

Juni 2016

# Handleiding

## *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 Muta *Screen Kit*

 10 (catalogusnr. 673022)

 24 (catalogusnr. 673023)

Versie 1

**IVD**

Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met instrumenten van Rotor-Gene<sup>®</sup> Q,  
Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> en LightCycler<sup>®</sup>

**CE**

**REF** 673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R3 **MAT** 1072500NL



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. Ga naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) voor meer informatie.

# Inhoud

Beoogd gebruik	4
Samenvatting en uitleg	4
Uitgangspunt van de procedure	6
Meegeleverde materialen	7
Inhoud van de kit	7
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	8
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	9
Algemene voorzorgsmaatregelen	9
Opslag en hantering van reagentia	10
Procedure	11
Bereiding DNA-monsters	11
Opslag van nucleïnezuren	11
Protocol: qPCR op Rotor Gene Q-instrumenten met rotor voor 72 buisjes	11
Protocol: qPCR met Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten	23
Protocol: qPCR met het LightCycler 480-instrument	32
Protocol: qPCR met een LightCycler 2.0-instrument	41
Interpretatie van de resultaten	47
Grafische weergave en criteria voor kwaliteitscontrole	47
Berekening van de genormaliseerde FAM/VIC-ratio en genotypering	48
Problemen oplossen	51
Kwaliteitscontrole	53
Beperkingen	53
Prestatiekenmerken	54
Niet-klinische onderzoeken	54
Klinische onderzoeken	55
Referenties	61
Symbolen	62
Contactgegevens	62
Bestelgegevens	63

## Beoogd gebruik

De *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKits* zijn bedoeld voor de detectie van de JAK2 V617F/G1849T-mutatie in genomisch DNA van proefpersonen met verdenking op myeloproliferatieve neoplasmata. De afwezigheid van JAK2 V617F/G1849T sluit de aanwezigheid van andere JAK2-mutaties niet uit. Als er extra mutaties voorkomen in de codons 615 tot 619 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 onderdelen vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

## Samenvatting en uitleg

In 2005 (2–5) werd de terugkerende somatische mutatie V617F ontdekt, 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 voor een aantal cytokinen, waaronder erythropoëetine, een cruciaal intracellulair signaalmolecuul.

De JAK2 V617F-mutatie is gedetecteerd bij > 95% van de patiënten met polycytemia vera (PV), 50–60% van de patiënten met essentiële trombocytemie (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 erythropoëtineafhankelijke erythroïde koloniegroei (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.

Voorheen werd MPN gediagnosticeerd op basis van 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 de diagnose van polycytemia vera (PV)	
Primair	<p>1. Hemoglobine (Hb) &gt; 18,5 g/dl<sup>1</sup> (mannen) of &gt; 16,5 g/dl<sup>1</sup> (vrouwen), of Hb of hematocriet (Hct) &gt; 99e percentiel van het referentiebereik voor leeftijd, geslacht of hoogte van leefomgeving; of                      Hb &gt; 17 g/dl<sup>1</sup> (mannen) of &gt; 15 g/dl<sup>1</sup> (vrouwen) indien verband houdend met een aanhoudende toename van <math>\geq 2</math> g/dl<sup>1</sup> ten opzichte van het basisniveau die niet kan worden toegeschreven aan het wegnemen van een ijzertekort; of                      Rodebloedcellenmassa &gt; 25% boven de gemiddelde normale voorspelde waarde</p> <p>2. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of een soortgelijke mutatie</p>
Secundair	<p>1. Myeloproliferatie van drie cellijnen van beenmerg                      2. Subnormaal erytropoëtinegehalte in serum                      3. Groei endogene erythroïde kolonie (Endogenous erythroid colony, EEC)</p>
Criteria voor de diagnose van essentiële trombocytemie (ET)	
Primair	<p>1. Aantal bloedplaatjes <math>\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}</math>                      2. Proliferatie van megakaryocyten met grote en ontwikkelde morfologie. Geen of weinig proliferatie van granulocyten of erythroïde proliferatie                      3. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor chronische myeloïde leukemie (CML), PV, primaire myelofibrose (PMF), myelodysplastisch syndroom (MDS) of een andere vorm van myeloïde neoplasma</p> <p>4. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of een andere klonale merker; of                      Geen tekenen van reactieve trombocytose</p>
Secundair	-
Criteria voor de 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 een andere vorm van myeloïde neoplasma</p> <p>3. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of een andere klonale merker; of                      Geen tekenen van reactieve beenmergfibrose</p>
Secundair	<p>1. Leuko-erythroblastose                      2. Toename van lactaatdehydrogenase (LDH) in serum                      3. Anemie                      4. Palpabele splenomegalie</p>

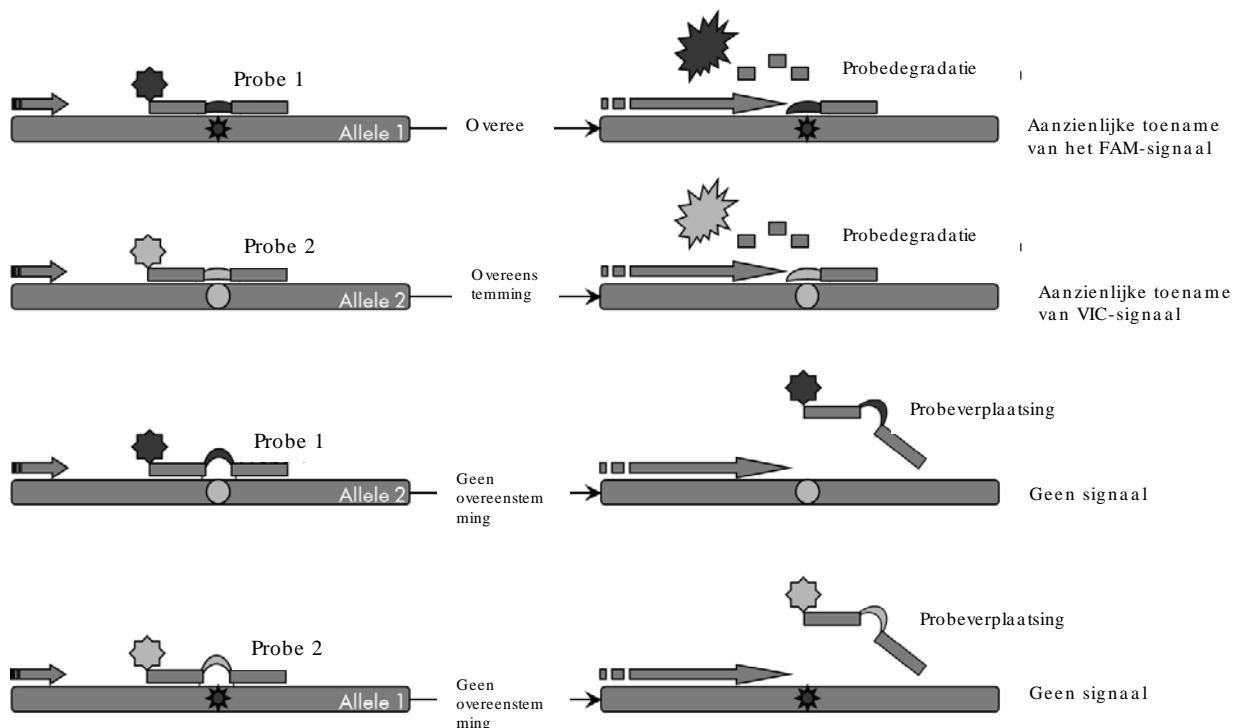
Internationale experts hebben onlangs criteria aangedragen voor therapeutische tests bij PV en ET. Op basis van gegevens van transplantaat, interferon alfa of hydroxyurea is JAK2-V617F-kwantificatie toegevoegd als mogelijk bruikbaar hulpmiddel voor het beoordelen van de respons op behandeling (9). Tijdens 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

In een allelisch onderscheidingsassay worden twee TaqMan<sup>®</sup>-probes gebruikt in een multiplex assay. Eén komt exact overeen met de sequentie van allel 2 (zoals het wildtype allel) en de andere komt exact overeen met de sequentie van allel 1 (zoals het allel met een mutatie). Elke probe is gemerkt met een onderscheidende fluorescerende kleurstof aan het 5'-uiteinde ervan, de reporter, zoals FAM<sup>™</sup> of VIC<sup>®</sup> en bevat een niet-fluorescerende quencher aan het 3'-uiteinde. De probes bevatten ook een minor groove binder (MGB<sup>™</sup>) waardoor kortere en stabielere probes kunnen worden gebruikt voor een meer nauwkeurige allelische discriminatie.

Tijdens de verlengingsfase van de PCR wordt de exact overeenkomende probe gesplitst door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van *Taq*-DNA-polymerase, waardoor de reporterkleurstof van de quencher wordt gescheiden en detecteerbaar fluorofoor vrijkomt. De probe die niet exact overeenkomt, wordt verplaatst in plaats van gespleten door het *Taq*-DNA-polymerase en geeft geen reporterkleurstof af. Het gegenereerde fluorescentiesignaal (VIC of FAM) wordt verzameld aan het einde van de PCR (eindpunt) en geeft onmiddellijk de aanwezigheid aan van de beoogde sequentie(s) in het monster (wildtype allel, gemuteerd allel of beide). Lange en moeizame PCR-vervolgstappen, die ook het besmettingsrisico verhogen, zijn niet noodzakelijk. De werkelijke hoeveelheid doelsequentie is niet vastgesteld.

De *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* gebruikt deze technologie zoals afgebeeld (zie afbeelding 1).



Afbeelding 1. Multiplex assay met TaqMan-probe. De *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* gebruikt deze technologie voor allelische discriminatie.

## Meegeleverde materialen

### Inhoud van de kit

<i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit</i>		(10)	(24)
Catalogusnr.		673022	673023
Aantal reacties		24	10
V617F Positive Control (V617F positieve controle)*	PG-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control (V617F negatieve controle)*†	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-off sample (Drempelmonster)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix (Primer-probemengsel) JAK2 V617F‡	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit Handbook</i> (Handleiding <i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i> ) (Engelstalig)		1	1

\* Positive control (Positieve controle): 100% V617F-DNA.

† Negative control (Negatieve controle): 100% wildtype DNA; 0% V617F.

‡ Mengsel van specifieke reverse en forward primers voor het *JAK2* gen, V617F-specifieke FAM-probe en wildtype VIC-probe.

Opmerking: Buisjes voor gebruik kort centrifugeren.

Opmerking: Voor het analyseren van onbekende monsters met de *ipsogen JAK2 Muta Screen* kit moet genomisch DNA worden geëxtraheerd. Reagentia die nodig zijn voor de extractie van DNA (bijv. de QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, cat.nr. 51304) worden niet meegeleverd en moeten worden gevalideerd in combinatie met de kit.

## 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 (VIB of SDS) die verkrijgbaar zijn bij de leveranciers van de producten.

### Reagentia

- Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit
- Nucleasevrij 1x TE-buffer, pH 8,0 (bijv. Thermo Fisher Scientific Inc., cat.nr. 12090015)
- Buffer en *Taq*-DNA-polymerase: De gevalideerde reagentia zijn TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., cat.nr. 4304437) en LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat.nr. 04535286001)
- Reagentia voor agarosegel van 0,8-1% in 0,5x TBE-elektroforesebuffer

### Verbruiksartikelen

- Nucleasevrije, aerosolbestendige, steriele PCR-pipettips met hydrofoobfilter
- PCR-buisjes van 0,5 ml of 0,2 ml zonder RNase en DNase
- Ijs

### Apparatuur

- Pipetten\* bedoeld voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Tafelcentrifuge\* met rotor voor reageerbuisjes van 0,2 ml/0,5 ml (die een snelheid van 10.000 tpm kan halen)
- Spectrofotometer\* voor DNA-kwantificatie
- Instrument voor realtime PCR:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM of een ander Rotor-Gene-instrument; LightCycler 2.0 of 480; Applied Biosystems 7300-systeem voor realtime PCR, Applied Biosystems 7500-systeem voor realtime PCR, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS of ABI PRISM 7900HT SDS; en bijbehorend specifiek materiaal
- Apparatuur\* voor pulsed-field gel-elektroforese

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



# Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Bedoeld voor in-vitrodiagnostiek

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact PDF-formaat op [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

Voer monster- en assayafval af in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

## Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor de uitvoering van qPCR-testen zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die geschikt zijn 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. Een verdere verdunning van de reagentia of het hanteren van andere incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve of tegenstrijdige gegevens. PPM-VF-reagens kan veranderen als het wordt blootgesteld 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:

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

Wij adviseren u het volgende:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik nieuwe aërosolbestendige pipettips voor alle pipetstappen om kruisbesmetting van de monsters en reagentia te voorkomen.

Bereid het PCR-mastervoormengsel met speciaal hiervoor bestemd materiaal (pipetten, tips, enz.) in een speciaal hiervoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, plasmide) worden verwerkt. Voeg de template toe in een afzonderlijke zone (bij voorkeur in een andere ruimte) met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).

## Opslag en hantering van reagentia

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

- Stel de primer-probemengsels (PPM-VF-buisje) zo min mogelijk 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 op de etiketten van de afzonderlijke componenten vermeld. Onder goede opslagomstandigheden blijft het product goed presteren tot aan de vervaldatum die op het etiket staat.

Er zijn geen duidelijke tekenen die op instabiliteit van dit product wijzen. U zou echter positieve en negatieve controles met onbekende specimens gelijktijdig moeten uitvoeren.

## Procedure

### Bereiding DNA -monsters

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

De hoeveelheid DNA wordt bepaald door de optische dichtheid te meten bij 260 nm. De kwaliteit van DNA moet worden beoordeeld door middel van spectrofotometrie of gel-elektroforese.

De verhouding  $A_{260}/A_{280}$  moet 1,7–1,9 zijn. Kleinere verhoudingen duiden meestal op besmetting door proteïnen of organische chemicaliën. Met behulp van elektroforetische analyse van een agarosegel van 0,8–1% kan het geïsoleerde DNA worden gevisualiseerd als een duidelijke strook van ongeveer 20 kb. Een lichte afwijking is acceptabel.

Het resulterende DNA wordt verdund tot 5 ng/  $\mu$ l in TE-buffer. De qPCR-reactie is geoptimaliseerd voor 25 ng gezuiverd genomisch DNA.

### Opslag van nucleïnezuren

Voor kortdurende opslag van maximaal 24 uur adviseren we om gezuiverde nucleïnezuren op te slaan bij 2–8 °C. Voor langdurige opslag van meer dan 24 uur adviseren we om ze op te slaan bij –20 °C.

