

# Příručka pro sadu *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 *MutaQuant*<sup>®</sup>



12 (katalogové číslo 673522)



24 (katalogové číslo 673523)

Verze 1

IVD

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

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



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R3

MAT

1072501CS



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

### **QIAGEN určuje standardy:**

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Obsah

<b>Použití</b>	<b>4</b>
<b>Souhrn a vysvětlení</b>	<b>4</b>
<b>Princip metody</b>	<b>6</b>
<b>Dodávané materiály</b>	<b>9</b>
Obsah sady	9
<b>Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky</b>	<b>10</b>
<b>Varování a bezpečnostní opatření</b>	<b>12</b>
Všeobecná bezpečnostní opatření	12
<b>Uchovávání a nakládání s reagensy</b>	<b>13</b>
<b>Postup</b>	<b>14</b>
Příprava vzorku DNA	14
Protokoly	
■ qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM se 72zkumavkovým rotorem	15
■ qPCR na ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístroj LightCycler 480	19
■ qPCR na přístroji LightCycler 1.2	25
<b>Interpretace výsledků</b>	<b>30</b>
Řešení problémů	34
<b>Řízení jakosti</b>	<b>37</b>
<b>Omezení</b>	<b>37</b>
<b>Výkonnostní charakteristiky</b>	<b>39</b>
Neklinické studie	39
Klinické studie	40
<b>Literatura</b>	<b>42</b>
<b>Symboly</b>	<b>43</b>
<b>Kontaktní informace</b>	<b>43</b>
<b>Informace o způsobu objednávání</b>	<b>44</b>

## Použití

Sada *ipsogen* JAK2 MutaQuant je kvantitativním testem in vitro pro detekci a kvantifikaci alely JAK2 V617F/G1849T v genomické DNA extrahované z periferní krve subjektů, u nichž je podezření na myeloproliferativní neoplasmus (MPN).

Absence mutace JAK2 V617F/G1849T nevyklučuje přítomnost jiných mutací JAK2. Test může vykazovat falešně negativní výsledky v případech dodatečných mutací umístěných v nukleotidech 88504 až 88622 (1).

**Poznámka:** Sada by se měla použít podle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými reagensy a přístroji. Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo schválené indikace a/nebo úprava komponent zneplatní závazky QIAGEN.

## Souhrn a vysvětlení

V roce 2005 (2–5) bylo zjištěno, že rekurentní somatická mutace, V617F, postihuje gen Janusovy tyrozinkinázy 2 (JAK2), což způsobilo velký průlom v chápání, klasifikace a diagnóze myeloproliferativních neoplasmů (MPN). JAK2 je zásadně důležitá intracelulární signální molekula pro řadu cytokinů včetně erytropoetinu.

Mutace JAK2 V617F je detekována u > 95 % pacientů s pravou polycytémií (PV), 50–60 % pacientů s esenciální trombocytémií (ET) a u 50 % pacientů s primární myelofibrózou (PMF). JAK2 V617F byla rovněž detekována v některých vzácných případech chronické myelomonocytické leukémie, myelodysplastického syndromu, systémové mastocytózy a chronické neutrofilní leukémie, ale v 0 % případů u CML (6).

Mutace odpovídá změně samostatného nukleotidu v případě nukleotidu JAK2 1849 v exonu 14, což má za následek jedinečnou substituci fenylalanin (F) valinem (V) na pozici 617 proteinu (doména JH2). Způsobuje to konstitutivní aktivaci JAK2, hematopoetické transformace in vitro a růstu erytropoetin independentní erytroidní kolonie (EEC) u všech pacientů s PV a velkým podílem ET a pacientů PMF (7). JAK2 V617F představuje klíčový hnací faktor transformace hematopoetických buněk v MPN, ale přesné patologické mechanismy, se stejnou jedinečnou mutací, vedoucí k takovým odlišným klinickým a biologickým entitám nebyly dosud plně objasněny.

Tradičně byla diagnóza MPN založena na klinických kritériích, histologii kostní dřeně a cytogenetických kritériích. Objev molekulárního markeru specifického pro onemocnění vedl jak ke zjednodušení procesu, tak ke zvýšené diagnostické přesnosti. Detekce mutace JAK2 V617F je nyní součástí referenčních kritérií WHO 2008 pro diagnózu MPN BCR-ABL negativní (tabulka 1) a přítomnost této mutace je hlavním kritériem pro diagnostické potvrzení.

**Tabulka 1. Kritéria WHO pro diagnózu MPN (upraveno z odkazu 8)**

Kritéria pro diagnózu pravé polycytémie (PV)	
Velká	<p>1. Hemoglobin (Hgb) <math>&gt;18,5 \text{ g.dl}^{-1}</math> (muži) nebo <math>&gt;16,5 \text{ g.dl}^{-1}</math> (ženy) nebo Hgb nebo hematokrit (Hct) <math>&gt;99.</math> percentil referenčního rozsahu pro věk, pohlaví či nadmořskou výšku místa bydliště nebo Hgb <math>&gt;17 \text{ g.dl}^{-1}</math> (muži) nebo <math>&gt;15 \text{ g.dl}^{-1}</math> (ženy), pokud je to spojeno s trvalým zvýšením <math>\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}</math> vůči výchozímu stavu, které nelze připsat na vrub korekci deficience železa nebo zvýšená hmotnost červenýchrvinek <math>&gt; 25 \%</math> nad průměrnou normální predikovanou hodnotu</p> <p>2. Přítomnost <i>JAK2V617F</i> nebo podobné mutace</p>
Malé	<p>1. Trilineární myeloproliferace kostní dřeně 2. Subnormální hladina erytropoetinu v séru 3. Růst endogenní erytroidní kolonie (EEC)</p>
Kritéria pro diagnózu esenciální trombocytémie (ET)	
Velká	<p>1. Počet destiček <math>\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}</math> 2. Proliferace megakaryocytů s velkou a zralou morfológií. Žádná nebo malá granulocytová nebo erytroidní proliferace 3. Nesplnění kritérií WHO pro chronickou myeloidní leukémii (CML), PV, primární myelofibrózu (PMF), myelodysplastického syndromu (MDS), nebo jiný myeloidní neoplasmus</p> <p>4. Prokázání <i>JAK2V617F</i> nebo jiného klonálního markeru nebo Neexistence důkazu reaktivní trombocytózy</p>
Malé	-
Kritéria pro diagnózu primární myelofibrózy (PMF)	
Velká	<p>1. Proliferace megakaryocytů a atypie doprovázená buď retikulínovou a/nebo kolagenovou fibrózou nebo za nepřítomnosti retikulínové fibrózy musí být změny megakaryocytů doprovázeny zvýšenou celularitou dřeně, granulocytickou proliferací a často sníženou erythropoézou (tj. prefibrotická PMF) 2. Nesplnění kritérií WHO pro (CML), PV, MDS nebo jiného myeloidního neoplasmu</p> <p>3. Prokázání <i>JAK2V617F</i> nebo jiného klonálního markeru nebo Neexistence důkazu reaktivní fibrózy kostní dřeně</p>
Malé	<p>1. Leukoerytroblastóza 2. Zvýšená sérová laktátová dehydrogenáza (LDH) 3. Anémie 4. Zjevná splenomegalie</p>

Nedávno navrhli mezinárodní experti kritéria pro terapeutická hodnocení u PV a ET. Na základě dat o aloimplantátu, alfa interferonu nebo hydroxymočovině byla začleněna kvantifikace *JAK2V617F* jako potenciálně užitečného nástroje pro sledování léčebné odezvy (9). U odezvy na některá nová léčiva cílená proti *JAK2* v klinickém vývoji byl pozorován pokles zátěže *JAK2 V617F* (10).

## Princip metody

Pro kvantitativní stanovení podílu polymorfismu jednoho nukleotidu (SNP) ve vzorcích DNA bylo navrženo několik odlišných technik. Z nich se dává přednost metodám založeným na kvantitativní řetězové reakci polymerázy v reálném čase (qPCR), protože jejich vyšší citlivost umožňuje sledovat zátěž alely longitudinálně. Mnohé z těchto technik mají střední citlivost 1-10 %, například TaqMan® alelová diskriminace, Pyrosequencing®, analýza křivky tání a přímé sekvencování. Některé z nich, jako je křivka tání a sekvencování, jsou semikvantitativní, zatímco ostatní, jako je Pyrosequencing, vyžadují zpracování po PCR nebo vyžadují instrumentaci, která není snadno dostupná nebo má prohibitivně vysoké zřizovací náklady pro rutinní laboratorní testování. Vysoce citlivý přístup o citlivosti < 0,1 % vyžaduje použití SNP specifického priméru, který povoluje selektivní amplifikaci mutantu nebo alely širokého typu, kterou lze snadno detekovat na přístroji qPCR v reálném čase. Sada *ipsogen JAK2 MutaQuant* je na této technice založena.

