

ipsogen[®] JAK2 MutaScreen EZ rinkinio vadovas



1 versija

IVD

Quantitative in vitro diagnostics

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q“, „Applied Biosystems[®]“, „ABI PRISM[®]“ ir „LightCycler[®]“ prietaisais



REF 673223



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
VOKIETIJA

R3 **MAT** 1072514LT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Bendrovė QIAGEN yra pirmaujanti novatoriškų mėginių ėmimo ir tyrimų technologijų, užtikrinančių bet kokio biologinio mėginio turinio išskyrimą ir aptikimą, tiekėja. Mūsų pažangūs, aukštos kokybės produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio paėmimo iki gauto rezultato.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų išskyrimas
- Nukleorūgštis ir baltymų tyrimai
- Mikro RNR ir RNR interferencijų tyrinėjimas
- Mėginių ėmimo ir tyrimo technologijų automatizavimas

Mūsų misija yra padėti jums pasiekti išskirtinės sėkmės ir laimėjimų. Daugiau informacijos rasite apsilankę [**www.qiagen.com**](http://www.qiagen.com).

Turinys

Paskirtis	4
Santrauka ir paaiškinimas	4
Procedūros principas	6
Pateiktos medžiagos	8
Rinkinio sudėtis	8
Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos	9
Išpėjimai ir atsargumo priemonės	10
Bendrosios atsargumo priemonės	10
Reagento saugojimas ir naudojimas	11
Procedūra	12
Mėginio DNR paruošimas	12
Nukleorūgščių saugojimas	12
Protokolai	
■ qPCR ant Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM arba Rotor-Gene Q 5plex HRM prietaisai su 72 mėgintuvėlių rotoriumi	12
■ qPCR „Applied Biosystems 7500“ arba ABI PRISM 7900HT prietaisuose	23
■ qPCR „LightCycler 480“ prietaise	32
Rezultatų aiškinimas	40
Grafinis vaizdavimas ir kokybės kontrolės kriterijai	40
Normalizuoto FAM / VIC santykio ir apskaičiavimas ir genotipavimas	41
Triukščių šalinimo vadovas	42
Kokybės kontrolė	43
Apribojimai	43
Eksplotavimo charakteristikos	44
Neklinikiniai tyrimai	44
Klinikiniai tyrimai	46
Nuorodos	48
Simboliai	49
Kontaktinė informacija	49
Užsakymo informacija	50

Paskirtis

ipsogen JAK2 MutaScreen EZ rinkinys skirtas JAK2 V617F/G1849T mutacijai genomo DNR aptikti asmenims, kuriems įtariama mieloproliferacinė neoplazija. Tai, kad nėra JAK2 V617F/G1849T nereiškia, kad nėra kitų JAK2 mutacijų. Tyrimas gali parodyti klaidingai neigiamus rezultatus, jei kodonuose nuo 615 iki 619 (1) yra papildomų mutacijų.

Pastaba: rinkinys turi būti naudojamas laikantis šiame vadove pateiktų instrukcijų, derinant su patvirtintais reagentais ir prietaisais. Jei šis gaminyje naudojamas nesilaikant nurodymų ir (arba) pakeičiami jo komponentai, QIAGEN nebeprisims už jį atsakomybės.

Santrauka ir paaiškinimas

Grižtamoji somatinė mutacija V617F, veikianti Jano tirozino kinazės 2 (JAK2) geną, buvo nustatyta 2005 m. (2–5), tai padėjo pasiekti didžiulį laimėjimų suprantant, klasifikuojant ir diagnozuojant mieloproliferacinę neoplaziją (MPN). JAK2 yra esminė molekulė, perduodanti intraceliuliarinį signalą eilei citokinų, įskaitant eritropoetiną.

JAK2 V617F mutacija aptinkama >95 % pacientų, sergančių tikrąja policitemija (PV), 50–60 % pacientų, sergančių esencine trombocitemija (ET) ir 50 % pacientų, sergančių pirmine mielofibroze (PMF). JAK2 V617F taip pat buvo aptikta tam tikrais retais lėtinės mielomonocitinės leukemijos, mielodisplazinio sindromo, sisteminės mastocitozės ir lėtinės neutrofilinės leukemijos atvejais, bet CML sudarė 0 % (6).

Mutacija atitinka JAK2 1849 vieno nukleotido pasikeitimą 14 egzone, tokiu būdu gaunant unikalų valino (V) pakaitalą fenilalaninui (F) ties 617 baltymo padėtimi (JH2 sritis). Dėl to atsiranda konstitucinis JAK2 aktyvinimas, hematopoetinė transformacija *in vitro* ir nuo eritropoetino nepriklausančios eritroidinės kolonijos (EEC) augimas visuose pacientuose, sergančiuose PV, ir didelėje dalyje ET ir PMF pacientų (7). JAK2 V617F yra pagrindinė hematopoetinių ląstelių transformavimo MPN varomoji priemonė, bet tikslūs patologiniai mechanizmai, kurie veda, su tokia pat identiška mutacija, prie šios skirtingos klinikinės ir biologinės būties, dar turi būti iki galo išaiškinti.

Tradiciškai MPN diagnozė buvo grindžiama klinikiniais kaulų čiulpų histologijos ir citogenetiniais kriterijais. Atradus specifinį ligos molekulinį markerį supaprastėjo procesas ir padidėjo diagnostinis tikslumas. JAK2 V617F mutacijos aptikimas dabar yra referencinių WHO 2008 kriterijų BCR-ABL neigiamo MPN (1 lentelė) nustatymui dalis ir šios mutacijos buvimas yra pagrindinis diagnozės patvirtinimo kriterijus.

1 lentelė. WHO kriterijai MPN diagnozuoti (pritaikyta pagal 8 nuorodą)

<u>Tikrosios policitemijos (PV) diagnozavimo kriterijai</u>	
Svarbūs	1. Hemoglobinas (Hgb) $>18,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (vyrams) arba $>16,5 \text{ g.dl}^{-1}$ (moterims) arba Hgb arba hematokritai (Hct) >99 -oji procentinė referencinio amžiaus, lyties arba gyvenamosios vietos aukštingumo diapazono dalis, arba Hgb $>17 \text{ g.dl}^{-1}$ (vyrams) arba $>15 \text{ g.dl}^{-1}$ (moterims), jeigu susieta su ilgalaikiu $\geq 2 \text{ g.dl}^{-1}$ padidėjimu lyginant su baziniu rodikliu, kuris negali būti priskirtas geležies trūkumo koregavimui, arba Raudonųjų ląstelių masė padidėjusi $>25 \%$ virš vidutinės įprastos numatytos reikšmės 2. <i>JAK2V617F</i> arba panašios mutacijos buvimas
Nesvarbūs	1. Kaulų čiulpų trijų linijų mieloproliferacija 2. Nepakankamas eritropoetino lygis kraujyje 3. Endogeninės eritroidų kolonijos (EEC) augimas
<u>Esencinės trombocitemijos (ET) diagnozavimo kriterijai</u>	
Svarbūs	1. Trombocitų skaičius $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ 2. Megakariocitų proliferacija su didele ir subrendusia morfologija. Nėra granuliocitų arba eritroidų proliferacijos arba ji maža 3. Neatitikimas lėtinės mieloidinės leukemijos (CML), PV, pirminės mielofibrozės (PMF), mielodisplastinio sindromo (MDS) arba kitos mieloidinės neoplazmos WHO kriterijams 4. <i>JAK2V617F</i> arba kito kloninio markerio pasireiškimas, arba Nėra reaktyviosios trombocitozės įrodymų
Nesvarbūs -	
<u>Pirminės mielofibrozės (PMF) diagnozavimo kriterijai</u>	
Svarbūs	1. Megakariocitų proliferacija ir atipija, lydima retikulino ir (arba) kolageno fibrozės arba Nesant retikulino fibrozės, megakariocitų pasikeitimai turi būti lydimi padidėjusio čiulpų akytumo, granuliocitinės proliferacijos ir, dažnai, sumažėjusios eritropoezės (t. y. prefibrotinės PMF) 2. Neatitikimas (CML), PV, MDS ar kitos mieloidinės neoplazmos WHO kriterijams 3. <i>JAK2V617F</i> arba kito kloninio markerio pasireiškimas, arba Nėra reaktyviosios čiulpų fibrozės įrodymų
Nesvarbūs	1. Leukoeritroblastozė 2. Padidėjusi laktato dehidrogenazė serume (LDH) 3. Anemija 4. Apčiuopiama splenomegalija

Nesenai tarptautiniai ekspertai pasiūlė PV ir ET terapinių bandymų kriterijus. Remiantis turimais alotransplantanto, alfa interferono arba hidroksiuorijos duomenimis JAK2V617F kiekio nustatymas buvo įtrauktas kaip potencialiai

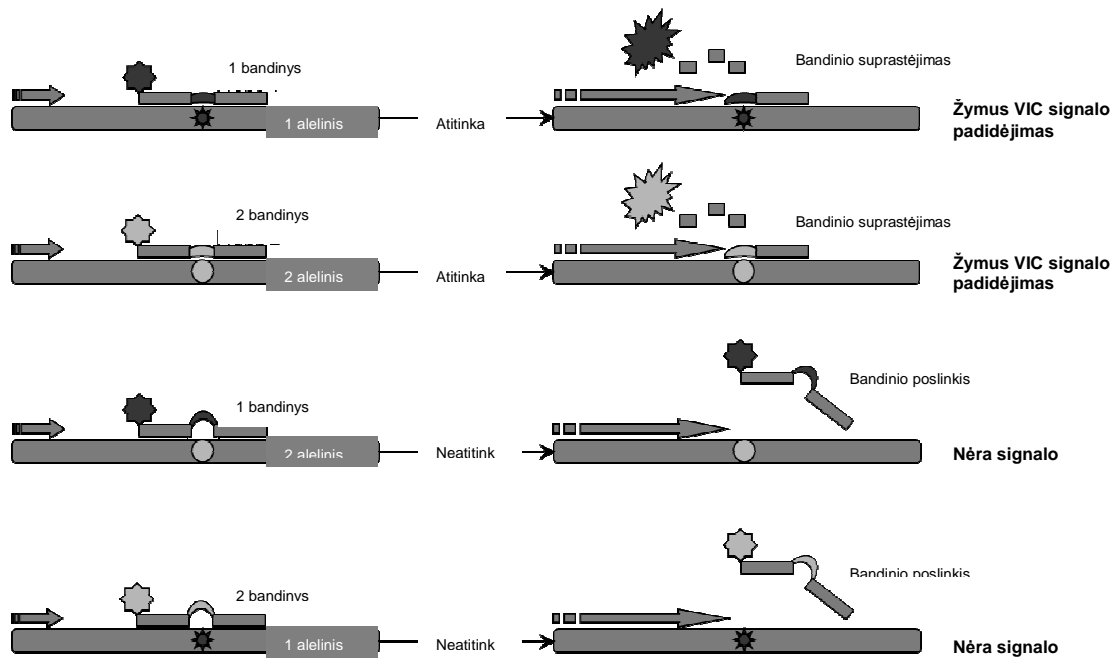
naudinga priemonė reakcijai į gydymą stebėti (9). Buvo stebimas JAK2 V617F apkrovos sumažėjimas reaguojant į tam tikrus naujus kliniškai kuriamus vaistinius preparatus, skirtus JAK2 (10).

Procedūros principas

Alelinio atskyrimo bandymo metu du „TaqMan[®]“ bandiniai yra naudojami multipleksiniame bandyme. Vienas tiksliai atitinka alelinio geno 2 seką (pvz., laukinio tipo alelinis genas), o kitas tiksliai atitinka alelinio geno 1 seką (pvz., alelinis genas su mutacija). Kiekvienas bandinys 5' gale pažymimas išsiskiriančiais fluorescenciniais dažais, žyme, pvz., FAM[™] arba VIC[®], ir jo 3' gale yra fluorescavimą gesinanti medžiaga. Bandiniuose taip pat yra nedidelis griovelio surišiklis (MGB[™]), leidžiantis naudoti trumpesnius bandinius su stabilesniu, o tai reiškia – tikslesniu aleliniu atskyrimu.

PCR pratęsimo fazės metu tiksliai atitinkantis mėginys yra skaldomas 5' → Taq DNR polimerazės 3' egzonukleazės veikla, atskiriant žymės dažus nuo fluorescavimą gesinančios medžiagos ir tokiu būdu išleisdamas aptinkamą fluorescavimą. Tiksliai neatitinkantis bandinys bus perkeltas, o ne skaldomas Taq DNR polimerazės ir žymės dažai nebus išleisti. Sugeneruotas fluorescencinis signalas (VIC arba FAM) surenkamas PCR pabaigoje (galutinis taškas) ir nedelsiant nurodo tikslinės (-ių) sekos (-ų) buvimą mėginyje (laukinio tipo alelinis genas, mutavęs alelinis genas arba abu), netaikant ilgų ir daug darbo reikalaujančių po PCR veiksmų, kurie taip pat padidina užteršimo riziką. Faktinis tikslinės sekos kiekis nenustatytas.

ipsogen JAK2 MutaScreen EZ rinkinys naudoja šią technologiją, kaip pavaizduota (žr. 1 pav.).



1 pav. TaqMan bandinio multipleksinis bandymas. *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinyje ši technologija naudojama aleliniam atskyrimui.

Pateiktos medžiagos

Rinkinio sudėtis

<i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ Kit</i>		(24)
Katalogo Nr.		673223
Reakcijų skaičius		24
1 dėžutė: kontrolės		
V617F Positive Control (V617F teigiama kontrolė)	PC-VF JAK2	30 µl
V617F Negative Control (V617F neigiama kontrolė)	NC-VF JAK2	30 µl
Cut-Off Sample (Ribinis mėginys)	COS-VF JAK2	30 µl
2 dėžutė: qPCR		
Primers and probes mix JAK2 V617F* (Gruntų ir bandinių mišinys JAK2 V617F)	PPM-JAK2 10x	145 µl
Master Mix for qPCR, 2x (Pagrindinis mišinys, skirtas qPCR, 2x)	qPCR master mix	720 µl
Nuclease-Free Water (Vanduo be nukleazės)	H ₂ O	1000 µl
Priežiūros paketas		
<i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ rinkinio vadovas</i> (anglų k.)		1

* Specifinių reversinių ir priekinių gruntų mišinys, skirtas *JAK2* genui, specifinis V617F FAM bandinys ir laukinio tipo VIC bandinys.