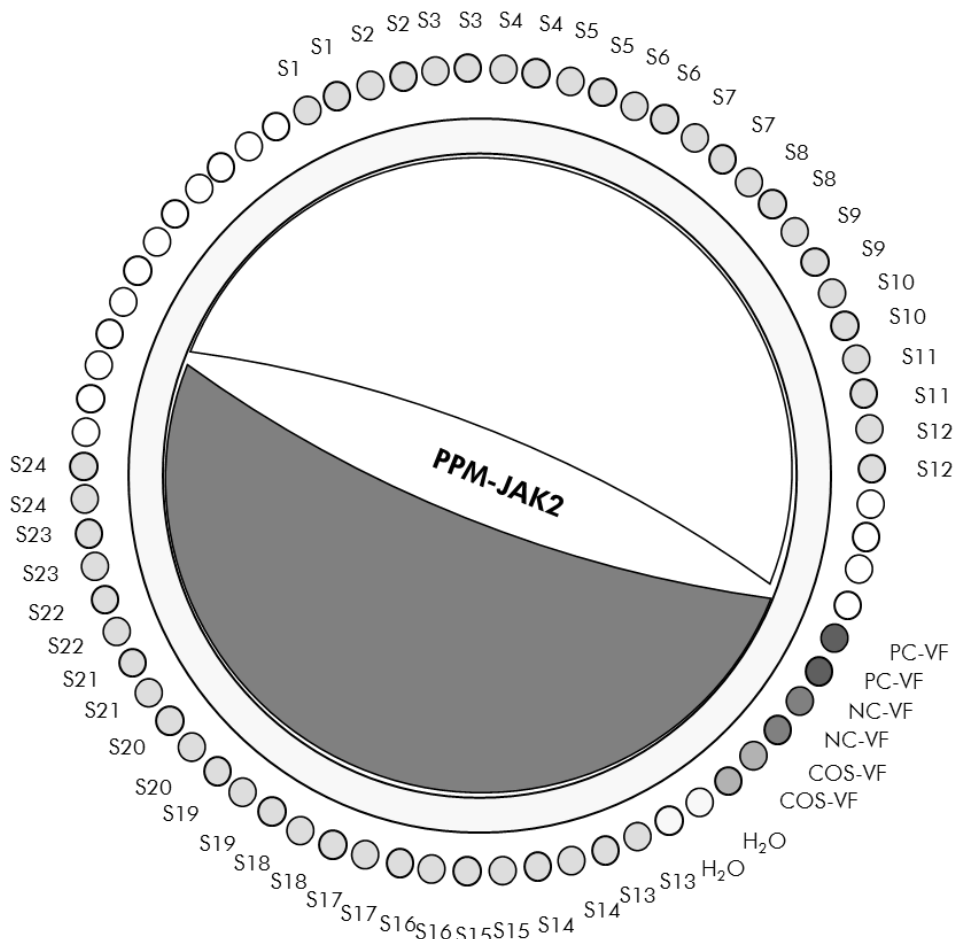
### Protocol: qPCR op Rotor Gene Q-instrumenten met rotor voor 72 buisjes

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

Tabel 2. Aantal reacties voor Rotor Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor Gene Q 5plex HRM-instrumenten met rotor voor 72 buisjes

Monsters	Reacties
JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-VF) (56 reacties)	
24 DNA-monsters	24 x 2 reacties
3 DNA-controles	3 x 2 reacties (PC-VF, NC-VF en COS-VF, elk in tweevoud getest)
Watercontrole	2 reacties

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



Afbeelding 2. Aanbevolen rotorinstelling voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit. PC-VF: positive control (positieve controle); NC-VF: negative control (negatieve controle); COS-VF: cut-off sample (drempelmonster); S: DNA-monster; H<sub>2</sub>O: watercontrole.

Opmerking : Let erop dat u een monster dat u wilt testen 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.  
Componenten moeten ongeveer 10 minuten voor het begin van de procedure uit de vriezer worden gehaald.
2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
3. 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 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25µl. Afhankelijk van het aantal reacties kan een voormengsel worden bereid met hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

Op Rotor-Gene-instrumenten kan de *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit worden gebruikt voor analyse van 24 monsters in tweevoud in één experiment (afbeelding 2), 20 monsters in tweevoud in twee experimenten of 15 monsters in tweevoud in drie experimenten.

Tabel 3. Bereiding van het qPCR-mengsel

Component	Aantal reacties (µl)				Uiteindelijke concentratie
	1	56+ 1*	28+ 1 <sup>†</sup>	18+ 1 <sup>‡</sup>	
TaqMan Universal PCR-mastermengsel, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1×
Primer-probemengsel, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	5	285	145	95	–
Monster (toe te voegen in stap 5)	5	5 elk	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	25 elk	–

\* 24 monsters; één experiment/kit.

<sup>†</sup> 10 monsters; twee experimenten/kit.

<sup>‡</sup> 5 monsters; drie experimenten/kit.

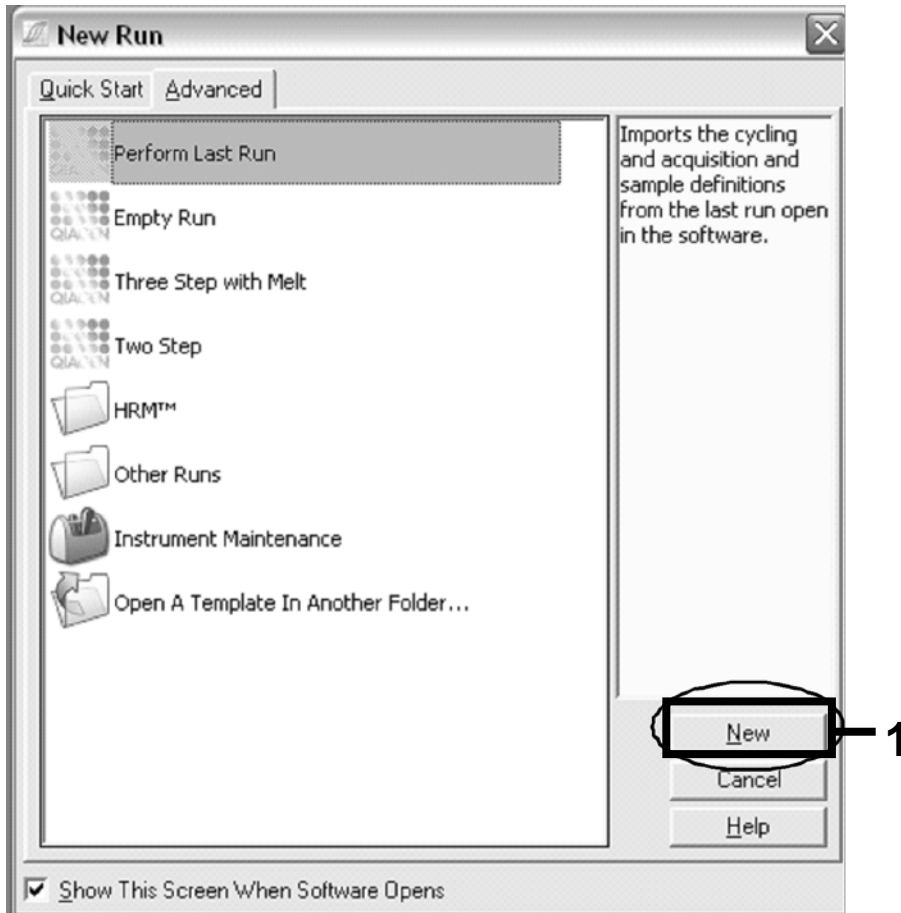
4. Vortex en centrifugeer het qPCR-mengsel kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
5. Vul ieder buisje met 20 µl van het qPCR-voormengsel.
6. Voeg 5 µl van het DNA-monstermateriaal of de controles toe aan het betreffende buisje (totaal volume 25 µl).
7. Meng de inhoud voorzichtig door de pipet op en neer te bewegen.
8. Sluit de PCR-buisjes af. Plaats de buisjes in de rotor voor 72 buisjes volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Plaats lege buisjes in alle andere posities.

9. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (accessoire van het Rotor Gene -instrument) op de rotor is geplaatst om te voorkomen dat de buisjes tijdens de run per ongeluk opengaan. Plaats de rotor in het RotorGene Q -instrument volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
10. Doorloop de volgende stappen om een temperatuurprofiel te maken voor de detectie van JAK2 -DNA.

De algemene assayparameters instellen	Afbeeldingen 3, 4
<b>Amplificatie van het DNA</b>	<b>Afbeelding 5</b>
Instellen van de gevoeligheid van het fluorescentiekanaal	Afbeelding 6

In de gebruiksaanwijzing van het instrument vindt u meer informatie over het programmeren van Rotor-Gene-instrumenten. In de afbeeldingen worden software-instellingen in het zwart en vetgedrukt weergegeven. Er worden illustraties weergegeven van de RotorGene Q-instrumenten.

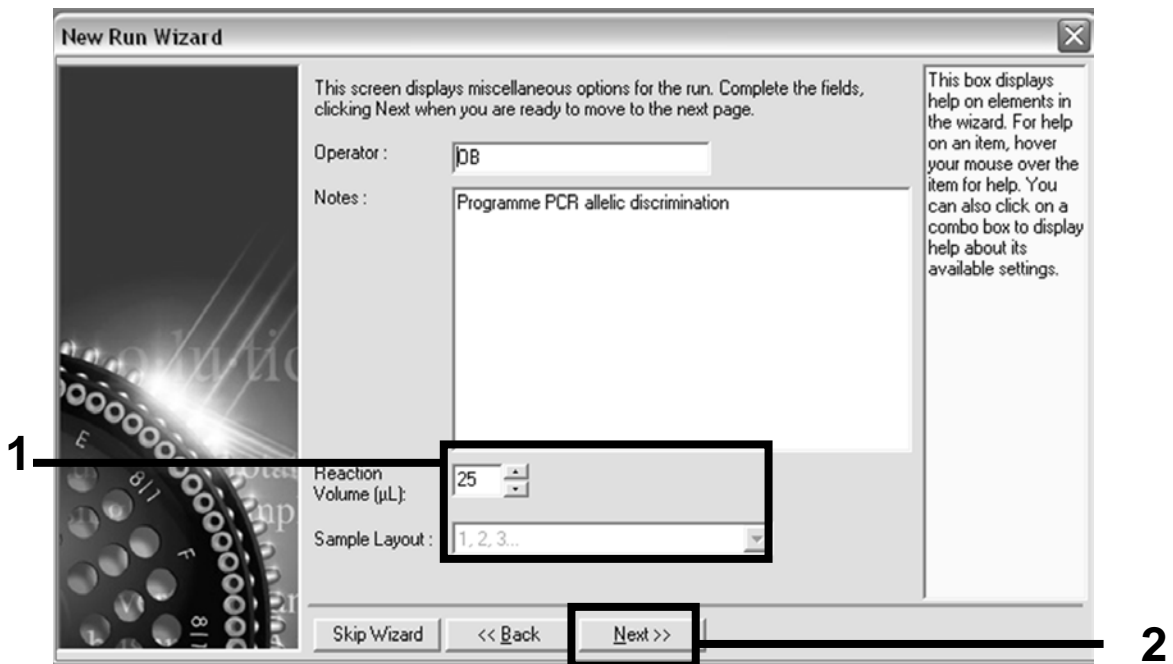
11. De Rotor-Gene-software starten. Klik in het dialoogvenster 'New run' (Nieuwe run) op 'New' (Nieuw).



Afbeelding 3. Het dialoogvenster 'New run' (Nieuwe run).



12. Stel in het dialoogvenster 'New Run Wizard' (Nieuwe run instellen) het volume in op 25  $\mu$ l en klik op 'Next' (Volgende).

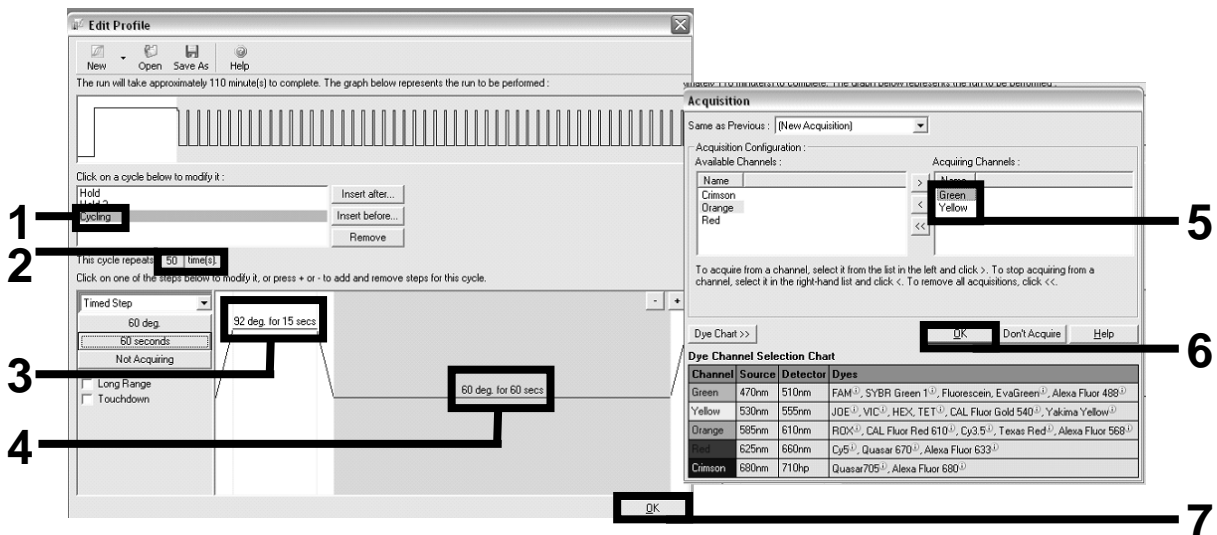


Afbeelding 4. Instellen van de algemene analyseparameters.

13. Klik in het volgende dialoogvenster 'New Run Wizard' (Nieuwe run instellen) op de knop 'Edit Profile' (Profiel bewerken) en programmeer het temperatuurprofiel zoals weergegeven in tabel 4 en afbeelding 5. Zorg ervoor dat u bij elke cyclus de laatste acquisitiestap toevoegt bij 60 °C voor allebei de kanalen groen (FAM) en geel (VIC).

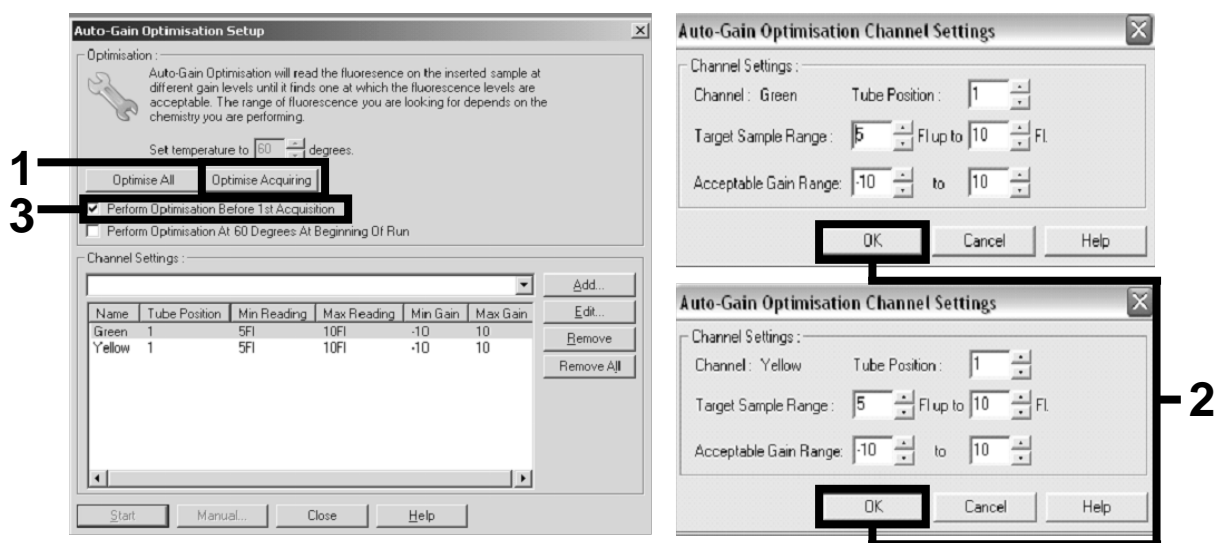
Tabel 4. Temperatuurprofiel

Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 min
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cycling (Cyclus)	50 keer 92 °C gedurende 15 sec 60 °C gedurende 1 min; enkel Registratie van FAM-fluorescentie in kanaal Cycling A Green (cyclus A, groen) Registratie van VIC-fluorescentie in kanaal Cycling A Yellow (cyclus A, geel)



Afbeelding 5. Amplificatie van het DNA.