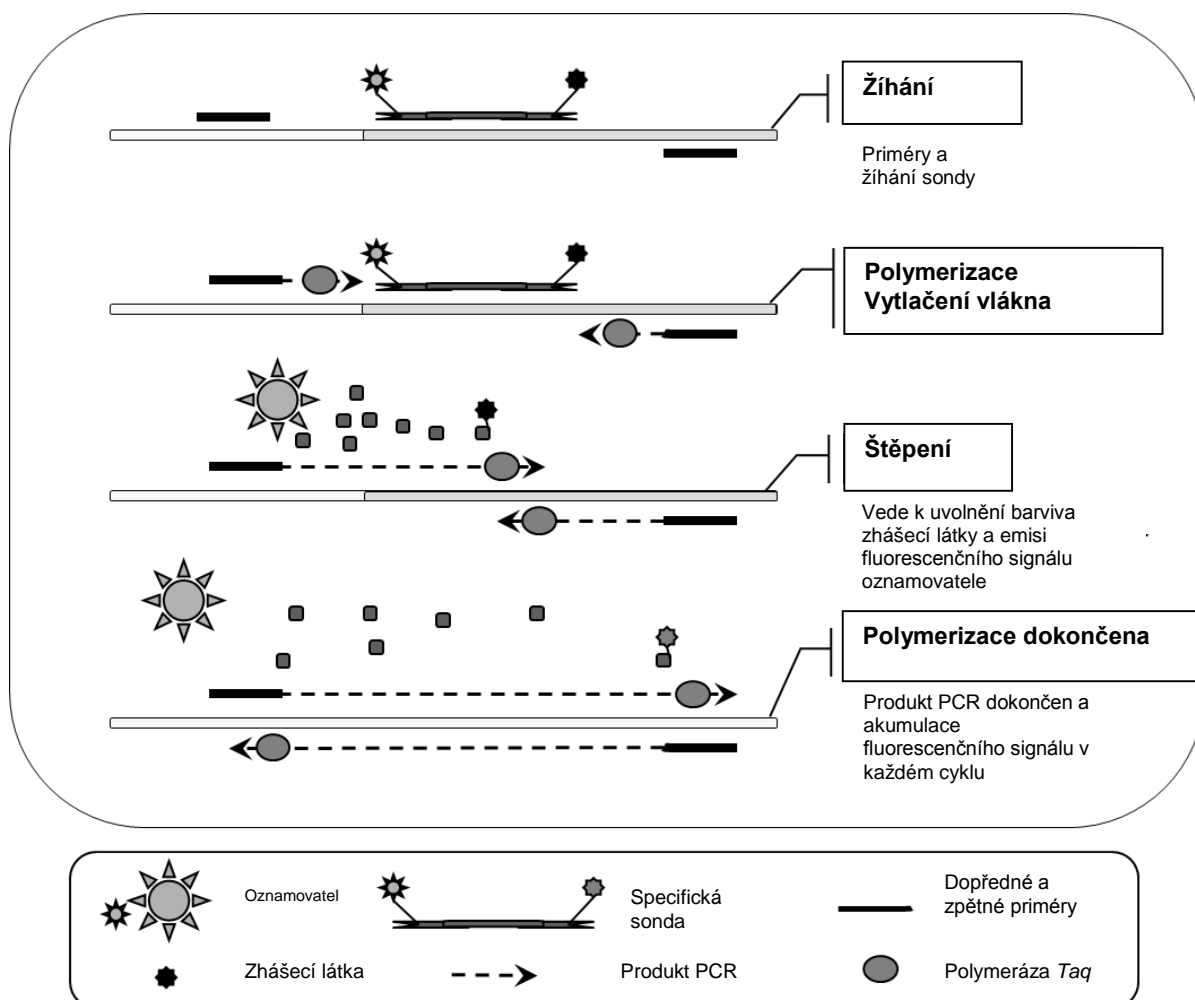
Použití qPCR umožňuje přesnou kvantifikaci výrobků PCR během exponenciální fáze procesu amplifikace PCR. Kvantitativní údaje PCR lze získat rychle bez zpracování po PCR detekcí fluorescenčních signálů v reálném čase během a/nebo po cyklování PCR, čímž se drasticky snižuje riziko kontaminace výrobku PCR. V současnosti jsou k dispozici 3 hlavní typy technik qPCR: analýza qPCR pomocí barviva SYBR® Green I, analýza qPCR používající hydrolyzační sondy a analýza qPCR pomocí hybridizačních sond.

Tato analýza využívá princip hydrolýzy oligonukleotidu dvojitého barviva qPCR. Během PCR dopředné a zpětné priméry hybridizují do specifické sekvence. Ve stejné směsi je obsažen oligonukleotid dvojitého barviva. Tato sonda, která se skládá z oligonukleotidu označeného barvivem 5' oznamovatele a za daným místem barvivem 3' zhášecí látky, hybridizuje do cílové sekvence v rámci výrobku PCR. Analýza qPCR se hydrolyzačními sondami využívá aktivitu exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Když je sonda nedotčená, blízkost paliva oznamovatele u barviva zhášecí látky způsobuje potlačení fluorescenci oznamovatele primárně převodem energie Försterova typu.

Pokud je během PCR přítomen zájmový cíl, sonda specificky žihá mezi dopřednými a zpětnými místy priméru. Aktivita exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA štěpí sondu mezi oznamovatele a zhášecí látku pouze v případě, když sonda hybridizuje na cíl. Fragmenty sondy jsou poté z cíle vytlačeny a polymerizace vlákna pokračuje. Konec sondy 3' je blokován, aby se zabránilo extenzi sondy během PCR (obrázek 1). Tento proces nastane v každém cyklu a nebude narušen exponenciální akumulací produktu.

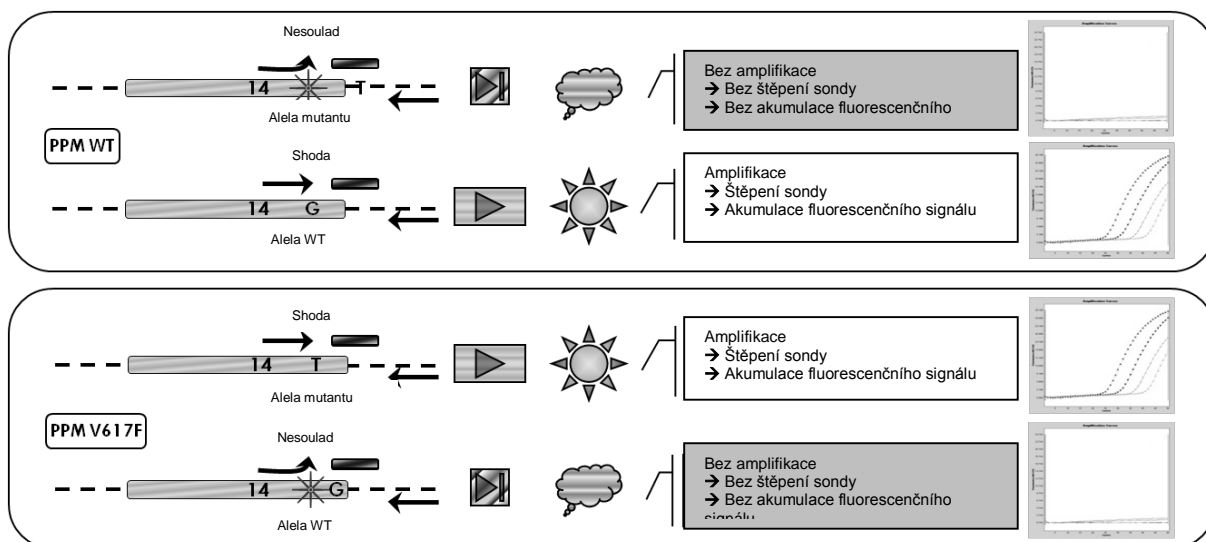
Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno pouze v případě, že bude cílová sekvence komplementární se sondou, a tím bude během PCR amplifikována. Kvůli těmto požadavkům se nedetekuje nespecifickou

amplifikaci. Tak je zvýšení fluorescence přímo úměrné cílové amplifikaci během PCR.



Obrázek 1. Princip reakce.

Kvantitativní technologie PCR specifický podle alely použitá v této analytické sadě umožňuje citlivou, přesnou a vysoce reprodukovatelnou detekci SNP. Tato technika je založena na použití specifických dopředných primérů pro divoký typ a alelu V617F (11). Pouze dokonalá shoda mezi DNA priméru a cíle umožňuje extenzi a amplifikaci PCR (obrázek 2).



**Obrázek 2. PCR specifický podle alely.** Použití směsi primérů divokého typu nebo V617F a sondy umožňuje specifickou detekci alely divokého typu nebo mutované alely ve dvou samostatných reakcích prováděných pomocí stejného vzorku. Výsledky je možné vyjádřit jako procentuální podíl kopií VF mezi celkovými kopiemi JAK2.