Pastaba: prieš naudodami trumpai apdorokite mėgintuvėlius centrifugoje.

Pastaba: analizuojant nežinomus mėginius su *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ* rinkiniu reikia ekstrahuoti genomo DNR. Reagentai, kurių reikia DNR ekstrakcijai atlikti (pvz., „QIAGEN® QIAamp® DNR Blood Maxi“ rinkinys, kat. nr. 51192 ir 51194), nepateikiami ir jų derinys su rinkiniu turi būti patvirtintas.

Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos

Dirbant su chemikalais visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS), kuriuos gausite iš gaminio tiekėjo.

Reagentai

- Be nukleazės 1x TE buferis, pH 8,0
- Reagentai, skirti 0,8–1 % agarozės geliui 0,5x TBE elektroforezės buferyje

Vartojimo reikmenys

- Atsparūs aerozoliui ir sterilūs PCR pipetės antgaliai be nukleazės su hidrofobiniais filtrais
- 0,5 ml arba 0,2 ml PCR mėgintuvėliai be RNase ir DNase
- Ledas

Įranga

- Mikrolitrinės pipetės*, skirtos PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stalinė centrifuga* su rotoriumi 0,2 ml / 0,5 ml reakcijų mėgintuvėliais (galinti pasiekti 10 000 aps./min.)
- Spektrofotometras* DNR kiekiui nustatyti
- Tikrojo laiko PCR prietaisas:* „Rotor-Gene Q 5plex HRM ar kitas „Rotor-Gene“ prietaisas; „LightCycler 480“; „Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System“ arba ABI PRISM 7900HT SDS; ir susijusios specifinės medžiagos

* Užtikrinkite, kad prietaisai būtų patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Išpėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta naudoti diagnostikai *in vitro*

Dirbant su chemikalais visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami žiniatinklyje patogiu ir kompaktišku PDF formatu adresu www.qiagen.com/safety, kur galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jo komponento SDS.

Mėginį ir bandymo atliekas šalinkite laikydamiesi vietinių saugos reglamentų.

Bendrosios atsargumo priemonės

qPCR testams atlikti reikalinga gera darbo laboratorijoje praktika, taip pat mokėjimas atlikti įrangos techninę priežiūrą, kuri yra skirta molekulinei biologijai ir atitinka galiojančius teisės aktus bei susijusius standartus.

Šis rinkinys yra skirtas naudoti diagnostikai *in vitro*. Šiame rinkinyje pateikti reagentai ir instrukcijos buvo patvirtinti, taip užtikrinant optimalų veikimą. Papildomas reagentų skiedimas arba inkubavimo trukmės ir temperatūros keitimas gali sąlygoti klaidingus arba prieštarigus duomenis. PPM-JAK2 reagentas gali pasikeisti jį veikiant šviesa. Visi reagentai sukurti specialiai naudoti su šiuo testu. Užtikrinant optimalų testo veikimą, jokių medžiagų pakeisti negalima.

Būkite išskirtinai atsargūs, kad apsisaugotumėte nuo:

- DNase užteršimo, kuris gali sugadinti DNR šabloną
- DNR arba PCR perkeliama užteršimo, dėl kurio bus gautas klaidingas teigiamas signalas

Todėl rekomenduojame toliau išdėstytus dalykus.

- Naudokite laboratorijos įrangą (pvz., pipetes, pipečių antgalius, reakcijų mėgintuvėlius) be nukleazės ir atlikdami tyrimą mūvėkite pirštines.
- Atlikdami visus veiksmus su pipetėmis naudokite šviežius aerzoliui atsparius pipečių galiukus, kad išvengtumėte mėginių ir reagentų tarpusavio užteršimo.
- Išankstinį PCR pagrindinį mišinį su tam skirtomis medžiagomis (pipetėmis, antgaliais ir t. t.) ruoškite specialioje srityje, kur nėra DNR matricų (DNR, PCR produkto). Atskiroje vietoje (pageidautina, atskiroje patalpoje) padėkite šabloną su specialiomis medžiagomis (pipetėmis, antgaliais ir t. t.).

Reagento saugojimas ir naudojimas

Rinkiniai yra siunčiami ant sausojo ledo ir gavus turi būti saugomi temperatūroje nuo –30 iki –15 °C.

- Iki minimumo sumažinkite šviesos poveikį gruntui ir bandinių mišiniam (PPM-JAK2 mėgintuvėlis).
- Prieš atidarydami mėgintuvėlius atsargiai juos pamaišykite ir centrifuguokite.
- Visus rinkinio komponentus laikykite originaliose talpose.

Šios laikymo sąlygos taikomos tiek atidarytiems, tiek neatidarytiems komponentams. Kitomis, nei nurodyta etiketėse, sąlygomis laikomų komponentų savybės gali tapti netinkamos ir tai gali neigiamai paveikti tyrimo rezultatus.

Kiekvieno reagento galiojimo datos nurodytos atskiro komponento etiketėse. Tinkamomis saugojimo sąlygomis gaminio savybės bus išsaugotos iki galiojimo datos, išspausdintos etiketėje.

Nėra akivaizdžių požymių, rodančių šio gaminio nestabilumą. Tačiau teigiamos ir neigiamos kontrolės turi būti vykdomos lygiagrečiai su nežinomais mėginiais.

Procedūra

Mėginio DNR paruošimas

Genomo DNR turi būti išgauta iš viso kraujo, išgrynintų periferinio kraujo limfocitų, daugiabranduolių ląstelių arba granulocitų. Kad būtų galima palyginti rezultatus, rekomenduojame pritaikyti tą patį ląstelių frakcijos ir DNR ekstrakcijos metodą. DNR ekstrakcija turi būti atlikta naudojant bet kokį naminį arba komercinį metodą (pvz., „QIAGEN QIAamp DNA Blood Maxi“ rinkinys, kat. Nr. 51192 ir 51194).

DNR kiekis nustatomas matuojant optinį tankį esant 260 nm. DNR kokybė turi būti įvertinta naudojant spektrofotometriją arba gelio elektroforezę.

A_{260}/A_{280} santykis turi būti 1,7–1,9. Mažesni santykiai paprastai reiškia užteršimą baltymais arba organinėmis cheminėmis medžiagomis.

Elektroforezinė 0,8–1 % agarozės gelio analizė turi užtikrinti individualių DNR vizualizaciją kaip atskirą maždaug 20 kb juostą. Nedidelis sutepimas yra priimtinas.

Gauta DNR yra praskiesta iki 5 ng/μl TE buferyje. qPCR reakcija yra optimizuota 25 ng išgryninto genomo DNR.

Nukleorūgščių saugojimas

Trumpalaikiam saugojimui iki 24 valandų išgrynintas nukleorūgštis rekomenduojame sandėliuoti 2–8 °C temperatūroje. Ilgalaikiam sandėliavimui virš 24 valandų rekomenduojame sandėliuoti –20 °C temperatūroje.

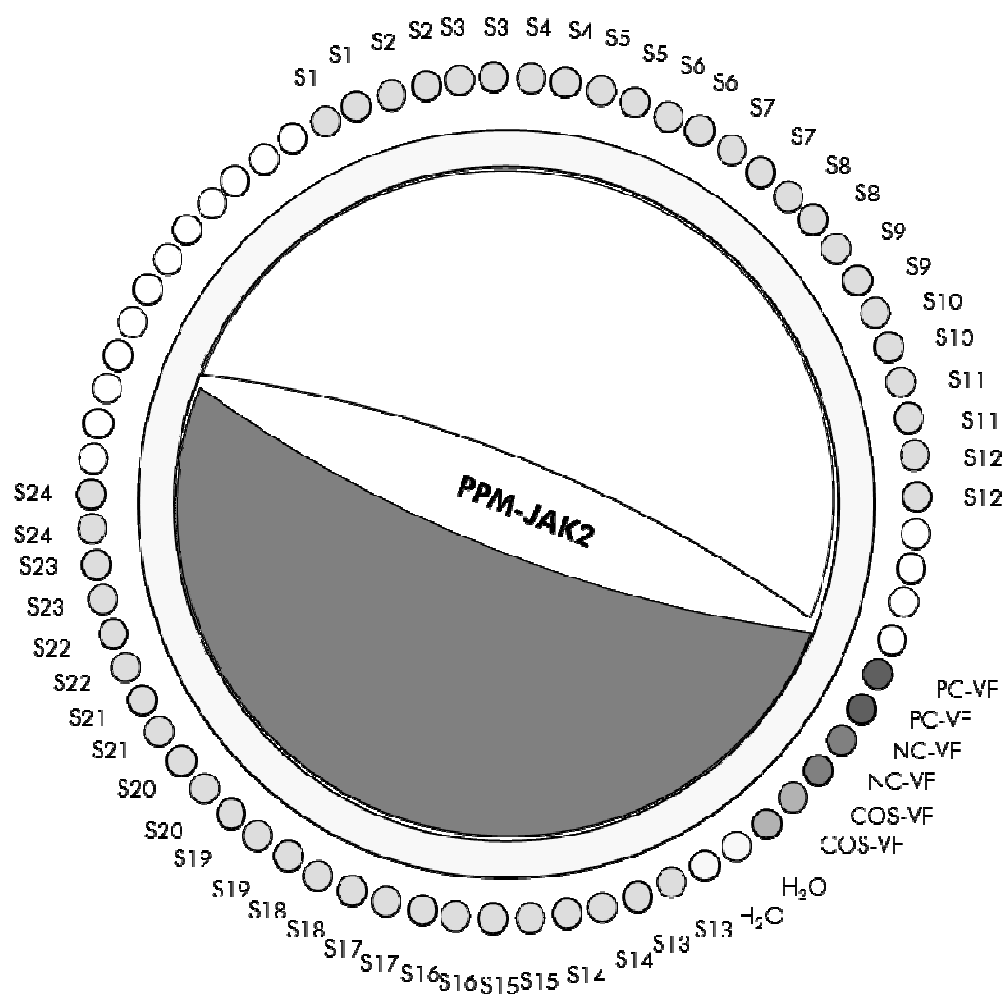
Protokolas: qPCR ant Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM arba Rotor-Gene Q 5plex HRM prietaisai su 72 mėgintuvėlių rotoriumi

Naudojant šį prietaisą rekomenduojame atlikti visus matavimus du kartus, kaip nurodyta 2 lentelėje.

2 lentelė. „Rotor-Gene Q“ prietaisų su 72 mėgintuvėlių rotoriumi reakcijų skaičius

Mėginiai	Reakcijos
Su JAK2 V617F gruntų ir bandinių mišiniu (PPM-JAK2)	
n DNR mėginiai	n x 2 reakcijos
3 DNR kontrolės	6 reakcijos (PC-VF, NC-VF ir COS-VF, kiekviena testuota du kartus)
Vandens kontrolė	2 reakcijos

Mėginių apdorojimas „Rotor-Gene Q“ prietaisais su 72 mėgintuvėlių rotoriumi



2 pav. Siūlomas rotoriaus išdėstymas atliekant eksperimentą su *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkiniu. PC-VF: teigiama kontrolė; NC-VF: neigiama kontrolė; COS-VF: ribinis mėginys; S: DNR mėginys; H₂O: vandens kontrolė.

Pastaba: visada pasirinkite, kad tiriamas mėginys būtų rotoriaus padėtyje 1. Priešingu atveju kalibravimo veiksmo metu prietaisas neatliks kalibravimo ir bus gauti neteisingi fluorescavimo duomenys.

Užpildykite visas kitas pozicijas tuščiais mėgintuvėliais.

qPCR „Rotor-Gene Q“ prietaisuose su 72 mėgintuvėlių rotoriumi

Pastaba: visus veiksmus atlikite ant ledo.

Procedūra

- 1. Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.**
Komponentai turi būti išimti iš šaldiklio maždaug 10 minučių prieš pradėdant procedūrą.
- 2. Pasukite ir trumpai centrifuguokite visus mėgintuvėlius (maždaug 10 sekundžių, 10 000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).**
- 3. Paruoškite toliau nurodytą qPCR mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių.**

Visos koncentracijos nurodytos galutiniam reakcijos tūriui.

3 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipečių schema ruošiant vieno reagento mišinį, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 25 µl galutinis reakcijos tūris. Išankstinis mišinys gali būti paruoštas, atsižvelgiant į reakcijų skaičių, naudojant tą patį grunto ir bandinio mišinį. Kompensuojant lašinimo iš pipetės klaidą gali būti įtraukti papildomi tūriai.

„Rotor-Gene“ prietaisuose *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinys gali būti naudojamas 24 mėginiams analizuoti dviem egzemplioriais viename eksperimente (2 pav.), 20 mėginių dviem egzemplioriais dviejuose eksperimentuose, arba 15 mėginių dviem egzemplioriais trijuose eksperimentuose.

3 lentelė. qPCR mišinio paruošimas

Komponentas	Reakcijų skaičius (μl)				Galutinė koncentracija
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
qPCR master mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Gruntų ir bandinių mišinys, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	5	285	145	95	–
Mėginys (turi įdėtas 6 veiksmė)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	25	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	–

* 24 mėginiai; 1 eksperimentas / rinkinys.

† 10 mėginių; 2 eksperimentai / rinkinys.

‡ 5 mėginiai; 3 eksperimentai / rinkinys.

