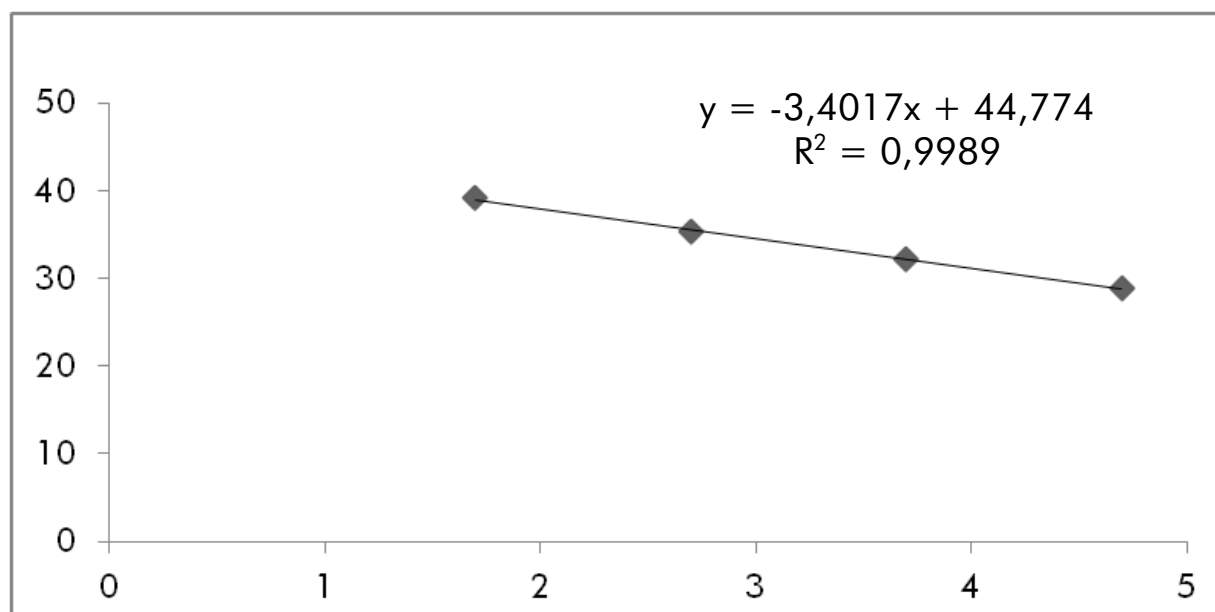
**Poznámka:** Každý používateľ by si mal merať svoju vlastnú reprodukovateľnosť vo svojom laboratóriu.

## Štandardná krivka a kritériá kvality

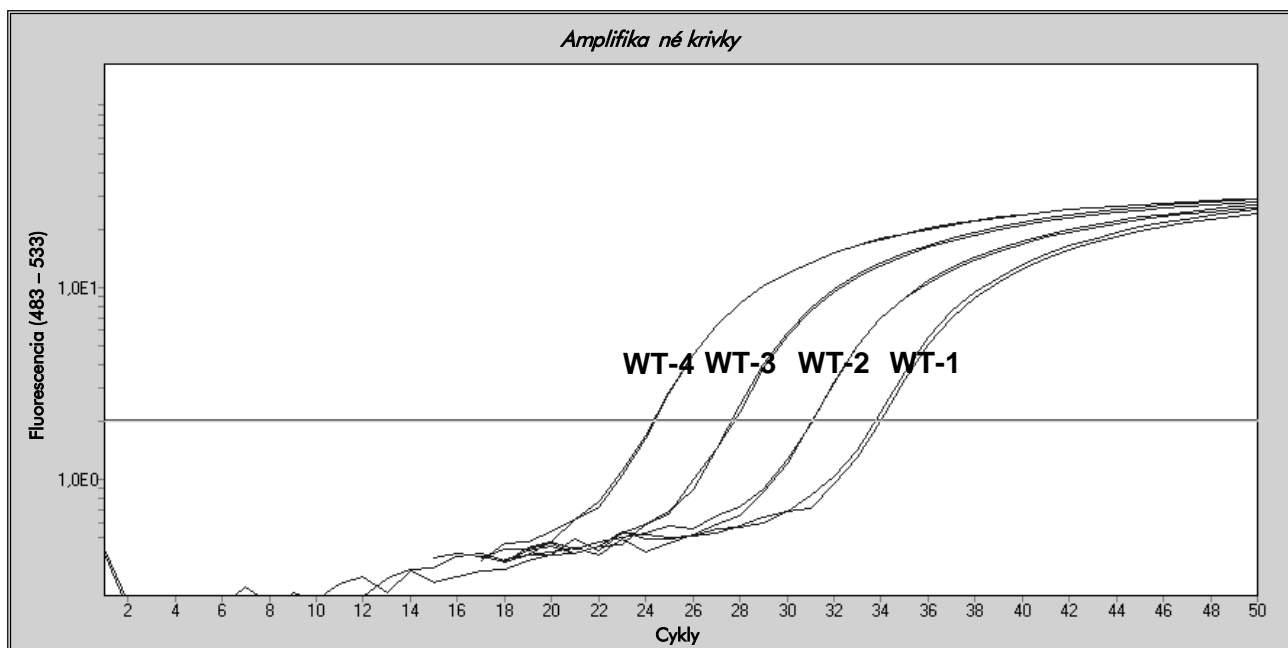
Obrázky 7 a 9 znázorňujú príklady výsledkov získaných pomocou súpravy *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit a obrázky 8 a 10 znázorňujú príklad teoretickej krivky vypočítanej pre štyri štandardné riedenia.