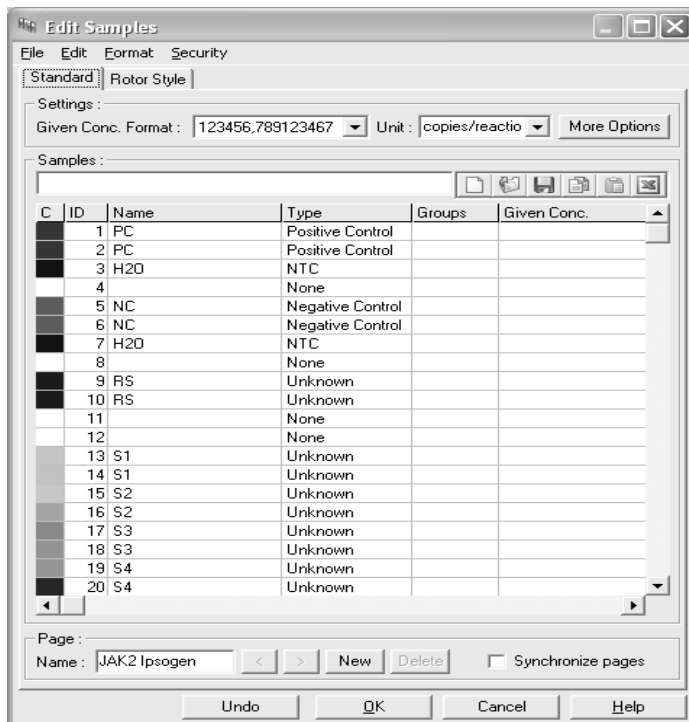
14. Het detectiebereik van de fluorescentiekanalen moet worden bepaald op basis van de intensiteit van de fluorescentie in de PCR-buisjes. Klik in het dialoogvenster 'New Run Wizard' (Nieuwe run instellen) op 'Gain Optimisation' (Optimalisatie versterking) om het dialoogvenster 'Auto-Gain Optimisation Setup' (Instellen automatische optimalisatie versterking) te openen. Klik op 'Optimise Acquiring' (Registratie optimaliseren) (afbeelding 6) en klik in het dialoogvenster 'Auto-Gain Optimisation Setup' (Instellen automatische optimalisatie versterking) van ieder kanaal (groen en geel, afbeelding 6) op 'OK'. Schakel voor beide kanalen het selectievakje 'Perform Optimisation Before 1st Acquisition' (Optimaliseren vóór eerste registratie) in (afbeelding 6).



Afbeelding 6. Instellen van de gevoeligheid van het fluorescentiekanaal.

15. De versterkingswaarden naar aanleiding van de kanaalkalibratie worden automatisch opgeslagen en worden weergegeven in het laatste menuvenster van de programmeerprocedure. Klik op 'Start Run' (Run starten) om het programma uit te voeren.

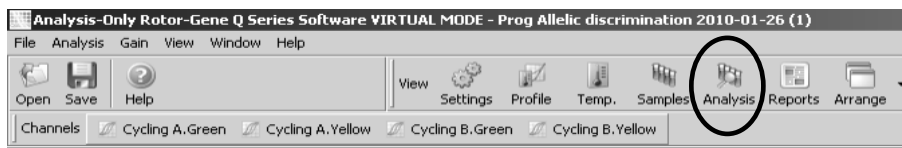
16. Voer de rotorinstellingen in de Rotor-Gene-software in (Figuur 7).



Afbeelding 7. Instelling Rotor -Gene: 'Edit Samples' (Monsters bewerken).

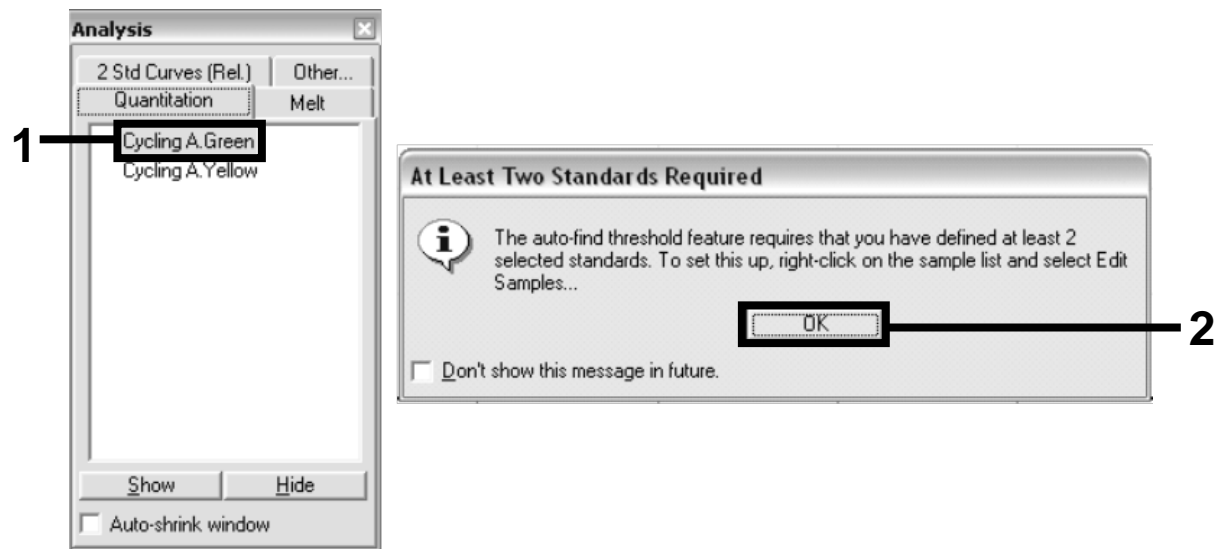
Eindpuntanalyseprocedure voor de instelling van het Rotor -Gene Q 5plex HRM -instrument

17. Klik nadat het PCR -programma is beëindigd in de taakbalk op 'Analysis' (Analyse) (afbeelding 8).



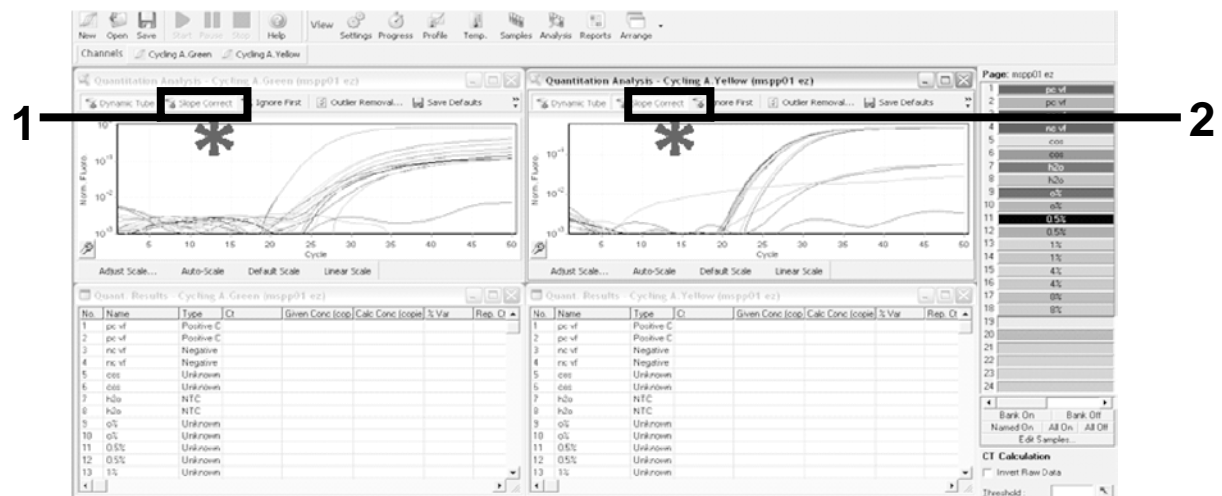
Afbeelding 8. Analysis (Analyse).

18. Dubbelklik in het dialoogvenster 'Analysis' (Analyse) (afbeelding 9) op 'Cycling A Green' (Cyclus A groen) en vervolgens op 'OK'. Herhaal deze procedure voor Cycling A Yellow (Cyclus A geel).



Afbeelding 9. Kwantificering: Cycling A. Green (Cyclus A. groen).

19. Er wordt een nieuw venster geopend (afbeelding 10). Klik in beide deelvensters op 'Slope Correct' (Hellingcorrectie), zoals weergegeven in afbeelding 10.



Afbeelding 10. Instelling 'Slope Correct' (Hellingcorrectie).

20. Bewaar gegevens als een Excel®-gegevensblad om gegevens te exporteren. Klik op 'OK', geef een naam op voor het exportbestand en sla het tekstbestand op (\*.txt).



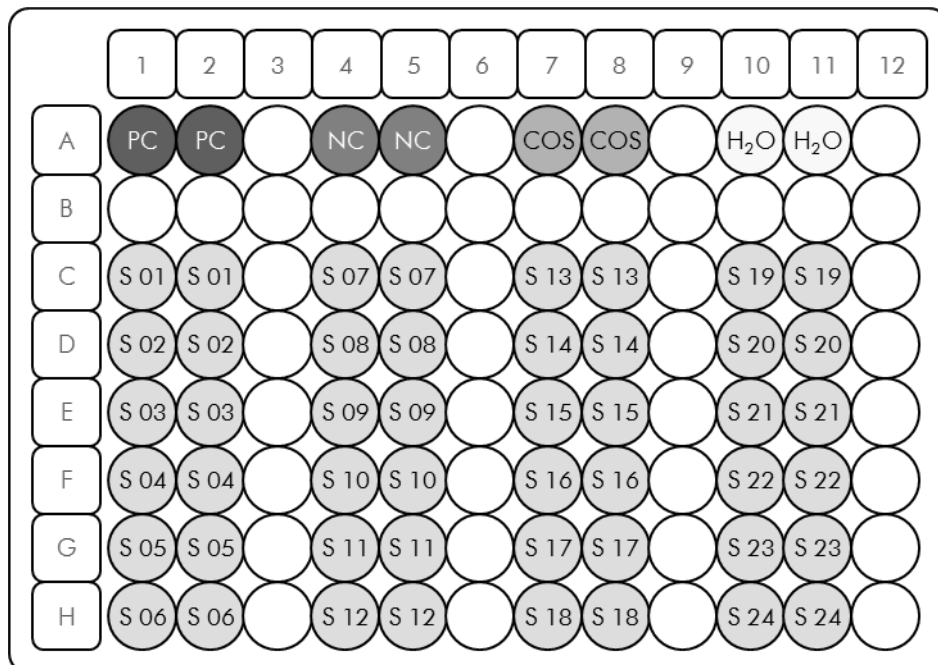
## Protocol: qPCR met Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten

Als u gebruikmaakt van qPCR-apparatuur met een plaat voor 96 wells adviseren wij om alle metingen in tweevoud uit te voeren, zoals aangegeven in Tabel 5.

Tabel 5. Aantal reacties voor Applied Biosystems 7300- en 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- of ABI PRISM 7900HT-instrumenten

Monsters	Reacties
JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-VF) (56 reacties)	
24 DNA-monsters	24 x 2 reacties
3 DNA-controles	3 x 2 reacties (PC-VF, NC-VF en COS-VF, elk in tweevoud getest)
Watercontrole	2 reacties

Monsterverwerking met Applied Biosystems 7300- en 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- of ABI PRISM 7900HT-instrumenten



Afbeelding 12. Aanbevolen plaatconfiguratie voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit. PC: positive control (positieve controle); NC: negative control (negatieve controle); COS: cut-off sample (drempelmonster); S: DNA-monster; H<sub>2</sub>O: watercontrole.

qPCR met Applied Biosystems 7300- en 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- of ABI PRISM 7900HT-instrumenten

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

## Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.  
Componenten moeten ongeveer 10 minuten voor het begin van de procedure uit de vriezer worden gehaald.
2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
3. 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 6 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. Afhankelijk van het aantal reacties kan een voormengsel worden bereid met hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

De *ipsogenJAK2* Muta *ScreenKit* kan met de Applied Biosystems 7300- en 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- of ABI PRISM 7900HT-instrumenten worden gebruikt voor analyse van 24 monsters in tweevoud in één experiment (afbeelding 12), 20 monsters in tweevoud in twee experimenten of 15 monsters in tweevoud in drie experimenten.



Tabel 6. Bereiding van het qPCR-mengsel

Component	Aantal reacties (µl)				Uiteindelijke concentratie
	1	56+ 1*	28+ 1 <sup>†</sup>	18+ 1 <sup>‡</sup>	
TaqMan Universal PCR- mastermengsel, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1×
Primer- probleemengsel, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	5	285	145	95	–
Monster (toe te voegen in stap 4)	5	5 elk	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	25 elk	–

\* 24 monsters; één experiment/kit.

<sup>†</sup> 10 monsters; twee experimenten/kit.

<sup>‡</sup> 5 monsters; drie experimenten/kit.

4. Vortex en centrifugeer het qPCR-mengsel kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
5. Vul iedere well met 20 µl van het qPCR-voormengsel.
6. Breng 5 µl van het DNA-monstermateriaal of de controles over naar de betreffende well (totaal volume 25 µl).
7. Meng de inhoud voorzichtig door de pipet op en neer te bewegen.
8. Sluit de plaat en centrifugeer kortdurend (300 x g, ongeveer 10 sec.).
9. Plaats de plaat in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
10. Programmeer de thermocycler met behulp van het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 7 en start de run.