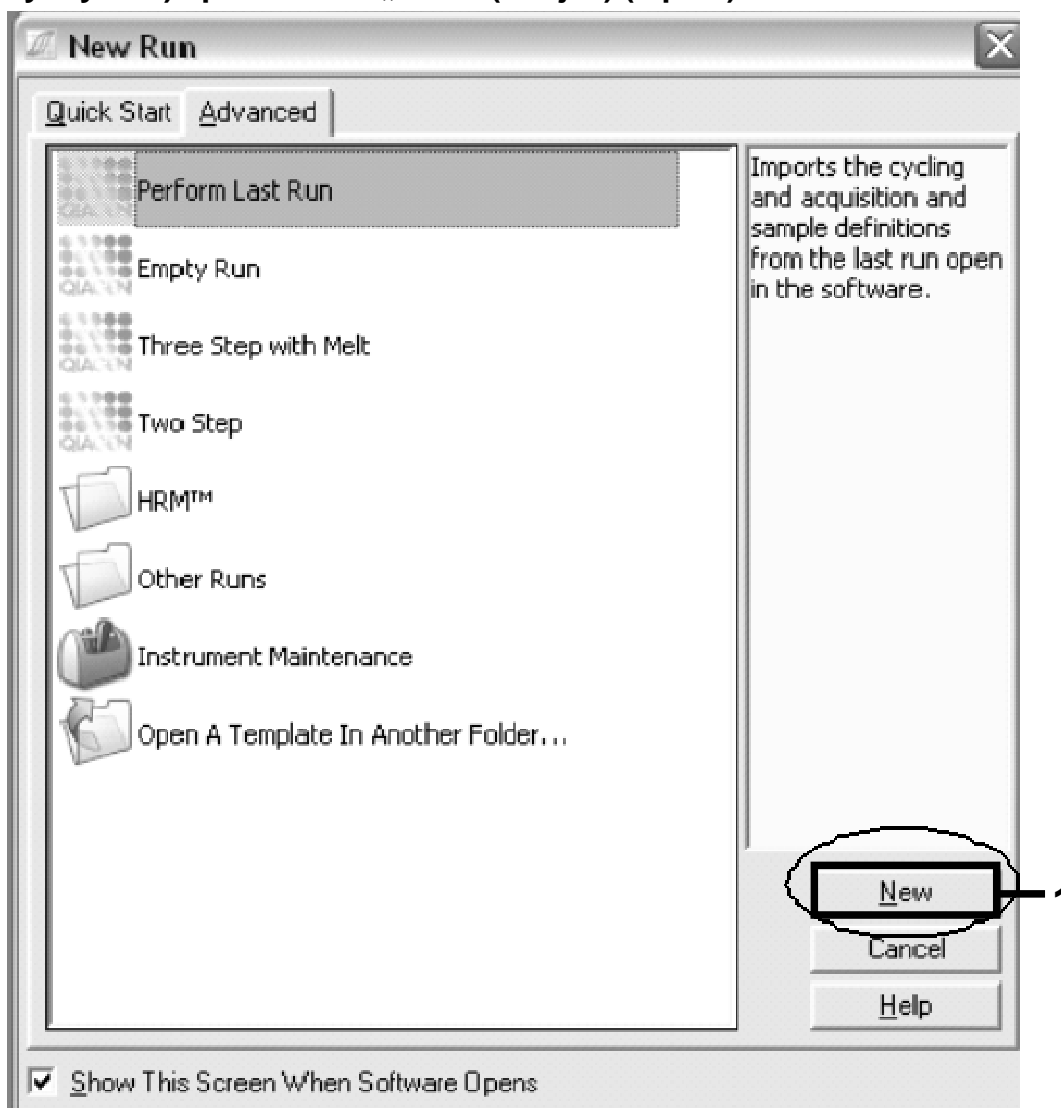
- Pasukite ir trumpai centrifuguokite qPCR mišinį (maždaug 10 sekundžių, 10 000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).**
- Supilkite į kiekvieną mėgintuvėlį po 20 μl qPCR paruošiamojo mišinio.**
- Įpilkite 5 μl mėginio medžiagos DNR arba kontrolės į atitinkamą mėgintuvėlį (bendras tūris 25 μl).**
- Atsargiai sumaišykite, lašindami pipete viršuje ir apačioje.**
- Uždarykite PCR mėgintuvėlius. Sudėkite mėgintuvėlius į 72 mėgintuvėlių rotorių atsižvelgdami į gamintojo rekomendacijas. Užpildykite visas kitas pozicijas tuščiais mėgintuvėliais.**
- Užtikrinkite, kad fiksavimo žiedas („Rotor-Gene“ prietaiso priedas) būtų uždėtas ant rotoriaus viršaus, siekiant išvengti atsitiktinio mėgintuvėlių atsidarymo eigos metu. Įdėkite rotorių į „RotorGene Q“ prietaisą atsižvelgdami į gamintojo rekomendacijas.**

10. JAK2 DNR aptikti vykdydami toliau nurodytus veiksmus sukurkite temperatūros profilį.

Bendrųjų tyrimo parametrų nustatymas	3, 4 pav.
DNR sustiprinimas	5 pav.
Fluorescavimo kanalo jautrumo nustatymas	6 pav.

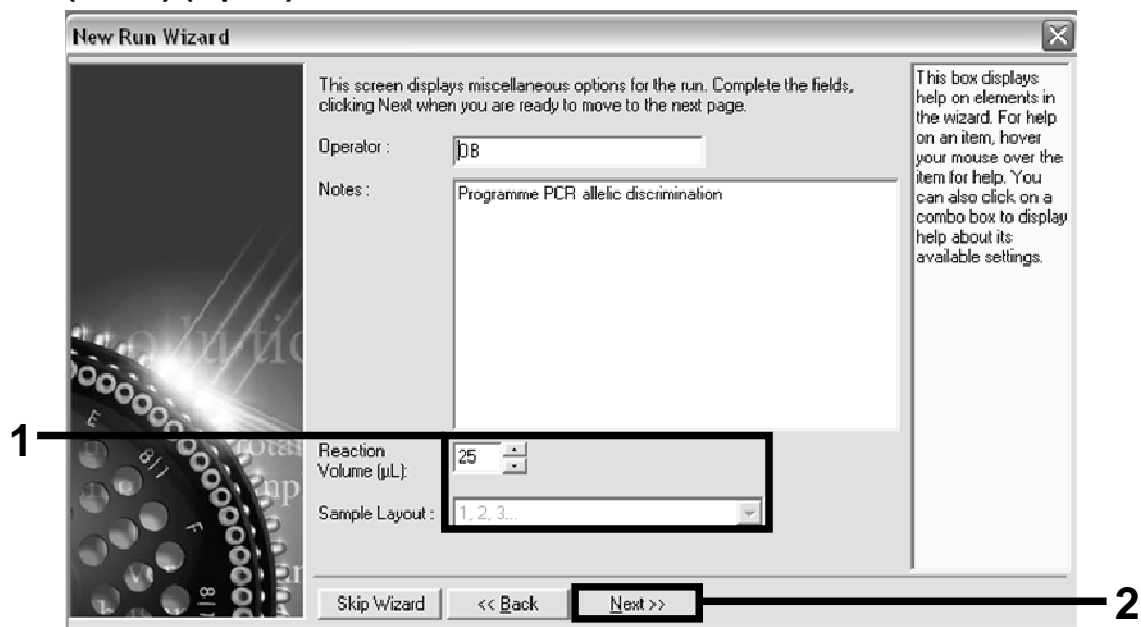
Išsamesnės informacijos apie „Rotor-Gene“ prietaisų programavimą rasite prietaiso naudotojo vadove. Iliustracijose programos parametrai pateikiami pastorintu juodu šriftu. Iliustracijose vaizduojami „Rotor-Gene Q“ prietaisai.

11. Paleiskite „Rotor-Gene“ programą. Dialogo lange „New Run“ (naujas vykdymas) spustelėkite „New“ (naujas) (3 pav.).



3 pav. Dialogo langas „New Run“.

12. Atidarykite dialogo langą „New Run Wizard“ (naujo vykdymo vedlys). Nurodydami PCR reakcijos tūrį pasirinkite 25 ir spustelėkite „Next“ (toliau) (4 pav.).

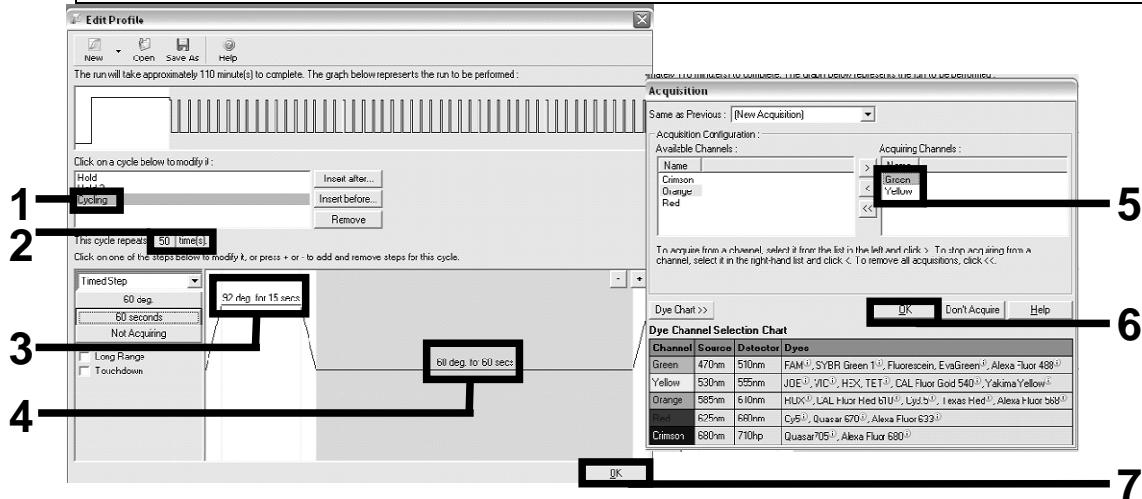


4 pav. Bendrųjų tyrimo parametrų nustatymas

13. Kitame dialogo lange „New Run Wizard“ spustelėkite mygtuką „Edit Profile“ (redaguoti profilį) ir suprogramuokite temperatūros profilį kaip pavaizduota 4 lentelėje ir 5 pav. Būtinai įtraukite paskutinį suradimo veiksmą 60 °C temperatūroje, kiekviename cikle, abiem kanalams – žaliajam (FAM) ir geltonam (VIC).

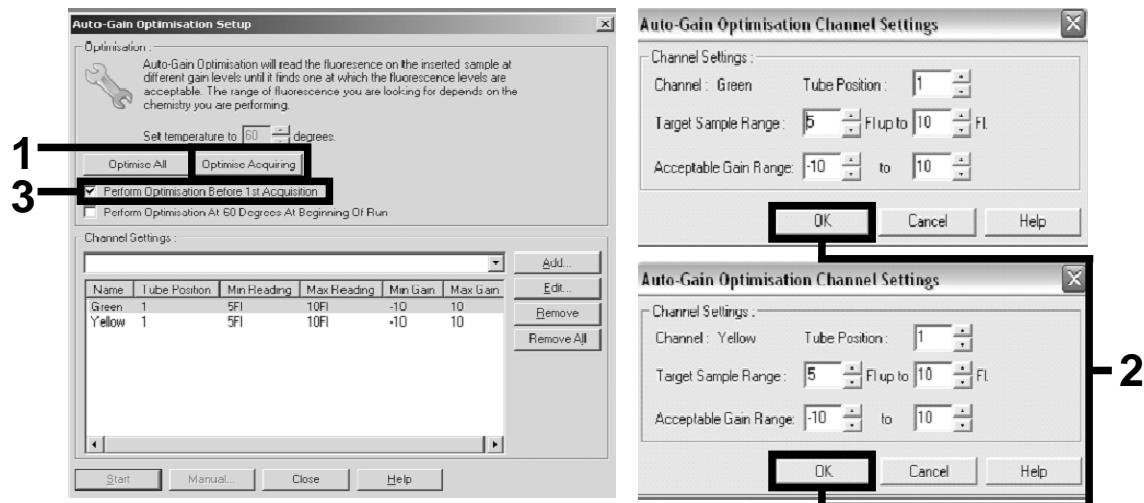
4 lentelė. Temperatūros profilis

Palaikymas	Temperatūra: 50 laipsnių Trukmė: 2 min.
Palaikymas 2	Temperatūra: 95 laipsniai Trukmė: 10 min.
Ciklai	50 kartų 92 laipsniai 15 s 60 laipsnių 1 min.; vienas FAM fluorescavimo gavimas kanale „Cycling A Green“ (ciklas A žalias) VIC fluorescavimo gavimas kanale „Cycling A Yellow“ (ciklas A geltonas)



5 pav. DNR sustiprinimas.

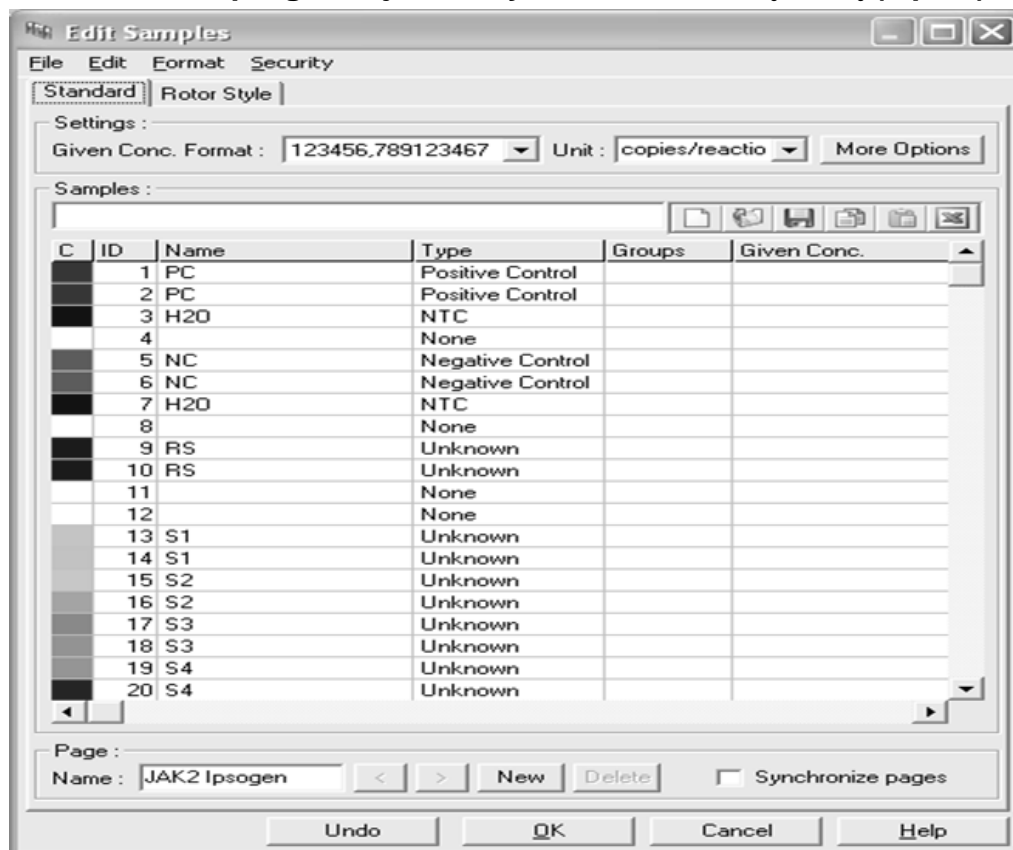
14. Fluorescavimo kanalų aptikimo diapazonas turi būti nustatytas pagal fluorescavimo intensyvumą PCR mėgintuvėliuose. Dialogo lange „New Run Wizard“ spustelėkite „Gain Optimisation“ (optimizuoti), kad būtų atidarytas dialogo langas „Auto-Gain Optimisation Setup“ (automatinio optimizavimo sąranka). Spustelėkite „Optimise Acquiring“ (optimizuoti gavimą) (6 pav.), tada kiekvieno kanalo (žalio ir geltono, 6 pav.) dialogo languose „Auto-Gain Optimisation Channel Settings“ (automatinio optimizavimo kanalų parametrai) spustelėkite „OK“ (gerai). Užtikrinkite, kad būtų pažymėtas abiejų kanalų langelis „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (atlikti optimizavimą prieš 1-ąjį gavimą) (6 pav.).