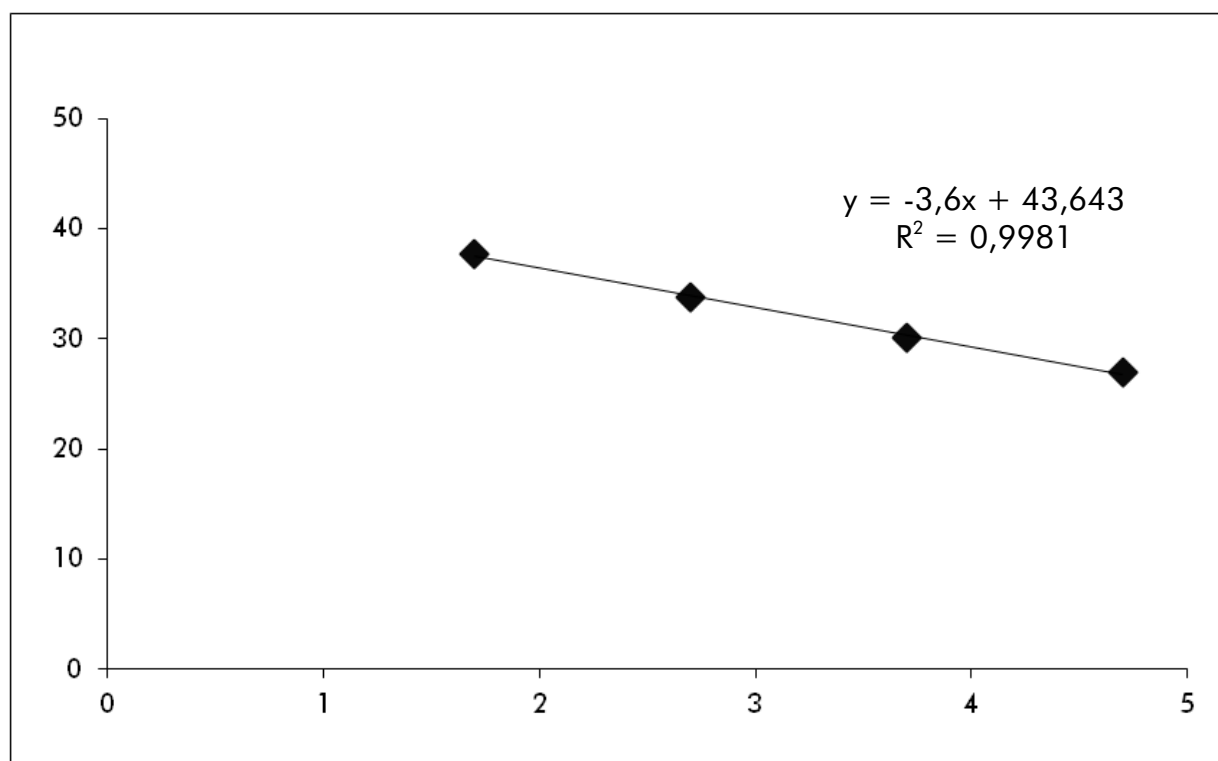
Obrázok 7. Amplifikačný diagram pre  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  kópií plazmidu JAK2 V617F (kontroly M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF, v danom poradí).



