



Augustus 2016

Handleiding *ipsogen*[®] JAK2 Muta *Quant*[®] Kit

 12 (catalogusnr. 673522)

 24 (catalogusnr. 673523)

Versie 1

IVD

Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met instrumenten van RotorGene[®] Q,
ABI PRISM[®] 7900HT SDS, Applied Biosystem[®] 7500 realtime
PCRstelsel en LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DUITSLAND

R3

MAT

1072501NL



Sample & Assay Technologies

QIAGEN monster - en assaytechnologieën

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN is toonaangevend op het gebied van :

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek naar microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Het is onze missie om ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken behaalt. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoud

Beoogd gebruik	4
Samenvatting en uitleg	4
Uitgangspunt van de procedure	6
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit	9
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	10
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	11
Algemene voorzorgsmaatregelen	11
Opslag en verwerking reagentia	12
Procedure	13
Bereiding monster-DNA	13
Protocols	
■ Protocol: qPCR in Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes	14
■ Protocol: qPCR in een ABI PRISM 7900HT SDS-, Applied Biosystems 7500 realtime PCR System- of LightCycler 480-instrument	19
■ Protocol: qPCR in een LightCycler 1.2-instrument	25
Interpretatie van de resultaten	30
Problemen oplossen	34
Kwaliteitscontrole	38
Beperkingen	38
Prestatiekenmerken	39
Niet-klinische onderzoeken	39
Klinische onderzoeken	40
Referenties	42
Symbolen	43
Contactgegevens	43
Bestelgegevens	44

Beoogd gebruik

De *ipsogen*JAK2 Muta *Quant* Kit is een kwantitatieve in-vitrotest die is bedoeld voor de detectie van JAK2 V617F/G1849T-allel in genomisch DNA dat is geëxtraheerd uit perifere bloed van proefpersonen met verdenking van myeloproliferatieve neoplasmata (MPN).

De afwezigheid van JAK2 V617F/G1849T-mutatie sluit de aanwezigheid van andere JAK2-mutaties niet uit. Als er extra mutaties voorkomen in de nucleotiden 88504 tot 88622, kunnen de testresultaten vals negatief zijn (1).

Opmerking: De kit moet worden gebruikt conform de instructies in deze handleiding en in combinatie met gevalideerde reagentia en instrumenten. Bij afwijkend gebruik van dit product en/of aanpassing van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Samenvatting en uitleg

In 2005 (2–5) werd een terugkerende somatische mutatie ontdekt, V617F, die invloed heeft op het Janus-tyrosinekinase 2-gen (JAK2). Dit leidde tot een belangrijke doorbraak in het begrijpen, classificeren en diagnosticeren van myeloproliferatieve neoplasmata (MPN). JAK2 is een cruciaal intracellulair signaalmolecuul voor een aantal cytokinen, waaronder erythropoëtiene.

De JAK2 V617F-mutatie is gedetecteerd bij > 95% van de patiënten met polycythaemia vera (PV), 50–60% van de patiënten met essentiële trombocytomie (ET) en 50% van de patiënten met primaire myelofibrose (PMF). JAK2 V617F is ook gedetecteerd bij enkele zeldzame gevallen van chronische myelomonocytaire leukemie, myelodysplastisch syndroom, systemische mastocytose en chronische neutrofiele leukemie, maar bij 0% van de patiënten met CML (6).

De mutatie komt overeen met een enkele nucleotideverandering van JAK2-nucleotide 1849 in exon 14, wat resulteert in een unieke substitutie van valine (V) naar fenylalanine (F) op positie 617 van de proteïne (JH2-domein). Dit leidt tot constitutieve activatie van JAK2, hematopoëtische transformatie in vitro en erythropoëtieneafhankelijke erythroïde koloniegroei (erythropoëtiene-independent erythroid colony, EEC) bij alle patiënten met PV en een groot deel van de patiënten met ET en PMF (7). JAK2 V617F vertegenwoordigt een belangrijke factor van de transformatie van hematopoëtische cellen in MPN, maar de exacte pathologische mechanismen met dezelfde unieke mutatie die leiden tot dergelijke verschillende klinische en biologische entiteiten, zijn nog niet volledig verklaard.

Traditioneel werd de diagnose MPN gebaseerd op klinische beenmerghistologie en cytogenetische criteria. De ontdekking van een ziektespecifieke moleculaire merker heeft geleid tot een vereenvoudiging van het proces en toegenomen diagnostische nauwkeurigheid. Detectie van de JAK2 V617F-mutatie maakt nu deel uit van de referentiecriteriën die de WHO in 2008 heeft gesteld voor de diagnose van BCR-ABL-negatieve MPN (tabel 1). De aanwezigheid van deze mutatie is een belangrijk criterium voor bevestiging van de diagnose.

Tabel 1. WHO-criteria voor de diagnose van MPN (aangepast van referentie 8)

Criteria voor een diagnose polycythaemia vera (PV)	
Primair	<p>1. Hemoglobine (Hb) > 18,5 g/dl⁻¹ (mannen) of > 16,5 g/dl⁻¹ (vrouwen) of Hb of hematocriet (Hct) > 99e percentiel van het referentiebereik voor leeftijd, geslacht of hoogte van leefomgeving; of Hb > 17 g/dl⁻¹ (mannen) of > 15 g/dl⁻¹ (vrouwen) indien verband houdend met een aanhoudende toename van ≥ 2 g/dl⁻¹ ten opzichte van het basisniveau die niet kan worden toegeschreven aan het wegnemen van een ijzertekort; of Rodebloedcellenmassa van > 25% boven de gemiddelde normale voorspelde waarde</p> <p>2. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of soortgelijke mutatie</p>
Secundair	<p>1. Myeloproliferatie van drie cellijnen van beenmerg 2. Subnormaal erytropoëtienegehalte in serum 3. Groei endogene erytroïde kolonie (EEC)</p>
Criteria voor een diagnose van essentiële trombocytemie (ET)	
Primair	<p>1. Aantal bloedplaatjes $\geq 450 \times 10^9$ l⁻¹ 2. Proliferatie van megakaryocyten met grote en ontwikkelde morfologie. Geen of weinig proliferatie van granulocyten of erytroïde proliferatie 3. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor chronische myelomonocytaire leukemie (CML), PV, primaire myelofibrose (PMF), myelodysplastisch syndroom (MDS) of ander myeloproliferatief neoplasma.</p> <p>4. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of andere klonale merker; of Geen tekenen van reactieve trombocytose</p>
Secundair	-
Criteria voor een diagnose van primaire myelofibrose (PMF)	
Primair	<p>1. Proliferatie van megakaryocyten en atypie in combinatie met ofwel reticuline- en/of collageenfibrose; of Indien er geen sprake is van reticulinefibrose, dient de verandering in megakaryocyten gepaard te gaan met een toegenomen cellulariteit van het beenmerg, proliferatie van granulocyten en dikwijls verminderde erytropoëse (d.w.z. prefibrotische PMF) 2. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor (CML), PV, MDS of ander myeloproliferatief neoplasma</p> <p>3. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of andere klonale merker; of Geen tekenen van reactieve beenmergfibrose</p>
Secundair	<p>1. Leuko-erytroblastose 2. Toename van lactaatdehydrogenase (LDH) in serum 3. Anemie 4. Palpabele splenomegalie</p>

Internationale experts hebben onlangs criteria voorgesteld voor therapeutische tests bij PV en ET. Op basis van gegevens van transplantaat, interferon alfa of hydroxyurea is JAK2 V617F-kwantificatie toegevoegd als mogelijk bruikbaar hulpmiddel voor het beoordelen van de respons op de behandeling (9). Tijdens klinische ontwikkeling werd een daling waargenomen van JAK2 V617F-last als reactie op een aantal van de nieuwe geneesmiddelen tegen JAK2 (10).

Uitgangspunt van de procedure

Er zijn verschillende technieken voorgesteld voor het kwantitatief vaststellen van de proportie van enkelvoudige nucleotidepolymorfismen (single nucleotide polymorphisms, SNP's) in DNA-monsters. Methoden op basis van de realtime kwantitatieve polymerasekettingreactie (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) genieten de voorkeur vanwege hun grotere gevoeligheid, waardoor de allelast longitudinaal kan worden beoordeeld. Veel van deze technieken hebben een matige gevoeligheid van 1-10%, zoals TaqMan[®]-alleldiscriminatie, Pyrosequencing[®], smeltcurveassays en directe sequentiëring. Een aantal van deze technieken, zoals smeltcurven en sequentiëring, zijn alleen semikwantitatief terwijl voor andere technieken, zoals Pyrosequencing, verwerking na PCR of niet vrij beschikbare instrumentatie nodig is of waarvan de opstartkosten voor routinematige laboratoriumonderzoeken buitensporig hoog zijn. Voor een hoogsensitieve benadering met een gevoeligheid van < 0,1% moet gebruik worden gemaakt van een speciaal voor SNP bestemde primer, waarmee selectieve amplificatie van het mutant-allel of wildtype-allel mogelijk is. Dit allel is eenvoudig te detecteren met een instrument voor realtime qPCR. De *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit is op deze techniek gebaseerd.