## Dodávané materiály

### Obsah sady

<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalogové č.		673522	673523
Počet reakcí		12	24
V617F positive control (Pozitivní kontrola V617F) (100% V617F allele) [100 % alela V617F]	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (Negativní kontrola V617F) (100% wild-type allele) [100 % alela divokého typu]	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF standardní ředění, 50 kopií) (5 x 10 <sup>1</sup> V617F copies/5 µl) [5 x 10 <sup>1</sup> V617F kopie/5 µl]	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (M2-VF standardní ředění, 500 kopií) (5 x 10 <sup>2</sup> V617F copies/5 µl) [5 x 10 <sup>2</sup> V617F kopie/5 µl]	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (M3-VF standardní ředění, 5 000 kopií) (5 x 10 <sup>3</sup> V617F copies/5 µl) [5 x 10 <sup>3</sup> V617F kopie/5 µl]	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50,000 copies (M4-VF standardní ředění, 50 000 kopií) (5 x 10 <sup>4</sup> V617F copies/5 µl) [5 x 10 <sup>4</sup> V617F kopie/5 µl]	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (WT-1 standardní ředění, 50 kopií) (5 x 10 <sup>1</sup> wild-type copies/5 µl) [5 x 10 <sup>1</sup> kopie divokého typu/5 µl]	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (WT-2 standardní ředění, 500 kopií) (5 x 10 <sup>2</sup> wild-type copies/5 µl) [5 x 10 <sup>2</sup> kopie divokého typu/5 µl]	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl

<b>ipsogen JAK2 MutaQuant Kit</b>		<b>(12)</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalogové č.</b>		<b>673522</b>	<b>673523</b>
<b>Počet reakcí</b>		<b>12</b>	<b>24</b>
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (WT-3 standardní ředění, 5 000 kopií) (5 x 10 <sup>3</sup> wild-type copies/5 µl) [5 x 10 <sup>3</sup> kopie divokého typu/5 µl]	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT-4 standardní ředění, 50 000 kopií) (5 x 10 <sup>4</sup> wild-type copies/5 µl) [5 x 10 <sup>4</sup> kopie divokého typu/5 µl]	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT* (Směs primérů a sondy JAK2 WT*)	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F† (Směs primérů a sondy JAK2 V617F†)	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen <i>JAK2 MutaQuant Kit Handbook</i> (angličtina)		1	1

\* Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro kontrolní gen JAK2 divokého typu plus specifická sonda FAM<sup>TM</sup>-TAMRA<sup>TM</sup>.

† Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro mutaci JAK2 V617F plus specifická sonda FAM-TAMRA.

**Poznámka:** Standardní ředění a priméry a směsi sond před použitím vortexujte a krátce odstřeďte.

## Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

### Reagencie

- Voda pro PCR bez nukleázy
- Pufr a polymeráza DNA *Taq*: Validované reagencie jsou TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, katalogové číslo 04535286001) nebo

LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe<sup>®</sup> (Master Mix 5x)  
(Roche, katalogové číslo 03515567001)

### Spotřební díly

- Sterilní pipetovací špičky PCR odolné proti aerosolu neobsahující nukleázu s hydrofobními filtry
- 0,5ml nebo 1,5ml zkumavky PCR neobsahující nukleázu
- Led

### Vybavení

- Mikrolitrová pipeta\* vyčleněná pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga\* s rotorem pro 0,5ml/1,5ml reakční zkumavky a mikrodesky (schopná dosáhnout 13.000–14.000 ot/min)
- Přístroj PCR pracující v reálném čase:\* Systém Rotor-Gene Q 5plex HRM<sup>®</sup> nebo jiný systém Rotor-Gene; LightCycler 1.2 nebo 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a s tím spojený specifický materiál
- Biofotometr

\* Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

## Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách

**[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

## Všeobecná bezpečnostní opatření

Použití testů qPCR vyžaduje správnou laboratorní praxi včetně údržby zařízení, která jsou vyčleněna pro molekulární biologii, a je ve shodě s platnými předpisy a příslušnými standardy.

Tato sada je určena pro diagnostické použití in vitro. Reagencie a pokyny dodávané s touto sadou byly validovány pro optimální chování. Další ředění reagensů nebo pozměnění inkubačních časů a teplot může vést k chybným nebo rozporným údajům. Reagencie PPM-WT a PPM-VF se mohou změnit, pokud budou vystaveny působení světla. Všechny reagencie byly specificky vytvořeny pro použití s tímto testem. Pro optimální chování testu by se neměly provádět žádné náhrady.

Postupujte s maximální opatrností, aby nedošlo k následujícímu:

- Kontaminace DNázou, která by mohla způsobit degradaci templátové DNA
- Přenosová kontaminace DNA nebo PCR s následným falešně pozitivním signálem

Proto doporučujeme následující.

- Použijte laboratorní vybavení zbavené nukleázy (např. pipety, pipetovací špičky, reakční lahvičky) a při provádění analýzy mějte nasazené rukavice.
- Použijte čerstvé pipetovací špičky odolné vůči aerosolu pro všechny pipetovací kroky, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci vzorků a reagensů.
- Připravte hlavní směs před PCR s vyčleněnými materiály (pipety, špičky atd.) ve vyhrazeném místě, kam nebyly zavlečeny žádné matrice DNA (DNA, plazmidy nebo produkty PCR). Dejte templát do samostatné zóny (nejlépe do samostatné místnosti) se specifickým materiálem (pipety, špičky atd.).

## Uchovávání a nakládání s reagensiemi

Sady se dodávají na suchém ledu a po doručení se musí uskladnit při teplotách od -15°C do -30°C.

- Minimalizujte expozici primérů a směsí sond (zkumavky PPM-WT a PPM-VF) působení světla.
- Před otevřením zkumavky jemně smíchejte a centrifugujte.
- Uložte všechny součásti sady do původních obalů.

Tyto podmínky uchovávání platí jak pro otevřené, tak neotevřené komponenty. Komponenty uchovávané za jiných podmínek, než jsou uvedeny a štítcích, nemusí řádně fungovat a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky rozborů.

Data použitelnosti pro každou reagensii jsou vyznačena na štítcích individuálních komponent. Za správných podmínek uchovávání si produkt uchová vlastnosti až do data použitelnosti vytištěného na štítku.

Neexistují žádné zřejmé příznaky, které by upozorňovaly na nestabilitu tohoto produktu. Pozitivní a negativní kontroly by se u neznámých vzorků měly provádět současně.

# Postup

## Příprava vzorku DNA

Je zapotřebí získat genomickou DNA buď z celé krve, čištěných periferních krevních lymfocytů celé krve, polynukleárních buněk nebo granulocytů. Pro srovnatelné výsledky se doporučuje, aby se použila stejná buněčná frakce a metoda extrakce DNA. Extrakci DNA lze provést pomocí domácí vyvinuté metody nebo komerčně dostupné sady.

Množství DNA by se mělo stanovit měřením optické hustoty (OD) vzorku při 260 nm a kvalitu DNA lze stanovit buď spektrofotometrií, nebo gelovou\* elektroforézou.

- Poměr  $OD_{260}/OD_{280}$  by měl být 1,7-1,9 a menší poměry než tyto mohou znamenat kontaminaci proteinem nebo přítomnost organických chemikálií.
- Elektroforézní analýza na 0,8-1,0 % agarovém gelu\* by měla dovolit vizualizaci izolované DNA jakožto samostatného pásu přibližně 20 kb (slabý stěr poskytne přijatelné výsledky).

Výslednou DNA bude nutné naředit na koncentraci 5 ng/μl v 1x TE pufru\* při pH 8,0 a poté uložena při +4 až +8°C po 1 týden nebo -20°C, pokud se požaduje delší doba uchování.

Reakce qPCR se optimalizuje pro vzorky DNA obsahující 25 ng čištěné genomické DNA.

\* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

## Protokol: qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM se 72zkumavkovým rotorem

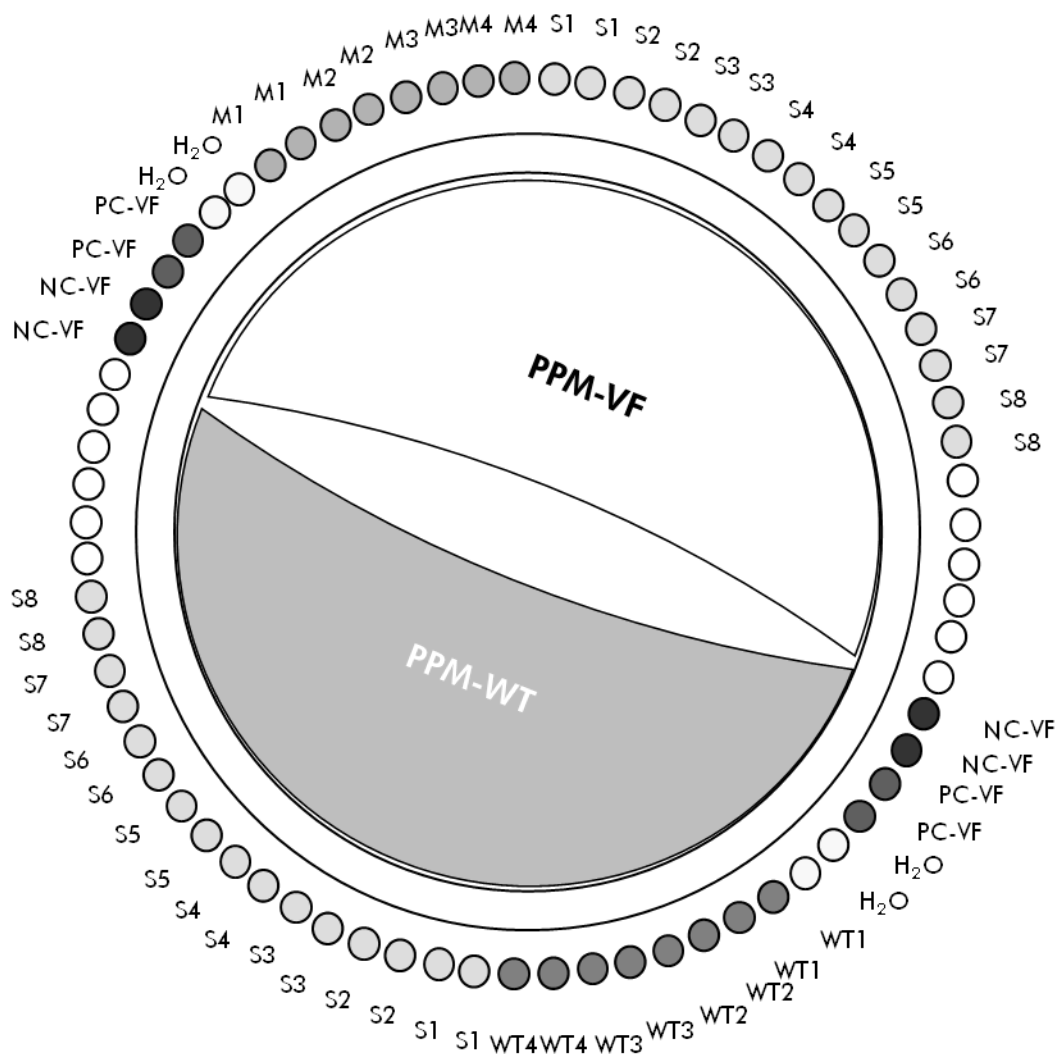
Při použití tohoto přístroje doporučujeme provádět všechna měření dvojmo, jak je uvedeno v tabulce 2.