Obrázok 8. Štandardná krivka pre JAK2 V617F.



Obrázok 9. Amplifikačný diagram pre  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  kópií plazmidu divokého typu JAK2 (kontroly WT-1, WT-2, WT-3 a WT-4 v danom poradí).



Obrázok 10. Štandardná krivka pre divoký typ JAK2.

Keďže štandardy predstavujú 10-násobné zriedenia, teoretický sklon krivky je  $-3,32$ . Sklon od  $-3,0$  do  $-3,9$  je akceptovateľný, pokiaľ je  $R^2 > 0,95$  (12). Pre presné výsledky je však žiadúca hodnota  $R^2 > 0,98$  (13).

Na výpočet počtu kópií V617F a WT  $\log_{10}$  v neznámych vzorkách možno potom použiť rovnice štandardnej krivky.

Na transformovanie nespracovaných stredných hodnôt  $C_P/C_T$  (získaných pomocou PPM-VF) pre neznáme a kontrolné vzorky na počet kópií JAK2 V617F ( $CN_{V617F}$ ) je potrebné použiť rovnicu štandardnej krivky V617F.

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Stredná hodnota } C_{pV617F} - \text{priesečník so štandardnou krivkou}_{V617F})}{\text{Sklon štandardnej krivky}_{V617F}}$$

Na transformovanie nespracovanej strednej hodnoty  $C_P/C_T$  (získanej pomocou PPM-WT) pre neznáme a kontrolné vzorky na počet kópií JAK2 divého typu ( $CN_{WT}$ ) je potrebné použiť rovnicu štandardnej krivky divého typu.

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Stredná hodnota } C_{pWT} - \text{priesečník so štandardnou krivkou}_{WT})}{\text{Sklon štandardnej krivky}_{WT}}$$

### Vyjadrenie výsledkov

Výsledky sú relatívne k 25 ng celkovej genómovej DNA a mali by byť vyjadrené ako percento JAK2 V617F nasledujúcim spôsobom.

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

### Reprodukovateľnosť medzi replikátmi

Získané údaje by mali byť v zhode medzi duplikátmi.

### Pozitívne a negatívne kontroly

Výsledkom pozitívnej kontroly alebo PC-VF by mala byť percentuálna hodnota JAK2 V617F vyššia ako 99,9 %.

Výsledkom negatívnej kontroly alebo NC-VF by mala byť percentuálna hodnota JAK2 V617F nižšia ako 0,1 %.

Ak tieto kontroly nefungujú správne, vyhľadajte riešenie v časti „Sprievodca riešením problémov“ na strane 32.

## Kontroly vody

Výsledkom negatívnej kontroly by mala byť nulová hodnota CN pre detekciu JAK2 V617F aj JAK2 divého typu.

Pozitívna kontrola vody vyplýva z krížovej kontaminácie. Riešenie nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“ uvedenej ďalej.

## Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete v časti „Kontaktné informácie“ na strane 41).

### Komentáre a návrhy

---

#### Štandardná krivka pre divý typ alebo V617F nie je lineárna

Prevrátenie liekovky,  
prevrátenie počas  
distribúcie, krížová  
kontaminácia, čiastočná  
degradácia štandardu,  
reagencia RQPCR,  
nešpecifická amplifikácia  
alebo chyba programu PCR

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

Súpravu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit  
skladujte pri teplote od –15 do –30 °C a  
chráňte zmes primérov a sond pred  
svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia  
s reagentami“, strana 12.

Vyhňte sa opakovanému zmrazeniu a  
roztápaniu.

#### Žiadny alebo slabý signál pre jeden štandard

Štandard sa nedistribuuje  
alebo sa používa rovnaká  
zmes PPM

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

Zopakujte cyklus PCR.