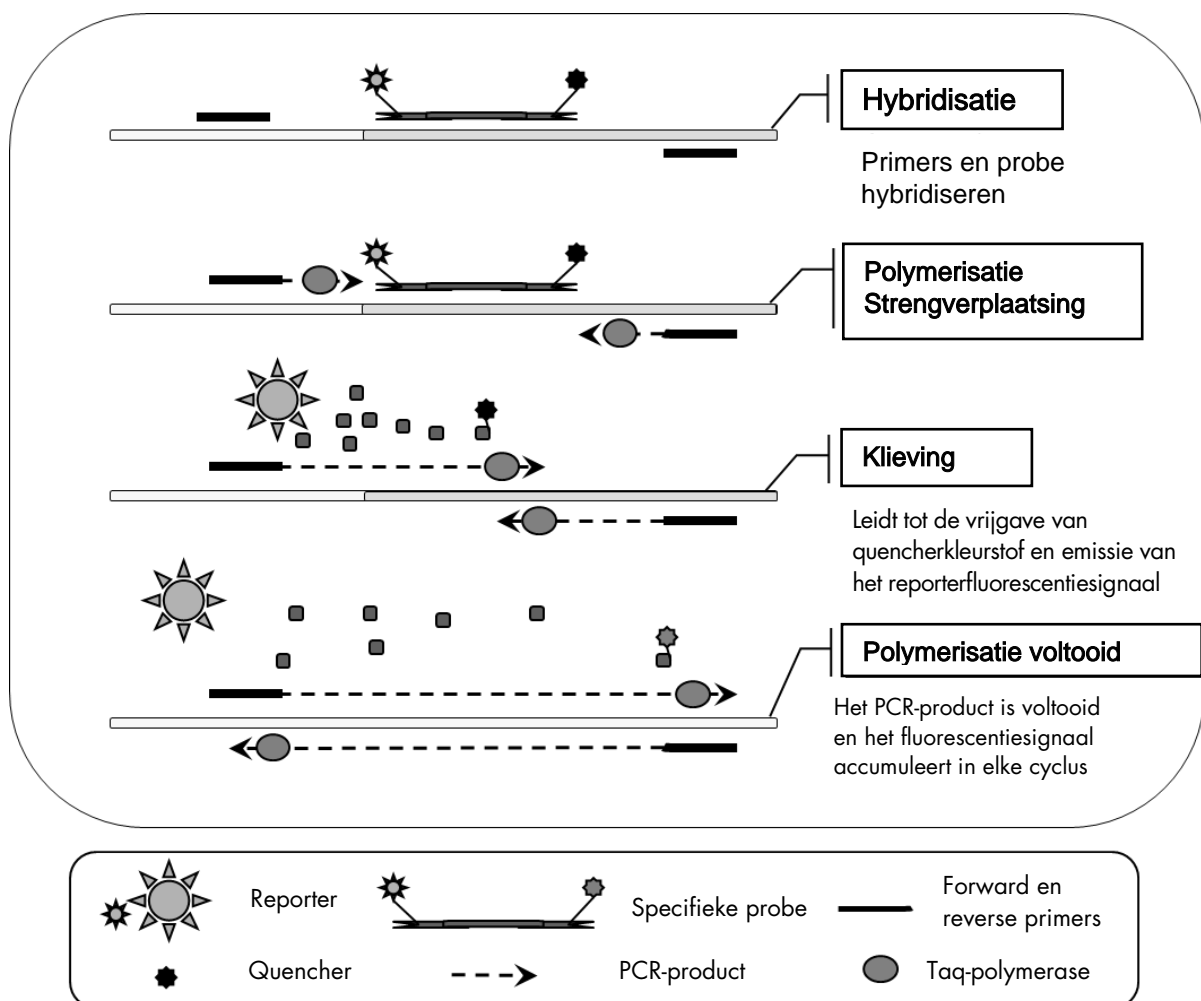
Met qPCR is accurate kwantificatie van PCR-producten mogelijk gedurende de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces. Kwantitatieve PCR-gegevens kunnen snel worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij realtime detectie van fluorescente signalen tijdens en/of na de PCR-cyclus. Zo wordt het risico van contaminatie van het PCR-product drastisch verminderd. Er zijn momenteel 3 hoofdtypen qPCR-technieken beschikbaar: qPCR-analyse met SYBR[®] Green I-kleurstof, qPCR-analyse met hydrolyseprobes en qPCR-analyse met hybridisatieprobes.

Bij deze assay wordt het qPCR-principe van oligonucleotidehydrolyse met twee kleurstoffen benut. Gedurende de PCR worden forward en reverse primers gehybridiseerd volgens een specifieke sequentie. Hetzelfde mengsel bevat een oligonucleotide met twee kleurstoffen. Deze probe, die bestaat uit een oligonucleotide dat is gemerkt met een 5'-reporterkleurstof en een downstream 3'-quencher met kleurstof, hybridiseert tot een doelsequentie in het PCR-product. Bij de qPCR-analyse met hydrolyseprobes wordt gebruikgemaakt van de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase van *Thermus aquaticus* (*Taq*). Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterkleurstof ten

opzichte van de quencherkleurstof in suppressie van de reporterfluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht.

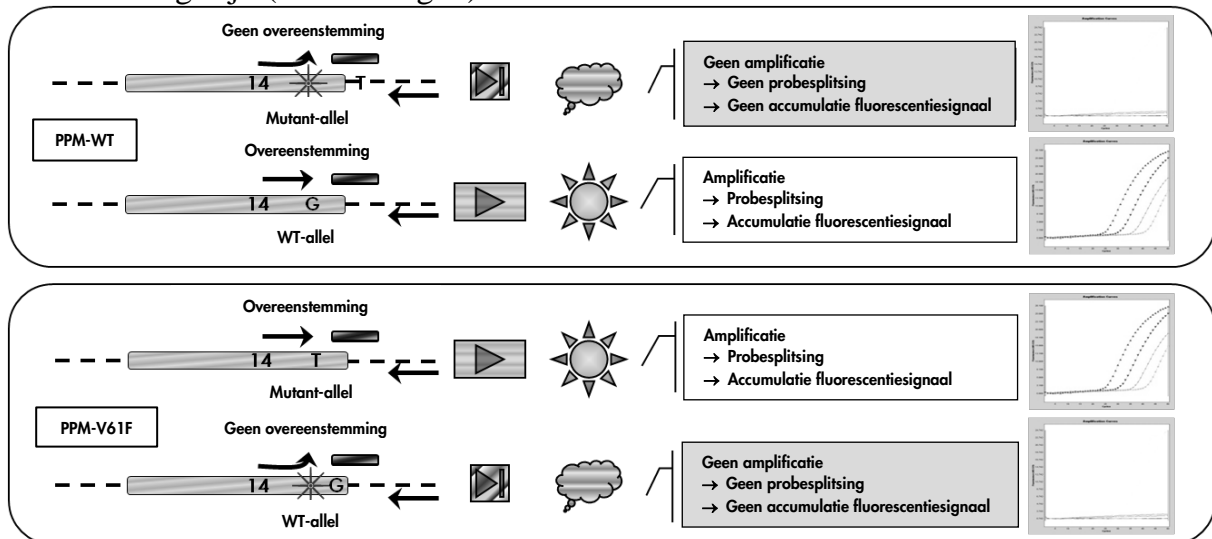
Als het gewenste doel tijdens de PCR aanwezig is, hybridiseert de probe zich vooral tussen de plekken met forward en reverse primer. Door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase wordt de probe alleen tussen de reporter en quencher gespleten als de probe aan het doel hybridiseert. De probefragmenten worden vervolgens verplaatst van het doel en polymerisatie van de streng gaat verder. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (afbeelding 1). Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet.

De toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is aan de probe en zodoende tijdens de PCR wordt geamplificeerd. Vanwege deze vereisten wordt niet-specifieke amplificatie niet gedetecteerd. De fluorescentietoename is daarom direct proportioneel aan de doelamplificatie gedurende de PCR.



Afbeelding 1. Reactieprincipe.

De kwantitatieve allelspecifieke PCR-technologie die in deze assaykit wordt gebruikt, maakt gevoelige, accurate en in grote mate reproduceerbare detectie van SNP's mogelijk. Deze techniek is gebaseerd op het gebruik van specifieke forward primers voor het wildtype- en V617F-allel (11). Alleen bij perfecte overeenstemming van de primer en het doel-DNA is extensie en amplificatie in de PCR mogelijk (afbeelding 2).



Afbeelding 2. Allelspecifieke PCR. Door het mengsel van wildtype- of V617F-primers en een probe is specifieke detectie mogelijk van het wildtype-allel of mutant-allel in twee afzonderlijke reacties die met hetzelfde monster plaatsvinden. Resultaten kunnen worden uitgedrukt als percentage van het aantal VF-kopieën in het totaal aantal JAK2-kopieën.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>ipsogen JAK2 Muta Quant Kit</i>		(12)	(24)
Catalogusnr.		673522	673523
Aantal reacties		12	24
V617F positive control (positieve controle) (100% V617F-allel)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (negatieve controle) (100% wildtype-allel)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (M1-VF standaard verdunning, 50 kopieën) (5×10^1 V617F-kopieën/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (M2-VF standaard verdunning, 500 kopieën) (5×10^2 V617F-kopieën/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5000 copies (M3- VF standaard verdunning, 5000 kopieën) (5×10^3 V617F-kopieën/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF standaard verdunning, 50.000 kopieën (5×10^4 V617F- kopieën/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (WT-1 standaard verdunning, 50 kopieën) (5×10^1 wildtype-kopieën/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (WT-2 standaard verdunning, 500 kopieën) (5×10^2 wildtype-kopieën/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution, 5000 copies (WT-3 standaard verdunning, 5000 kopieën) (5×10^3 wildtype-kopieën/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution, 50,000 copies (WT- 4 standaard verdunning, 50.000 kopieën) (5×10^4 wildtype-kopieën/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix (Mengsel van primers en probe) JAK2 WT*	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix (Mengsel van primers en probe) JAK2 V617F†	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
<i>ipsogen JAK2 Muta Quant Kit Handbook</i> (English) (Handleiding <i>ipsogen JAK2 Muta Quant Kit</i> [Engels])		1	1

* Mengsel van een bepaalde reverse en forward primer voor het wildtype JAK2-controlegen, plus een FAMTM-TAMRATM-specifieke probe.