**Tabulka 2. Počet reakcí pro přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem**

Vzorky	Reakce
<b>S priméry JAK2 V617F a směs sond (PPM-VF)</b>	
Standardy 4 M-VF	8 reakcí, každá jednotlivá testována dvojmo
n vzorků DNA	n x 2 reakcí
2 kontroly DNA	4 reakce: pozitivní kontrola (PC-VF) a negativní kontrola (NC-VF), každá jednotlivě testována dvojmo
Kontrola vody	2 reakce
<b>S priméry JAK2 divokého typu a směs sond (PPM-WT)</b>	
4 standardy divokého typu	8 reakcí, každá jednotlivá testována dvojmo
n vzorků DNA	n x 2 reakcí
2 kontroly DNA	4 reakce: PC-VF a NC-VF, každá jednotlivá testována dvojmo
Kontrola vody	2 reakce

### Zpracování vzorku na přístrojích Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem

Doporučujeme testování nejméně 8 vzorků DNA pomocí reakční sady 24 (katalogové číslo 673523) a nejméně 6 vzorků DNA pomocí reakční sady 12 (katalogové číslo 673522) ve stejném experimentu pro optimalizaci použití standardů, primérů a směsí sond.



**Obrázek 3. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen 24 sample JAK2 MutaQuant*. PC-VF: Pozitivní kontrola 617F; NC-VF: Negativní kontrola V617F; M-VF: Standardy V617F; M-WT: standardy divokého typu; S: Vzorek DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.**

**Poznámka:** Dbejte vždy na to, abyste testovaný vzorek umístili na rotoru do polohy 1. Jinak během kalibračního kroku přístroj kalibraci neprovede a budou pořízena nesprávná fluorescenční data.

Všechny ostatní pozice zaplňte prázdnými zkumavkami.

### **Přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem**

**Poznámka:** Všechny úkony provádějte na ledu.

### **Postup**

- 1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.**
- 2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.



Tabulka 3 a 4 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagentů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25  $\mu$ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejného poměru a směsi sond (buď PPM-VF, nebo PPM-WT). Zahrnuty jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

**Tabulka 3. Příprava směsi qPCR**

Komponenta	1 reakce ( $\mu$ l)	Premix V617F 30 + 1 reakcí ( $\mu$ l)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	387,5	1x
Priméry a směs sond, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	201,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	–
Celkový objem	25,0	25 každý	–

**Tabulka 4. Příprava směsi qPCR**

Komponenta	1 reakce ( $\mu$ l)	Premix WT 30 + 1 reakcí ( $\mu$ l)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	387,5	1x
Priméry a směs sond, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	201,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	–
Celkový objem	25,0	25 každý	–

3. Dávkujte 20 µl premixy qPCR (VF nebo WT) na zkumavku.
4. Přidejte 5 µl materiálu, který se má kvantifikovat (25 ng vzorku genomické DNA nebo kontroly), do příslušné zkumavky (celkový objem 25 µl).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Zkumavky vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.
7. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 5.

**Tabulka 5. Teplotní profil**

Režim analýzy	Kvantifikace
<b>Držet</b>	Teplota: 50 stupňů Čas: 2 minuty
<b>Držet 2</b>	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty
<b>Cyklování</b>	50 krát 95°C po 15 sekund 62°C po 1 minutu se snímáním fluorescence FAM v kanálu Zelená: Jednotlivý

8. U přístrojů Rotor-Gene Q vyberte pro analýzu "Slope Correct" (Správný sklon). Doporučujeme nastavit prahovou hodnotu na 0,03. Spusťte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 5.

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

Při použití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách doporučujeme provádět všechna měření dvojnásobně, jak je uvedeno v tabulce 6.

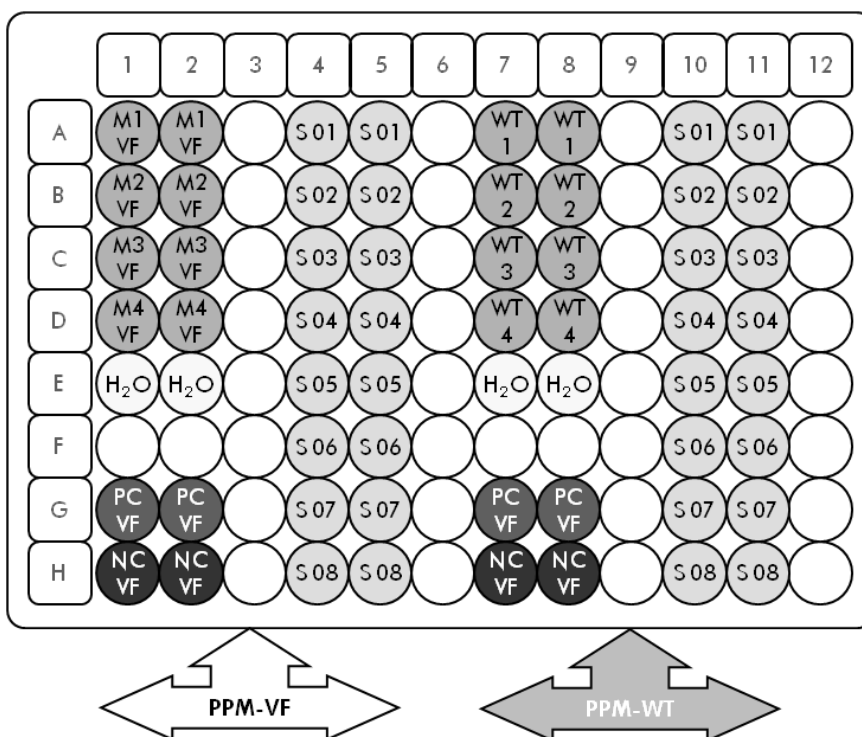
**Tabulka 6. Počet reakcí při využití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách**

Vzorky	Reakce
<b>S priméry JAK2 V617F a směs sond (PPM-VF)</b>	
Standardy 4 M-VF	8 reakcí, každá jednotlivá testována dvojnásobně
n vzorků DNA	n x 2 reakcí
2 kontroly DNA	4 reakce: PC-VF a NC-VF, každá jednotlivá testována dvojnásobně
Kontrola vody	2 reakce
<b>S priméry JAK2 divokého typu a směs sond (PPM-WT)</b>	
4 standardy divokého typu	8 reakcí, každá jednotlivá testována dvojnásobně
n vzorků DNA	n x 2 reakcí
2 kontroly DNA	4 reakce: PC-VF a NC-VF, každá jednotlivá testována dvojnásobně
Kontrola vody	2 reakce

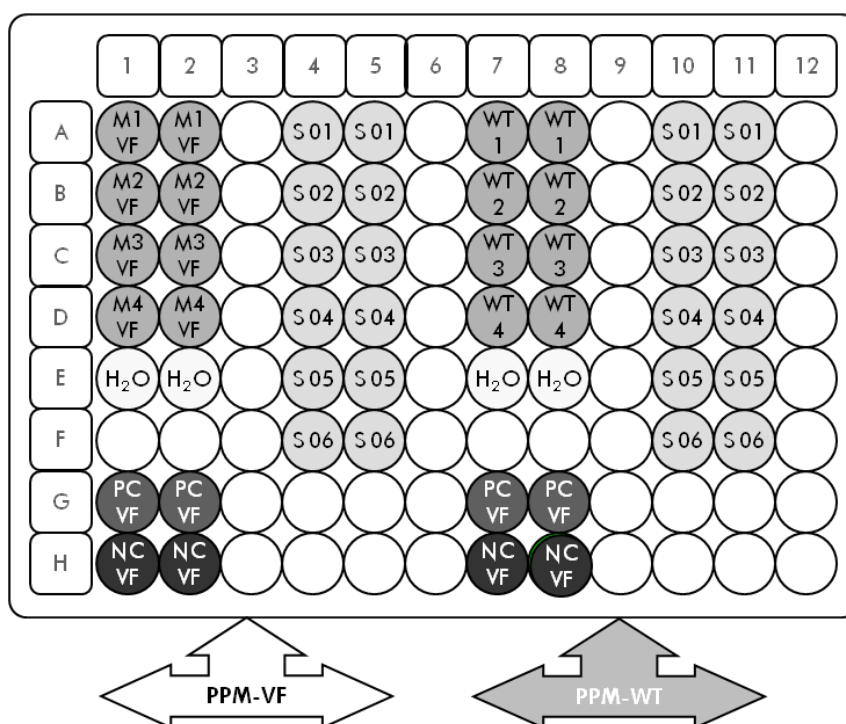
### Zpracování vzorku na qPCR na ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístroji LightCycler 480

Doporučujeme testování 8 vzorků DNA pomocí reakční sady 24 (katalogové číslo 673523) a nejméně 6 vzorků DNA pomocí reakční sady 12 (katalogové číslo 673522) ve stejném experimentu pro optimalizaci použití standardů, primérů a směsí sond.