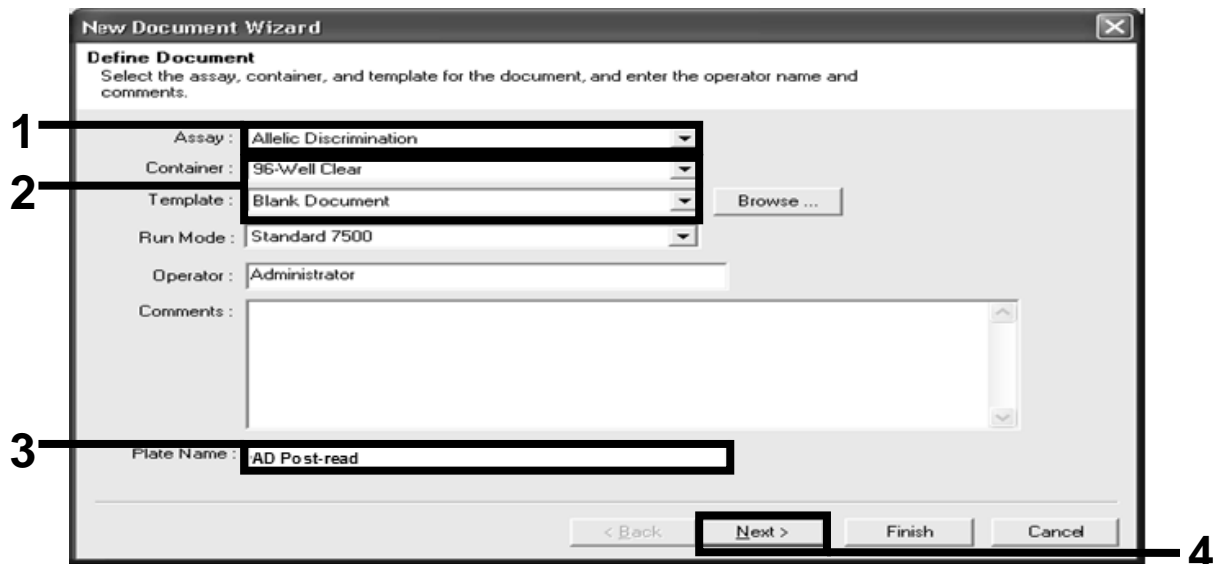
Tabel 7. Temperatuurprofiel voor Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten

Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 min
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cycling (Cyclus)	50 keer 92 °C gedurende 15 s 60 °C gedurende 1 min

Lees de analyseprocedure voor Applied Biosystems- en ABI PRISM-instrumenten na afloop van de run.

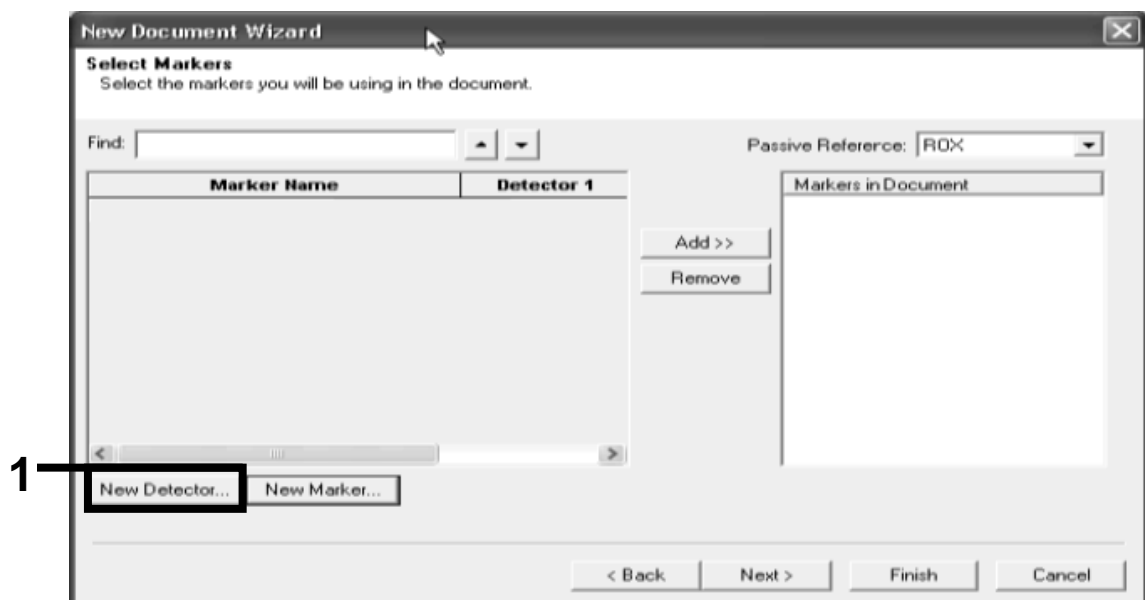
Raadpleeg de gebruikershandleiding van het instrument voor meer informatie over het programmeren van de Applied Biosystems 7300- en 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- of ABI PRISM 7900HT-instrumenten. De software-instellingen hebben een vetgedrukt zwart kader voor een duidelijker overzicht.

11. Selecteer nadat de run is voltooid 'Start/Program' (Start/Programma) en vervolgens 'File/New' (Bestand/Nieuw).
12. Klik in het dialoogvenster 'New Document Wizard' (Nieuw document maken) op de vervolgkeuzelijst 'Assay' (Assay) en selecteer 'Allelic Discrimination' (Alleldiscriminatie) (afbeelding 13).
13. Accepteer de standaardinstellingen voor de velden 'Container' (Container) en 'Template' (Sjabloon) ('96-Well Clear' [96-wells wissen] en 'Blank Document' [Leeg document], afbeelding 13). Typ *AD Post-read* (afbeelding 13) in het veld 'Platename' (Plaatnaam) en klik op 'Next' (Volgende) om het dialoogvenster 'Select Markers' (Merkers selecteren) te openen.



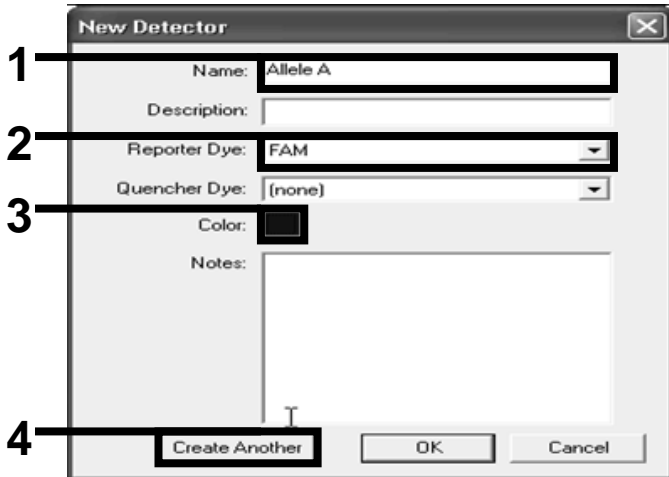
Afbeelding 13. Voorinstellingen voor het maken van een nieuwe post-read run (New Document Wizard [Nieuw document maken]).

14. Ga verder met stap 18 als in het deelvenster 'Markers in Document' (Merkers in document) van het dialoogvenster 'Select Markers' (Merkers selecteren) een merker wordt weergegeven die geschikt is voor uw toepassing. Ga verder met stap 15 als dat niet het geval is.
15. Volg deze stappen om detectoren en merkers te maken. Klik op 'New Detector' (Nieuwe detector) (afbeelding 14).



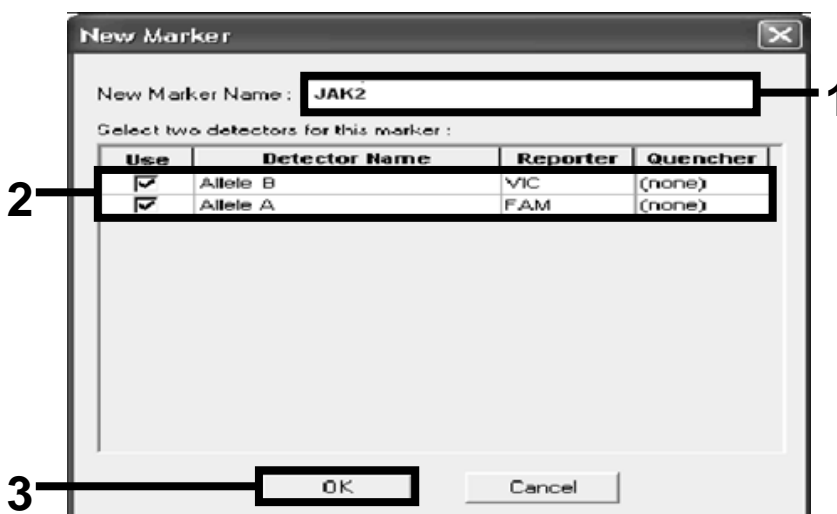
Afbeelding 14. In het deelvenster 'Markers in Document' (Merkers in document) wordt geen merker weergegeven die geschikt is voor uw toepassing.

16. Typ in het veld 'Name (Naam)' van het dialoogvenster 'New Detector' (Nieuwe detector) *Allele A* (afbeelding 15). Laat 'Reporter Dye' (Reporterkleurstof) ingesteld staan op 'FAM'. Klik op de knop 'Color' (Kleur), selecteer een kleur en klik op 'OK' (afbeelding 15). Klik op 'Create Another' (Een andere maken) (afbeelding 15).



Afbeelding 15. Detectoren maken.

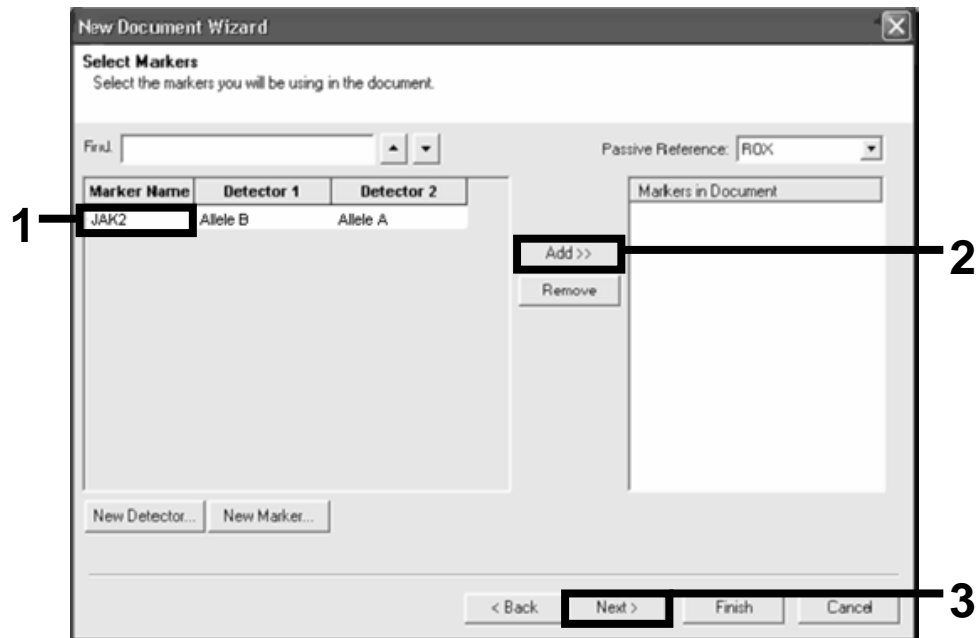
17. Typ in het veld 'Name (Naam)' van het volgende dialoogvenster 'New Detector' (Nieuwe detector) *Allele B*. Selecteer in het veld 'Reporter Dye' (Reporterkleurstof) de optie 'VIC'. Klik op de knop 'Color' (Kleur), selecteer een kleur en klik op 'OK'.
18. Klik in het dialoogvenster 'Select Markers' (Merkers selecteren) op 'New Marker' (Nieuwe merker) (zie afbeelding 14).
19. Typ in het veld 'New Marker Name' (Nieuwe merkernaam) van het dialoogvenster 'New Marker' (Nieuwe merker) *JAK2* (afbeelding 16). Selecteer de detectoren 'Allele A' (Allele A) en 'Allele B' (Allele B) die zijn gemaakt in de stappen 16 en 17 (of al waren gedefinieerd) en klik op 'OK' (afbeelding 16).



Afbeelding 16. Merkers maken.

20. Selecteer in het dialoogvenster 'Select Markers' (Merkers selecteren) de optie 'JAK2', zoals hierboven gemaakt, of een geschikte vooraf gedefinieerde merker en klik op 'Add>>' (Toevoegen>>) (afbeelding 17).

Opmerking: Selecteer een merker en klik op 'Remove' (Verwijderen) om deze te verwijderen.

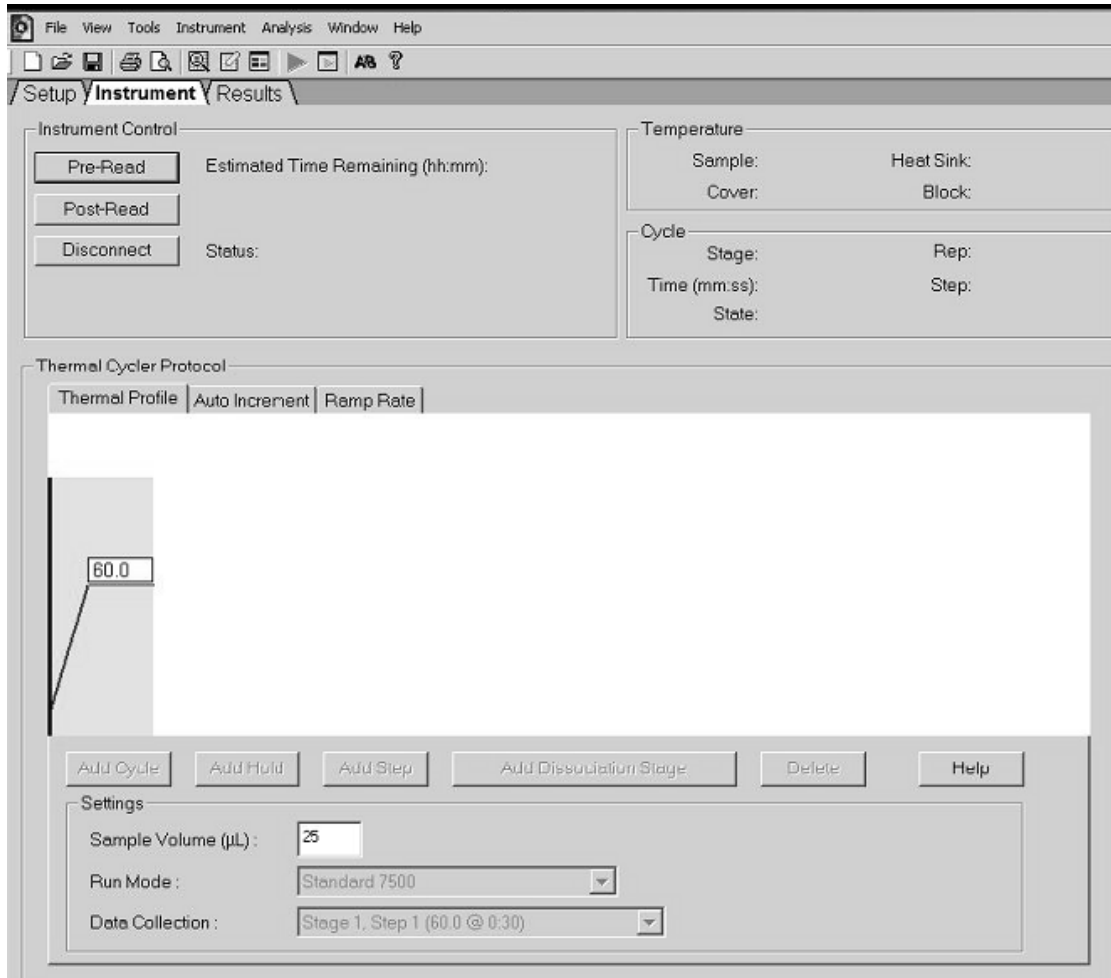


Afbeelding 17. Merkers selecteren.