† Mengsel van een bepaalde reverse en forward primer voor de JAK2 V617F-mutatie, plus een FAM-TAMRA-specifieke probe.

Opmerking: Vortex en centrifugeer de standaardverduunningen en het primer-probemengsel kort voor gebruik.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (safety data sheets, SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Reagentia

- Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit
- Buffer en *Taq*DNA-polymerase: De gevalideerde reagentia zijn TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, cat.nr. 4304437) en LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat.nr. 04535286001) of LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, cat. nr. 03515567001)

Verbruiksartikelen

- Nuclease-free aerosol-resistant sterile PCR pipet tips with hydrophobic filters (nucleasevrije, aerosol-resistente, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters)
- Nucleasevrije PCR-buisjes van 0,5 ml of 1,5 ml
- Ijs

Apparaat

- Microliterpipet* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Tafelcentrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 0,5 ml/1,5 ml en microtiterplaten (die snelheden van 13.000–14.000 tpm kan halen)
- Realtime PCR-instrument:* Rotor-Gene Q 5plex HRM of een ander instrument van Rotor-Gene; LightCycler 1.2 of 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 realtime PCR System; en de materialen die daarbij horen
- Biofotometer

*Zorg ervoor dat de instrumenten volgens de aanbevelingen van de fabrikant zijn gecontroleerd en gekalibreerd.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen. Deze zijn als handige, compacte PDF-bestanden online beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook het VIB voor elke QIAGEN-kit en elke component van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

Gooi monster- en assayafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor het gebruik van qPCRtesten zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die gelden voor moleculaire biologie en die voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn gevalideerd voor optimale prestaties. Verdere verdunning van de reagentia of het hanteren van andere incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve of tegenstrijdige gegevens. PPI-WT- en PPMVF-reagentia kunnen veranderen bij blootstelling aan licht. Alle reagentia zijn specifiek samengesteld voor gebruik met deze test. Voor een optimale werking van de test mogen er geen vervangende materialen worden gebruikt.

Wees zorgvuldig ter voorkoming van:

- contaminatie door DNase die kan leiden tot degradatie van het template-DNA
- contaminatie door achtergebleven DNA- of PCR-materiaal, wat resulteert in een vals positief signaal

Wij adviseren u daarom het volgende:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosol-resistente pipettips ter voorkoming van kruiscontaminatie van de monsters en reagentia.
- Bereid voorafgaand aan PCR een mastermengsel met behulp van speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips etc.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmiden of PCR-producten) worden verwerkt. Voeg de template toe in een afzonderlijke zone (bij voorkeur in een andere ruimte) met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).

Opslag en verwerking reagentia

De kits worden op droog ijs verzonden en moeten na ontvangst bij -15 °C tot -30 °C worden bewaard.

- Stel de primer-probemengsels (PPM-WT en PPM-VF-buisjes) niet te veel bloot aan licht.
- Meng en centrifugeer de buisjes voorzichtig voordat u ze opent.
- Bewaar alle kitcomponenten in de originele verpakking.

Deze opslagomstandigheden gelden voor zowel geopende als ongeopende componenten. Componenten die onder andere omstandigheden dan de op de etiketten vermelde omstandigheden worden bewaard, werken mogelijk niet naar behoren en kunnen de assayresultaten negatief beïnvloeden.

De vervaldatum van de verschillende reagentia staan vermeld op de etiketten van de afzonderlijke componenten. Onder de juiste opslagcondities blijft de werking van het product optimaal tot aan de vervaldatum die op het etiket staat vermeld.

Er zijn geen duidelijke tekenen die duiden op instabiliteit van dit product. U moet echter wel gelijktijdig positieve en negatieve controles met onbekende monsters uitvoeren.

Procedure

Bereiding monster -DNA

Genomisch DNA moet worden verkregen uit volbloed, gezuiverde lymfocyten uit perifeer bloed of volbloed, polynucleaire cellen of granulocyten. Voor vergelijkbare resultaten adviseren wij om dezelfde cellulaire fractie en DNA extractiemethode te gebruiken. DNA-extractie kan worden uitgevoerd met behulp van een zelf ontwikkelde methode of een in de handel verkrijgbare kit.

De kwantiteit van DNA wordt bepaald door middel van het meten van de optische dichtheid (OD) van het monster bij 260 nm en de kwaliteit van DNA wordt bepaald door middel van spectrofotometrie of gelelektroforese*.

- De verhouding OD_{260}/OD_{280} moet 1,7–1,9 zijn. Kleinere verhoudingen kunnen duiden op proteïnecontaminatie of de aanwezigheid van organische chemicaliën.
- Met behulp van elektroforetische analyse van een agarosegel van 0,8–1,0% kan het geïsoleerde DNA worden gevisualiseerd als een duidelijke strook van ongeveer 20 kb (een lichte afwijking is acceptabel).

Het resulterende DNA moet worden verdund in 1x TE-buffer* tot een concentratie van 5 ng/ μ l bij een pH van 8,0 en kan maximaal 1 week worden bewaard bij + 4 tot + 8 °C of bij –20 °C als langdurige opslag noodzakelijk is.

De qPCR-reactie is geoptimaliseerd voor DNA-monsters met 25 ng gezuiverd genomisch DNA.

*Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Protocol: qPCR in Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

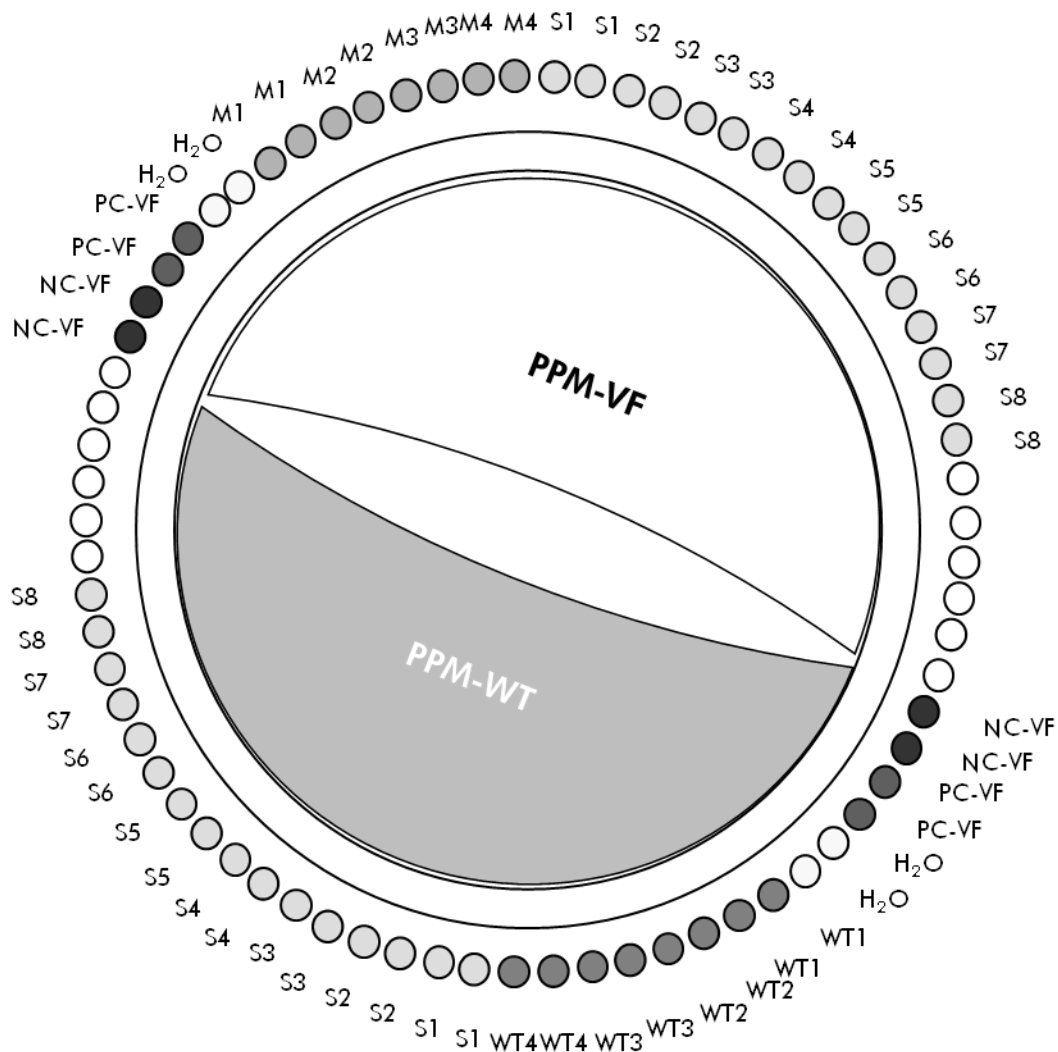
Wanneer u dit instrument gebruikt, adviseren we u alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 2.