Schéma desky na obrázku 4 představuje příklad takového experimentu využívajícího reakční sadu 24 (katalogové číslo 673523) a obrázek 5 ukazuje příklad takového experimentu využívajícího reakční sadu 12 (katalogové číslo 673522).



**Obrázek 4. Navrhované nastavení desky pro jeden experiment používající reakční sadu 24 (katalogové číslo 673523). PC-VF: Pozitivní kontrola 617F; NC-VF: Negativní kontrola V617F; M-VF: Standardy V617F; M-WT: standardy divokého typu; S: Vzorek DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody**



**Obrázek 5. Navrhované nastavení desky pro jeden experiment používající reakční sadu 12 (katalogové číslo 673522). PC-VF: Pozitivní kontrola 617F; NC-VF: Negativní kontrola V617F; M-VF: Standardy V617F; M-WT: standardy divokého typu; S: Vzorek DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody**

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

**Poznámka:** Všechny úkony provádějte na ledu.

### Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 7 a 8 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25  $\mu$ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejného poměru a směsi sond (buď PPM-VF, nebo PPM-WT). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

**Tabulka 7. Příprava směsi qPCR**

Komponenta	Premix V617F			Konečná koncentrace
	1 reakce ( $\mu$ l)	26 + 1 reakcí ( $\mu$ l)	30 + 1 reakcí ( $\mu$ l)	
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Priméry a směs sond, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	175,5	201,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25,0	25 každý	25 každý	–

**Tabulka 8. Příprava směsi qPCR**

Komponenta	Premix WT			Konečná koncentrace
	1 reakce (μl)	26 + 1 reakcí (μl)	30 + 1 reakcí (μl)	
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Priméry a směs sond, PPM-WT25x	1,0	27	31	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	175,5	201,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25,0	25 každý	25 každý	–

3. Dávkujte 20 μl premixu qPCR (VF nebo WT) na jamku.
4. Přidejte 5 μl materiálu, který se má kvantifikovat (25 ng vzorku genomické DNA nebo kontroly), do příslušné jamky (celkový objem 25 μl).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Uzavřete desku a krátce odstřed'ujte (300 x g, přibližně 10 sekund).
7. Desku vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.
8. Naprogramujte tepelný cyklovač pomocí programu tepelného cyklu a nastavte přístroj na snímání duální označené fluorescenční sondy FAM, jak je uvedeno v tabulce 9 pro ABI PRISM 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nebo v tabulce 10 pro přístroj LightCycler 480.

**Tabulka 9. Teplotní profil pro ABI PRISM 7900HT SDS a systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR**

Režim analýzy	Standardní křivka - absolutní kvantifikace
Držet	Teplota: 50°C Čas: 2 minuty
Držet 2	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty
Cyklování	50krát 95°C po 15 sekund 63°C po 1 minutu 30 sekund se snímáním fluorescence FAM; zhášecí látka: TAMRA

**Tabulka 10. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480**

Režim analýzy	Absolutní kvantifikace ("Abs Quant")
Detekční formáty	Vyberte "Simple Probe" (Samostatná sonda) v okně Detekční formáty
Držet	Teplota: 50°C Čas: 2 minuty
Držet 2	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty
Cyklování	50 krát 95°C po 15 sekund 63°C po 1 minutu a 30 sekund se snímáním fluorescence FAM odpovídající (483–533 nm) pro LC verzi 01 a (465–510 nm) pro LC verzi 02

**9. U systému ABI PRISM 7900HT a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System postupujte podle kroku 9a. U přístroje LightCycler 480 postupujte podle kroku 9b.**

**9a. ABI PRISM 7900HT SDS a systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: Doporučujeme nastavení prahové hodnoty na 0,1. Spusťte program cyklování, jak je uvedeno v tabulce 9.**

**9b. LightCycler 480: Doporučujeme režim analýzy Bod vhodnosti s pozadím na 2,0 a prahovou hodnotou 2,0. Spust'ete program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 10.**



## Protokol: qPCR na přístroji LightCycler 1.2

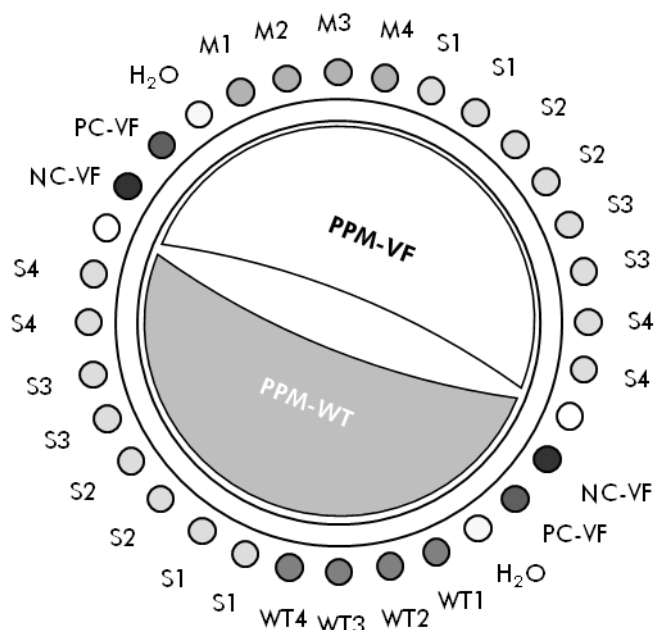
Při použití kapilárních přístrojů doporučujeme měřit vzorky dvojmo a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v tabulce 11.

**Tabulka 11. Počet reakcí pro přístroj LightCycler 1.2**

Vzorky	Reakce
<b>S priméry JAK2 V617F a směs sond (PPM-VF)</b>	
Standardy 4 M-VF	4 reakce, každá testována jednou
n vzorků DNA	n x 2 reakcí
2 kontroly DNA	2 reakce: PC-VF a NC-VF, každá testována jednou
Kontrola vody	1 reakce
<b>S priméry JAK2 divokého typu a směs sond (PPM-WT)</b>	
4 standardy divokého typu	4 reakce, každá testována jednou
n vzorků DNA	n x 2 reakcí
2 kontroly DNA	2 reakce: PC-VF a NC-VF, každá testována jednou
Kontrola vody	1 reakce

### Zpracování vzorku na přístroji LightCycler 1.2

Doporučujeme testování 4 vzorků DNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Kapilární schéma na obrázku 6 ukazuje příklad experimentu.



**Obrázek 6. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen JAK2 MutaQuant*. PC-VF: Pozitivní kontrola 617F; NC-VF: Negativní kontrola V617F; M-VF: Standardy V617F; M-WT: standardy divokého typu; S: Vzorek DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.**

## qPCR na přístroji LightCycler 1.2

**Poznámka:** Kvůli konkrétním technologickým požadavkům se musí experimenty s přístrojem LightCycler provádět při použití specifických reagensů. Doporučujeme používat LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe a dodržovat pokyny výrobce pro přípravu Master Mix 5x.

**Poznámka:** Všechny úkony provádějte na ledu.

## Postup

- 1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.**
- 2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.**

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 12 a 13 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 20 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejného poměru a směsi sond (buď PPM-VF, nebo PPM-WT). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

**Tabulka 12. Příprava směsi qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>1 reakce (μl)</b>	<b>Premix V617F 15 + 1 reakcí (μl)</b>	<b>Konečná koncentrace</b>
Čerstvě připravená master mix LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Priméry a směs sond, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	10,2	163,2	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	–
Celkový objem	20,0	20 každý	–

**Tabulka 13. Příprava směsi qPCR**

<b>Komponenta</b>	<b>1 reakce (μl)</b>	<b>Premix WT 15 + 1 reakcí (μl)</b>	<b>Konečná koncentrace</b>
Čerstvě připravená master mix LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Priméry a směs sond, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	10,2	163,2	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	–
Celkový objem	20,0	20 každý	–

- 3. Dávkujte 15 μl premixu qPCR (VF nebo WT) na kapiláru.**
- 4. Přidejte 5 μl materiálu, který se má kvantifikovat (25 ng vzorku genomické DNA nebo kontroly), do příslušné zkumavky (celkový objem 20 μl).**
- 5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.**
- 6. Umístěte kapiláry do adaptérů dodávaných s přístrojem, krátce odstřed'ujte (700 x g, přibližně 10 sekund).**
- 7. Kapiláry vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.**
- 8. Naprogramujte přístroj LightCycler 1.2 pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 14.**

**Tabulka 14. Teplotní profil**

<b>Režim analýzy</b>	<b>Kvantifikace</b>
<b>Držet 1</b>	Teplota: 55°C Čas: 2 minuty Nárůst: 20
<b>Držet 2</b>	Teplota: 95°C Čas: 10 minuty Nárůst: 20
<b>Cyklování</b>	50 krát 95°C po 15 sekund; nárůst: 20 66°C po 1 minutu; nárůst: 20; se snímáním fluorescence FAM: Jednotlivý

9. Pro přístroj LightCycler 1.2 se doporučuje F1/F2 a režim "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (analýzy založené na 2. derivaci). Spust'te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 14.