## Komentáre a návrhy

---

### Negatívna (H<sub>2</sub>O) kontrola je pozitívna

Krížová kontaminácia,  
kontaminácia reagensie,  
chyba prístroja, obrátenie  
jamiek alebo kapilár alebo  
degradácia sondy

Vymeňte všetky kritické reagensie.

So vzorkami, komponentmi súpravy a spotrebným materiálom vždy zaobchádzajte v súlade so všeobecne uznávanými postupmi, aby ste zabránili kontaminácii pri prenose.

Zmesi primérov a sond chráňte pred svetlom.

Skontrolujte, či na fluorescenčných krivkách nie sú falošné pozitívne výsledky.

### Žiadny signál, ani pri štandardnej kontrole

a) Bol zvolený nesprávny  
detekčný kanál

Nastavte kanál na F1/F2 alebo  
530 nm/640 nm.

b) Chyba pipetovania alebo  
vynechanie reagensí

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

Zopakujte cyklus PCR.

c) Žiadny program akvizície  
údajov

Skontrolujte program cyklu.

Vyberte režim akvizície „single“  
(samostatná) na konci každého segmentu  
hybridizácie primérov programu PCR.

### Chýbajúci alebo slabý signál vo vzorkách, ale štandardné kontroly sú v poriadku

Inhibičné účinky materiálu  
vzorky spôsobené  
nedostatočnou purifikáciou

Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu  
(OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) a koncentráciu DNA.

Zopakujte prípravu DNA.

### Intenzita fluorescencie je príliš nízka

a) Nesprávne skladovanie  
komponentov súpravy

Alikvotné reagensie na skladovanie.

Súpravu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit skladujte pri teplote od –15 do –30 °C a chráňte zmes primérov a sond pred svetlom. Pozri „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“, strana 12.

Vyhňte sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.

## Komentáre a návrhy

---

- b) Veľmi malé počiatkové množstvo cieľovej DNA

Skontrolujte množstvo vzoriek DNA.

**Poznámka:** V závislosti od zvolenej metódy prípravy DNA sa môžu vyskytnúť inhibičné účinky.

### Negatívne kontroly sú pozitívne

Prenos kontaminácie

Vymeňte všetky kritické reagenty.

Experiment opakujte s novými alikvótmi všetkých reagentov.

So vzorkami, komponentmi súpravy a spotrebným materiálom vždy zaobchádzajte v súlade so všeobecne uznávanými postupmi, aby ste zabránili kontaminácii pri prenose.

### Intenzita fluorescencie sa líši

- a) Chyba pipetovania

Po rozmrazení vortexujte a premiešajte všetky reagenty.

Variabilitu LightCycler spôsobenú tzv. „chybou pipetovania“ je možné znížiť analýzou údajov v režime F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.

- b) Nedostatočné odstredenie doštičky, skúmaviek alebo kapilár alebo pripravená zmes PCR môže byť ešte vždy v hornej nádobe kapiláry, alebo môže byť v kapilárnom hrote zachytená vzduchová bublina

Kapiláry naplnené reakčnou zmesou vždy odstredíte, ako je to opísané v osobitnom návode na obsluhu nástroja.

- c) Vonkajší povrch kapilárneho hrotu je znečistený

Pri manipulácii s kapilármi vždy noste rukavice.

## Komentáre a návrhy

---

### **Pozitívne kontroly divého typu alebo V617F signalizujú použitie recipročného PPM**

Krížová kontaminácia,  
kontaminácia reagensie,  
alebo obrátenie jamiek alebo  
kapilár

Vymeňte všetky kritické reagensie.  
Experiment opakujte s novými alikvótni  
všetkých reagensíí.

So vzorkami, komponentmi súpravy a  
spotrebným materiálom vždy  
zaobchádzajte v súlade so všeobecne  
uznávanými postupmi, aby ste zabránili  
kontaminácii pri prenose.

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

### **Obrátená detekcia pozitívnej kontroly**

Distribuované prevrátenie  
PPM v jamke alebo kapiláre  
alebo v predbežnej zmesi

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

### **Žiadny signál pre jednu alebo obidve pozitívne kontroly**

Vynechaná PPM alebo  
kontrolná DNA

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

### **Vysoké hodnoty na pozadí**

Bielenie fluoroforom

Sondu skladujte a manipulujte s ňou mimo  
svetla.