Tabel 2. Aantal reacties in een Rotor-Gene Q-instrument met rotor voor 72 buisjes

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F-mengsel van primers en probe (PPM-VF)	
4 M-VF-standaarden	8 reacties, elke reactie tweemaal getest
n DNA-monsters	n x 2 reacties
2 DNA-controles	4 reacties: positive control (positieve controle) (PC-VF) en negative control (negatieve controle) (NC-VF), elke reactie tweemaal getest
Watercontrole	2 reacties
Met het JAK2-wildtypemengsel van primers en probe (PPM-WT)	
4 wildtypestandaarden	8 reacties, elke reactie tweemaal getest
n DNA-monsters	n x 2 reacties
2 DNA-controles	4 reacties: PC-VF en NC-VF, elke reactie tweemaal getest
Watercontrole	2 reacties

Monsterverwerking met Rotor-Gene Q-instrumenten met rotor voor 72 buisjes

Wij adviseren om in hetzelfde experiment ten minste acht DNA-monsters te testen met de kit voor 24 reacties (cat.nr. 673523) en ten minste zes DNA-monsters te testen met de kit voor 12 reacties (cat.nr. 673522) om het gebruik van de standaarden en de mengsels van primers en probe te optimaliseren.



Afbeelding 3. Aanbevolen rotorinstelling voor elk experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta Quant Kit voor 24 monsters. PC-VF: V617F positive control (positieve controle); NC-VF: V617F negative control (negatieve controle); M-VF: V617F standaarden; M-WT: wildtype standaarden; S: DNA-monster; H₂O: watercontrole.

Opmerking: Let erop dat u het monster dat u wilt testen altijd in buispositie 1 van de rotor plaatst. Als u dit niet doet, wordt er tijdens de kalibratiestap geen kalibratie uitgevoerd en worden er onjuiste fluorescentiegegevens verkregen.

Plaats lege buisjes in alle andere posities.

qPCR in Rotor-Gene Q-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 3 en 4 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPM-VF of PPM-WT). Het extra volume is opgenomen om eventuele pipetteerfouten te compenseren.

Tabel 3. Bereiding van het qPCR-mengsel

Bestanddeel	1 reactie (µl)	V617F-voormengsel 30 + 1 reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
TaqMan Universal PCR-mastermengsel, 2x	12,5	387,5	1×
Mengsel van primers en probe, PPM-VF 25x	1,0	31	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	6,5	201,5	–
Monster (toevoegen in stap 4)	5,0	5 elk	–
Totaal volume	25,0	25 elk	–

Tabel 4. Bereiding van het qPCR -mengsel

Bestanddeel	1 reactie (µl)	WT-voormengsel 30 + 1 reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
TaqMan Universal PCRmastermengsel, 2x	12,5	387,5	1x
Mengsel van primers en probe, PPMWT 25x	1,0	31	1x
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	6,5	201,5	–
Monster (toevoegen in stap 4)	5,0	5 elk	–
Totaal volume	25,0	25 elk	–

3. Schenk in ieder buisje 20 µl van het qPCR -voormengsel (VF or WT).
4. Breng 5 µl van het te kwantificeren materiaal (25 ng genomisch DNA -monster of controle) over naar het betreffende buisje (totaal volume 25 µl).
5. Meng de inhoud voorzichtig door op en neer te pipetteren.
6. Plaats de buisjes in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
7. Stel het Rotor -Gene Q -instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 5.

Tabel 5. Temperatuurprofiel

Analysemodus	Kwantificatie
Hold (Constant)	Temperatuur: 50 graden Tijd: 2 minuten
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min.
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 sec 62 °C gedurende 1 min. met acquisitie van FAM-fluorescentie in kanaal Groen: enkel

8. Selecteer bij Rotor-Gene Q-instrumenten 'Slope correct' (Hellingcorrectie) voor de analyse. We adviseren u de drempelwaarde in te stellen op 0,03. Start het in tabel 5 aangegeven thermocyclerprogramma.



Protocol: qPCR in een ABI PRISM 7900HT SDS -, Applied Biosystems 7500 realtime PCR System - of LightCycler 480 - instrument

Wanneer u een qPCRinstrument met een plaat voor 96 wells gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 6.

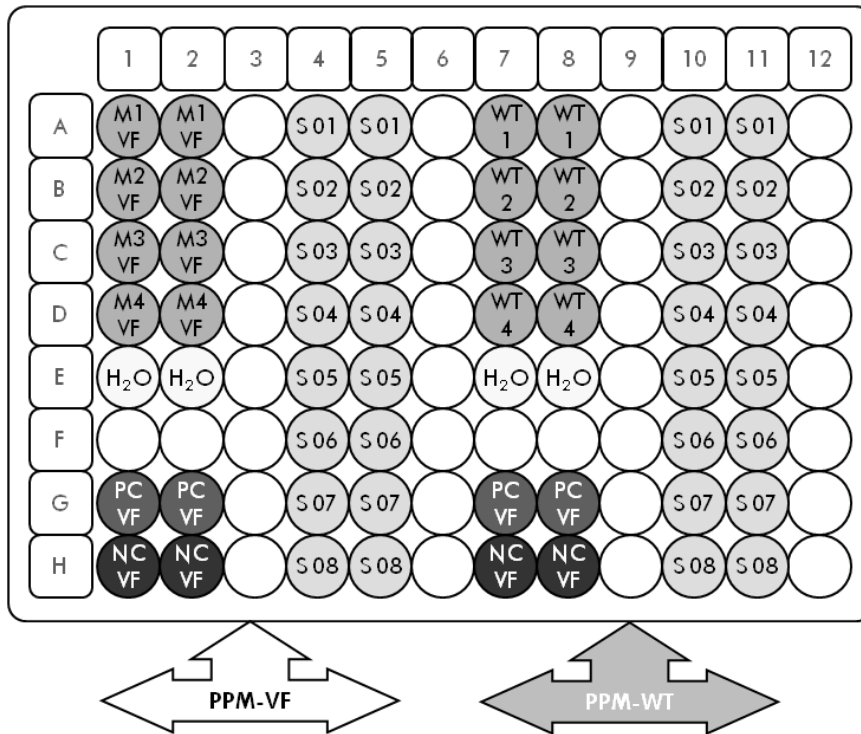
Tabel 6. Aantal reacties met qPCR -instrument met plaat voor 96 wells

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F -mengsel van primers en probe (PPM -VF)	
4 M-VF-standaarden	8 reacties, elke reactie tweemaal getest
n DNA-monsters	n x 2 reacties
2 DNA-controles	4 reacties: PGVF en NC-VF, elke reactie tweemaal getest
Watercontrole	2 reacties
Met het JAK2 -wildtypemengsel van primers en probe (PPM -WT)	
4 wildtypestandaarden	8 reacties, elke reactie tweemaal getest
n DNA-monsters	n x 2 reacties
2 DNA-controles	4 reacties: PGVF en NC-VF, elke reactie tweemaal getest
Watercontrole	2 reacties

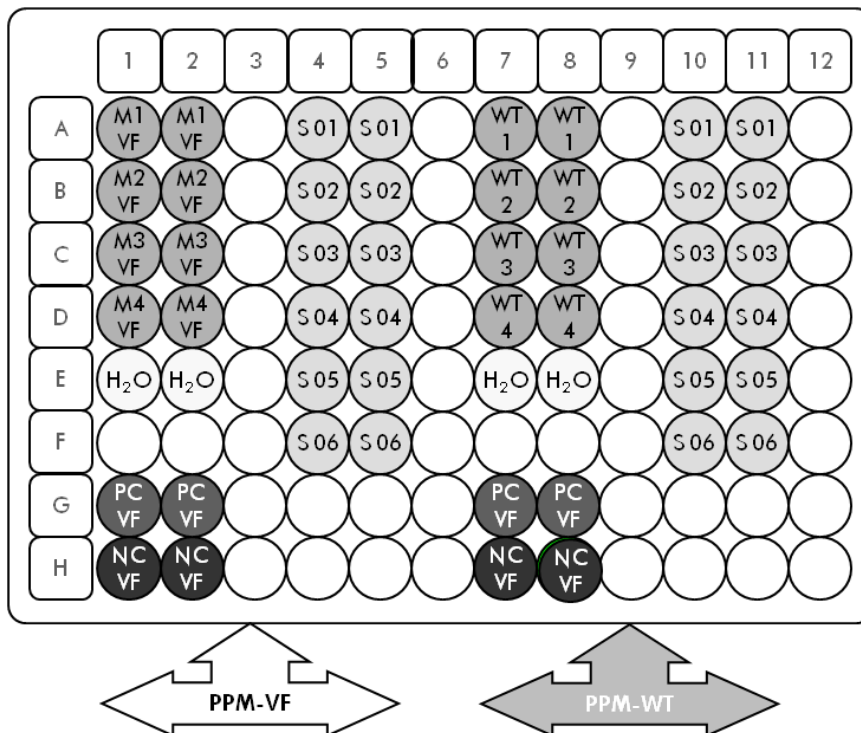
Monsterverwerking in een ABI PRISM 7900HT SDS -, Applied Biosystems 7500 realtime PCR System - of LightCycler 480 -instrument

Wij adviseren om in hetzelfde experiment acht DNA-monsters te testen met de kit voor 24 reacties (cat.nr. 673523) en ten minste zes DNA-monsters te testen met de kit voor 12 reacties (cat.nr. 673522) om het gebruik van de standaarden en de mengsels van primers en probe te optimaliseren.