6 pav. Fluorescavimo kanalo jautrumo nustatymas.

15. Kanalo kalibravimu nustatytos gavimo reikšmės išsaugomos automatiškai ir yra nurodomos programavimo procedūros paskutiniame meniu lange. Spustelėkite „Start Run“ (pradėti vykdymą), kad programa būtų vykdoma.

16. „Rotor-Gene“ programoje atidarykite rotoriaus sąranką (7 pav.).



7 pav. „Rotor-Gene“ sąranka: „Edit Samples“ (redaguoti mėginiai).

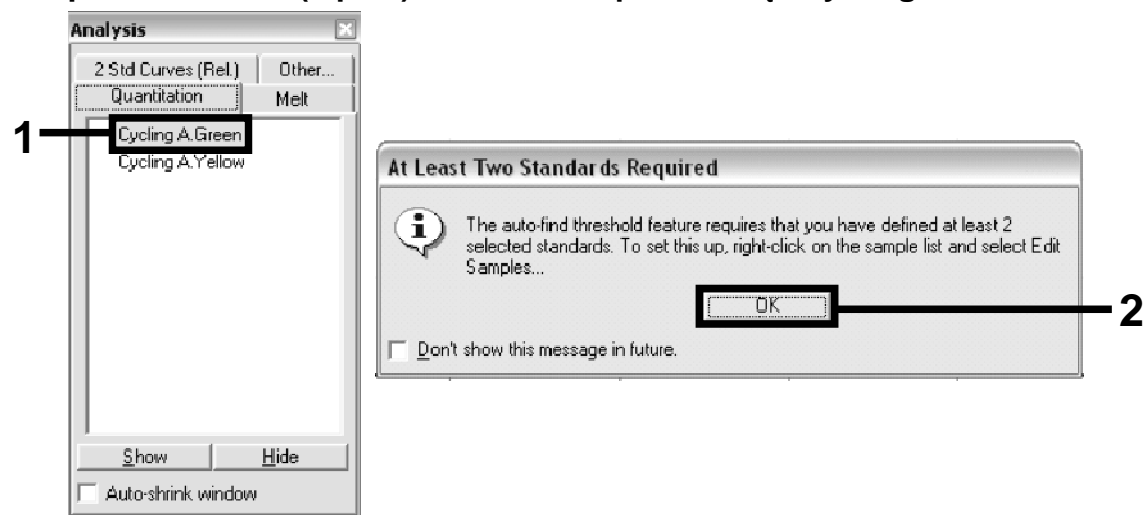
„Rotor-Gene Q 5plex HRM“ prietaiso parametro galutinio taško analizės procedūra

17. Pasibaigus PCR programai įrankių juostoje spustelėkite „Analysis“ (analizė) (8 pav.).



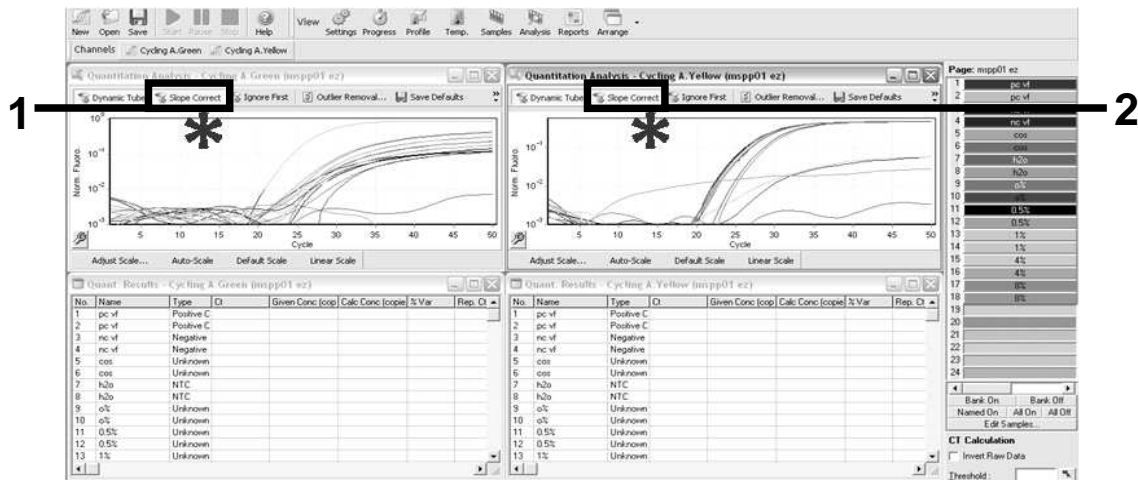
8 pav. Analizė.

18. Dialogo lange „Analysis“ du kartus spustelėkite „Cycling A. Green“, paskui – „OK“ (9 pav.). Pakartokite procedūrą „Cycling A. Yellow“.



9 pav. Kiekio nustatymas: „Cycling A. Green“.

19. Pasirodys naujas langas (10 pav.). Abiejuose skydeliuose spustelėkite „Slope Correct“ (nuolydis teisingas), kaip pavaizduota 10 pav.



10 pav. Nustatymas „Slope Correct“.

20. Norėdami eksportuoti duomenis, išsaugokite „Excel[®]“ duomenų lapo pavidalu. Pasirinkite „File/Save As/Excel data sheet“ (failas / išsaugoti kaip / „Excel“ duomenų lapas) ir spustelėkite „OK“. Suteikite eksportuojamo failo pavadinimą ir išsaugokite tekstinio failo pavidalu (*.txt).
21. Atidarykite tekstinį failą programoje „Excel“ ir pasirinkite stulpelį A. Pasirinkite „Data/Convert and Next“ (duomenys / konvertuoti ir toliau). Pasirinkite „Comma“ (kablelis), paskui spustelėkite „End“ (baigti). Rezultatai bus pateikti kaip parodyta 11 pav.

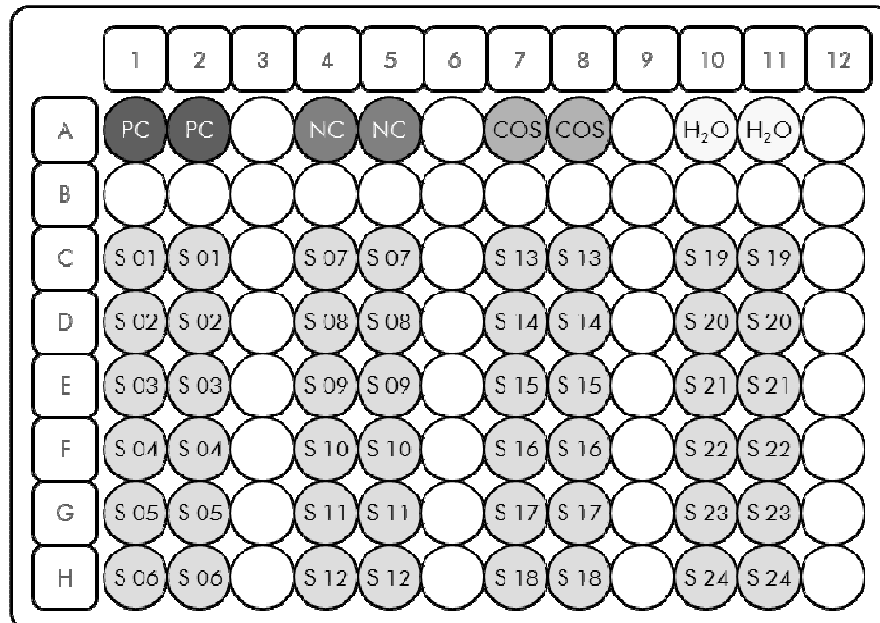
Protokolas: qPCR „Applied Biosystems 7500“ arba ABI PRISM 7900HT prietaisuose

Naudojant 96 šulinėlių lėkštės qPCR įrangą rekomenduojame atlikti visus matavimus du kartus, kaip nurodyta 5 lentelėje.

5 lentelė. Reakcijų skaičius „Applied Biosystems 7500“ arba ABI PRISM 7900HT prietaisams

Mėginiai	Reakcijos
Su JAK2 V617F gruntų ir bandinių mišiniu (PPM-JAK2)	
n DNR mėginiai	n x 2 reakcijos
3 DNR kontrolės	6 reakcijos (PC-VF, NC-VF ir COS-VF, kiekviena testuota du kartus)
Vandens kontrolė	2 reakcijos

Mėginio apdorojimas „Applied Biosystems 7500“ arba ABI PRISM 7900HT prietaisuose



12 pav. Siūlomas lėkštės išdėstymas atliekant eksperimentą su *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkiniu. PC: teigiama kontrolė; NC: neigiama kontrolė; COS: ribinis mėginys; S: DNR mėginys; H₂O: vandens kontrolė.

qPCR „Applied Biosystems 7500“ arba ABI PRISM 7900HT prietaisuose

Pastaba: visus veiksmus atlikite ant ledo.

Procedūra

- 1. Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.**
Komponentai turi būti išimti iš šaldiklio maždaug 10 min. prieš pradėdant procedūrą.
- 2. Pasukiokite ir trumpai centrifuguokite visus mėgintuvėlius (maždaug 10 s, 10 000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).**
- 3. Paruoškite toliau nurodytą qPCR mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių.**

Visos koncentracijos nurodytos galutiniam reakcijos tūriui.

6 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipetės schema ruošiant vieno reagento mišinį, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 25 µl galutinis reakcijos tūris. Išankstinis mišinys gali būti paruoštas, atsižvelgiant į reakcijų skaičių, naudojant tą patį grunto ir bandinio mišinį. Kompensuojant lašinimo iš pipetės klaidą gali būti įtraukti papildomi tūriai.

„Applied Biosystems 7500“ arba ABI PRISM 7900HT *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinys gali būti naudojamas 24 mėginiams analizuoti dviem egzemplioriais viename eksperimente (12 pav.), 20 mėginių dviem egzemplioriais dviejuose eksperimentuose, arba 15 mėginių dviem egzemplioriais trijuose eksperimentuose.

6 lentelė. qPCR mišinio paruošimas

Komponentas	Reakcijų skaičius (µl)				Galutinė koncentracija
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
„TaqMan Universal PCR Master Mix“, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Gruntų ir bandinių mišinys, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	5	285	145	95	–
Mėginys (turi įdėtas 6 veiksmes)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	25	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	–

* 24 mėginiai; 1 eksperimentas / rinkinys.

† 10 mėginių; 2 eksperimentai / rinkinys.

‡ 5 mėginiai; 3 eksperimentai / rinkinys.

4. Pasukiokite ir trumpai centrifuguokite qPCR mišinį (maždaug 10 sekundžių, 10 000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).
5. Supilkite į kiekvieną šulinėlį po 20 µl qPCR paruošiamojo mišinio.
6. Įpilkite 5 µl mėginio medžiagos DNR arba kontrolės į atitinkamą šulinėlį (bendras tūris 25 µl).
7. Atsargiai sumaišykite, lašindami pipete viršuje ir apačioje.
8. Uždarykite lėkštę ir trumpai centrifuguokite (300 x g, maždaug 10 sekundžių).
9. Įdėkite lėkštę į termociklerį atsižvelgdami į gamintojo rekomendacijas.
10. Suprogramuokite termociklerį naudodami šiluminio ciklo nustatymo programą, kaip nurodyta 7 lentelėje ir pradėkite vykdymą.