# Interpretace výsledků

## Princip datové analýzy

Data pro prahový cyklus ( $C_T$ ) a hodnoty průsečíku ( $C_P$ ) lze exportovat z přístroje qPcR a vložit do souboru Excel<sup>®</sup> pro analýzu. Tyto hodnoty lze poté použít pro výpočet průměrné hodnoty  $C_P$  a  $C_T$  a standardní průměrné hodnoty  $C_T$  lze vynést a získat tak standardní křivku pro standardy divokého typu a V617F pomocí následující rovnice a tabulky 15.

$y$  = průměr  $C_P$ ;  $x = \log_{10} CN$ , kde  $CN$  = je počet kopií genu v 5 $\mu$ l vzorku

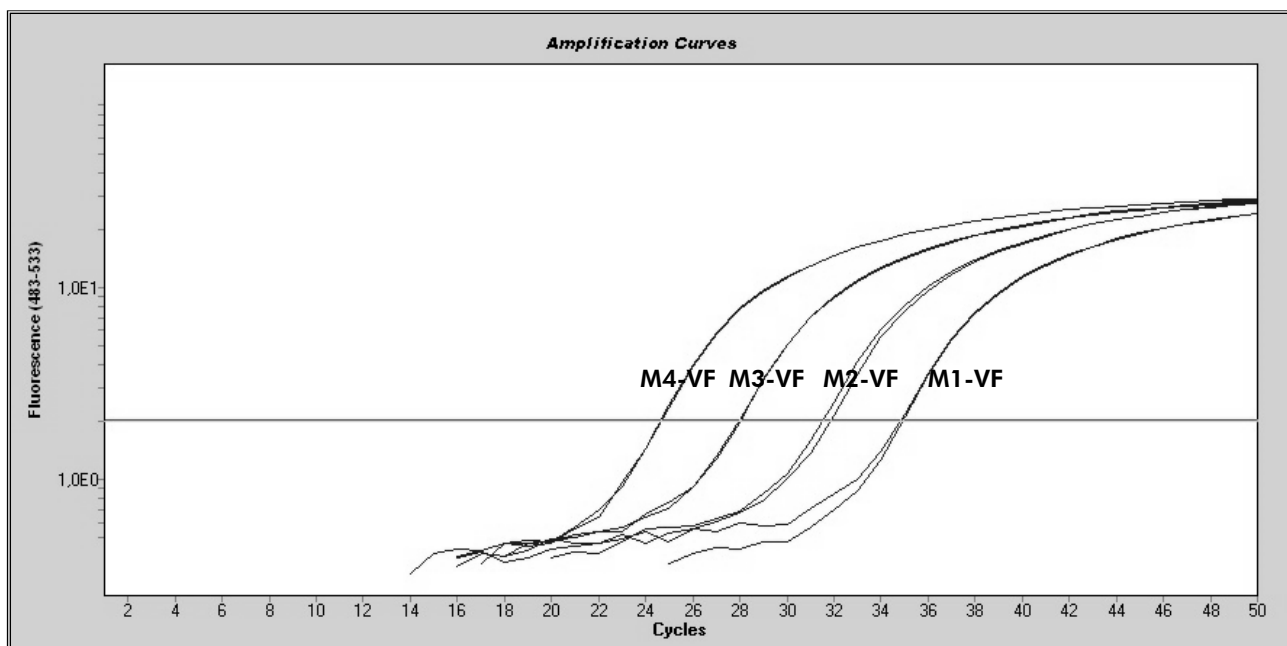
**Tabulka 15. Kvantitativní data pro standardy divokého typu a V617F**

Standardní	Počet kopií (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

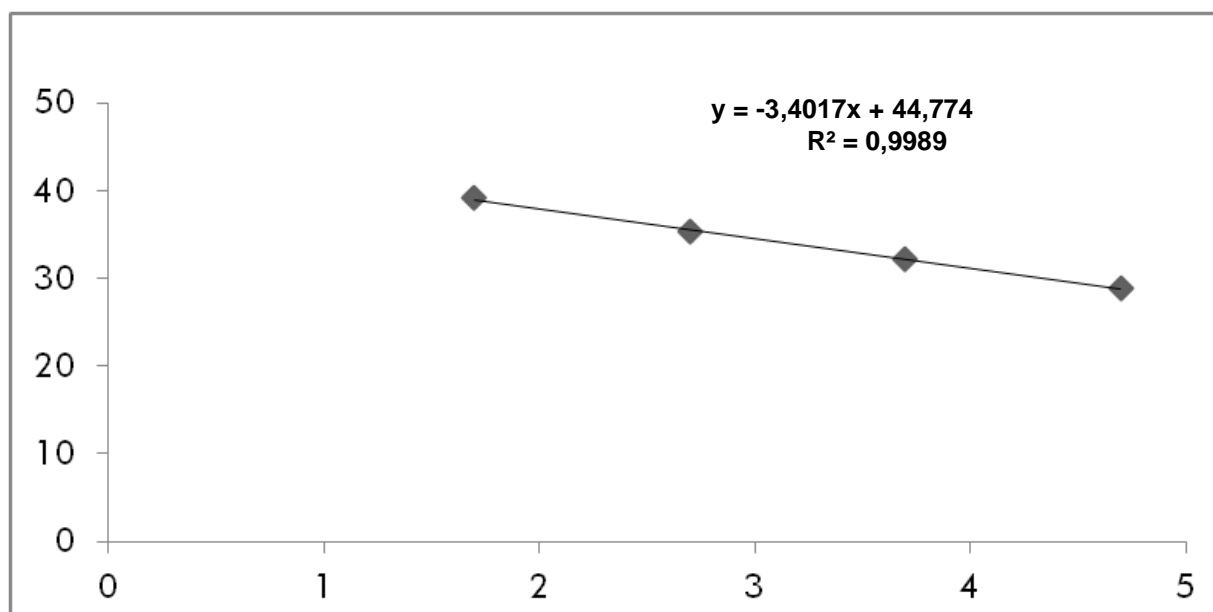
**Poznámka:** Každý uživatel by měl měřit vlastní reprodukovatelnost ve své laboratoři.

## Standardní křivka a kritéria kvality

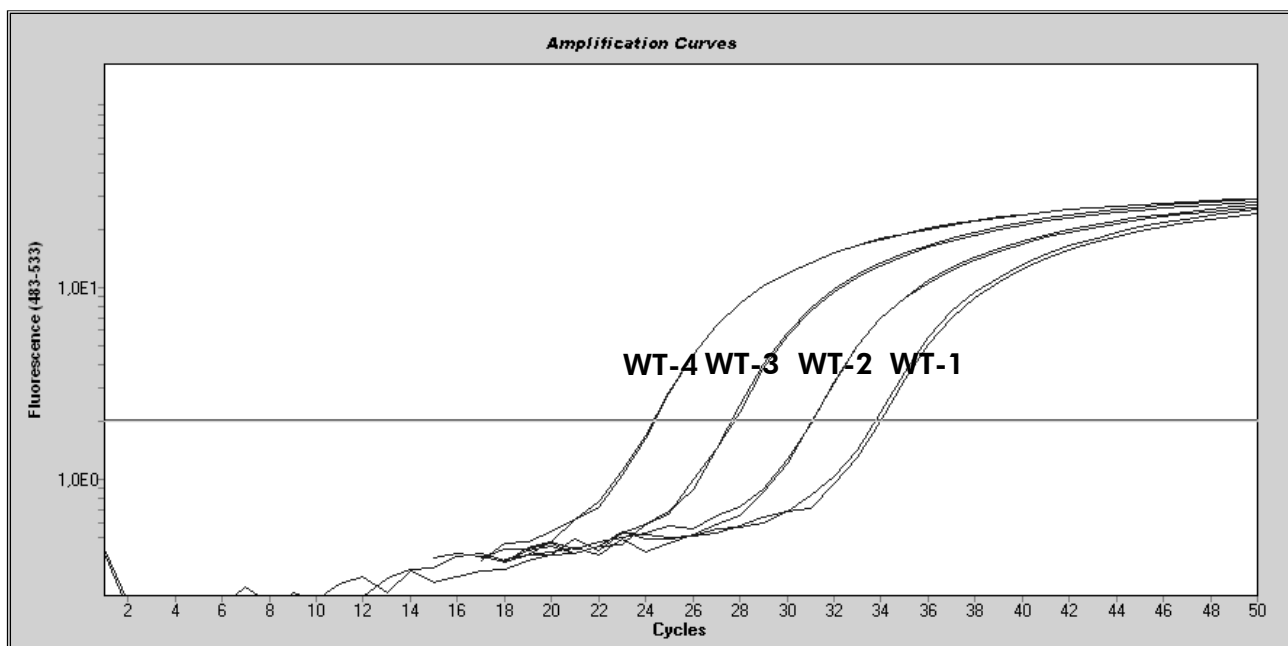
Obrázky 7 a 9 ukazují příklady výsledků získaných pomocí sady *ipsogen* JAK2 MutaQuant a obrázky 8 a 10 ukazují příklad teoretické křivky vypočítané na 4 standardních ředěních.