In afbeelding 4 ziet u een voorbeeld van een dergelijk experiment met behulp van de kit voor 24 reacties (cat.nr. 673523) en in afbeelding 5 ziet u een voorbeeld van een dergelijk experiment met behulp van de kit voor 12 reacties (cat.nr. 673522).



Afbeelding 4. Aanbevolen opstelling van de plaat voor één experiment met behulp van de kit voor 24 reacties (cat.nr. 673523). PC-VF: V617F positive control (positieve controle); NC-VF: V617F negative control (negatieve controle); M-VF: V617F standaarden; M-WT: wildtype standaarden; S: DNA-monster; H₂O: watercontrole



Afbeelding 5. Aanbevolen opstelling van de plaat voor één experiment met behulp van de kit voor 12 reacties (cat.nr. 673522). PC-VF: V617F positive control (positieve controle); NC-VF: V617F negative control (negatieve controle); M-VF: V617F standaarden; M-WT: wildtype standaarden; S: DNA-monster; H₂O: watercontrole

qPCR in een ABI PRISM 7900HT SDS-, Applied Biosystems 7500 realtime PCR System- of LightCycler 480 -instrument

Opmerking : Voer alle stappen uit op ijs.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Bereid het volgende qPCR -mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties geldenvoor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 7 en 8 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPMVF of PPMWT). Het extra volume is opgenomen om eventuele pipetteerfouten te compenseren.

Tabel 7. Bereiding van het qPCR -mengsel

Bestanddeel	V617F-voormengsel			Uiteindelijke concentratie
	1 reactie (µl)	26 + 1 reacties (µl)	30 + 1 reacties (µl)	
TaqMan Universal PCR mastermengsel, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mengsel van primers en probe, PPMVF 25x	1,0	27	31	1x
Nucleasevrij water van PCR kwaliteit	6,5	175,5	201,5	–
Monster (toevoegen in stap 4)	5,0	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25,0	25 elk	25 elk	–

Tabel 8. Bereiding van het qPCR-mengsel

Bestanddeel	1 reactie (μ l)	WT-voormengsel		Uiteindelijke concentratie
		26 + 1 reacties (μ l)	30 + 1 reacties (μ l)	
TaqMan Universal PCR- mastermengsel, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mengsel van primers en probe, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Nucleasevrij water van PCR- kwaliteit	6,5	175,5	201,5	–
Monster (toevoegen in stap 4)	5,0	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25,0	25 elk	25 elk	–

3. Vul iedere well met 20 μ l qPCR-voormengsel (VF of WT).
4. Breng 5 μ l van het te kwantificeren materiaal (25 ng genomisch DNA-monster of controle) over naar de betreffende well (totaal volume 25 μ l).
5. Meng de inhoud voorzichtig door op en neer te pipetteren.
6. Sluit de plaat en centrifugeer kort (circa 10 seconden bij 300 *g*).
7. Leg de plaat in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
8. Programmeer de thermocycler met behulp van het thermocyclerprogramma en stel het instrument in voor de acquisitie van FAM -fluorescentie met dubbel gelabelde probe, zoals aangegeven in tabel 9 voor de ABI PRISM 7900HT SDS en het Applied Biosystems 7500 realtime PCR -systeem of in tabel 10 voor het LightCycler 480 -instrument.

Tabel 9. Temperatuurprofiel voor de ABI PRISM 7900HT SDS en het Applied Biosystems 7500 realtime PCR -systeem

Analysemodus	Standaardcurve– absolute kwantificering
Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 minuten
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 minuten
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 seconden 63 °C gedurende 1 minuut en 30 seconden met acquisitie van FAMfluorescentie; quencher: TAMRA

Tabel 10. Temperatuurprofiel van het LightCycler 480 -instrument

Analysemodus	Absolute kwantificering ('Abs Quant')
Detection formats (Detectievormen)	Selecteer 'Simple Probe' (Enkele probe) in het venster 'Detection formats' (Detectievormen)
Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 minuten
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 minuten
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 seconden 63 °C gedurende 1 minuut en 30 seconden met acquisitie van FAMfluorescentie overeenkomend met (483–533 nm) voor LC versie 01 en (465–510 nm) voor LC versie 02

- Volg stap 8a voor de ABI PRISM 7900HT en het Applied Biosystems 7500 realtime PCR -systeem. Volg stap 8b voor het LightCycler 480 -instrument.

- 9a. De ABI PRISM 7900HT en het Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem: We raden u aan de drempelwaarde in te stellen op 0,1. Start het in tabel 9 aangegeven cyclusprogramma.
- 9b. LightCycler 480: we adviseren een analysemodus met passende meetpunten met een achtergrond op 2,0 en een drempel op 2,0. Start het in tabel 10 aangegeven thermocyclerprogramma.

Protocol: qPCR in een LightCycler 1.2 -instrument

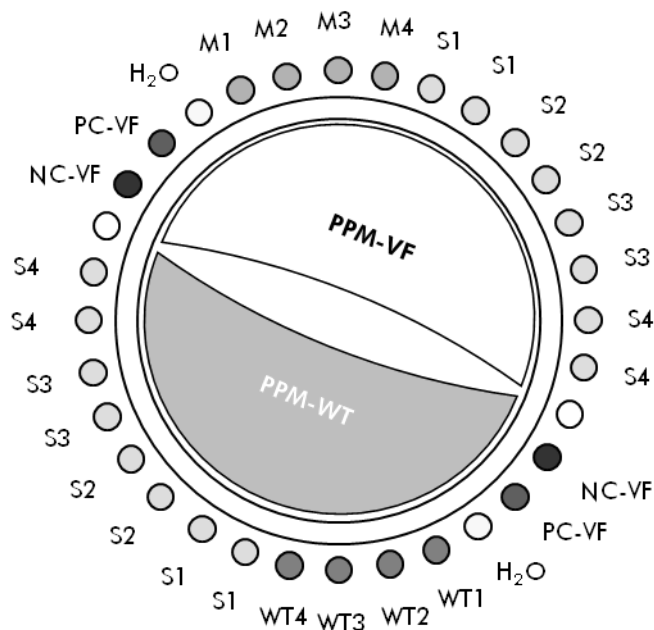
Wanneer u een instrument met capillaire buisjes gebruikt, raden we u aan de monsters tweemaal en de controles eenmaal te meten, zoals vermeld in tabel 11.

Tabel 11. Aantal reacties met een LightCycler 1.2 -instrument

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F -mengsel van primers en probe (PPM -VF)	
4 M-VF-standaarden	4 reacties, elke reactie eenmaal getest
n DNA-monsters	n x 2 reacties
2 DNA-controles	2 reacties: PGVF en NC-VF, elke reactie eenmaal getest
Watercontrole	1 reactie
Met het JAK2 -wildtypemengsel van primers en probe (PPM -WT)	
4 wildtypestandaarden	4 reacties, elke reactie eenmaal getest
n DNA-monsters	n x 2 reacties
2 DNA-controles	2 reacties: PGVF en NC-VF, elke reactie eenmaal getest
Watercontrole	1 reactie

Monsterverwerking in een LightCycler 1.2 -instrument

We raden u aan om vier DNA-monsters in dezelfde proef te testen om zo het gebruik van de standaarden en de primer-probemengsels te optimaliseren. In afbeelding 6 ziet u het schema van capillaire buisjes voor een dergelijke proef.



Afbeelding 6. Aanbevolen rotorinstelling voor elk experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit. PC-VF: V617F positive control (positieve controle); NC-VF: V617F negative control (negatieve controle); M-VF: V617F standaarden; M-WT: wildtype standaarden; S: DNA-monster; H₂O: watercontrole.

qPCR in LightCycler 1.2-instrument

Opmerking: Vanwege bepaalde technologische vereisten moeten experimenten met de LightCycler 1.2 met specifieke reagentia worden uitgevoerd. We raden u aan de LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe te gebruiken en de instructies van de fabrikant op te volgen bij het bereiden van het mastermengsel 5x.

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
2. Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 12 en 13 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 20 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel (PPM-VF of PPM-WT). Het extra volume is opgenomen om eventuele pipetteerfouten te compenseren.

Tabel 12. Bereiding van het qPCR -mengsel

Bestanddeel	1 reactie (µl)	V617F-voormengsel 15 + 1 reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
Vers bereid LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-mengsel, 5x	4,0	64,0	1x
Mengsel van primers en probe, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	10,2	163,2	–
Monster (toevoegen in stap 4)	5,0	5 elk	–
Totaal volume	20,0	20 elk	–

Tabel 13. Bereiding van het qPCR-mengsel

Bestanddeel	1 reactie (µl)	WT-voormengsel 15 + 1 reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
Vers bereid LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-mengsel, 5x	4,0	64,0	1×
Mengsel van primers en probe, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	10,2	163,2	–
Monster (toevoegen in stap 4)	5,0	5 elk	–
Totaal volume	20,0	20 elk	–

3. Vul ieder capillair met 15 µl qPCR-voormengsel (VF or WT).
4. Breng 5 µl van het te kwantificeren materiaal (25 ng genomisch DNA-monster of controle) over naar het betreffende buisje (totaal volume 20 µl).
5. Meng de inhoud voorzichtig door op en neer te pipetteren.
6. Plaats de capillaire buisjes in de adapter die met het instrument is meegeleverd en centrifugeer kort (circa 10 seconden bij 700 *g*).
7. Plaats de capillaire buisjes in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
8. Stel het LightCycler 1.2 -instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 14.