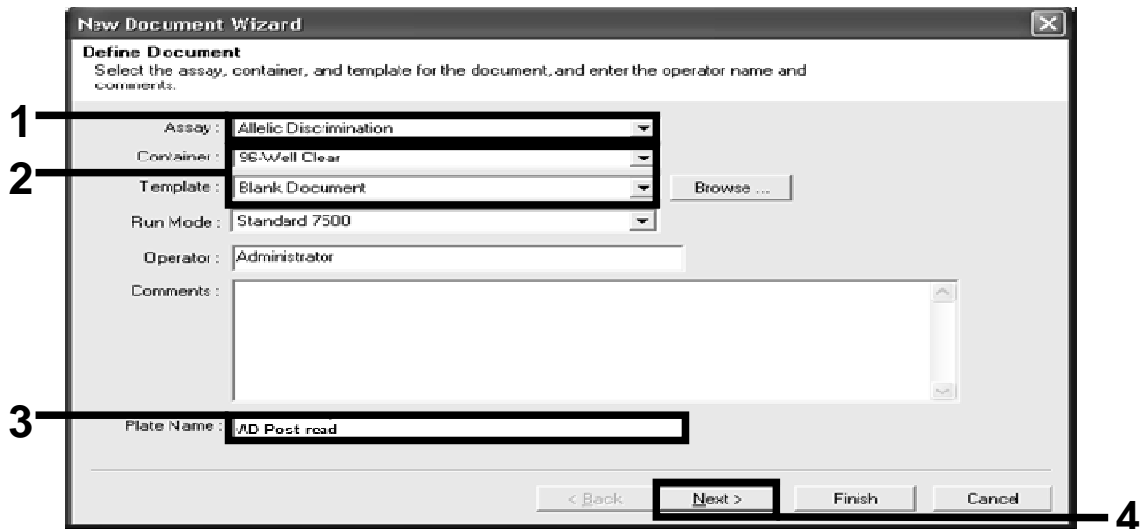
7 lentelė. Temperatūros profilis „Applied Biosystems 7500“ ir ABI PRISM 7900 HT prietaisams

Palaikymas	Temperatūra: 50 °C Trukmė: 2 min.
Palaikymas 2	Temperatūra: 95 °C Trukmė: 10 min.
Ciklai	50 kartų 92 °C 15 s 60 °C 1 min.; vienas

„Applied Biosystems“ ir ABI PRISM prietaisų vykdymo po nuskaitymo analizės procedūra

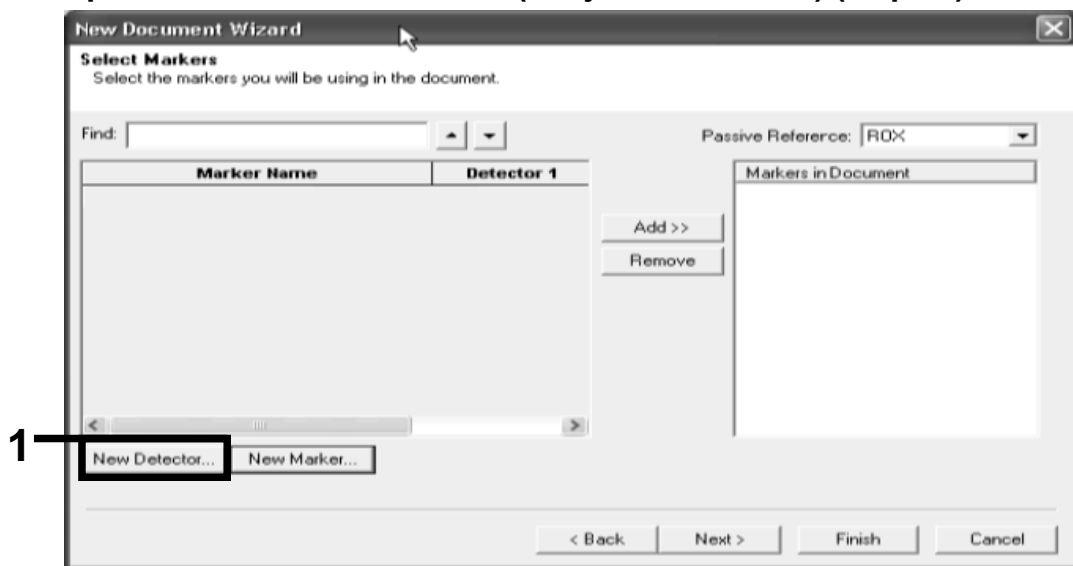
Detalios informacijos apie „Applied Biosystems 7500“ ir ABI PRISM 7900HT prietaisų programavimą ieškokite prietaiso naudotojo vadove. Užtikrinant geresnę apžvalgą programos parametrai pateikiami pastorintu juodu šriftu.

- 11. Pasibaigus šiam vykdymui pasirinkite „Start/Program“ (pradėti / programuoti), paskui pasirinkite „File/New“ (failas / naujas).**
- 12. Dialogo lange „New Document Wizard“ (naujo dokumento vedlys) spustelėkite išskleidžiamąjį sąrašą „Assay“ (tyrimas) ir pasirinkite „Allelic Discrimination“ (alelinis atskyrimas) (13 pav.).**
- 13. Patvirtinkite numatytuosius laukelių „Container“ (talpa) ir „Template“ (šablonas) („96-Well Clear“ (96 šulinėliai tušti) ir „Blank Document“ (tuščias dokumentas), 13 pav.). Laukelyje „Plate Name“ (lėkštės pavadinimas) įveskite *AD Post-read* (13 pav.), paskui spustelėkite „Next>“, kad atidarytumėte dialogo langą „Select Markers“ (pasirinkti markerius).**



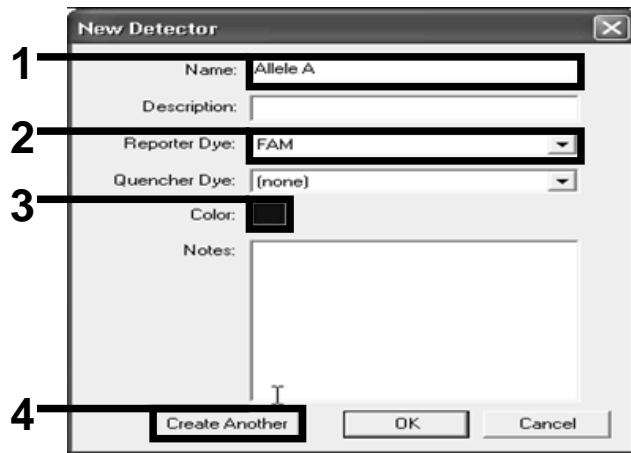
13 pav. Išankstiniai naujo vykdymo po nuskaitymo kūrimo parametrai („New Document Wizard“).

14. Jeigu dialogo lange „Select Markers“ esančiame skydelyje „Markers in Document“ (markeriai dokumente) yra jūsų programai tinkantis markeris, vykdykite 18 veiksmą. Jeigu jo nėra, toliau vykdykite 15 veiksmą.
15. Sukurkite detektorius ir markerius kaip nurodyta žemiau. Spustelėkite „New Detector“ (naujas detektorius) (14 pav.).



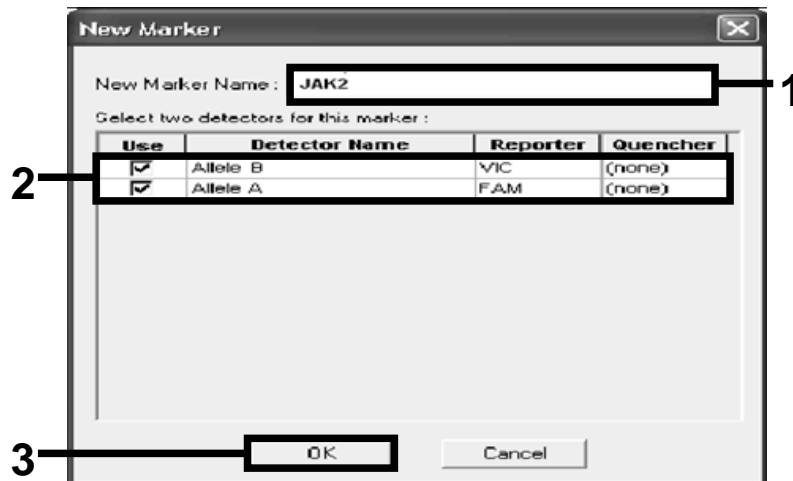
14 pav. Skydelyje „Markers in Document“ nėra jūsų programai tinkamo markerio.

16. Dialogo lango „New Detector“ laukelyje „Name“ (pavadinimas) įveskite *Allele A* (15 pav.). Palikite „Reporter Dye“ (žymės dažai) nustatytą ties „FAM“. Spustelėkite mygtuką „Color“, pasirinkite spalvą, po to spustelėkite „OK“ (15 pav.). Spustelėkite „Create Another“ (kurti kitą) (15 pav.).



15 pav. Detektorių kūrimas.

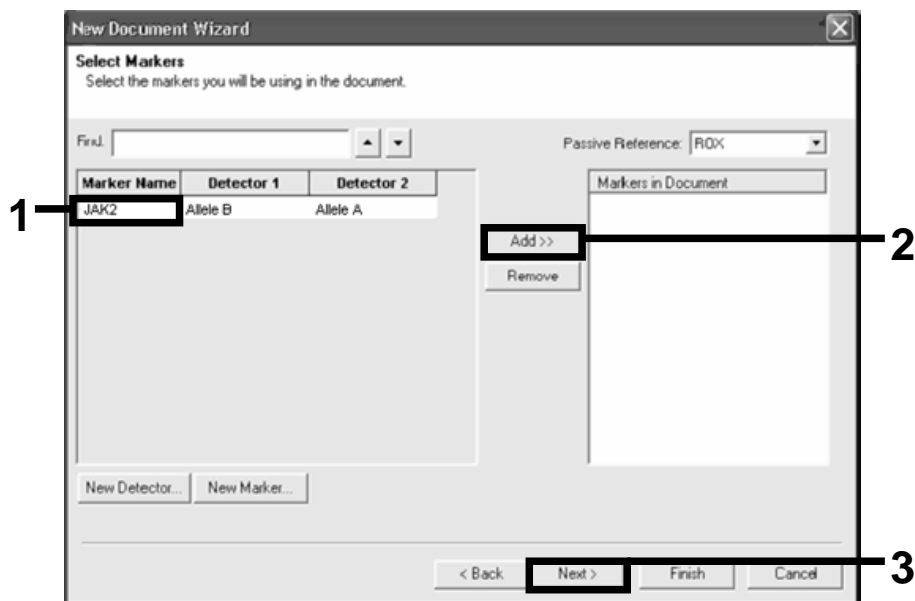
17. Kitame dialogo lango „New Detector“ laukelyje „Name“ (pavadinimas) įveskite *Allele B*. Laukelyje „Reporter Dye“ pasirinkite „VIC“. Spustelėkite mygtuką „Color“, pasirinkite spalvą, po to spustelėkite „OK“.
18. Dialogo lange „Select Markers“ pasirinkite „New Marker“ (naujas markeris) (žr. 14 pav.).
19. Dialogo lango „New Marker“ laukelyje „New Marker Name“ (naujo markerio pavadinimas) įveskite *JAK2* (16 pav.). Pasirinkite „Allele A“ ir „Allele B“ detektorius, sukurtus 16 ir 17 veiksmuose (arba jau apibrėžtus), ir spustelėkite „OK“ (16 pav.).



16 pav. Markerių kūrimas.

20. Dialogo lange „Select Markers“ pasirinkite aukščiau sukurtą „JAK2“ arba tinkamą iš anksto nustatytą markerį, paskui spustelėkite „Add>>“ (pridėti>>) (17 pav.).

Pastaba: norėdami pašalinti markerį pasirinkite jį, paskui spustelėkite „Remove“ (pašalinti).



17 pav. Markerių pasirinkimas.

21. Spustelėkite „Next>“.

22. Dialogo lange „Setup Sample Plate“ (mėginių lėkštės sąranka) spustelėkite ir vilkite pasirinkdami markerį šulinėliams, kuriuose yra mėginiai. Spustelėkite „Finish“ (baigti).

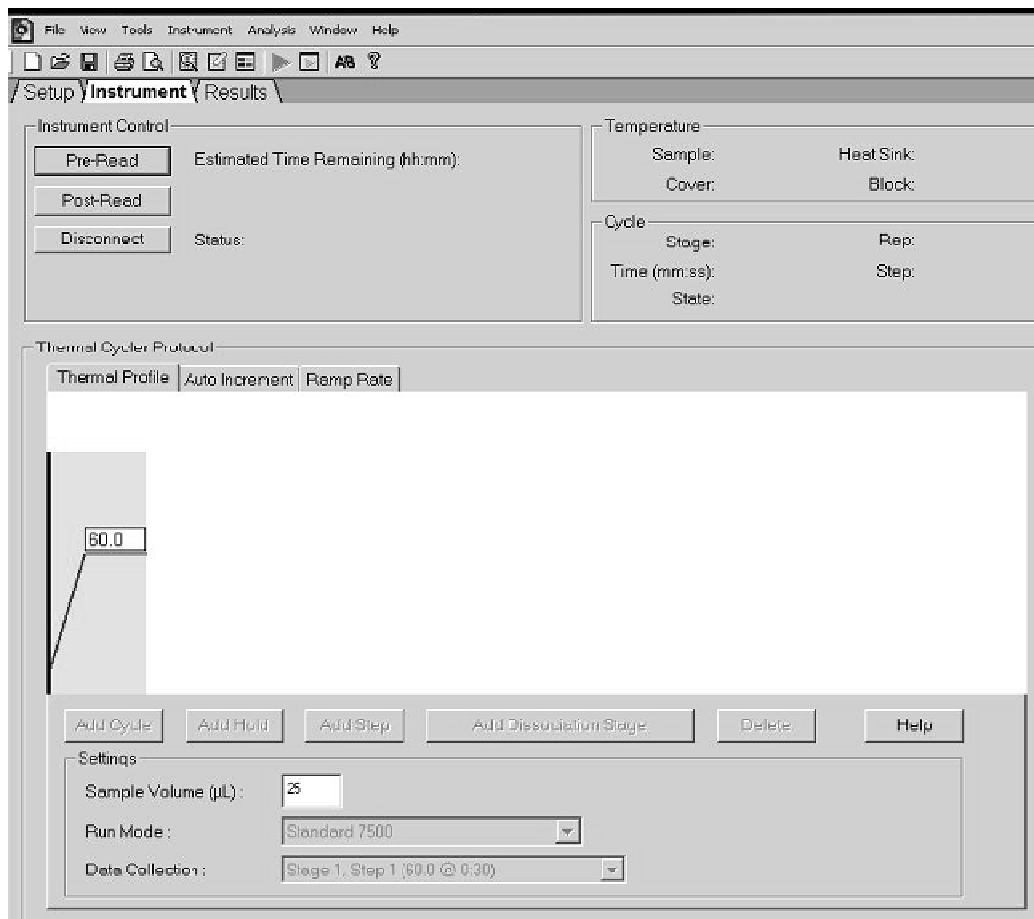
23. Pasirinkite skirtuką „Instrument“ (prietaisas) ir pakeiskite mėginio tūrį į 25 µl.

24. Pasirinkite „File/Save“ (failas / išsaugoti), paskui spustelėkite „Save“, kad būtų išsaugotas vardas, kurį priskyrėte sukurdami lėkštę.