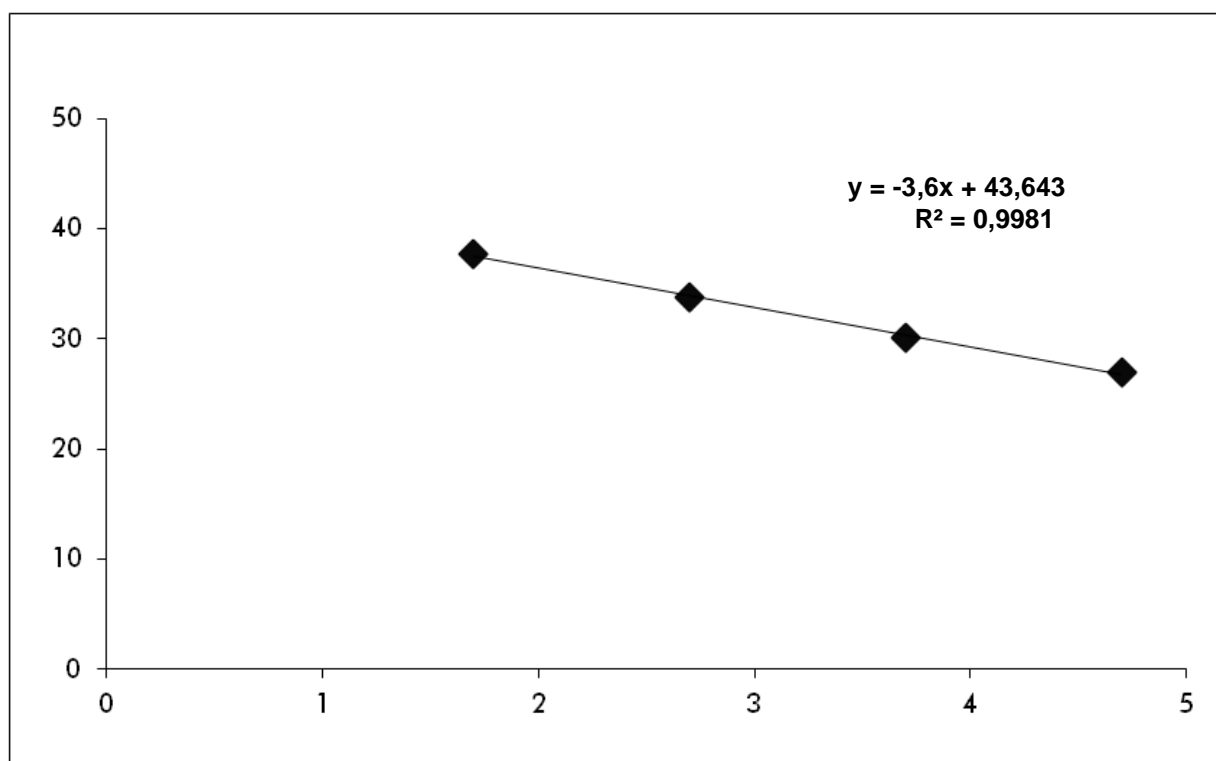
Obrázek 7. Vynesení amplifikace kopií  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  plasmidů JAK2 V617F (kontroly M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF pro příslušné kopie).



Obrázek 8. Standardní křivka JAK2 V617F.



Obrázek 9. Vynesení amplifikace kopií  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  plasmidů divokého typu JAK2 (kontroly WT-1, WT-2, WT-3 a WT-4 pro příslušné kopie).



Obrázek 10. Standardní křivka pro divoký typ JAK2.

Jako standardy slouží 10násobná ředění, teoretický sklon křivky je -3,32. Sklon od -3,0 do -3,9 je přijatelný, pokud je  $R^2 > 0,95$  (12). Ovšem hodnota  $R^2 > 0,98$  je žádoucí pro přesné výsledky (13).



Rovnice standardní křivky lze poté použít k výpočtu V617F a počtu kopií WT  $\log_{10}$  v neznámých vzorcích.

Rovnice standardní křivky V617F by se měla používat k převodu surových průměrů hodnoty  $C_P/ C_T$  (získáno pomocí PPM-VF) pro neznámé a kontrolní vzorky na počet kopií JAK2 V617F ( $CN_{V617F}$ ).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Průměr } C_{pV617F} - \text{Průsečík standardní křivky}_{V617F})}{\text{Sklon standardní křivky}_{V617F}}$$

Rovnice standardní křivky divokého typu by se měla používat k převodu surových průměrných hodnot  $C_P/ C_T$  (získáno pomocí PPM-VF) pro neznámé a kontrolní vzorky na počet kopií JAK2 divokého typu ( $CN_{WT}$ ).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Průměr } C_{pWT} - \text{Průsečík standardní křivky}_{WT})}{\text{Sklon standardní křivky}_{WT}}$$

### Vyjádření výsledků

Výsledky se vztahují k 25 ng celkové genomické DNA a měly by se vyjádřit jako procentuální podíl JAK2 V617F následovně:

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

### Reprodukovatelnost mezi replikáty

Získané údaje by měly být u duplikátů konzistentní.

### Pozitivní a negativní kontroly

Pozitivní kontrola nebo PC-VF by měla uvádět procentuální podíl JAK2 V617F, který je vyšší než 99,9 %.

Negativní kontrola nebo NC-VF by měla uvádět procentuální podíl JAK2 V617F, který je nižší než 0,1 %.

Pokud tyto kontroly nebudou fungovat správně, řešení naleznete v "Řešení problémů", strana 34.

## Kontroly vody

Negativní kontroly by měly uvádět nulovou CN jak pro detekci JAK2 V617F, tak divokého typu JAK2.

Pozitivní kontrola vody je výsledkem zkřížená kontaminace. Viz “Řešení problémů” níže, kde naleznete řešení.

## Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně informací a protokolu v tomto manuálu nebo přípravy vzorků a jejich technologií rozborů (možnosti navázání kontaktu viz “Kontaktní informace”, strana 43).

### Komentáře a návrhy

---

#### Standardní křivka pro divoký typ nebo V617F není lineární

Inverze lahvičky, inverze během distribuce, zkřížená kontaminace, částečná degradace standardu, reagensie RQPCR, nespecifická amplifikace nebo chyba programu PCR

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

Uchovávejte sadu *ipsogen* JAK2 MutaQuant při teplotě od -15 do -30°C a chraňte priméry a směsi sond před světlem. Viz “Uchovávání a nakládání s reagensiemi”, strana 13.

Chraňte před opakovaným zmražením nebo roztavením.

#### Pro jeden standard žádný nebo nízký signál

Standard se nedistribuuje nebo použijte stejnou směs PPM

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

Opakujte chod PCR.

## Komentáře a návrhy

---

### Negativní kontrola (H<sub>2</sub>O) je pozitivní

Zkřížená kontaminace, kontaminace reagensy, chyba přístroje, inverze jamky nebo kapiláry nebo degradace sondy

Vyměňte všechny kritické reagensy.

Vždy nakládejte se vzorky, komponenty sady a spotřební materiály ve shodě s běžně přijatou praxí, aby se zabránilo kontaminaci přenosem.

Chraňte priméry a směsi sond před světlem.

Zkontrolujte, zda fluorescenční křivky nejsou falešně pozitivní.

### Nulový signál i u standardní kontroly

a) Byl vybrán nesprávný detekční kanál

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

b) Chyba pipetování nebo vynechané reagensy.

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

Opakujte chod PCR.

c) Žádný program pro snímání dat

Zkontrolujte program cyklu

Zkontrolujte režim snímání "Jednotlivý" na konci každého segmentu snímání programu PCR.

### Nepřítomný nebo nízký signál u vzorků, ale standardní kontroly jsou v pořádku.

Inhibiční účinky materiálu vzorku způsobené nedostatečným čištěním

Vždy před zahájením zkontroluje kvalitu DNA (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) a koncentraci.

Opakujte přípravu DNA.

### Intenzita fluorescence je příliš nízká

a) Nevhodné uchování komponent sady

Alikvotní reagensy pro uchování

Uchovávejte sadu *ipsogen* JAK2

*MutaQuant* při teplotě od -15

do -30°C a chraňte priméry a směsi

sond před světlem. Viz "Uchování a nakládání s reagensy", strana 13.

Chraňte před opakovaným zmražením nebo roztavením.