Tabel 14. Temperatuurprofiel

Analysemodus	Kwantificatie
Hold (Constant) 1	Temperatuur: 55 °C Tijd: 2 minuten Helling: 20
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 minuten Helling: 20
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 seconden; helling: 20 66 °C gedurende 1 minuut; helling: 20; met acquisitie van FAM-fluorescentie: enkel

9. Bij gebruik van de LightCycler 1.2 wordt de modus F1/F2 en '2nd derivative analysis' (2e afgeleide analyse) aanbevolen. Start het in tabel 14 aangegeven thermocyclerprogramma.

Interpretatie van de resultaten

Principe van de gegevensanalyse

Gegevens van de drempelcyclus (C_T) en crossing point (kruispunt)-waarden (C_P) kunnen worden geëxporteerd vanuit het qPCR-instrument en worden geïmporteerd in een Excel®-bestand voor analyse. Deze waarden kunnen vervolgens worden gebruikt om de gemiddelde waarde voor C_P en C_T te berekenen en de standaard gemiddelde C_T -waarden in kaart te brengen, zodat er een standaard curve kan worden gemaakt voor beide wildtype en V617F-standaarden met behulp van de volgende formule en tabel 15.

$y =$ Gemiddelde C_P -waarde; $x = \log_{10}$ CN, waarbij CN = aantal genkopieën in het 5 μ l-monster.

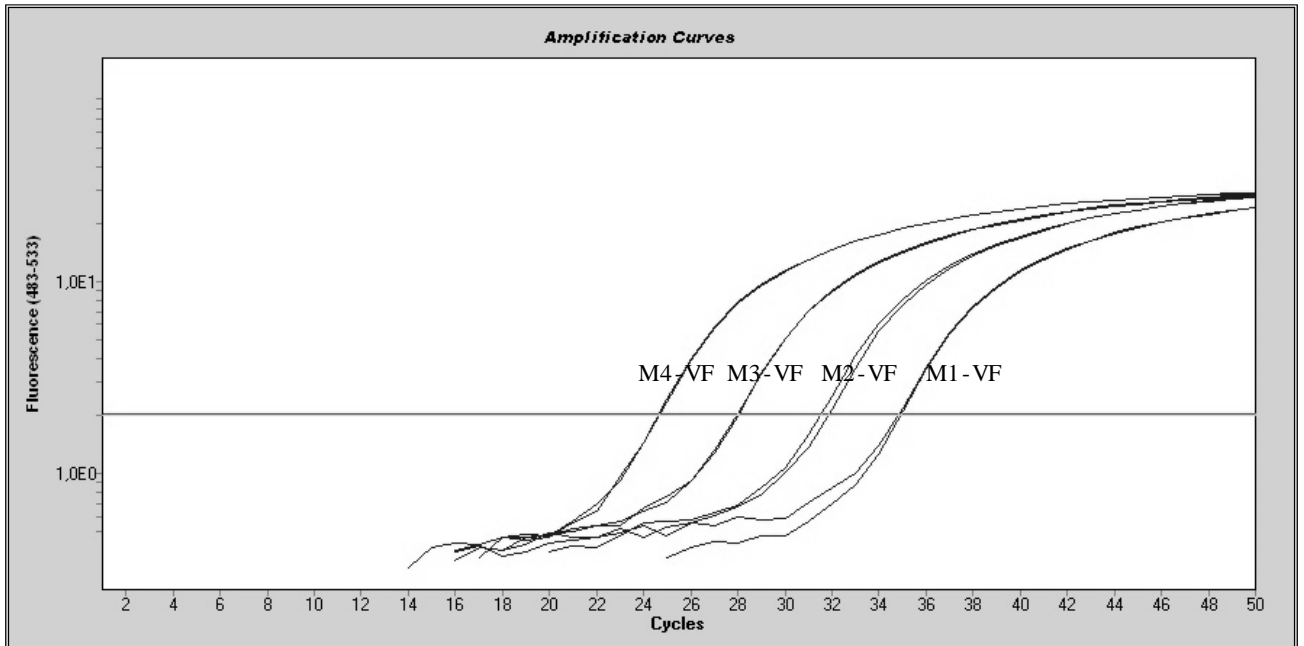
Tabel 15. Kwantitatieve gegevens voor de wildtype en V617F-standaarden

Standaard	Aantal kopieën (CN)	\log_{10} CN
M1-VF	5 x 10 ¹ VF	1.7
M2-VF	5 x 10 ² VF	2.7
M3-VF	5 x 10 ³ VF	3.7
M4-VF	5 x 10 ⁴ VF	4.7
WT-1	5 x 10 ¹ WT	1.7
WT-2	5 x 10 ² WT	2.7
WT-3	5 x 10 ³ WT	3.7
WT-4	5 x 10 ⁴ WT	4.7

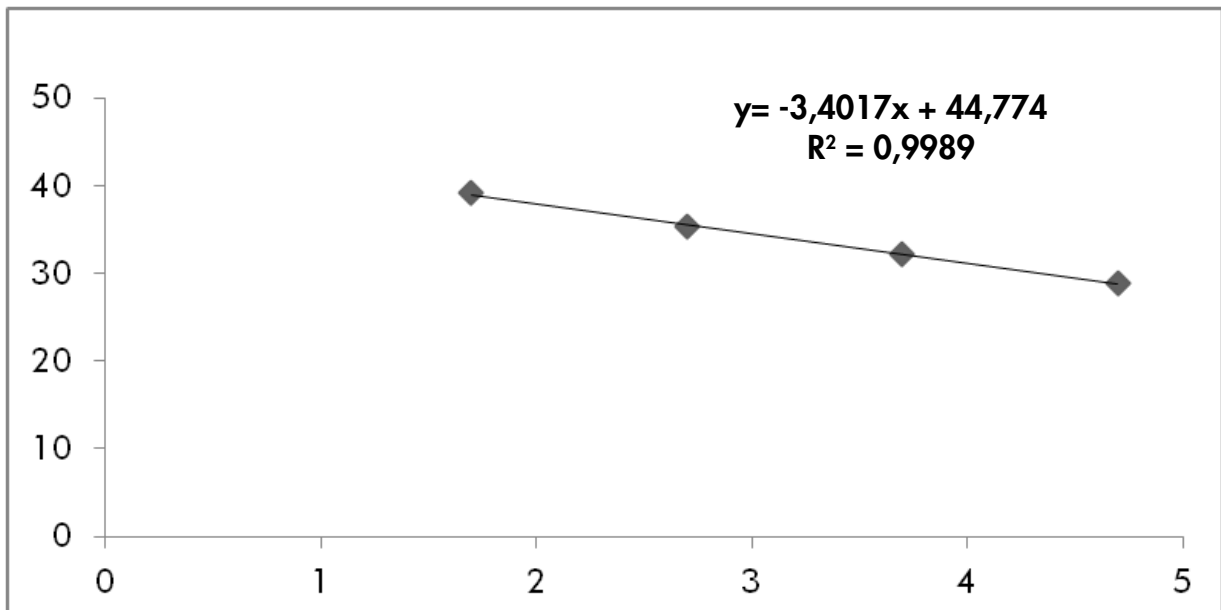
Opmerking: Alle gebruikers moeten zelf de reproduceerbaarheid in hun laboratorium meten.

Standaardcurve en kwaliteitscriteria

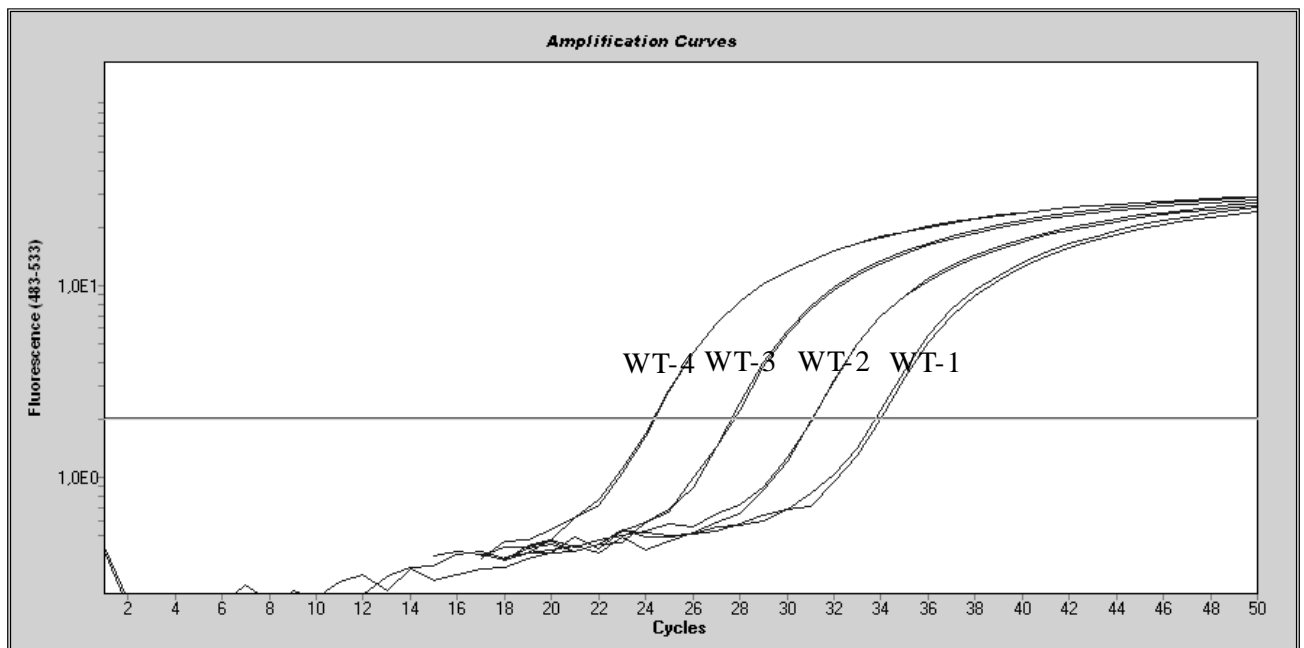
In afbeelding 7 en 9 worden voorbeelden weergegeven van resultaten die zijn verkregen met behulp van de *ipsogen*JAK2 Muta *Quant* Kit en in afbeelding 8 en 10 wordt een voorbeeld weergegeven van de theoretische curve die is berekend op basis van vier standaardverdunningen.