25. Įdėkite reakcijų lėkštę į prietaisą laikydamiesi gamintojo rekomendacijų

26. Pradėkite vykdymą po nuskaitymo. Spustelėkite „Post-Read“ (po nuskaitymo).

Prietaisas atliks 1 ciklo 60 sekundžių trukmės vykdymą 60 °C temperatūroje. Šio vykdymo metu prietaisas surinks FAM ir VIC fluorescavimą kiekviename šulinėlyje (18 pav.).



18 pav. Vykdymas po nuskaitymo.

27. Pasirinkite „File/Export“ (failas / eksportuoti), paskui spustelėkite „Results“ (rezultatai), kad eksportuotumėte rezultatus į „Excel“ failą. Rezultatai bus pateikti kaip parodyta 19 pav.

Comments:		VIC mėginys 1							FAM mėginys 1			
12	SDS v1 ?											
14	Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method
16	A1	sample 1	VIC	Unknown	247.697	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.164	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call
17	A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call
18	A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call
19	A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call
20	A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call
21	A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.006	5.273	Undetermined	100.00	Manual Call
22	A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.943	Undetermined	100.00	Manual Call
23	A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call
24	A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call
25	A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call
26	A11	C-	VIC	Unknown	269.600	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call
27	A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call
28	B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call
29	B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call
30	B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call
31	B4	ER	VIC	Unknown	404.146	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call
32	B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call
33	B6	H2C	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.345	Undetermined	100.00	Manual Call
34	B7	H2C	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call
35	B8	H2C	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call

19 pav. Rezultatų pavyzdys, rodomas „Excel“ faile.

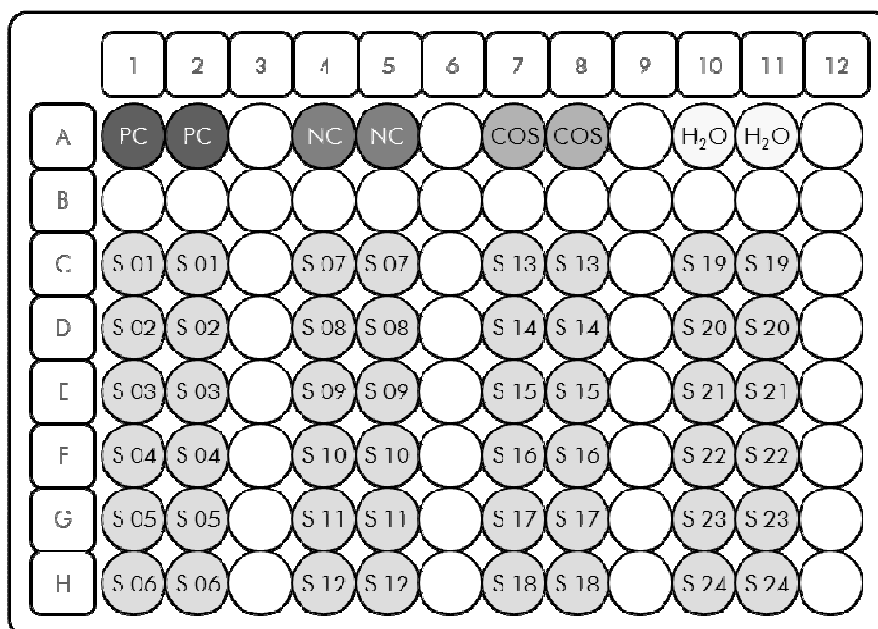
Protokolas: qPCR „LightCycler 480“ prietaise

Naudojant 96 šulinėlių lėkštės qPCR įrangą rekomenduojame atlikti visus matavimus du kartus, kaip nurodyta 8 lentelėje.

8 lentelė. „LightCycler 480“ prietaiso reakcijų skaičius

Mėginiai	Reakcijos
Su JAK2 V617F gruntų ir bandinių mišiniu (PPM-JAK2)	
n DNR mėginiai	n x 2 reakcijos
3 DNR kontrolės	6 reakcijos (PC-VF, NC-VF ir COS-VF, kiekviena testuota du kartus)
Vandens kontrolė	2 reakcijos

Mėginių apdorojimas „LightCycler 480“ prietaise



20 pav. Siūlomas lėkštės išdėstymas atliekant eksperimentą su *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkiniu. PC: teigiama kontrolė; NC: neigiama kontrolė; COS: ribinis mėginys; S: DNR mėginys; H₂O: vandens kontrolė.

qPCR „LightCycler 480“ prietaise

Pastaba: visus veiksmus atlikite ant ledo.

Procedūra

- 1. Atšildykite visus reikiamus komponentus ir sudėkite juos ant ledo.**
Komponentai turi būti išimti iš šaldiklio maždaug 10 min. prieš pradėdant procedūrą.
- 2. Pasukite ir trumpai centrifuguokite visus mėgintuvėlius (maždaug 10 s, 10 000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).**
- 3. Paruoškite toliau nurodytą qPCR mišinį atsižvelgdami į apdorojamų mėginių skaičių.**

Visos koncentracijos nurodytos galutiniam reakcijos tūriui.

9 lentelėje aprašoma lašinimo iš pipetės schema ruošiant vieno reagento mišinį, apskaičiuota taip, kad būtų gautas 25 µl galutinis reakcijos tūris. Išankstinis mišinys gali būti paruoštas, atsižvelgiant į reakcijų skaičių, naudojant tą patį grunto ir bandinio mišinį. Kompensuojant lašinimo iš pipetės klaidą gali būti įtraukti papildomi tūriai.

„LightCycler 480“ prietaise *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinys gali būti naudojamas 24 mėginiams analizuoti dviem egzemplioriais viename eksperimente (20 pav.), 20 mėginių dviem egzemplioriais dviejuose eksperimentuose, arba 15 mėginių dviem egzemplioriais trijuose eksperimentuose.

9 lentelė. qPCR mišinio paruošimas

Komponentas	Reakcijų skaičius (μl)				Galutinė koncentracija
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
„TaqMan Universal PCR Master Mix“, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Gruntų ir bandinių mišinys, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
PCR kategorijos vanduo be nukleazės	5	285	145	95	–
Mėginys (turi įdėtas 6 veiksmes)	5	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	Po 5 kiekv.	–
Bendras tūris	25	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	Po 25 kiekv.	–

* 24 mėginiai; 1 eksperimentas / rinkinys.

† 10 mėginių; 2 eksperimentai / rinkinys.

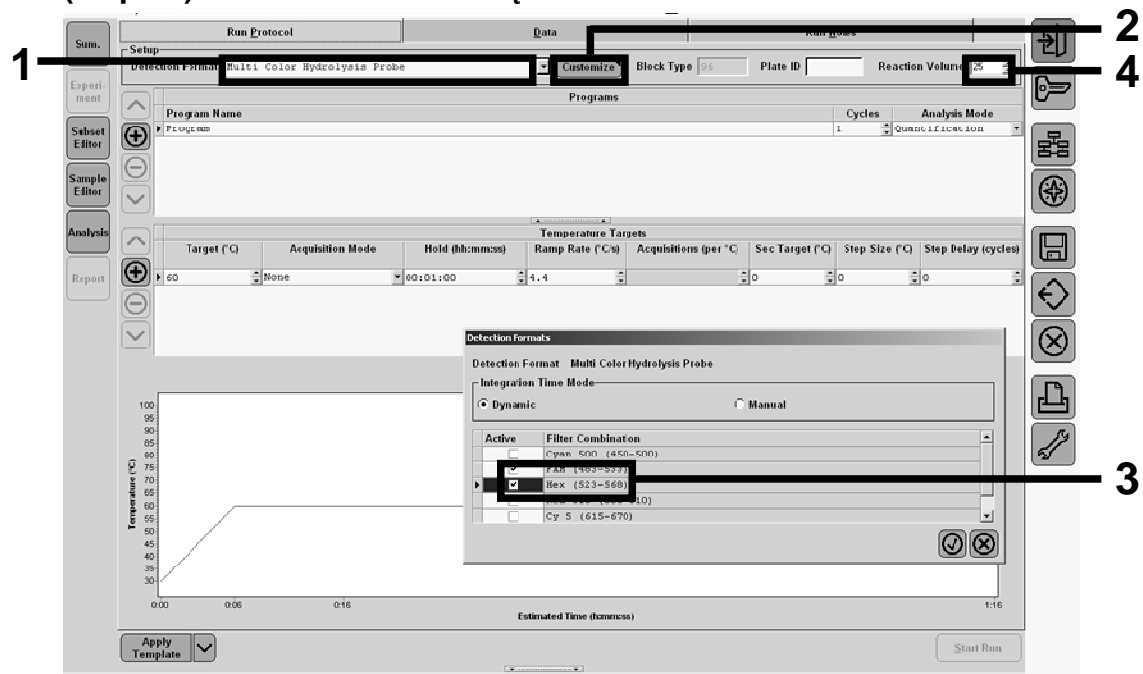
‡ 5 mėginiai; 3 eksperimentai / rinkinys.

4. Pasukiokite ir trumpai centrifuguokite qPCR mišinį (maždaug 10 s, 10 000 aps./min., kad skystis susirinktų mėgintuvėlio apačioje).
5. Supilkite į kiekvieną šulinėlį po 20 μl qPCR paruošiamojo mišinio.
6. Įpilkite 5 μl mėginio medžiagos DNR arba kontrolės į atitinkamą šulinėlį (bendras tūris 25 μl).
7. Atsargiai sumaišykite, lašindami pipete viršuje ir apačioje.
8. Uždarykite lėkštę ir trumpai centrifuguokite (300 x g, maždaug 10 s).
9. Įdėkite lėkštę į termociklerį atsižvelgdami į gamintojo rekomendacijas.
10. Pagrindiniame puslapyje pasirinkite „New Experiment“ (naujas eksperimentas).

11. „LightCycler 480 I vykdykite 11a veiksmą. „LightCycler 480 II vykdykite 11b veiksmą.

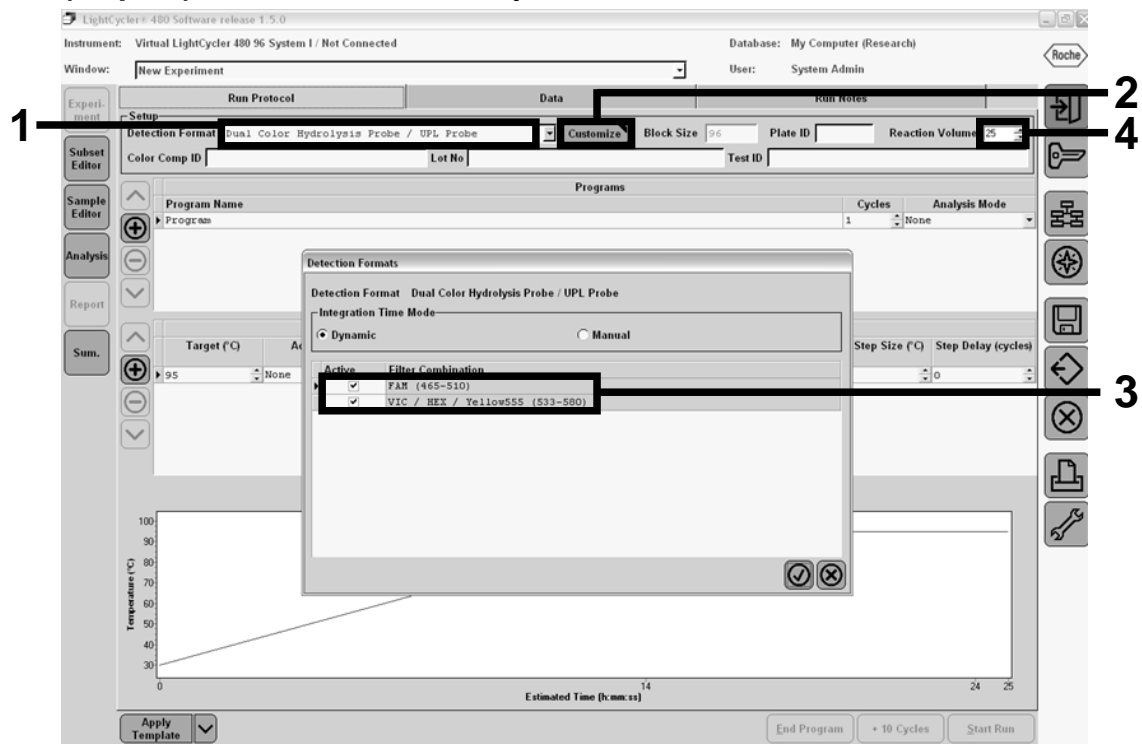
Išsamios informacijos apie „LightCycler 480“ prietaiso programavimą ieškokite prietaiso naudotojo vadove. Užtikrinant geresnę apžvalgą programos parametrai pateikiami pastoritnu juodu šriftu.

11a. „LightCycler 480 I“: Pasirinkite „Multi Color Hydrolysis Probe“ (spalvotas hidrolizės bandinys), spustelėkite „Customize“ (tinkinti), paskui patikrinkite, ar pasirinkti kanalai „FAM (483–533)“ ir „Hex (533–568)“ (pvz., VIC) (21 pav.). Nustatykite reakcijos tūrį ties „25“ µl (21 pav.) ir atlikite 12 veiksmą.



21 pav. „LightCycler 480 I“: aptikimo formato nustatymas.

11b. „LightCycler 480 II“: Pasirinkite „Dual Color Hydrolysis Probe“ (dviejų spalvų hidrolizės bandinys), spustelėkite „Customize“, paskui patikrinkite, ar pasirinkti kanalai „FAM (465–510)“ ir „VIC / HEX / (533–580)“ (pvz., VIC) (22 pav.). Nustatykite reakcijos tūrį ties „25“ µl (22 pav.) ir atlikite 12 veiksmą.



22 pav. „LightCycler 480 II“: aptikimo formato nustatymas.

12. Suprogramuokite termociklerį naudodami šiluminio ciklo nustatymo programą, kaip nurodyta 10 lentelėje ir pradėkite vykdymą.

Pastaba: aprašydami lėkštės sąranką prietaise, pasirinkite „Endpt Geno“ skyriuje „Step 1: select workflow“ (1 veiksmas: pasirinkite darbų eigą).