21. Klik op 'Next>' (Volgende>).
22. Klik op de merkers en versleep deze in het dialoogvenster 'Setup Sample Plate' (Monsterplaat instellen) om de merker te selecteren voor wells die monsters bevatten. Klik op 'Finish' (Voltooien).
23. Selecteer het tabblad 'Instrument' (Instrument) en verander het monstervolume in 25 µl.
24. Selecteer 'File/Save' (Bestand/Opslaan) en klik op 'Save' (Opslaan) om de naam te behouden die u heeft toegewezen toen u de plaat maakte.
25. Laad de reactieplaat in het instrument volgens de aanwijzingen van de fabrikant

26. Start de post-read run. Klik op 'Post-Read'.

Het instrument voert een run uit van 1 cyclus gedurende 60 seconden bij 60 °C. Tijdens deze run verzamelt het instrument FAM- en VIC-fluorofoor in iedere well (afbeelding 18).



Afbeelding 18. Post-read run.

27. Selecteer 'File/Export' (Bestand/Exporteren) en klik op 'Results' (Resultaten) om de resultaten naar een Excel-bestand te exporteren. De resultaten worden weergegeven zoals in afbeelding 19.

Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method
A1	sample 1	VIC	Unknown	247.897	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.184	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call
A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call
A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call
A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call
A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call
A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.806	5.278	Undetermined	100.00	Manual Call
A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.948	Undetermined	100.00	Manual Call
A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call
A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call
A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call
A11	C-	VIC	Unknown	269.500	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call
A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call
B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call
B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call
B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call
B4	ER	VIC	Unknown	404.145	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call
B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call
B6	H2O	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.346	Undetermined	100.00	Manual Call
B7	H2O	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call
B8	H2O	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call

Afbeelding 19. Voorbeeld van resultaten, weergegeven in een Excel-bestand.

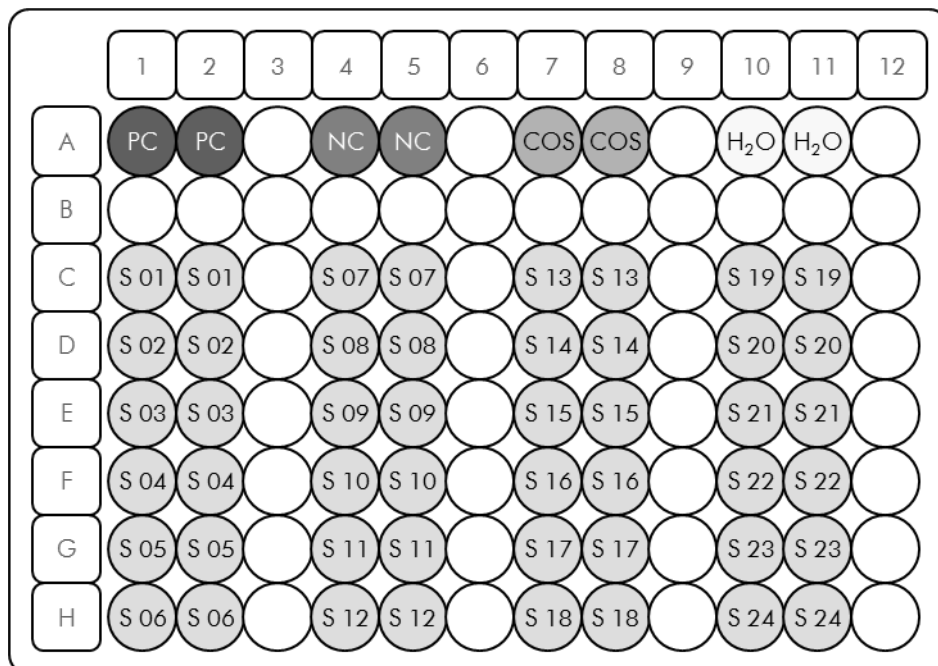
## Protocol: qPCR met het LightCycler 480-instrument

Als u gebruikmaakt van qPCR-apparatuur met een plaat voor 96 wells adviseren wij om alle metingen in tweevoud uit te voeren, zoals aangegeven in tabel 8.

Tabel 8. Aantal reacties voor het LightCycler 480-instrument

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-JAK2)	
24 DNA-monsters	24 x 2 reacties
3 DNA-controles	3 x 2 reacties (PC-VF, NC-VF en COS-VF, elk in tweevoud getest)
Watercontrole	2 reacties

### Monsterverwerking met het LightCycler 480-instrument



Afbeelding 20. Aanbevolen plaatconfiguratie voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit. PC: positive control (positieve controle); NC: negative control (negatieve controle); COS: cut-off sample (drempelmonster); S: DNA-monster; H<sub>2</sub>O: watercontrole.



qPCR op het LightCycler 480 -instrument

Opmerking : Voer alle stappen uit op ijs.

#### Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.  
Componenten moeten ongeveer 10 minuten voor het begin van de procedure uit de vriezer worden gehaald.
2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
3. 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 9 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25µl. Afhankelijk van het aantal reacties kan een voormengsel worden bereid met hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

De *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit kan met het LightCycler 480-instrument worden gebruikt voor analyse van 24 monsters in tweevoud in één experiment (afbeelding 20), 20 monsters in tweevoud in twee experimenten of 15 monsters in tweevoud in drie experimenten.

Tabel 9. Bereiding van het qPCR-mengsel

Component	Aantal reacties (µl)				Uiteindelijke concentratie
	1	56+ 1*	28+ 1 <sup>†</sup>	18+ 1 <sup>‡</sup>	
TaqMan Universal PCR-mastermengsel, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1×
Primer-probemengsel, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	5	285	145	95	–
Monster (toe te voegen in stap 6)	5	5 elk	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	25 elk	–

\* 24 monsters; één experiment/kit.

<sup>†</sup> 10 monsters; twee experimenten/kit.

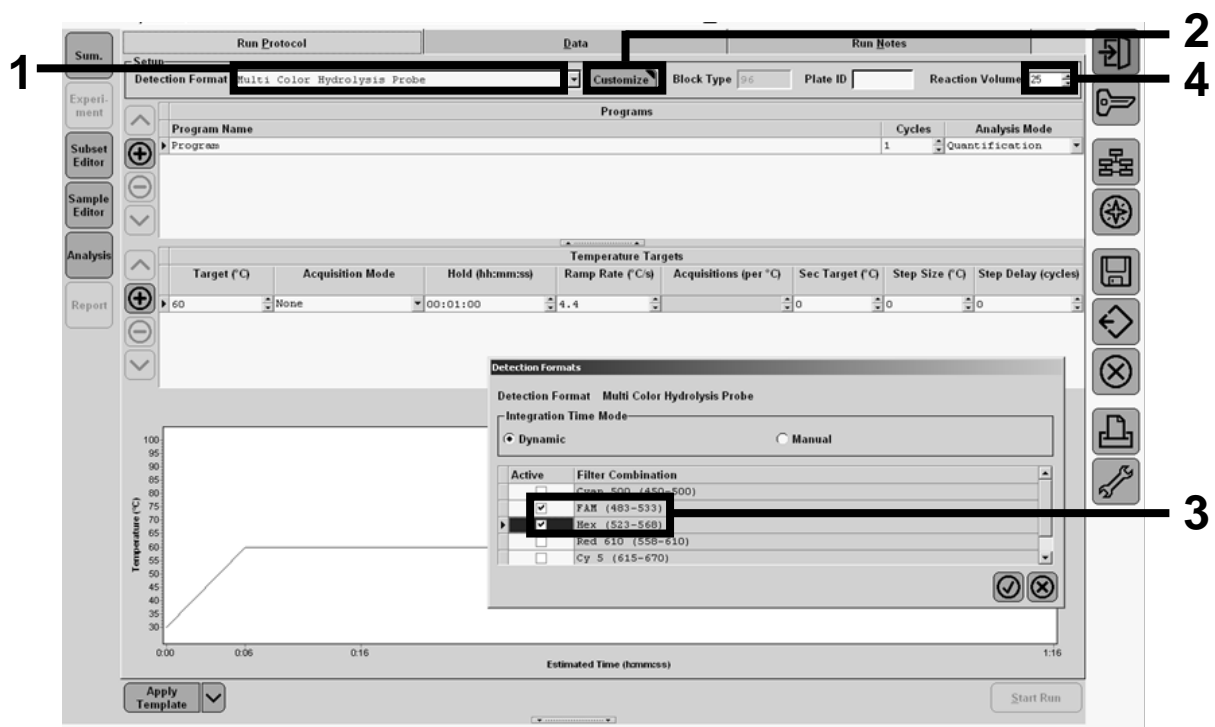
<sup>‡</sup> 5 monsters; drie experimenten/kit.

4. Vortex en centrifugeer het qPCR-mengsel kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
5. Vul iedere well met 20 µl van het qPCR-voormengsel.
6. Breng 5 µl van het DNA-monstermateriaal of de controles over naar de betreffende well (totaal volume 25 µl).
7. Meng de inhoud voorzichtig door de pipet op en neer te bewegen.
8. Sluit de plaat en centrifugeer kortdurend (300 x *g*, ongeveer 10 sec.).
9. Plaats de plaat in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
10. Open het startscherm en selecteer 'New Experiment' (Nieuw experiment).

11. Volg stap 11a voor de LightCycler 480 I. Volg stap 11b voor de LightCycler 480 II.

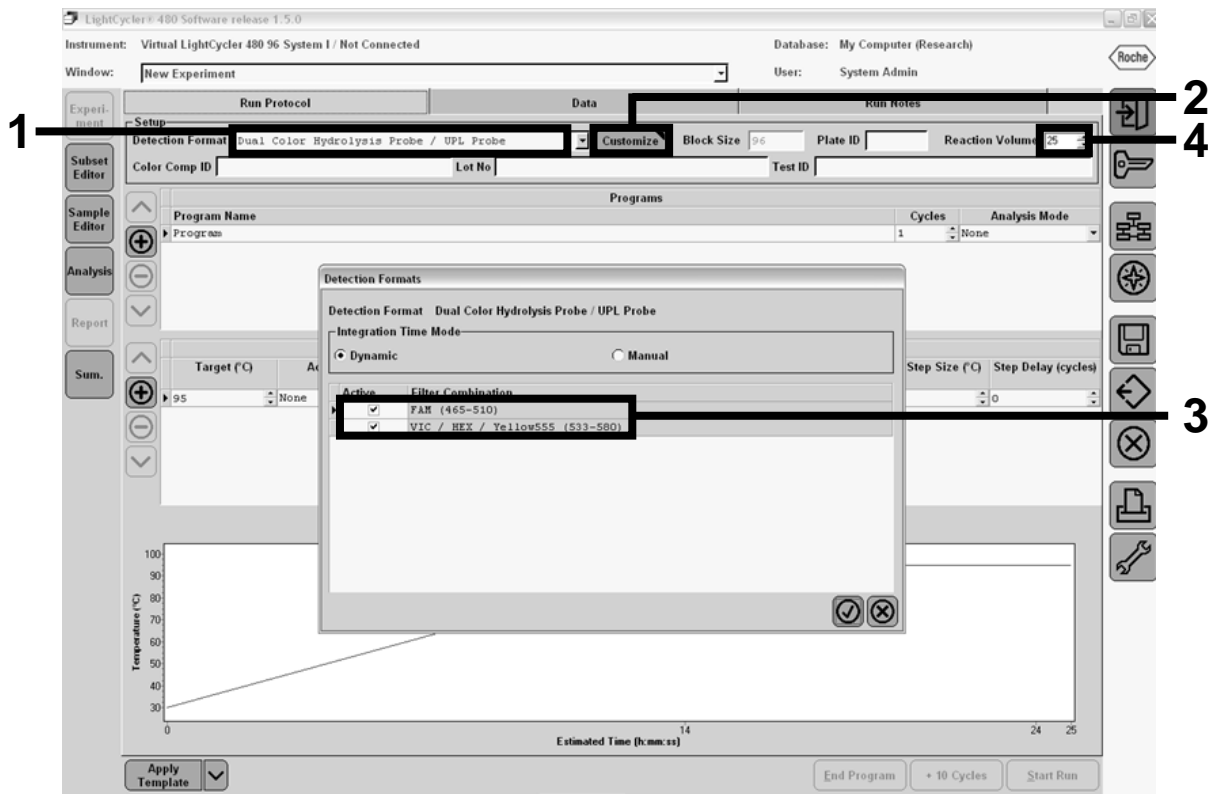
Raadpleeg de betreffende gebruikershandleiding voor meer informatie over het programmeren van het LightCycler 480-instrument. De software-instellingen hebben een vetgedrukt zwart kader voor een duidelijker overzicht.

11a. LightCycler 480 I: Selecteer 'Multi Color Hydrolysis Probe' (Meerkleurige hydrolyseprobe), klik op 'Customize' (Aanpassen) en controleer of de kanalen 'FAM (483–533)' en 'Hex (533–568)' (d.w.z. VIC) zijn geselecteerd (afbeelding 21). Stel het reactievolume in op '25'  $\mu$ l (afbeelding 21) en ga verder met stap 12.



Afbeelding 21. LightCycler 480 I: De detectievorm instellen.

11b. LightCycler 480 II: Selecteer 'Dual Color Hydrolysis Probe' (Tweekleurige hydrolyseprobe), klik op 'Customize' (Aanpassen) en controleer of de kanalen 'FAM (465–510)' en 'VIC / HEX / (533–580)' zijn geselecteerd (afbeelding 22). Stel het reactievolume in op '25'  $\mu$ l (afbeelding 22) en ga verder met stap 12.



Afbeelding 22. LightCycler 480 II: De detectievorm instellen.

12. Programmeer de thermocycler met behulp van het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 10 en start de run.

Opmerking: Selecteer 'Endpt Geno' (Eindpunt Genotypering) in de sectie 'Step 1 : select workflow' (Stap 1: workflow selecteren) als u de plaatinstelling uitvoert vanaf het instrument.