## Komentáře a návrhy

---

- b) Velmi nízké výchozí množství cílové DNA

Zkontrolujte množství DNA vzorku

**Poznámka:** V závislosti na zvolenou metodu přípravy DNA se mohou vyskytnout inhibiční účinky.

### Negativní kontroly jsou pozitivní

Přenosová kontaminace

Vyměňte všechny kritické reagenty.

Zopakujte experiment s novým alikvotními množstvími všech reagentů.

Vždy nakládejte se vzorky, komponenty sady a spotřební materiály ve shodě s běžně přijatou praxí, aby se zabránilo kontaminaci přenosem.

### Intenzita fluorescence se mění

- a) Chyba pipetování

Po tání proveďte vortexování a spin všech reagentů.

Proměnlivost LightCycler způsobená tzv. "chybou pipetování" lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.

- b) Nedostatečné odstředování desky, zkumavek nebo kapilár může způsobit přítomnost připravené směsi PCR v horní části kapiláry nebo může dojít k zachycení vzduchové bubliny v hrotu kapiláry

Vždy centrifugujte kapiláry na plněné reakční směsi, jak je to popsáno v konkrétní provozní příručce přístroje.

- c) Vnější povrch hrotu kapiláry je znečištěn

Při manipulaci s kapilárami vždy noste rukavice.

## Komentáře a návrhy

---

### Signál pozitivních kontrol divokého typu nebo V617F používejte reciproční PPM

Zkřížená kontaminace, kontaminace reagensy nebo inverze jamky či kapiláry

Vyměňte všechny kritické reagensy.

Zopakujte experiment s novými alikvotními množstvími všech reagensů.

Vždy nakládejte se vzorky, komponenty sady a spotřební materiály ve shodě s běžně přijatou praxí, aby se zabránilo kontaminaci přenosem.

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

### Invertovaná detekce pozitivní kontroly

Distribuovaná inverze PPM v jamce nebo kapiláře nebo v premixu

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

### Žádný signál pro jednu pozitivní kontrolu nebo obě

Vynechána kontrola PPM nebo DNA

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

### Vysoké pozadí

Bělení fluoroforem

Sondu chraňte před světlem.

### Špatná reprodukovatelnost u vzorků duplikátů

Chyba pipetování nebo zkřížená kontaminace

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

## Řízení jakosti

V souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobců společnosti QIAGEN je každá výrobní šarže souprav *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu. Certifikáty analýzy jsou k dispozici na požádání na stránkách [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Omezení

Uživatelé musí být školeni a obeznámeni s touto technologií před použitím tohoto zařízení. Tato sada by se měla použít podle následujících pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými přístroji “Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky”, strana 10.

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů. Uživatel odpovídá za validaci chování systému v souvislosti s jakýmikoliv postupy použitými v jeho laboratoři, které nejsou zahrnuty do studií chování QIAGEN.

Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagencie s prošlou trvanlivostí.

# Výkonnostní charakteristiky

## Neklinické studie

### Přesnost

Studie přesnosti byly provedeny pomocí 12 vzorků DNA extrahovaných z buněčných linií, které odpovídají odlišným zátěžím alely JAK2 V617F. Celkem bylo provedeno 80 měření u každého vzorku pomocí 3 odlišných šarží sady *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Tato studie přesnosti využívala systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR.

Analytická data jsou shrnuta do tabulky 15.

Tabulka 15. Vzorky DNA s údaji o přesnosti

Vzorek	Teoretický JAK2 V617F (%)	n*	Průměr (%)	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

\* Odlehlé hodnoty byly vyloučeny. Ty jsou definovány jako hodnoty menší než dolní kvartil méně trojnásobek mezikvartilového rozpětí nebo větší než horní kvartil plus trojnásobek mezikvartilového rozpětí na krabicovém grafu.

n = počet validovaných vzorků; CV = globální koeficient variace.

## Mez slepého pokusu a mez detekce

Byla stanovena úroveň pozadí nebo úroveň slepého pokusu (LOB) na negativních vzorků (8 vzorků, 76 měření). Tato hodnota byla stanovena jako 0,014 %.

Mez detekce (LOD) byla stanovena pomocí vzorků, o nichž se ví, že jsou pozitivní, ale mají nízkou expresi (7 vzorků, 68 měření). Byla stanovena jako 0,061 % s horní mezí intervalu 90 % spolehlivosti 0,091 %.

Tuto optimální citlivost lze získat u vzorků obsahujících nejméně 10 000 kopií genu JAK2 (divoký typ nebo mutace V617F).

Data kvantifikace je nutné hlásit následujícím způsobem.

- JAK2 V617F  $\leq$  0,014 % lze interpretovat tak, že mutace JAK2 V617F nebyla detekována.
- Pokud je JAK2 V617F  $>$  0,014 %, ale  $<$  0,091 %, pak to lze interpretovat jako nejednoznačný výsledek.
- JAK2 V617F  $\geq$  0,091 % lze interpretovat jako pozitivní výsledek a že mutace JAK2 V617F byla detekována.

## Linearita

Studie linearity byly provedeny na 12 vzorcích, kdy každý byl získán z odlišné směsi DNA extrahované z buněčných linií, které byly pozitivní a negativní pro mutaci JAK2 V617F. Každý vzorek byl testován 5krát. Data z této studie ukázala, že sada *ipsogen* JAK2 MutaQuant poskytuje lineární výsledky v dynamickém rozsahu.

## Klinické studie

DNA byla extrahována z krve nebo kostní dřeně u vzorků 87 pacientů a analyzována pomocí sady *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Kromě toho byl kvantifikován procentuální podíl mutací JAK2 V617F a porovnán s výsledky testů screeningu získaných pomocí sady *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ (katalogové číslo 673223). Získaná data jsou uvedena v tabulce 16.



**Tabulka 16. Tabulka nepředvídaných událostí ukazuje shodu mezi výsledky získanými sadou *ipsogen* JAK2 MutaQuant a sadou *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ**











		Výsledky sady <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ			
		Detekována mutace	Nejednoznačný výsledek	Nedetekována mutace	n
Výsledky sady <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant	Detekována mutace	40	2	7	49
	Nejednoznačný výsledek	0	0	21	21
	Nedetekována mutace	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Pozitivní shoda	100 % (95 % interval spolehlivosti: 91 %, 100 %)				
Negativní shoda	71 % (95 % interval spolehlivosti: 51 %, 85 %)				
Celková shoda	89 % (95 % interval spolehlivosti: 79 %, 95 %)				

## Literatura

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

Na obalech a štítcích se mohou objevit následující symboly:

	Obsahuje reagenty pro <N> reakcí
	Použijte do
	Prostředky zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Další informace viz návod k použití

## Kontaktní informace

Pro technickou podporu a více informací navštivte náš technický servis na [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), zavolejte 00800-22-44-6000 nebo kontaktujte Vašeho místního distributora (viz zadní strana nebo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Pro 12 reakcí: Kontrola genu divokého typu JAK2, gen kontroly JAK2 V617F, priméry a směs sond PPM-WT, priméry a směs sondy PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Pro 24 reakcí: Kontrola genu divokého typu JAK2, gen kontroly JAK2 V617F, priméry a směs sond PPM-WT, priméry a směs sondy PPM-VF	673523
<b>Rotor-Gene Q MDx - pro analýzu PCR v reálném čase validované IVD v klinických aplikacích</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklovač PCR v reálném čase a analyzátor taveniny s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, nachový) plus kanál HRM, laptop, software, příslušenství, 1letá záruka na díly a práci, instalace a školení není zahrnuto	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklér a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt - HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus HRM kanál, notebook počítač, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002033

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro. Produkty *ipsogen* se nesmí dále prodávat, upravovat pro další prodej nebo používat k výrobě komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti QIAGEN.

Informace v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího oznámení. QIAGEN nepřebírá žádnou odpovědnost za žádné chyby, které se mohou v tomto dokumentu objevit. Má se za to, že tento dokument je v době zveřejnění úplný a přesný. V žádném případě nebude QIAGEN odpovídat za náhodné, zvláštní, násobné nebo následné škody související s používáním tohoto dokumentu nebo z něho vyplývajících.

Produkty *ipsogen* mají záruku na dodržení pro ně stanovených technických parametrů. Výlučný závazek QIAGEN a výlučný opravný prostředek zákazníka se omezuje na náhradu výrobků zdarma v případě, že se výrobky nebudou chovat podle záruky.

Mutace JAK2 V617F a její použití je chráněno patentovými právy včetně Evropského patentu EP1692281, patentů USA 7,429,456 a 7,781,199, patentových přihlášek USA US20090162849 a US20120066776 a zahraničními ekvivalenty.

Nákup tohoto výrobku nepřináší žádné právo na jeho použití pro klinická hodnocení s léky zaměřenými na JAK2V617F. Pro taková použití QIAGEN vyvíjí specifické licenční programy. Kontaktujte naše právní oddělení emailem [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).

### Omezená licenční smlouva

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* souhlas s následujícími podmínkami:

1. Sada *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* smí být používána výhradně v souladu s *Příručkou sady ipsogen JAK2 MutaQuant* a pouze s komponenty obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponent sady s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v *Příručce sady ipsogen JAK2 MutaQuant* a dodatečných protokolech dostupných na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její díly jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracována ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může zákazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

---

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