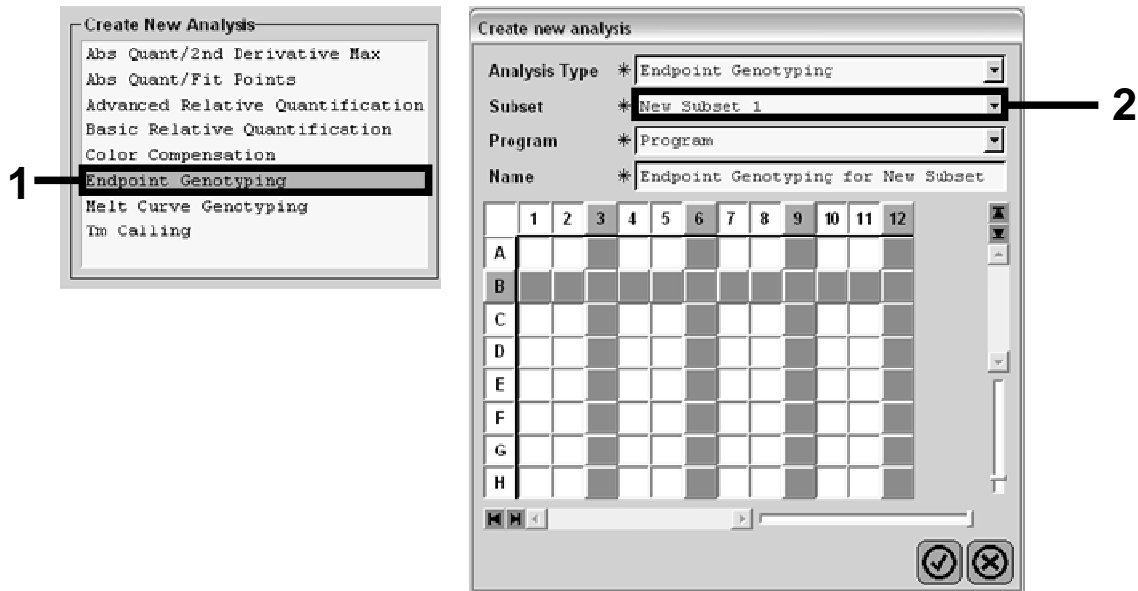
10 lentelė. „LightCycler 480“ prietaiso temperatūros profilis

Palaikymas	Temperatūra: 50 °C Trukmė: 2 minutės
Palaikymas 2	Temperatūra: 95 °C Trukmė: 10 minučių
Ciklai	50 kartų 92 °C 15 sekundžių; vienas 60 °C 1 minutę; vienas
Palaikymas 3	60 °C 1 minutę; vienas

„LightCycler 480“ prietaiso galutinio taško analizės procedūra

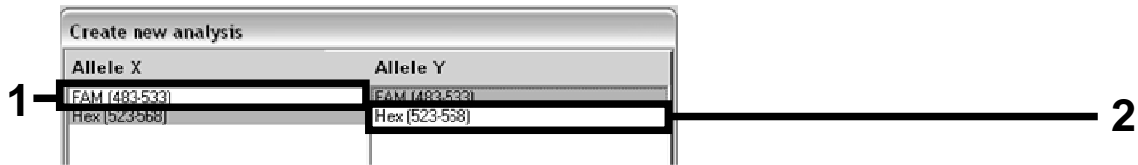
13. Pasibaigus vykdymui spustelėkite „Analysis“.

14. Dialogo lange „Create New Analysis“ (kurti naują analizę) pasirinkite „Endpoint Genotyping“ (galutinio taško genotipavimas), paskui meniu „Subset“ (poaibis) pasirinkite poaibį (23 pav.).



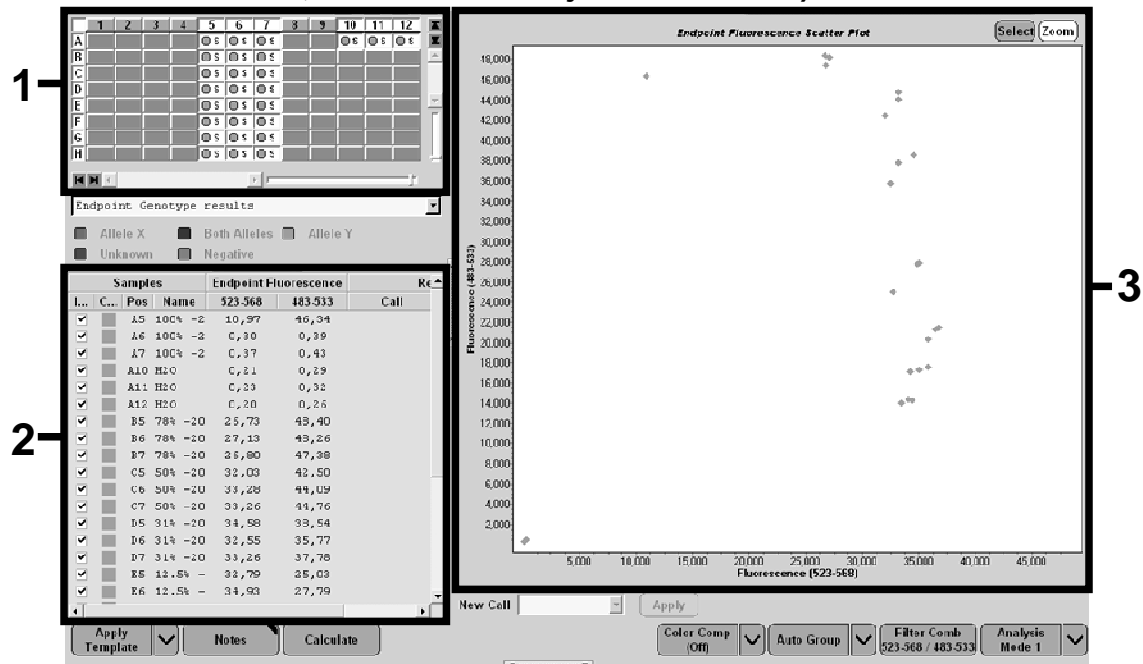
23 pav. Analizės tipo ir analizuojamo poaibio pasirinkimas.

15. Kitame lange pasirinkite „FAM“ (pvz., VIC) fluorescavimą „Allele X“ ir „Hex“ fluorescavimą „Allele Y“ (24 pav.).



24 pav. Fluorescavimo pasirinkimas „Allele X“ ir „Allele Y“.

16. Kitame lange (25 pav.) rodoma lėkštės sąranka (1, viršuje kairėje), kiekvieno mėginio fluorescavimo rezultatus (2, apačioje kairėje), ir išsisklaidymo brėžinį su aleliniu atskyrimu (3, dešinė; FAM ir VIC fluorescavimas, išmatuotas 50-ajame PCR cikle).



25 pav. Duomenų santrauka.

17. Norėdami eksportuoti duomenis dešiniuoju pelės klavišu spustelėkite mėginio rezultatų šabloną, paskui pasirinkite „Export Table“ (eksportuoti lentelę). Failas bus išsaugotas tekstinio failo (.txt) formatu.

18. Norėdami peržiūrėti ir analizuoti rezultatus atidarykite failą programoje „Excel“. Rezultatai bus pateikti kaip parodyta 26 pav.

Microsoft Excel - test

Fichier Edition Affichage Insertion Format Outils Données Fenêtre ?

Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)

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

VIC
FAM

26 pav. Rezultatų pavyzdys, rodomas „Excel“ faile.

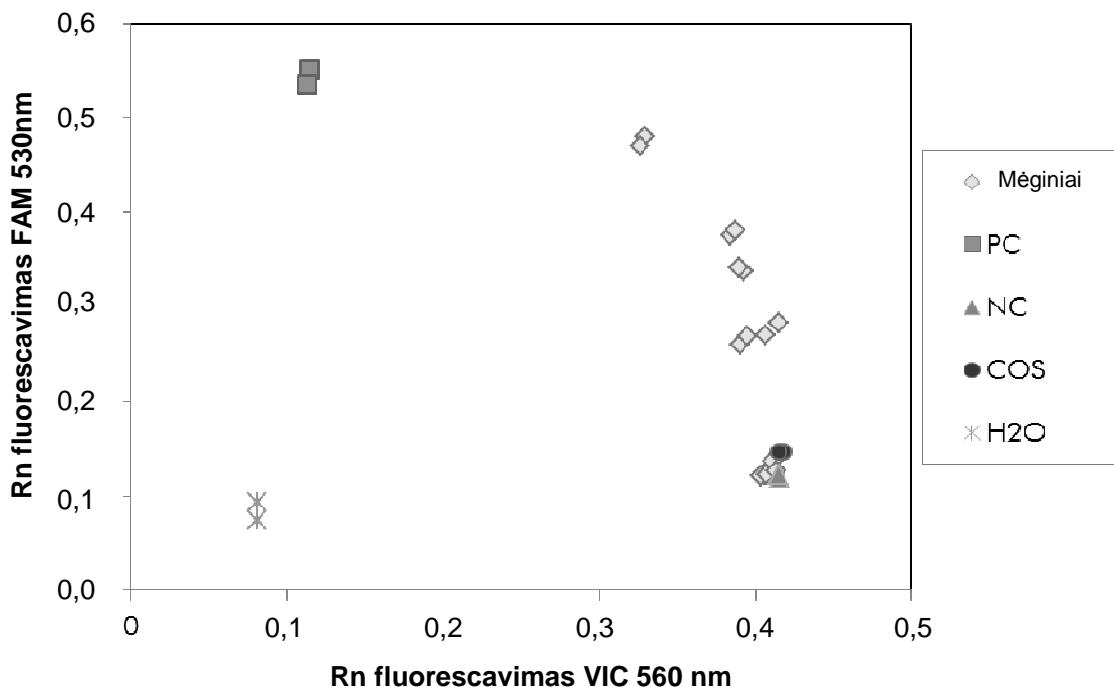
Rezultatų aiškinimas

Ištraukite eksportuotus duomenis iš sistemos sugeneruoto „Analyze Export File“ (analizės eksporto failas) ir patikrinkite fluorescavimo lygius (dubliuoti lygiai turi atitikti).

Paruoškite fluorescavimo duomenų grafinį vaizdavimą (išsklaidymo brėžinį). x ašis yra VIC fluorescavimas; y ašis yra FAM fluorescavimas.

Grafinis vaizdavimas ir kokybės kontrolės kriterijai

Išsklaidymo brėžinio pavyzdys pateiktas 27 pav.



27 pav. Reprezentacinio alelinio atskyrimo eksperimento išsklaidymo brėžinys. Prietaisai: „Rotor-Gene Q“, „Applied Biosystems“, ABI PRISM ir „LightCycler 480“.

Mėginiai turi būti sudėti į lanką, jungiantį neigiamas kontroles (NC) su teigiamomis kontrolėmis (PC).

Netinkama bet kokios kontrolės padėtis gali rodyti eksperimento klaidą.

- Teigiamos kontrolės turi būti išdėstytos viršutiniame kairiajame kampe.
- Neigiamos kontrolės turi būti išdėstytos apatiniame dešiniajame kampe.
- Netinkama neigiamos kontrolės padėtis gali rodyti užteršimą.

- Ribinis mėginys (COS) turi būti rodomas virš neigiamų kontrolių.
- Vandens kontrolės (H₂O) turi būti apatiniam kairiajame kampe.
 - Neteisinga vandens kontrolės padėtis (aukščiau nei NC matuojant FAM arba aukščiau nei PC matuojant VIC) gali rodyti užteršimą.

Pastaba: neteisinga kontrolės arba mėginio padėtis išsklaidymo brėžinyje turi būti atmesta ir eksperimentas turi būti atliktas iš naujo naudojant naują DNR mėginį.

Normalizuoto FAM / VIC santykio ir apskaičiavimas ir genotipavimas

Apskaičiuokite visų mėginių FAM / VIC santykius. Apskaičiuokite teigiamos kontrolės (PC) FAM / VIC santykius, ribinį mėginį (COS) ir neigiamą kontrolę (NC). Dubliuotų egzempliorių santykiai turi atitikti. Apskaičiuokite vidutinį visų dublikatų santykį.

Apskaičiuokite ribinio mėginio (COS) ir visų mėginių normalizuotą santykį (NRatio):

$$\text{NRatio}_{\text{Mėginys}} = \frac{\text{Santykis}_{\text{Mėginys}}}{\text{Santykis}_{\text{NC}}}$$

Pastaba: pilka testo zona (GZ) apibrėžiama kaip reikšmių sritis, kurioje išsklaidymo veiksmingumas yra nepakankamai tikslus. Pilkos zonoje esanti reikšmė rodo, kad tikslinis markeris negali būti įvertintas kaip esantis arba nesantis. Pilkos zona turi būti apskaičiuota kiekvienam eksperimentui.

Apskaičiuokite pilkąją zoną arba abejotiną sritį, šalia normalizuoto COS santykio (NRatio_{COS}):

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

Palyginkite kiekvieno mėginio normalizuotą santykį su NRatio_{COS} GZ. Rezultatų aiškinimas apibrėžiamas 11 lentelėje.

11 lentelė. Genotipavimo rezultatų aiškinimas naudojant normalizuotus santykius

Rezultatai	Aiškinimas
$\text{NRatio}_{\text{Mėginys}} > \text{NRatio}_{\text{COS}} \times 1,06$	Aptiktas JAK2 V617F
$\text{NRatio}_{\text{Mėginys}} < \text{NRatio}_{\text{COS}} \times 0,94$	JAK2 V617F neaptiktas
$\text{NRatio}_{\text{Mėginys}} \text{ NRatio}_{\text{COS}}$ ribose GZ	Rezultatas negalutinis

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas sprendžiant bet kokias iškilusias problemas. Norėdami gauti daugiau informacijos taip pat skaitykite dažnai užduodamų klausimų puslapį mūsų Techninės pagalbos centre: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninių tarnybų mokslininkai visuomet mielai atsakys į bet kokius klausimus, kurie gali jums kilti tiek dėl šiame vadove pateiktos, tiek su mėginiais ir tyrimo technologijomis susijusios informacijos bei protokolų (kontaktinę informaciją rasite „Kontaktinė informacija“, 49 psl.).