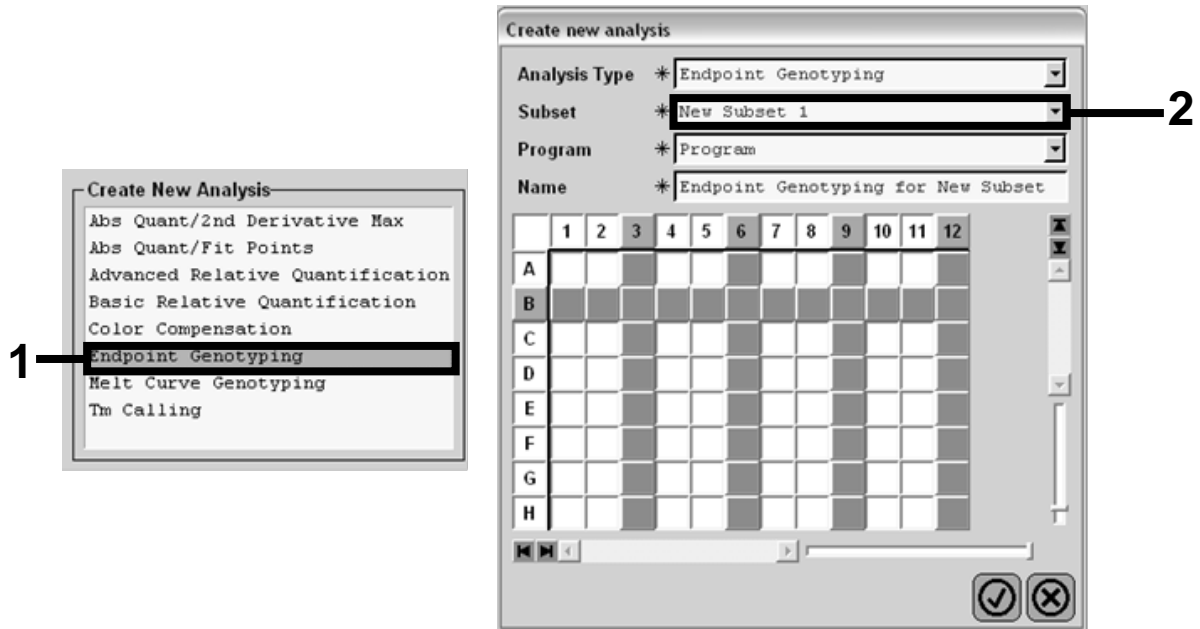
Tabel 10. Temperatuurprofiel voor het LightCycler 480-instrument

Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 min
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cycling (Cyclus)	50 keer 92 °C gedurende 15 sec; enkel 60 °C gedurende 1 min; enkel
Hold 3 (Constant 3)	60 °C gedurende 1 min; enkel

Eindpuntanalyseprocedure voor het LightCycler 480-instrument

13. Klik op 'Analysis' (Analyse) zodra de run is voltooid.

14. Selecteer 'Endpoint Genotyping' (Eindpunt genotypering) in het dialoogvenster 'Create New Analysis' (Nieuwe analyse maken) en selecteer in het menu 'Subset' de subgroep die u wilt analyseren (afbeelding 23).



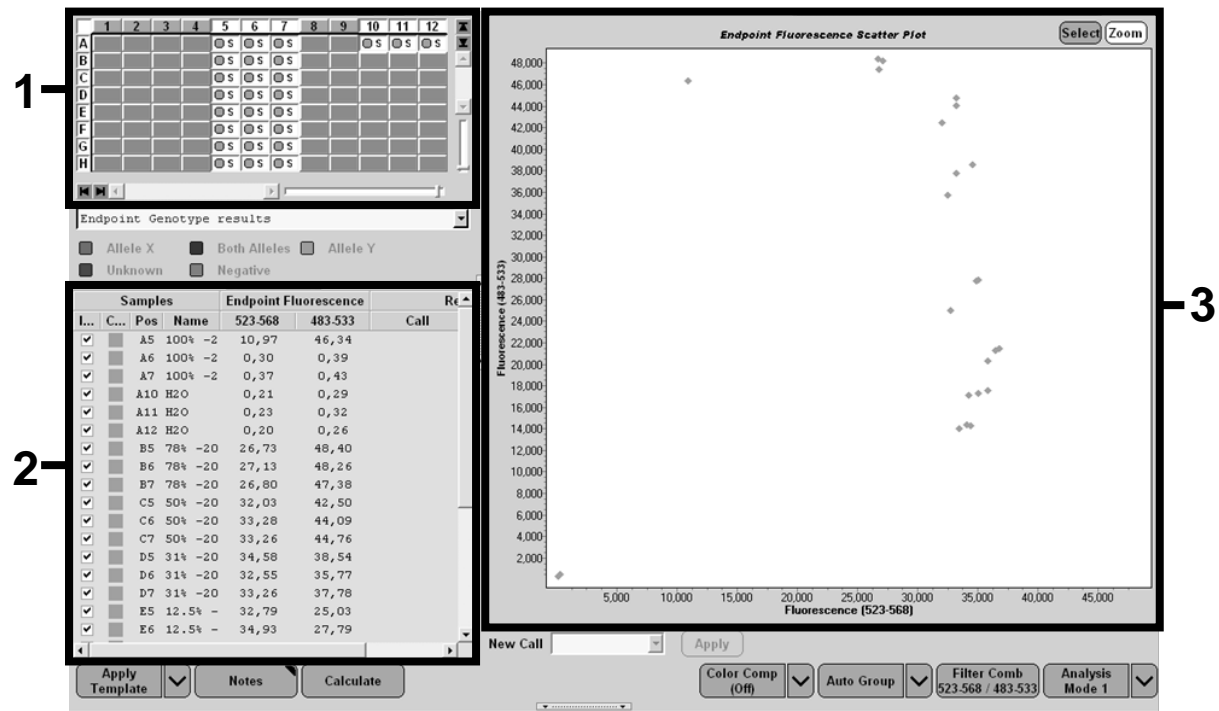
Afbeelding 23. Analysetype en subgroep selecteren om te analyseren.

15. Selecteer in het volgende venster 'Hex fluorescence' (VIC-fluorescentie) voor 'Allele-X' (Allel X) en 'FAM-fluorescence' (FAM-fluorescentie) voor 'Allele-Y' (Allel Y) (afbeelding 24).



Afbeelding 24. Fluorescentie selecteren voor 'Allele-X' (Allel X) en 'Allele-Y' (Allel Y).

16. In het volgende venster (afbeelding 25) worden de plaatinstelling (1, linksboven), de fluorescentieresultaten voor elk monster (2, linksonder) en het spreidingsdiagram met allelische discriminatie (3, rechts; FAM- en VIC-fluorescentie gemeten in de 50e PCR-cyclus) weergegeven.



Afbeelding 25. Samenvatting gegevens.

17. Klik met de rechtermuisknop op de sjabloon voor monsterresultaten en selecteer 'Export Table' (Tabel exporteren) om gegevens te exporteren. Het bestand wordt opgeslagen als een tekstbestand (.txt).

18. Open het bestand in Excel om de resultaten te bekijken en analyseren. De resultaten worden weergegeven zoals in afbeelding 26.

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**

Afbeelding 26. Voorbeeld van resultaten, weergegeven in een Excel-bestand.



## Protocol: qPCR met een LightCycler 2.0-instrument

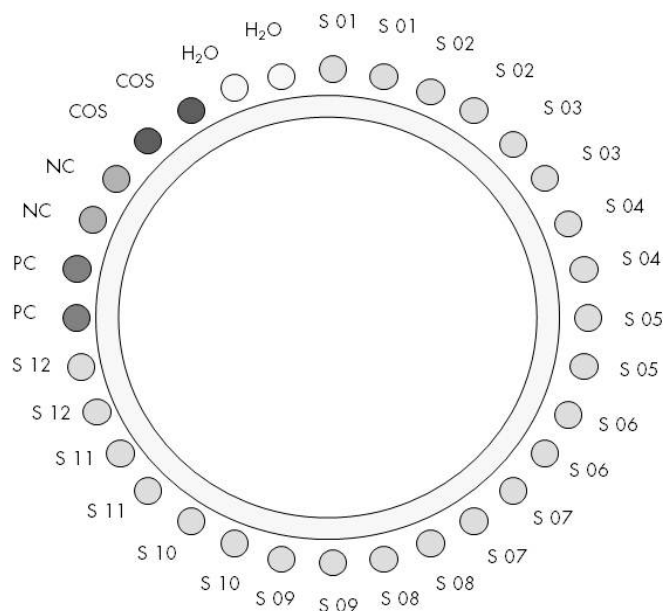
Opmerking: Vanwege bepaalde technologische vereisten moeten experimenten met de LightCycler 2.0 met specifieke reagentia worden uitgevoerd. Wij adviseren het gebruik van de LightCycler TaqMan Master. Volg de instructies van de fabrikant om de Master Mix 5x te bereiden.

Als u een rotor voor 32 capillairbuisjes gebruikt, adviseren wij om alle metingen in tweevoud uit te voeren, zoals aangegeven in tabel 11.

Tabel 11. Aantal reacties voor het LightCycler 2.0-instrument

Monsters	Reacties
JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-VF) (32 reacties)	
12 DNA-monsters	12 x 2 reacties
3 DNA-controles	3 x 2 reacties (PC-VF, NC-VF en COS-VF, elk in tweevoud getest)
Watercontrole	2 reacties

### Monsterverwerking met een LightCycler 2.0-instrument



Afbeelding 27. Aanbevolen rotorinstelling voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta Screen Kit. PC: positive control (positieve controle); NC: negative control (negatieve controle); COS: cut-off sample (drempelmonster) S: DNA-monster; H<sub>2</sub>O: watercontrole.

## qPCR met een LightCycler 2.0-instrument

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

### Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.  
Componenten moeten ongeveer 10 minuten voor het begin van de procedure uit de vriezer worden gehaald.
2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
3. 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 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 20 µl. Afhankelijk van het aantal reacties kan een voormengsel worden bereid met hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten.

Op het LightCycler 2.0-instrument kan de *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* worden gebruikt voor het analyseren van 12 monsters in tweevoud in één experiment (afbeelding 27).

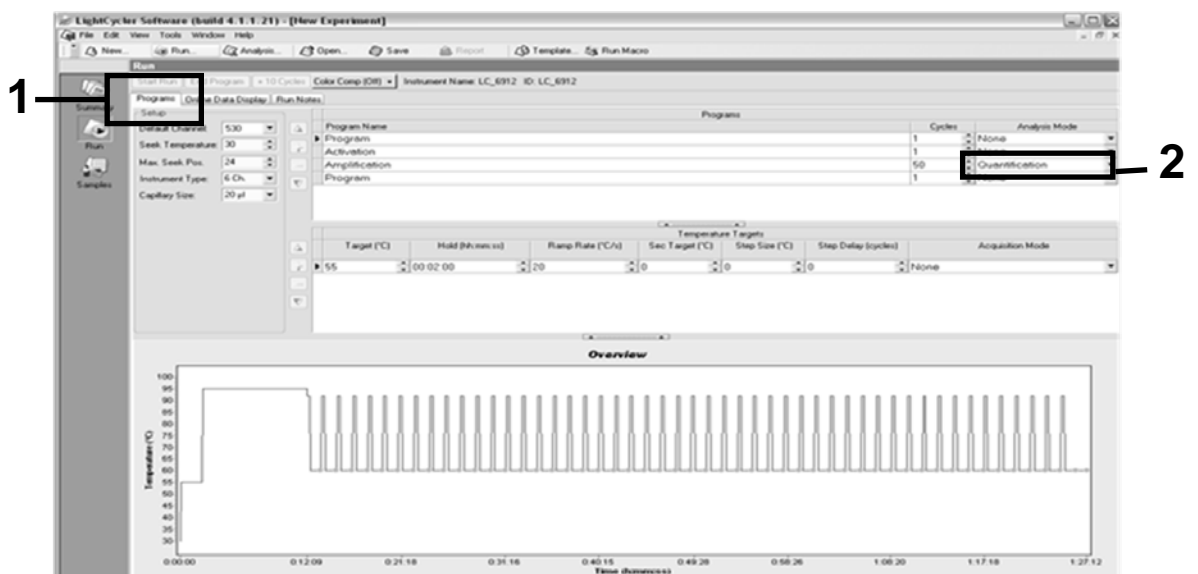
Tabel 12. Bereiding van qPCR-mengsel voor het LightCycler 2.0-instrument

Component	Aantal reacties (µl)		Uiteindelijke concentratie
	1	32+ 1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1×
Primer-probemengsel, 10x	2	66	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	9	297	–
Monster (toe te voegen in stap 4)	5	5 elk	–
Totaal volume	20	20 elk	–

4. Vortex en centrifugeer het qPCR-mengsel kortdurend (ongeveer 10 sec, 10.000 tpm, om de vloeistof op de bodem van het buisje te verzamelen).
5. Vul ieder capillairbuisje met 15 µl van het qPCR-voormengsel.
6. Voeg 5 µl DNA-monstermateriaal of controles toe aan het betreffende capillairbuisje (totaal volume 20 µl).
7. Meng de inhoud voorzichtig door de pipet op en neer te bewegen.
8. Plaats de capillairbuisjes in de adapter die bij het instrument is geleverd en centrifugeer kortdurend (700 x *g*, gedurende 10 sec).
9. Plaats de monsters in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
10. Programmeer de thermocycler (afbeelding 28) volgens het programma dat wordt aangegeven in tabel 13.

Raadpleeg de betreffende gebruikershandleiding voor meer informatie over het programmeren van het LightCycler 2.0-instrument. De software-instellingen hebben een vetgedrukt zwart kader voor een duidelijker overzicht.

Opmerking : Zorg ervoor dat de instellingen voor zowel de amplificatie-/cyclische stap als voor de eindstop bij 60 °C gelden voor kwantificering, enkelvoudige registratie van FAM-fluorescentie en enkelvoudige registratie van VIC-fluorescentie.



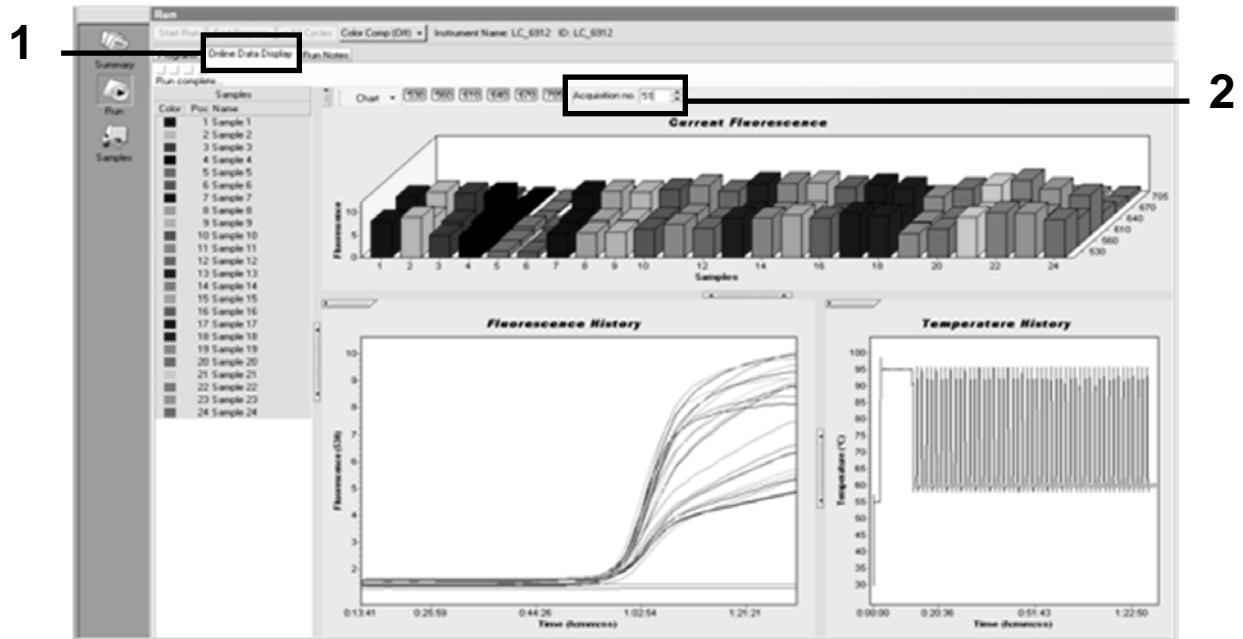
Afbeelding 28. Programmeerscherm voor de LightCycler 2.0.