### **Nedostatočná reprodukovateľnosť duplikátov vzoriek**

Chyba pipetovania alebo  
krížová kontaminácia

Skontrolujte schému pipetovania a  
nastavenie reakcie.

## Kontrola kvality

V súlade s certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy *ipsogen JAK2 MutaQuant* Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu. Osvedčenia o analýze sú k dispozícii na požiadanie na stránke [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Obmedzenia

Pred použitím tohto zariadenia musia byť používatelia zaškolení a oboznámení s touto technológiou. Táto súprava by sa mala používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s overeným prístrojom uvedeným v „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“, strana 10.

Všetky získané diagnostické výsledky sa musia interpretovať v spojení s inými klinickými alebo laboratórnymi nálezmi. Používateľ je zodpovedný za overenie výkonu systému pre všetky postupy používané v jeho laboratóriu, na ktoré sa nevzťahujú štúdie výkonnosti QIAGEN.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

# Charakteristiky účinnosti

## Neklinické štúdie

### Presnosť

Presná štúdia sa vykonala použitím 12 vzoriek DNA extrahovaných z bunkových línií, ktoré zodpovedali rôznym alelovým záťažiam JAK2 V617F. Celkovo sa vykonalo 80 meraní na každej vzorke použitím 3 rôznych šarží súpravy *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. Pri tejto štúdii presnosti sa využíval systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Analytické údaje sú zhrnuté v Tabuľke 16.

**Tabuľka 16. Presné údaje vzorky DNA**

Vzorka	Teoretická hodnota JAK2 V617F (%)	n*	Stredná hodnota (%)	CV (%)	Percentil	
					5	95
A	0	73	0,004	117,5	0,000	0,015
B	0,05	80	0,101	89,2	0,003	0,284
C	0,5	79	0,449	61,6	0,161	0,950
D	1	68	1,169	41,6	0,611	1,998
E	2	80	2,046	33,5	1,168	3,185
F	4	80	3,733	30,6	2,120	5,560
G	5	77	5,246	22,4	3,647	7,309
H	12,5	80	16,633	16,6	12,792	22,335
I	31	80	28,602	14,8	22,705	34,773
J	50	76	56,181	6,6	50,024	63,724
K	78	80	80,153	3,8	75,352	85,551
L	100	70	99,998	0,003	99,992	100,000

\* Odľahlé hodnoty boli vylúčené. Boli definované ako hodnoty menšie ako spodný kvartil mínus 3-násobok medzikvartilového rozsahu alebo väčšie ako vrchný kvartil plus 3-násobok medzikvartilového rozsahu na grafe Box a Whisker.

n = počet validovaných vzoriek; CV = globálny koeficient variácie.

## Limit slepého pokusu a limit detekcie

Úroveň pozadia alebo úroveň slepého pokusu (level of blank, LOB) sa stanovila na negatívnych vzorkách (8 vzoriek, 76 meraní). Zistila sa hodnota 0,014 %.

Limit detekcie (limit of detection, LOD) sa stanovil pomocou vzoriek, o ktorých sa vedelo, že sú pozitívne, ale s nízkym vyjadrením (7 vzoriek, 68 meraní). Zistila sa hodnota 0,061 % s 90 % intervalom spoľahlivosti na vrchnej hranici 0,091 %.

Túto optimálnu citlivosť je možné dosiahnuť na vzorkách obsahujúcich najmenej 10 000 kópií génu JAK2 (divý typ alebo mutácia V617F).

Kvantifikačné údaje by sa mali vykazovať nasledovne.

- JAK2 V617F  $\leq$  0,014 % možno interpretovať, pretože sa nedetegovala mutácia JAK2 V617F.
- JAK2 V617F je  $>$  0,014 %, ale  $<$  0,091 % možno interpretovať ako nepresvedčivý výsledok.
- JAK2 V617F  $\geq$  0,091 % možno interpretovať ako pozitívny výsledok a že bola detegovaná mutácia JAK2 V617F.