Komentarai ir pasiūlymai

Teigiamos kontrolės neigiamas signalas

- a) Pipečių lašinimo klaida Patikrinkite pipečių schemą ir reakcijos sąranką.
Pakartokite PCR vykdymą.
- b) Netinkamas rinkinio komponentų saugojimas Laikykite *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinį temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir saugokite gruntų ir bandinių mišinius (PPM) nuo šviesos. Žr. „Reagento saugojimas ir naudojimas“, 11 psl.
Venkite pakartotinai užšaldyti ir atšildyti.
Paskirstykite reagentus saugojimui.

Neigiamos kontrolės yra teigiamos

- Tarpusavio užteršimas Pakeiskite visus gyvybiškai svarbius reagentus.
Pakartokite eksperimentą su naujais visų reagentų bandiniais.
Visada dirbkite su mėginiais, rinkinio komponentais ir vartojimo reikmenimis laikydamiesi bendrai patvirtintos praktikos, taip išvengsite tarpusavio užteršimo pernešimo.

Nėra signalo, net esant teigiamoms kontrolėms

- a) Pipečių lašinimo klaida arba praleisti reagentai Patikrinkite pipečių schemą ir reakcijos sąranką.
Pakartokite PCR vykdymą.

Komentariai ir pasiūlymai

- | | |
|---|--|
| b) Slopinantys mėginio medžiagos poveikiai, sukelti nepakankamo išgryninimo | Pakartokite DNR paruošimą. |
| c) „LightCycler“: Pasirinktas neteisingas aptikimo kanalas | Nustatykite kanalo parametras ties F1/F2 arba 530 nm / 640 nm. |
| d) „LightCycler“: duomenų gavimas nesuprogramuotas | Patikrinkite ciklo programas.
Kiekvieno PCR programos išdeginimo segmento pabaigoje pasirinkite gavimo režimą ties „single“ (vienas). |

Mėginių signalo nėra arba signalas silpnas, bet teigiamos kontrolės geros

- | | |
|---|--|
| Prasta DNR kokybė arba maža koncentracija | Prieš pradėdami visada patikrinkite DNR kokybę ir koncentraciją. |
|---|--|

„LightCycler“: fluorescencinis intensyvumas per silpnas

- | | |
|--|--|
| a) Netinkamas rinkinio komponentų saugojimas | Laikykite <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ rinkinį temperatūroje nuo –30 iki –15 °C ir saugokite gruntų ir bandinių mišinius (PPM) nuo šviesos. Žr. „Reagento saugojimas ir naudojimas“, 11 psl.
Venkite pakartotinai užšaldyti ir atšildyti.
Paskirstykite reagentus saugojimui. |
| b) Labai mažas pradinis tikslinio DNR kiekis | Padidinkite mėginio DNR kiekį.
Pastaba: priklausomai nuo pasirinkto DNR paruošimo metodo gali atsirasti slopinantis poveikis. |

„LightCycler“: skiriasi fluorescencinis intensyvumas

- | | |
|----------------------------|---|
| a) Pipečių lašinimo klaida | Įvairovę sukėlusį vadinamoji „pipečių lašinimo klaida“ gali būti sumažinta analizuojant duomenis F1/F2 arba 530 nm/640 nm režimu. |
|----------------------------|---|

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ“ rinkinio partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę. Svetainėje www.qiagen.com/support/ užsakius galima gauti analizės sertifikatą.

Apribojimai

Visi reagentai gali būti išskirtinai naudojami diagnostikai *in vitro*. Gaminį turi naudoti tik specialiai apmokyti ir išklause instrukcijas dėl *in vitro* diagnostikos procedūrų atlikimo darbuotojai.

Norint užtikrinti optimalius PCR rezultatus reikia griežtai laikytis naudotojo vadove pateiktų nurodymų.

Reikia atkreipti dėmesį į galiojimo pabaigos datas, išspausdintas ant visų komponentų dėžių ir etikečių. Nenaudokite komponentų, kurių naudojimo laikas pasibaigęs.

Visi sugeneruoti diagnostiniai rezultatai turi būti aiškinami kartu su kitais gautais klinikiniais arba laboratoriniais duomenimis. Naudotojas atsako už sistemos tinkamumo patvirtinimą bet kokioms jo laboratorijoje atliekamoms procedūroms, kurioms nebuvo atlikti QIAGEN tinkamumo tyrimai.

Eksplotavimo charakteristikos

Buvo atlikti sistemos „Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System“ eksploataavimo savybių tyrimai.

Neklinikiniai tyrimai

Buvo atlikti neklinikiniai tyrimai, skirti nustatyti analitinę *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinio veikimą.

Tikslumas priartėjus prie ribinės reikšmės

Penki mažą mutavimo lygį atitinkantys mėginiai buvo išmatuoti 40 kartų naudojant 3 *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinio partijas. Rezultatų santrauka pateikta 12 lentelėje.

12 lentelė. Neklinikinių tyrimų tikslumo duomenys

Mėginys	Kartojimai	Aptiktas mutavimas	Rezultatas negalutinis	Mutavimas neaptiktas
0 %	40	0	0	40
0,5 %	40	0	0	40
1 %	40	0	5	35
4 %	40	40	0	0
8 %	40	40	0	0

Įvesties ribos

Rekomenduojama genominės DNR įvestis yra 25 ng. Buvo ištirti skirtingi DNR kiekiai, siekiant nustatyti, ar genominės DNR suma gali paveikti normalizuotą santykį, dėl to bus gauti negalutiniai rezultatai. Rezultatų santrauka pateikta 13 lentelėje.

13 lentelė. Genomo DNR įvesties kiekio poveikis

Mėginys	Įvestis (ng)	Kartojimai	Aptiktas mutavimas	Rezultatas negalutinis	Mutavimas neaptiktas
0 %	2,5	3	0	0	3
	10	3	0	0	3
	25	3	0	0	3
	100	3	0	0	3
	250	3	0	0	3
Viso 0 %		15	0	0	15

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

13 lentelė. Tęsinys

Mėginys	Įvestis (ng)	Kartojimai	Aptiktas mutavimas	Rezultatas negalutinis	Mutavimas neaptiktas
1 %	2,5	3	0	0	3
	10	3	0	0	3
	25	3	0	0	3
	100	3	0	1	2
	250	3	0	2	1
Viso 1 %		15	0	3	12
4 %	2,5	3	2	1	0
	10	3	3	0	0
	25	3	3	0	0
	100	3	3	0	0
	250	3	3	0	0
Viso 4 %		15	14	1	0
100 %	2,5	3	3	0	0
	10	3	3	0	0
	25	3	3	0	0
	100	3	3	0	0
	250	3	3	0	0
Viso 100 %		15	15	0	0

Klinikiniai tyrimai

Naudojant *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinį buvo išanalizuoti 98 subjektų DNR mėginiai, anksčiau charakterizuoti taikant nepriklausomą metodą, kartu su 9 DNR mėginiais, paimtais iš sveikų donorų. Rezultatų santrauka pateikta 14 lentelėje.

14 lentelė. Anksčiau charakterizuotų naudojant *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinį mėginių rezultatai

Mėginys	Kartojimai	Aptiktas mutavimas	Rezultatas negalutinis	Mutavimas neaptiktas	Tyrimo triktis
JAK2 laukinio tipo	50	0	1	49	0
0% JAK2 V617F <Mėginys≤2% JAK2 V617F	9	2	1	6	0
>5% JAK2 V617F	48	47	0	0	1

98 % tikėtinų neigiamų mėginių mutacija nebuvo aptikta.

100 % tikėtinų teigiamų mėginių mutacija buvo aptikta.











Atmetus abejotinus rezultatus (t. y., rezultatus iki 2 % arba negalutinius rezultatus), bendras sutarimas yra 100 %.

Nuorodos

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

Simboliai

Toliau pateikti simboliai gali būti nurodyti ant pakuotės ir etiketėse:

	Sudėtyje yra reagentų, kurių pakanka <N> reakcijoms
	Sunaudoti iki
	<i>In vitro</i> diagnostikai skirtas medicinos prietaisas
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris
	Visuotinis prekinio vieneto numeris
	Temperatūros apribojimas
	Gamintojas
	Žr. naudojimo instrukcijas

Kontaktinė informacija

Norėdami gauti techninės pagalbos ir išsamesnės informacijos apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support, skambinkite 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš QIAGEN techninės priežiūros departamentų arba vietinių platintojų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Užsakymo informacija

Gaminys	Turinys	Kat. nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit (24)	24 reakcijoms: V617F teigiama kontrolė, V617F neigiama kontrolė, V617F ribinis mėginys, gruntų ir mėginių mišinys JAK2 V617F, pagrindinis mišinys, skirtas qPCR, vanduo be nukleazės	673223
„Rotor-Gene Q MDx“ – IVD patvirtintai tikrojo laiko PCR analizei klinikinėse programose		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Tikrojo laiko PCR cikleris ir didelės raiškos lydymo analizatorius su 5 kanalais (žalias, geltonas, oranžinis, raudonas, tamsiai raudonas) ir HRM kanalas, nešiojamas kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Tikrojo laiko PCR cikleris ir didelės raiškos lydymo analizatorius su 5 kanalais (žalias, geltonas, oranžinis, raudonas, tamsiai raudonas) ir HRM kanalas, nešiojamas kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, montavimas ir mokymai	9002033
„QIAamp DNA Blood Maxi Kit“ – genominei DNR išgryninti iš kraujo		
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10)	10 DNR maks. ruošinių: 10 „QIAamp Maxi Spin“ kolonų, QIAGEN proteazė, buferiai, ėmimo mėgintuvėliai (50 ml)	51192
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50)	50 DNR maks. ruošinių: 50 „QIAamp Maxi Spin“ kolonų, QIAGEN proteazė, buferiai, ėmimo mėgintuvėliai (50 ml)	51194

Norėdami sužinoti naujausią licenzijos informaciją ir konkrečiam gaminiui taikomus atsisakymus skaitykite atitinkamo QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. QIAGEN rinkinio vadovus ir naudotojo vadovus galima rasti adresu www.qiagen.com arba jų galima prašyti iš QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

Šis gaminys skirtas naudoti diagnostikai *in vitro*. *ipsogen* gaminių negalima pakartotinai parduoti, keisti, pritaikant pakartotinam pardavimui, arba naudoti komercinių produktų gamybai negavus rašytinio QIAGEN patvirtinimo.

Šiame dokumente pateikta informacija gali būti pakeista be įspėjimo. QIAGEN neprisiima atsakomybės už bet kokias šiame dokumente galinčias pasitaikyti klaidas. Laikoma, kad šis dokumentas yra išsamus ir tikslus publikavimo metu. Jokiu atveju QIAGEN nebus laikoma atsakinga už atsitiktinę, specialiąją, daugybinę arba pasekinę žalą, susijusią arba kilusią iš šio dokumento naudojimo.

Garantuojama, kad *ipsogen* gaminiai atitinka nurodytus techninius duomenis. Tuo atveju, jei gaminys neveikia kaip numatyta, vienintelis QIAGEN įsipareigojimas ir vienintelė kliento kompensacija apribojama nemokamu gaminių pakeitimu.

Šis gaminys yra parduotas pagal licencinį susitarimą su „Epoch Biosciences“ naudoti tik IVD ir jis negali būti naudojamas jokiems kitiems moksliniams, komerciniams klinikiškiems tyrimams ar kitiems, ne IVD srities, tikslams.

Čia nurodyta JAK2 V617F mutacija ir naudojimo būdai saugomi patentų teise, įskaitant Europos patentą EP1692281, JAV patentus 7,429,456 ir 7,781,199, JAV patentų paraiškas US20090162849 ir US20120066776 bei užsienio analogus.

Šio gaminių pirkimas nesuteikia jokių teisių jį naudoti klinikiškiems vaistinių preparatų nuo JAK2 V617F tyrimams. Tokiems naudojimui atvejams QIAGEN sukuria specialias licencijų programas. Kreipkitės į mūsų teisės departamentą adresu jak2licenses@qiagen.com.

Prekių ženklai: „QIAGEN“[®], „Sample to Insight“[®], „QIAamp“[®], „*ipsogen*“[®], „Rotor-Gene“[®] („QIAGEN Group“); ABI PRISM[®], „Applied Biosystems“[®], FAM[™], VIC[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); „Excel“[®] („Microsoft Corporation“); „LightCycler“[®], „TaqMan“[®] („Roche Group“); MGB[™] („Epoch Biosciences“).

Ribotoji licencinė sutartis

Naudodamas šį gaminį bet kuris *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinio pirkėjas arba naudotojas sutinka su nurodytomis sąlygomis:

1. *ipsogen*JAK2 MutaScreen EZ rinkinys gali būti naudojamas išskirtinai tik laikantis „*ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinio vadove, skirtame naudoti tik su rinkinyje esančiais komponentais, pateiktų nurodymų. QIAGEN nesuteikia licencijos teisių pagal jokią savo intelektinę nuosavybę naudoti arba įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su bet kokiais jį rinkinį neįtrauktais komponentais, išskyrus atvejus, aprašytus „*ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ rinkinio vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com.
2. Išskyrus tai, kas aiškiai nurodyta licencijose, QIAGEN negarantuoja, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Licenzija suteikiama vienkartiniam šio rinkinio ir jo komponentų naudojimui ir jį negali būti panaudoti pakartotinai, konstrukciškai modifikuoti arba perparduoti.
4. QIAGEN atsisako visų kitų licencijų, tiesiogiai išreikštų arba numatomų, išskyrus aiškiai nurodytąsias.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka neatlikti arba neleisti kam nors kitam atlikti jokių žingsnių, dėl kurių būtų įvykdyti aukščiau uždrausti veiksmai arba palengvėtų jų įvykdymas. QIAGEN gali kreiptis į bet kurį teismą užtikrindama šios ribotos licencinės sutarties draudimų laikymąsi ir jai bus atlygintos visos tyrimo ir teismo išlaidos, įskaitant advokato honorarus, patirtos bet kokiuose teisiniuose veiksmuose, kurių ji bus priversta imtis užtikrindama šios ribotos licencinės sutarties arba bet kokių joje nurodytų intelektinės nuosavybės teisių, susijusių su rinkiniu ir (arba) jo komponentais, vykdymą.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

HB-1359-003 © 2013–2016 QIAGEN, visos teisės saugomos.

www.qiagen.com