Tabel 13. Temperatuurprofiel van het LightCycler 2.0-instrument

Hold (Constant)	Temperatuur: 55 °C Tijd: 2 min Helling: 20
Hold 2 (Constant 2)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min Helling: 20
Cycling (Cyclus)	50 keer 92 °C gedurende 15 sec; helling: 20 60 °C gedurende 1 min; helling 20
Hold 3 (Constant 3)	60 °C gedurende 1 min; helling 20


## Eindpuntanalyseprocedure voor het LightCycler 2.0-instrument

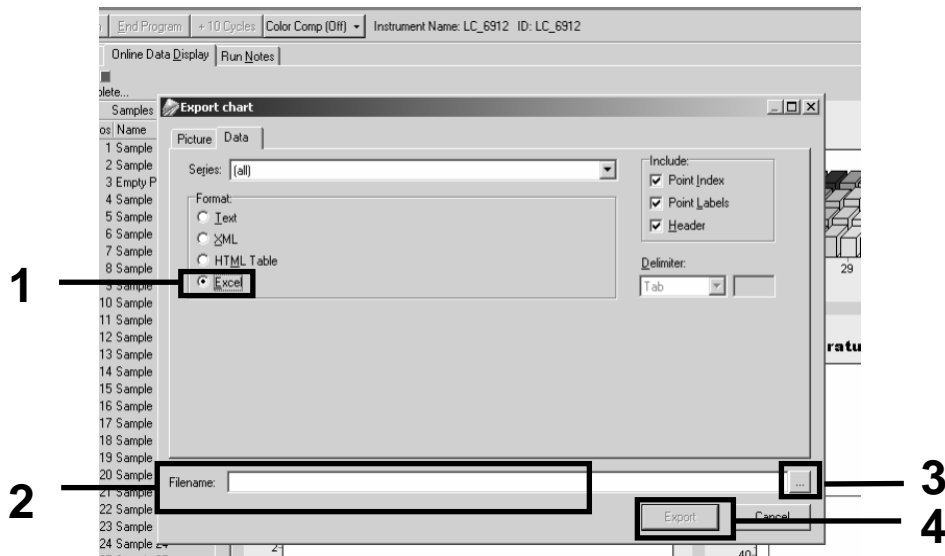
11. Klik aan het einde van de amplificatierun op het tabblad 'Online Data Display' (Online gegevensweergave) (afbeelding 29). Open het weergavemenu in de linkerbovenhoek van het venster 'Current Fluorescence' (Huidige Fluorescentie) en typ 51 in het veld 'Acquisition no.' (Acquisitiernr.)



Afbeelding 29. Resultaten en geschiedenis in online gegevensweergave.

12. Klik met de rechtermuisknop in de buurt van de grafiek 'Current Fluorescence' (Huidige Fluorescentie) en selecteer 'Export' (Exporteren).

13. Klik in het dialoogvenster 'Export chart' (Diagram exporteren) op het vak 'Excel' (afbeelding 30). Voer een naam in het dialoogvenster 'Filename' (Bestandsnaam) in. Selecteer een exportbestemming voor het resultaatbestand met de knop . Klik op 'Export' (Exporteren).



Afbeelding 30. De exportindeling en de bestandslocatie selecteren.

14. Open het bestand in Excel om de resultaten te bekijken en analyseren.

De resultaten voor LightCycler 2.0 worden als volgt weergegeven.

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

Afbeelding 31. Voorbeeld van LightCycler 2.0-resultaten, weergegeven in een Excel-bestand.

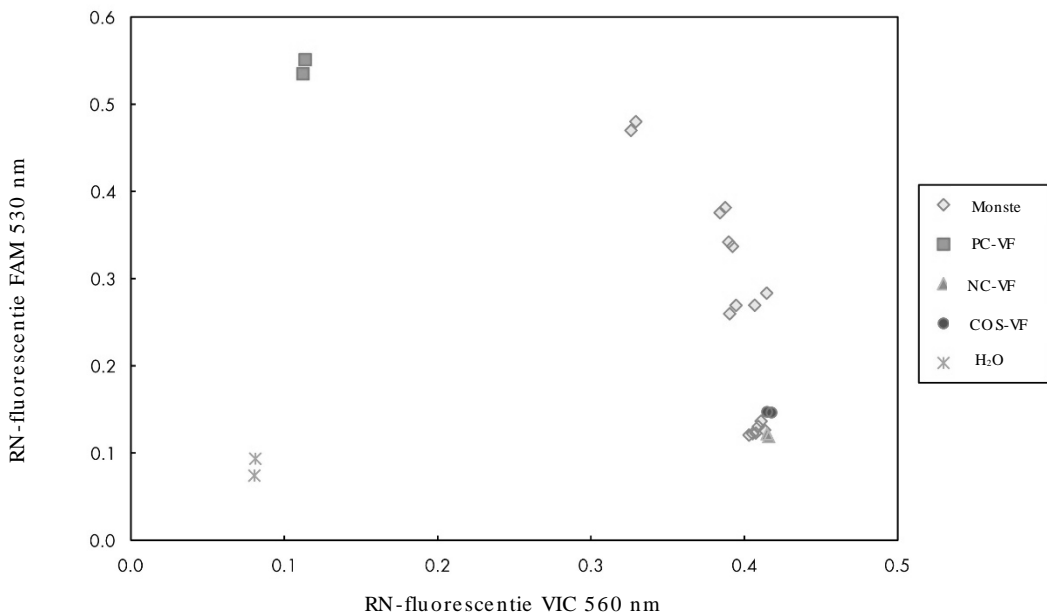
## Interpretatie van de resultaten

Een bestand maken dat geschikt is om geëxporteerde gegevens voor alle instrumenten te extraheren: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM of een ander Rotor-Gene-instrument, LightCycler 2.0 of 480; Applied Biosystems 7300 of 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS of 7900HT SDS en controleer de fluorescentieniveaus (deze moeten voor alle duplicaten constant zijn).

Maak een grafische weergave (spreidingsdiagram) van de fluorescentiegegevens. De x-as is de VIC-fluorescentie; de y-as is de FAM-fluorescentie.

### Grafische weergave en criteria voor kwaliteitscontrole

Afbeelding 32 is een voorbeeld van een spreidingsdiagram.



Afbeelding 32. Spreidingsdiagram van een representatief alleldiscriminatie-experiment. Instrumenten: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM en LightCycler 480.

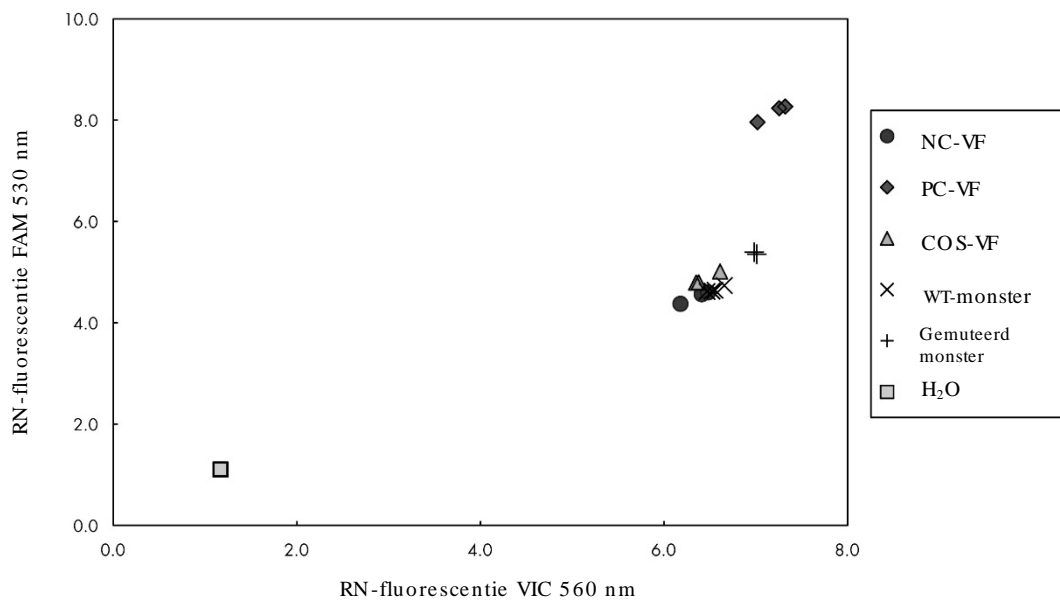
Monsters moeten zich bevinden op de boog die de negatieve controles (NC) verbindt met de positieve controles (PC).

Onjuiste positionering van een controle kan duiden op een onjuist experiment.

- Positieve controles moeten zich linksbovenin bevinden.
- Negatieve controles moeten zich rechtsonderin bevinden.
- Slechte positionering van een negatieve controle kan duiden op besmetting.
- Het drempelmonster moet boven de negatieve controles worden weergegeven.

- De watercontroles moeten zich linksonderin bevinden.
- Een slechte positionering van een watercontrole (hoger dan NC voor FAM-meting of hoger dan PC voor VIC) kan duiden op besmetting.

Opmerking: De positionering van de controles kan verschillen bij de analyse van LightCycler 2.0-instrumentgegevens (zie afbeelding 33). De watercontroles moeten zich nog steeds linksonderin bevinden.



Afbeelding 33. Spreidingsdiagram van een representatief alleldiscriminatie-experiment. Instrumenten: LightCycler 2.0.

## Berekening van de genormaliseerde FAM/ VIC-ratio en genotypering

Bereken de FAM/ VIC-verhoudingen voor alle monsters. Bereken de FAM/ VIC-verhoudingen voor de positieve controle (PC), het drempelmonster (COS) en de negatieve controle (NC). De verhoudingen tussen duplicaten moeten constant zijn. Bereken de gemiddelde verhouding van alle duplicaten.

Bereken de genormaliseerde verhouding (NRatio) voor het drempelmonster (COS) en voor alle monsters:

$$NRatio_{\text{Monster}} = \frac{Ratio_{\text{Monster}}}{Ratio_{\text{NC}}}$$



Opmerking: De grijze zone (GZ) van een test is een gebied met waarden waarin de discriminatoire prestatie niet nauwkeurig genoeg is. Een waarde in de grijze zone geeft aan dat de doelmerker niet kan worden gerekend als aanwezig of afwezig. Voor ieder experiment moet de grijze zone worden berekend.

Bereken de grijze zone of het onzekere gebied rond de genormaliseerde verhouding van de COS ( $NRatio_{COS}$ ):

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

Vergelijk de genormaliseerde verhouding van elk monster met de  $NRatio_{COS}$  GZ. In tabel 14 wordt een interpretatie gegeven van de resultaten en in tabel 15 wordt een voorbeeld gegeven van hoe de gegevens worden berekend en geïnterpreteerd.

Tabel 14. Interpretatie van genotyperingresultaten met genormaliseerde verhoudingen

Resultaten	Interpretatie
$NRatio_{Monster} > NRatio_{COS} \times 1,06$	JAK2 V617F is gedetecteerd
$NRatio_{Monster} < NRatio_{COS} \times 0,94$	JAK2 V617F is niet gedetecteerd
$NRatio_{Monster}$ binnen $NRatio_{COS}$ GZ	Resultaat niet doorslaggevend

Tabel 15. Een voorbeeld van berekening en interpretatie van fluorescentiegegevens

Monster	VIC	FAM	Ratio	Gemiddelde ratio	NRatio	Interpretatie
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutatie niet gedetecteerd
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Mutatie gedetecteerd
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Drempelmonster
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutatie niet gedetecteerd
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Mutatie gedetecteerd
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Resultaat niet doorslaggevend
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Resultaat niet doorslaggevend
S 4	2,322	2,191	0,944			
GZ	1,205	1,359				

## Problemen oplossen

Dit gedeelte is een hulpmiddel voor het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina Veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). De wetenschappers van QIAGEN Technical Services beantwoorden graag al uw vragen over de informatie en protocollen in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (ga naar 'Contactgegevens' op pagina 62 voor contactgegevens).

### Opmerkingen en suggesties

---

#### Positief controlesignaal negatief

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| a) Pipetteerfout                     | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.<br><br>Herhaal de PCR-run.  |
| b) Onjuiste opslag van kitonderdelen | Bewaar de <i>ipsogenJAK2</i> Muta <i>ScreenKit</i> bij -30 tot -15 °C en houd het primer-probemengsel (PPM) buiten het bereik van licht. Zie 'Opslag en hantering van reagentia' op pagina 10.<br><br>Vermijd herhaaldelijk ontdooien en invriezen.<br><br>Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag. |

#### Negatieve controles zijn positief

- |                 |   |
|-----------------|---|
| Kruisbesmetting | Vervang alle essentiële reagentia.<br><br>Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.<br><br>Hanteer monsters, kitonderdelen en verbruiksartikelen altijd volgens de algemene richtlijnen voor de preventie van kruisbesmetting. |
|-----------------|---|

#### Geen signaal, zelfs niet bij positieve controles.

- |  |  |
|--|--|
| a) Pipetteerfout of reagentia vergeten | Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.<br><br>Herhaal de PCR-run. |
|--|--|

## Opmerkingen en suggesties

---

- b) Remmend effect van het monstermateriaal als gevolg van onvoldoende zuivering Herhaal de DNA-bereiding.
- c) LightCycler: Onjuist detectiekanaal geselecteerd Stel het kanaal in op F1/F2 of 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: geen gegevensregistratie geprogrammeerd Controleer de cyclusprogramma's. Selecteer aan het einde van elk hybridisatiesegment van het PCR-programma de registratiemodus 'single' (enkelvoudig).

Afwezig of laag signaal in monsters maar positieve controles oké

- Slechte DNA-kwaliteit of lage concentratie Controleer altijd de kwaliteit en concentratie van het DNA voordat u begint.

LightCycler: Intensiteit van fluorescentie te laag

- a) Onjuiste opslag van kitonderdelen Bewaar de *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* bij -30 tot -15 °C en houd het primer-probemengsel (PPM) buiten het bereik van licht. Zie 'Opslag en hantering van reagentia' op pagina 10.  
Vermijd herhaaldelijk ontdooien en invriezen.  
Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag.
- b) Zeer lage initiële hoeveelheid doel-DNA Vergroot de hoeveelheid DNA-monster.  
Opmerking: Afhankelijk van de gekozen methode voor DNA-bereiding kunnen remmende effecten optreden.

LightCycler: Intensiteit van fluorescentie varieert

- a) Pipetteerfout De 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) Capillairbuisjes zijn onvoldoende gecentrifugeerd | Het bereide PCR-mengsel kan zich nog boven in het capillaire buisje bevinden of er zit een luchtbel in de punt.<br><br>Centrifugeer capillairbuisjes waar het reactiemengsel in zit altijd op de wijze die in de gebruikshandleiding van het apparaat is beschreven. |
| c) De punt van het capillairbuisje is vuil           | Draag altijd handschoenen wanneer u met capillairbuisjes werkt.  |

## Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsmanagementsysteem van QIAGEN, wordt elke partij *ipsogenJAK2* Muta *ScreenKits* getest op vooraf bepaalde specificaties om een constante productkwaliteit te garanderen.

Certificaten van analyse zijn op aanvraag verkrijgbaar bij [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Beperkingen

Voordat u dit apparaat in gebruik neemt, moet u hiervoor zijn opgeleid en moet u vertrouwd zijn met de 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 8 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 uitgevoerd en die niet in de prestatieonderzoeken van QIAGEN worden behandeld.

Let goed op de vervaldatum op het etiket van de doos en op de etiketten van alle componenten. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken.