## Linearita

Štúdie linearity sa vykonávali na 12 vzorkách, pričom každá z nich sa získala z inej zmesi DNA extrahovanej z bunkových línií, ktoré boli pozitívne a negatívne na mutáciu JAK2 V617F. Každá vzorka bola testovaná 5-krát. Údaje z tejto štúdie ukázali, že súprava *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit poskytla lineárne výsledky v celom dynamickom rozsahu.

## Klinické štúdie

DNA z krvi alebo kostnej drene sa extrahovala z 87 vzoriek pacientov a analyzovala sa pomocou súpravy *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. Ďalej bolo kvantifikované percento mutácií JAK2 V617F a porovnané s výsledkami skríningových testov získanými pomocou súpravy *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (kat. č. 673223). Získané údaje sú uvedené v Tabuľke 17.

**Tabuľka 17. Tabuľka náhodnosti uvádzajúca zhodu medzi výsledkami získanými so súpravami *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit a *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit**

		Výsledky zo súpravy <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit			
		Mutácia zistená	Nepresvedčivý výsledok	Mutácia nezistená	n
<b>Výsledky zo súpravy <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit</b>	Mutácia zistená	40	2	7	49
	Nepresvedčivý výsledok	0	0	21	21
	Mutácia nezistená	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Pozitívna zhoda	100 % (95 % interval spoľahlivosti: 91 %, 100 %)				
Negatívna zhoda	71 % (95 % interval spoľahlivosti: 51 %, 85 %)				
Celková zhoda	89 % (95 % interval spoľahlivosti: 79 %, 95 %)				

## Referenčná literatúra

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT\_008413.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R. L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.



## Symbols

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť na balení a štítkoch:



<N>

Obsahuje reagencie postačujúce na <N> reakcií



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Teplotné obmedzenia



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie

## Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) alebo na telefónnom čísle 00800-22-44-6000, alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Pre 12 reakcií: Kontrola génu JAK2 divého typu, kontrolný gén JAK2 V617F, zmes primérov a sond PPM-WT, zmes primérov a sond PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Pre 24 reakcií: Kontrola génu JAK2 divého typu, kontrolný gén JAK2 V617F, zmes primérov a sond PPM-WT, zmes primérov a sond PPM-VF	673523
<b>Rotor-Gene Q MDx – pre IVD-validované analýzy real-time PCR v klinických aplikáciách</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie	9002033

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite **www.qiagen.com** alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Tento produkt je určený na diagnostické použitie in vitro. Produkty *ipsogen* sa nemôžu opätovne predávať, upravovať na ďalší predaj ani používať na výrobu komerčných výrobkov bez písomného súhlasu spoločnosti QIAGEN.

Informácie uvádzané v tomto dokumente sa môžu zmeniť bez predchádzajúceho upozornenia. Spoločnosť QIAGEN nenesie žiadnu zodpovednosť za chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť v tomto dokumente. Tento dokument sa v čase uverejnenia považuje za úplný a presný. Spoločnosť QIAGEN v žiadnom prípade nezodpovedá za náhodné, špeciálne, viacsobné alebo následné škody, ktoré vzniknú v súvislosti s používaním tohto dokumentu alebo vyplývajúce z jeho použitia.

Na produkty *ipsogen* sa poskytuje záruka, že spĺňajú uvedené špecifikácie. Jediný záväzok spoločnosti QIAGEN a jediný prostriedok nápravy zákazníkom je obmedzený na bezplatnú výmenu produktov v prípade, že produkty nebudú fungovať v súlade so zárukou.

Mutácia JAK2 V617F a jej použitia sú chránené patentovými právami vrátane európskeho patentu EP1692281, amerických patentov 7,429,456 a 7,781,199, amerických patentových prihlášok US20090162849 a US20120066776 a zahraničných náprotivkov.

Nákup tohto produktu neposkytuje žiadne právo na jeho použitie na klinické skúšky liekov zameraných na JAK2V617F. QIAGEN vyvíja špecifické licenčné programy pre takéto použitie. Kontaktujte naše právne oddelenie na [jak2licenses@qiagen.com](mailto:jak2licenses@qiagen.com).

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

### Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit a iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvorí súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v príručke k *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* Kit a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