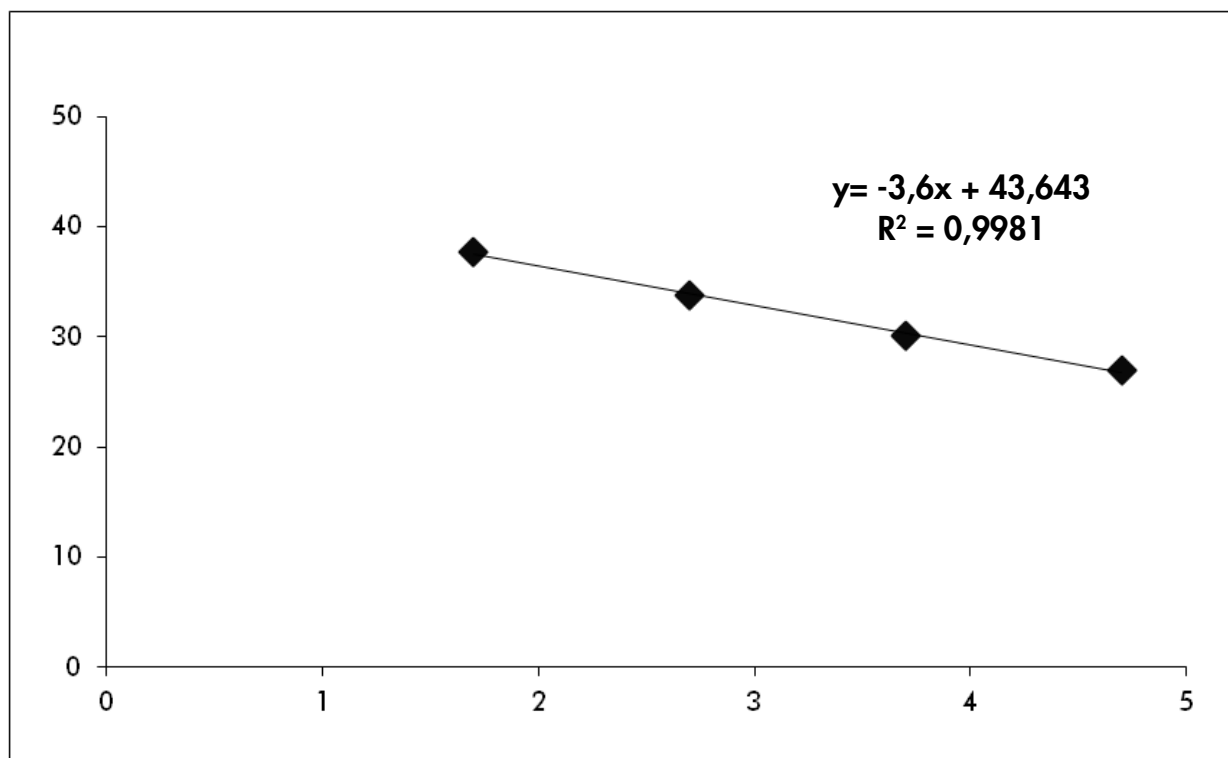
Afbeelding 7. Amplificatieplots van 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 , en 5×10^4 kopieën van het JAK2 V617F-plasmide (controles M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF, respectievelijk).



Afbeelding 8. Standaardcurve for JAK2 V617F.



Afbeelding 9. Amplificatieplots van 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 , en 5×10^4 kopieën van het JAK2 wildtype plasmide (controles WT-1, WT-2, WT-3, en WT-4, respectievelijk).



Afbeelding 10. Standaardcurve for JAK2 wildtype.

Aangezien de standaarden 10-voudige verdunningen zijn, is de theoretische helling van de curve -3,32. Een helling tussen de -3,0 en -3,9 is aanvaardbaar, zolang $R^2 > 0,95$ is (12). Een waarde van $R^2 > 0,98$ is wenselijk voor nauwkeurige resultaten (13).

Vervolgens kunnen de vergelijkingen van de standaardcurve worden gebruikt om het aantal V617F-en WT log₁₀-kopieën in de onbekende monsters te berekenen.

Gebruik de vergelijking van de V617F-standaardcurve om onbewerkte, gemiddelde C_P/C_T-waarden (verkregen met PPM-VF) van de onbekende en controlemonsters om te zetten naar het aantal JAK2 V617F-kopieën (CN_{V617F}).

$$\log_{10} \text{CN}_{\text{V617F}} = \frac{(\text{Gemiddelde } C_{\text{pV617F}} - \text{Asafsede standaardcurve}_{\text{V617F}})}{\text{Helling van standaardcurve}_{\text{V617F}}}$$

Gebruik de vergelijking van de wildtype standaardcurve om onbewerkte, gemiddelde C_P/C_T-waarden (verkregen met PPM-WT) van de onbekende en controlemonsters om te zetten naar het aantal JAK2 wildtype kopieën (CN_{WT}).

$$\log_{10} \text{CN}_{\text{WT}} = \frac{(\text{Gemiddelde } C_{\text{pWT}} - \text{Asafsede standaardcurve}_{\text{WT}})}{\text{Helling van standaardcurve}_{\text{WT}}}$$

Weergave van de resultaten

De resultaten hebben betrekking op 25 ng geheel genomisch DNA en moeten op de volgende manier worden weergegeven als het percentage van JAK2 V617F.

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

Reproduceerbaarheid tussen replica's

De verkregen gegevens moeten consistent zijn tussen duplicaten.

Positieve en negatieve controles

De positieve control (positieve controle), of PC-VF, moet een percentage JAK2 V617F opleveren dat hoger is dan 99,9%.

De negatieve control (negatieve controle), of NC-VF, moet een percentage JAK2 V617F opleveren dat lager is dan 0,1%.

Raadpleeg pagina 34 van de 'Problemen oplossen' als deze controles niet goed kunnen worden uitgevoerd om een oplossing te vinden.

Watercontroles

Negatieve controles zouden nul CN moeten opleveren voor zowel de JAK2 V617F als de JAK2 wildtype detectie.

Een positieve watercontrole komt voort uit een kruisbesmetting. Zie 'Problemen oplossen' hieronder voor een oplossing.

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de pagina met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers van de afdeling Technische services van QIAGEN geven graag antwoord op uw vragen over de informatie of protocollen in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (zie 'Contactgegevens' op pagina 43 voor contactgegevens).

Opmerkingen en suggesties

De standaardcurven voor wildtype of V617F zijn niet lineair

Flacon omgekeerd, omkering tijdens distributie, kruiscontaminatie, gedeeltelijke degradatie van de standaard, RQ PCR-reagens, niet-specifieke amplificatie of PCR-programmeerfout

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Bewaar de *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit bij -15 tot -30 °C en stel de primer-probemengsels niet bloot aan licht. Zie 'Opslag en verwerking reagentia' op pagina 12.

Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.

Geen of zwak signaal voor één standaard

Standaard niet gedistribueerd of gebruik van hetzelfde PPM-mengsel

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Herhaal de PCR-run.

Opmerkingen en suggesties

Negatieve (H₂O-) controle is positief

Kruiscontaminatie, contaminatie van reagentia, instrumentfout, omgekeerde well of capillair of degradatie van de probe

Vervang alle kritieke reagentia.

Hanteer de monsters, kitcomponenten en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden om contaminatie door achtergebleven materiaal te voorkomen.

Stel de primer-probemengsels niet bloot aan licht.

Controleer fluorescentiecurven op vals positieven.

Geen signaal, zelfs niet in de standaardcontrole

a) Onjuist detectiekanaal geselecteerd

Stel het kanaal in op F1/F2 of 530 nm/640 nm.

b) Pipetteerfout of reagentia vergeten

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Herhaal de PCR-run.

c) Geen programma voor gegevensregistratie

Controleer het cyclusprogramma.

Selecteer aan het einde van elk hybridisatiesegment van het PCR-programma de acquisitiemodus 'single' (enkelvoudig).

Geen of zwak signaal in monsters, maar de standaardcontroles zijn goed

Remmend effect van monstermateriaal als gevolg van onvoldoende zuivering

Controleer altijd de kwaliteit en concentratie van het DNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀) voordat u begint.

Herhaal de DNA-bereiding.

Intensiteit van fluorescentie te laag

- a) Onjuiste opslag van kitcomponenten

Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag.

Bewaar de *ipsogen*JAK2 Muta *Quant* Kit bij -15 tot -30 °C en stel de primer-probemengsels niet bloot aan licht. Zie 'Opslag en verwerking reagentia' op pagina 12.

Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.

- b) Zeer lage initiële hoeveelheid doel-DNA

Controleer de hoeveelheid van het DNA-monster.

Opmerking: Er kunnen remmende effecten optreden, afhankelijk van de gekozen DNA-bereidingsmethode.

Negative controls (negatieve controles) zijn positief

Contaminatie door achtergebleven materiaal

Vervang alle kritieke reagentia.

Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.

Hanteer de monsters, kitcomponenten en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden om contaminatie door achtergebleven materiaal te voorkomen

Intensiteit van fluorescentie varieert

- a) Pipetteerfout

Vortex en draai alle reagentia na ontdooien.

De LightCycler-variabiliteit als gevolg van een zogenoemde 'pipetteerfout' kan worden beperkt door gegevens in de F1/F2- of 530 nm/640 nm-modus te analyseren.

Opmerkingen en suggesties

- b) De plaat, buisjes of capillairen zijn onvoldoende gecentrifugeerd, het bereide PCRMengsel bevindt zich mogelijk nog in het bovenste vat van het capillair of er zit misschien een luchtbel in de punt van het capillair. Centrifugeer capillaire buisjes waar het reactiemengsel in zit altijd op de wijze die in de gebruikshandleiding van het apparaat is beschreven.
- c) Punt van het capillaire buisje is vies Draag altijd handschoenen wanneer u met capillaire buisjes werkt.

Wildtype of V617F positive controls (positieve controles) signaleren met behulp van de reciproque PPM

- Kruiscontaminatie, contaminatie van reagentia of de well of capillair is omgekeerd
- Vervang alle kritieke reagentia.
- Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.
- Hanteer de monsters, kitcomponenten en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden om contaminatie door achtergebleven materiaal te voorkomen.
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Omgekeerde detectie van positive control (positieve controle)

- Omkering van PPM gedistribueerd in een well, capillair of voormengsel
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Geen signaal voor één of beide positive controls (positieve controles)

- PPM of controleDNA vergeten
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Sterke achtergrondkleuring

- Bleken van fluorofoor
- Houd de probe buiten het bereik van licht.

Slechte reproduceerbaarheid van de duplicaatmonsters

- Pipetteerfout of kruiscontaminatie
- Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij *ipsogen*JAK2 Muta *Quant* Kits getest aan de hand van vooraf vastgestelde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen. Analysecertificaten zijn op aanvraag verkrijgbaar via www.qiagen.com/support.

Beperkingen

Voordat ze dit apparaat gaan gebruiken, moeten gebruikers worden getraind en vertrouwd raken met deze technologie. De kit moet conform de instructies in deze handleiding worden gebruikt, in combinatie met een gevalideerd instrument dat in 'Benodigde maar niet meegeleverde materialen' op pagina 10 staat vermeld.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

Let goed op de uiterste houdbaarheidsdatums op het etiket van de doos en op de etiketten van alle onderdelen. Gebruik geen onderdelen waarvan de uiterste houdbaarheidsdatum is verstreken.

Prestatiekenmerken

Niet -klinische onderzoeken

Precisie

Er is een precisieonderzoek uitgevoerd met 12 DNAMonsters die waren geëxtraheerd uit cellijnen die correspondeerden met verschillende JAK2 V617F allelasten. Per monster werden in totaal 80 metingen uitgevoerd met behulp van 3 verschillende partijen van de *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. Voor het precisieonderzoek werd het Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem gebruikt.

Tabel 15 vormt een overzicht van de analytische gegevens.

Tabel 15. Precisiegegevens DNA -monsters

Monster	Theoretische JAK2 V617F (%)	n*	Gemiddelde (%)	CV (%)	Percentiel	
					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

* Grenswaarden zijn niet opgenomen. Deze waarden zijn vastgesteld als waarden in een Box en-Whiskerplot die kleiner zijn dan het laagste kwartiel min 3 keer de interkwartielafstand of die groter zijn dan het hoogste kwartiel plus 3 keer de interkwartielafstand.

n = aantal gevalideerde monsters; CV = globale variatiecoëfficiënt.

Blancolimiet en detectielimiet

Het achtergrondgehalte of het blanconiveau (level of blank, LOB) werd vastgesteld op basis van negatieve monsters (8 monsters, 76 metingen). Deze limiet bleek 0,014% te zijn.

De detectielimiet (limit of detection, LOD) werd vastgesteld met behulp van monsters die aantoonbaar positief waren maar een lage expressie hadden (7 monsters, 68 metingen). Dit bleek 0,061% te zijn, waarbij de betrouwbaarheidsinterval een bovengrens had van 90% bij 0,091%.

Deze optimale gevoeligheid kan worden verkregen bij monsters die ten minste 10.000 kopieën bevatten van het JAK2-gen (wildtype of V617F-mutatie).

De kwantitatieve gegevens worden als volgt weergegeven.

- JAK2 V617F $\leq 0,014\%$ betekent dat de JAK2 V617F-mutatie niet is gedetecteerd.
- JAK2 V617F is $> 0,014\%$, maar $< 0,091\%$, betekent dat het resultaat onduidelijk is.
- JAK2 V617F $\geq 0,091\%$ betekent dat het resultaat positief is en dat de JAK2 V617F-mutatie is gedetecteerd.

Lineariteit

Er werd een lineariteitsonderzoek uitgevoerd met 12 monsters, waarbij elk monster werd verkregen uit een ander mengsel DNA uit cellijnen die positief en negatief waren voor de JAK2 V617F-mutatie. Elk monster werd vijfmaal getest. De gegevens uit dit onderzoek wezen uit dat de *ipsogenJAK2 Muta Quant* Kit lineaire resultaten opleverde binnen dit dynamische bereik.

Klinische onderzoeken

Er werd DNA van bloed of beenmerg geëxtraheerd uit monsters van 87 patiënten en geanalyseerd met behulp van de *ipsogenJAK2 Muta Quant* Kit. Bovendien werd het percentage JAK2 V617F-mutaties gekwantificeerd en vergeleken met screeningtestresultaten die waren verkregen met behulp van de *ipsogenJAK2 Muta ScreenEZ* Kit (cat nr. 673223). De verkregen gegevens worden weergegeven in tabel 16.

Tabel 16. Kruistabel waarin de overeenstemming wordt weergegeven tussen resultaten die zijn verkregen met behulp van de *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit en de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* EZ Kit.

		Resultaten van de <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> EZ Kit			n
		Mutatie gedetecteerd	Onduidelijk resultaat	Geen mutatie gedetecteerd	
Resultaten van de <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Quant</i> Kit	Mutatie gedetecteerd	40	2	7	49
	Onduidelijk resultaat	0	0	21	21
	Geen mutatie gedetecteerd	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Positieve overeenstemming	100% (95% betrouwbaarheidsinterval: 91%, 100%)				
Negatieve overeenstemming	71% (95% betrouwbaarheidsinterval: 51%, 85%)				
Totale overeenstemming	89% (95% betrouwbaarheidsinterval: 79%, 95%)				

Referenties

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.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en etiketten staan:



Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Lotnummer



Materiaalnummer



Global Trade Item Number



Temperatuurbeperving



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/Support . Ook kunt u bellen naar 00800 -22-44-6000 of contact opnemen met de afdeling Technical service van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Quant</i> Kit (12)	Voor 12 reacties: Wildtype JAK2- gencontrole, JAK2 V617F-controlegen, primer-probemengsel PPM-WT, primer-probemengsel PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Quant</i> Kit (24)	Voor 24 reacties: Wildtype JAK2- gencontrole, JAK2 V617F-controlegen, primer-probemengsel PPM-WT, primer-probemengsel PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx – voor IVD-gevalideerde, realtime PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9002033

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Dit product is bestemd voor in-vitro diagnostisch gebruik. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen *ipsogen*-producten niet worden doorverkocht, gemodificeerd voor doorverkoop of gebruikt voor de productie van commerciële producten.

De in dit document gegeven informatie kan zonder kennisgeving worden gewijzigd. QIAGEN aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten in dit document. Dit document is voor zover bekend volledig en accuraat op het moment van publicatie. In geen geval is QIAGEN aansprakelijk voor incidentele schade, speciale schade, meervoudige schade of gevolgschade in verband met, of voortvloeiend uit, het gebruik van dit document.

Voor *ipsogen*-producten geldt een garantie voor de vermelde specificaties. De enige verplichting van QIAGEN en het enige recht van herstel van de klant zijn beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval dat de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

JAK2 V617F-mutatie en het gebruik daarvan zijn beschermd door patentrechten, waaronder het Europees patent EPI 692281, de Amerikaanse patenten 7,429,456 en 7,781,199, de Amerikaanse patentaanvragen US20090162849 en US20120066776 en buitenlandse tegenhangers.

Met de aankoop van dit product verwerft u niet het recht om het te gebruiken voor klinische trials voor geneesmiddelen tegen JAK2 V617F. QIAGEN ontwikkelt specifieke licentieprogramma's voor dergelijk gebruik. Neem contact op met onze juridische afdeling via jak2licenses@qiagen.com.

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

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit dat hij/zij akkoord gaat met de volgende voorwaarden:

1. De *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit mag uitsluitend in overeenstemming met de handleiding van de *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit en in combinatie met de componenten uit de kit worden gebruikt. QIAGEN verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de handleiding bij de *ipsogen* JAK2 Muta *Quant* Kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor bijgewerkte licentievoorwaarden www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

www.qiagen.com