## Prestatiekenmerken

### Niet-klinische onderzoeken

Er zijn niet-klinische onderzoeken uitgevoerd om de analytische prestaties van de *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* vast te stellen.

#### Precisie

Drie verdunningsniveaus van genomisch DNA van cellijnen die de JAK2 V617F-mutatie in wildtype DNA herbergen, werden getest met de *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit*. De verdunningen kwamen overeen met mutatiebelastingen van 1%, 2% en 3%. Voor elk niveau werden onafhankelijk van elkaar verdunningsbatches gemaakt. In 3 onafhankelijke experimenten werden replica's van deze verdunningen getest. Verhoudingen verkregen voor elk DNA-monster (Verhouding<sub>Monster</sub>) zijn vergeleken met de negatieve-controleverhouding (JAK2 100% wildtype DNA, Verhouding<sub>NC</sub>). De resultaten zijn samengevat in tabel 16.

Tabel 16. Precisiegegevens voor niet-klinische studies

Mutatieniveau	Verhouding <sub>Monster</sub> > Verhouding <sub>NC</sub>	%CV (verhouding)
1% V617F-DNA	100% (n = 183)	6,8
2% V617F-DNA	100% (n = 72)	4,5
3% V617F-DNA	100% (n = 135)	5,1

#### Interlaboratoriumanalysegegevens

Er werd een studie uitgevoerd in 13 laboratoria. Er werden analysegegevens verzameld over verdunningen van genomisch DNA dat de JAK2 V617F-mutatie herbergt in wildtype DNA. Er werden in ieder laboratorium drie experimenten uitgevoerd. Voor elk experiment werden de volgende DNA-monsters uit cellijnen getest:

- 1 negatieve controle (NC) 0% V617F
- 1 positieve controle (PC) 100% V617F
- 1 cut-off monster (COS) 2% V617F
- 3 monsters met tussentijdse mutatiebelastingen (20%, 50% en 80%)

De experimenten werden uitgevoerd op zeven verschillende instrumentmodellen:

- ABI PRISM 7000 SDS
- Applied Biosystems 7300 realtime PCR-systeem
- Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem
- ABI PRISM 7700 SDS
- ABI PRISM 7900 SDS
- LightCycler 2.0
- iCycler®

De resultaten zijn samengevat in tabel 17.

Tabel 17. Interlaboratoriumanalysegegevens verkregen uit verdunningen van genomisch DNA uit cellijnen die de JAK2 V617F-mutatie in wildtype DNA herbergen

Monsterdetectie	Positieve monsters	Negatieve monsters
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 wildtype	0	36

\*Positieve monsters bestonden uit 36 positieve controles (PC-VF), 36 drempelmonsters (COS-VF, 2% V617F), 34 monsters met 20% JAK2 V617F, 35 monsters met 50% JAK2 V617F en 36 monsters met 80% JAK2 V617F.

## Klinische onderzoeken

Vergelijking tussen de *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* en ARMS®-methode  
DNA-monsters van 141 patiënten met verdenking op MPN werden parallel getest met de *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* en een qPCRassay op basis van het ARMSprincipe (versterking ongevoelige mutatie) (11). De resultaten van de vergelijking zijn weergegeven in tabel 18 (2 x 3 kruistabellen) en tabel 19 (percentageovereenkomst).

Tabel 18. Vergelijking tussen de methoden: *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* en ARMS

		Resultaten van de ARMS-testmethode		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 wildtype (JAK2 V617F <2%)	Totaal
Resultaten van de <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> -testmethode	JAK2 V617F - mutatie gedetecteerd	91	0	91
	Resultaat niet doorslaggevend	1	2	3
	Geen JAK2 WT-mutatie gedetecteerd	1	46	47
Totaal		93	48	n = 141

Tabel 19. Vergelijking tussen de methoden: *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* en ARMS

	Overeenstemming (%)	95% CI* (%)
Positieve gegevens overeenkomst tussen <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>ScreenKit</i> en ARMS	98,9	94,1 -99,8
Negatieve gegevens overeenkomst tussen <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>ScreenKit</i> en ARMS	100	92,3 -100
Totale overeenstemming	99,3	96,0 -99,9

\* Betrouwbaarheidsintervallen werden berekend volgens CLSI EP14<sup>A</sup> 'Gebruikersprotocol voor evaluatie van kwalitatieve testprestaties Goedgekeurde richtlijn'.



Vergelijking tussen de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen*Kit en sequentiëring DNA-monsters van 51 patiënten met verdenking op MPN werden parallel met de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen*Kit en de referentietechniek ('gouden standaard'), directe sequentiëring, getest. Eén monster kon niet worden geïnterpreteerd vanwege een mislukte sequentiëring. Vergelijkingen van resultaten verkregen uit de 50 interpreteerbare monsters zijn samengevat in tabel 20 (2 x 3 kruistabellen) en tabel 21 (percentage overeenkomst).

Tabel 20. Vergelijking tussen de methoden: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit en sequentiëring

		Resultaten van directe sequentiëring		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 wildtype (JAK2 V617F <2%)	Totaal
Resultaten van de <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> -testmethode	JAK2 V617F-mutatie gedetecteerd	26	1	27
	Resultaat niet doorslaggevend	0	1	1
	Geen JAK2 WT-mutatie gedetecteerd	2	20	22
Totaal		28	22	n = 50

Tabel 21. Vergelijking tussen de methoden: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit en sequentiëring

	Overeenstemming (%)	95% CI* (%)
Positieve gegevens overeenkomst tussen <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit en sequentiëring	92,9	77,4-98,0
Negatieve gegevens overeenkomst tussen <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit en sequentiëring	95,2	77,3-99,2
Totale overeenstemming	93,9	83,5 - 97,9

\* Betrouwbaarheidsintervallen werden berekend volgens CLSI EP14 'Gebruikersprotocol voor evaluatie van kwalitatieve testprestaties; Goedgekeurde richtlijn'.

## Multi-center onderzoek op 228 monsters van patiënten

DNA-monsters van patiënten werden geanalyseerd met doe-het-zelf technieken in 13 laboratoria die bijdroegen aan een interlaboratoriumonderzoek. In elk laboratorium werden 3 experimenten uitgevoerd, met behulp van DNA uit cellijnen zoals beschreven voor de niet-klinische precisiegegevens (zie hierboven) en met DNA van 10 patiënten beschikbaar in het laboratorium.

De 228 monsters met een bekend JAK2-genotype werden parallel getest met de *ipsogen*JAK2 Muta *Screen*Kit en met zelf ontwikkelde methoden, waaronder kwalitatieve PCR, allelspecifieke PCR, fluorescentie-energie-resonantie-overdracht (FRET), sequentiëring, allelspecifieke oligonucleotide PCR, RFLP en allelische discriminatie. Resultaten van de vergelijkingen worden weergegeven in tabel 22 (2 x 3 kruistabellen) en tabel 23 (percentage overeenkomst).

Tabel 22. Vergelijking tussen de methoden: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit en zelf ontwikkelde methoden

		Resultaten van zelf ontwikkelde methoden		
		Mutatie gedetecteerd JAK2 V617F	Mutatie niet gedetecteerd JAK2 wildtype	Totaal
Resultaten van de <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> -testmethode	JAK2 V617F - mutatie gedetecteerd	139	3	142
	Resultaat niet doorslaggevend	5	17	22
	JAK2 WT Geen mutatie gedetecteerd	3	61	64
Totaal		147	81	n = 228

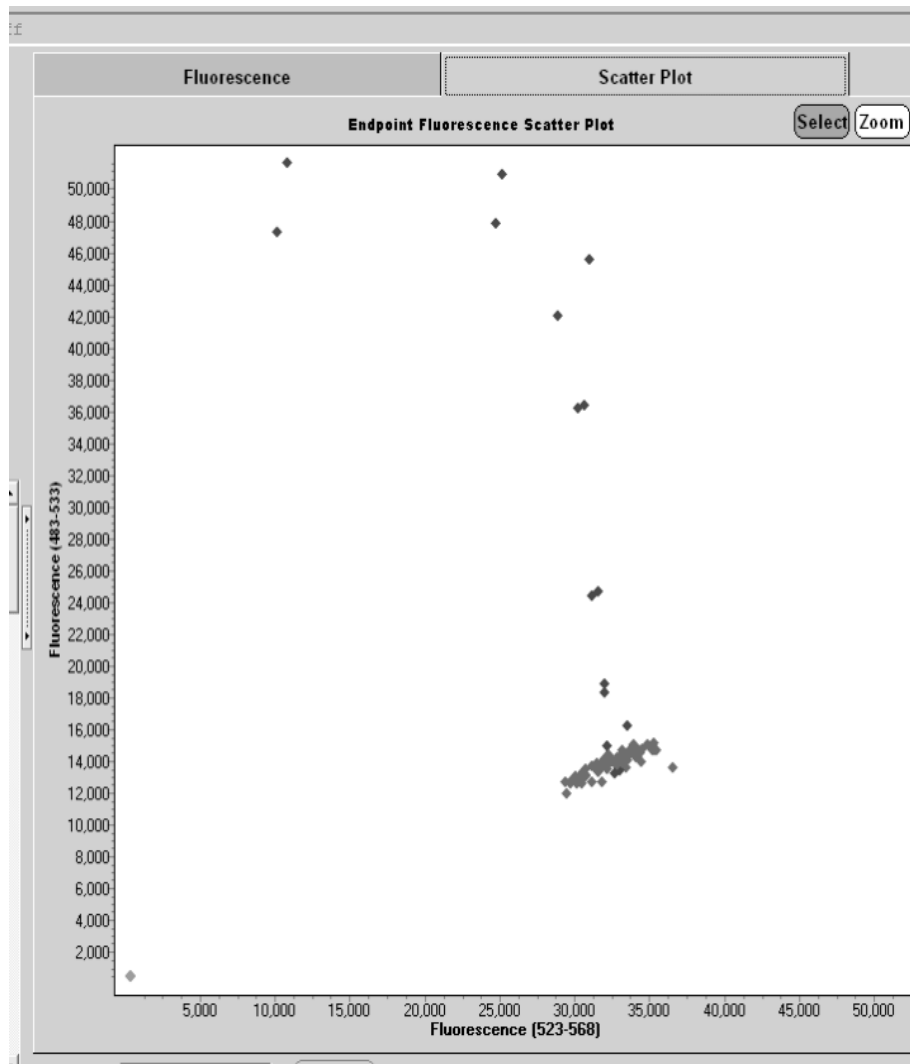
Tabel 23. Vergelijking tussen de methoden: *ipsogen JAK2 Muta Screen Kit* en zelf ontwikkelde methoden

	Overeenstemming (%)	95% CI* (%)
Positieve gegevens overeenkomst tussen <i>ipsogen JAK2 MutaScreenKit</i> en zelf ontwikkelde methoden	97,9	94,0-99,3
Negatieve gegevens overeenkomst tussen <i>ipsogen JAK2 MutaScreenKit</i> en zelf ontwikkelde methoden	95,3	87,1-98,4
Totale overeenstemming	97,1	93,8-98,7

\* Betrouwbaarheidsintervallen werden berekend volgens CLSI EP17-A2 'Gebruikersprotocol voor evaluatie van kwalitatieve testprestaties; Goedgekeurde richtlijn'.

Robuustheid: testen van monsters van gezonde donoren

DNA-monsters van 103 gezonde bloeddonoren werden geanalyseerd met de *ipsogen JAK2 MutaScreenRS Kit*. Alle monsters werden gedetecteerd als JAK2 wildtype. In afbeelding 34 is een analyse van 38 monsters met het LightCycler 480-instrument weergegeven.



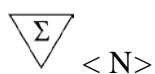
Afbeelding 34. Analyse van gezonde donoren. LightCycler 480-analyse van 38 gezonde donoren (◆) met de *ipsogen*JAK2 Muta *Screen*RS Kit (cat.nr. 673123). Positieve resultaten in tweevoud (◆) komen overeen met een referentieschaal die bij de kit wordt geleverd. VIC-fluorescentiewaarden worden uitgezet op de x-as en FAM-waarden op de y-as.

## Referenties

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* 366, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 290, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 113, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 29, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 108, 1865.

## Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en op de etiketten worden weergegeven:



Bevat voldoende reagentia voor < N > reacties



Vervaldatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer



Global Trade Item Number



Temperatuurbepierking



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

## Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreenKit (10)	Voor 10 reacties: V617F positieve controle, V617F negatieve controle, V617F drempelmonster, primer-probemengsel JAK2 wildtype en JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreenKit (24)	Voor 24 reacties: V617F positieve controle, V617F negatieve controle, V617F drempelmonster, primer-probemengsel JAK2 wildtype en JAK2 V617F	673023
Rotor-Gene Q MDx : voor IVD -gevalideerde, realtime PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCRcycler 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 niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCRcycler 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](http://www.qiagen.com) of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of uw plaatselijke distributeur.

Deze pagina is opzettelijk leeg gelaten



Dit product is bedoeld voor in-vitrodiagnostisch gebruik. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen producten van *ipsogen* 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. QIAGEN kan in geen enkel geval aansprakelijk worden gehouden 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 de enige verhaalmogelijkheid van de klant is beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

Dit product wordt verkocht onder een licentieovereenkomst met Epoch Biosciences voor gebruik bij in-vitrodiagnostiek en mag niet worden gebruikt voor ander onderzoek, commercieel klinisch onderzoek of ander gebruik buiten het gebied van in-vitrodiagnostiek.

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.

De aankoop van dit product geeft geen recht op gebruik voor klinische studies voor geneesmiddelen tegen JAK2 V617F. QIAGEN ontwikkelt specifieke licentieprogramma's voor dergelijk gebruik. Neem contact op met onze juridische afdeling via [ajak2licenses@qiagen.com](mailto:ajak2licenses@qiagen.com).

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

#### Beperkte licentieovereenkomst

Gebruik van dit product betekent de instemming van elke koper of gebruiker van de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* kit met de volgende voorwaarden:

1. De *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit mag uitsluitend in overeenstemming met de handleiding van de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit en alleen in combinatie met componenten uit de kit worden gebruikt. QIAGEN verleent geen enkele licentie op grond van enig intellectueel eigendom om de bijgeleverde componenten van deze kit te gebruiken met componenten die niet bij deze kit worden geleverd, behalve zoals beschreven in de handleiding van de *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit en aanvullende protocollen beschikbaar op [www.qiagen.com](http://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 haar componenten zijn gelicentieerd voor eenmalig gebruik en mogen niet opnieuw worden gebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN verwerpt uitdrukkelijk alle andere licenties, expliciet of impliciet, dan die uitdrukkelijk zijn vermeld.
5. De koper en gebruiker van de kit komen overeen om zelf en ook niemand anders, stappen te laten nemen die tot hierboven genoemde verboden handelingen kunnen leiden of vergemakkelijken. QIAGEN kan de verboden van deze beperkte licentieovereenkomst voor elke rechtbank afdwingen en zal alle onderzoeks- en gerechtskosten, met inbegrip van advocaatkosten, verhalen in elke actie om deze gelimiteerde licentieovereenkomst of een van haar intellectuele eigendomsrechten met betrekking tot de kit en/of de componenten ervan.

Ga voor de actuele licentievoorwaarden naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

---

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



---

1072500.NL.154011606

Sample & Assay Technologies