

Syyskuu 2017

ipsogen[®] JAK2 RGQ PCR Kit - käsikirja



Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -instrumentin kanssa

Versio 1

Kvantitatiivinen in vitro -diagnostiikka



673623



1107956



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA



1107956FI

Sisältö

Käyttötarkoitus	4
Yhteenveto ja selitykset.....	4
Menetelmän toimintaperiaate.....	6
Toimitetut materiaalit.....	9
Sarjan sisältö	9
Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen).....	9
Varoitukset ja varotoimet	12
Yleiset varotoimet	12
Reagenssien säilytys ja käsittely	14
Kuljetusolosuhteet	14
Säilytysolosuhteet	14
Stabiilius	14
Näytteen käsittely ja säilytys	15
Toimenpide.....	15
Genomisen DNA:n eristäminen ja valmistaminen kokoverestä	15
DNA:n kvalifiointi ja kvantifiointi.....	22
Genomisten DNA-näytteiden normalisointi	22
Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella	23
Tulosten tulkitseminen	31
Ongelmien ratkaisu	36
Laadunvarmistus	38
Rajoitukset	38
Suorituskykyominaisuudet	39
LOB (Limit of Blank)	39
Havaitsemisraja	39
Lineaarisuus.....	40
Toistettavuus ja uusittavuus	40
Häiritsevät aineet	41
Kliininen validointi ja menetelmän vertailu.....	41

Lähdeviitteet.....	43
Merkinnät.....	44
Yhteystiedot.....	45
Tilastiedot.....	46

Käyttötarkoitus

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit on kvantitatiivinen *in vitro* -testi, joka on tarkoitettu JAK2 V617F/G1849T -alleelin havaitsemiseen kokoverestä eristetystä genomisesta DNA:sta. Testi on tarkoitettu avuksi myeloproliferatiivisen neoplasman (myeloproliferative neoplasm, MPN) diagnosoinnissa yhdessä muiden kliinispatologisten tekijöiden kanssa.

Yhteenveto ja selitykset

Janus-tyrosiinikinaasi 2 -geeniin (JAK2) vaikuttava toistuva somaattinen mutaatio, V617F, löydettiin vuonna 2005 (1–4), mikä johti merkittävään läpimurtoon myeloproliferatiivisen neoplasman ymmärtämisessä, luokittelussa ja diagnosoinnissa. JAK2 on useiden sytokiinien (erytropoietiini mukaan lukien) tärkeä solunsisäinen signaalimolekyylä.

JAK2 V617F -mutaatio löytyy yli 95 prosentilta polysytemia veraa (polycythemia vera, PV) sairastavilta, 50–60 prosentilta essentiaalista trombosytemiaa (essential thrombocythemia, ET) sairastavilta ja 50 prosentilta idiopaattista myelofibroosia (primary myelofibrosis, PMF) sairastavilta potilailta. JAK2 V617F on löytynyt myös joissakin harvoissa tapauksissa potilailta, joilla on myelomonosyyttinen leukemia, myelodysplastinen oireyhtymä (myelodysplastic syndrome, MDS), systeeminen mastosytoosi tai krooninen neutrofiilileukemia, mutta ei yhdeltäkään kroonista myelooista leukemialta (chronic myeloid leukemia, CML) sairastavalta potilaalta (5).

Kyseessä on JAK2-geenin pistemutaatio nukleotidissa 1849 eksonissa 14. Tuloksena on valiin (valine, V) korvautuminen fenyylialaniinilla (phenylalanine, F) proteiinin paikassa 617 (JH2-domeeni). Mutaatiosta seuraa JAK2:n konstitutiivinen aktivaatio, hematopoieettinen transformaatio *in vitro* ja erytropoietiinistä riippumattomien erytrooisten pesäkkeiden (erythropoietin-independent erythroid colony, EEC) kasvua kaikilla PV-potilailla ja suurella osalla ET- ja PMF-potilaista (6). JAK2 V617F on olennainen hematopoieettisten solujen muutosten aiheuttaja myeloproliferatiivisissa taudeissa, mutta samasta mutaatiosta lähteviä näin erilaisiin kliinisiin ja biologisiin lopputuloksiin johtavia patologisia mekanismeja ei vielä tarkasti tunneta.

Myeloproliferatiivisten tautien diagnosointi on perinteisesti perustunut kliinisiin, luuydinhistologisiin ja sytogeneettisiin kriteereihin. Sairaudelle spesifin molekyyli-merkkiaineen löytyminen yksinkertaisti diagnosiprosessia ja paransi sen tarkkuutta. JAK2 V617F -mutaation löytyminen kuuluu nyt Maailman terveysjärjestön laatimiin BCR-ABL-negatiivisten myeloproliferatiivisten tautien diagnosikriteereihin 2008 (Taulukko 1, seuraava sivu), ja tämä mutaatio on tärkeä kriteeri diagnosin varmistamiselle.

Taulukko 1. WHO:n kriteerit myeloproliferatiivisten tautien diagnosoille (sovitettu viiteen 7 mukaisesti)

PV:n diagnostiset kriteerit	
Pääkriteerit	<p>1. Hemoglobiini (Hb) > 18,5 g.dl⁻¹ (miehet) tai > 16,5 g.dl⁻¹ (naiset) tai Hb tai hematokriitti yli viitevaihteluvälin 99. persenttiin iän, sukupuolen tai asuinkorkeuden mukaan tai</p> <p>Hb > 17 g.dl⁻¹ (miehillä) tai > 15 g.dl⁻¹ (naisilla), jos tason nousu on pysyvästi ≥ 2 g.dl⁻¹ mutta ei liity raudanpuutteen korjaukseen tai punasolumassan kasvu > 25 % yli keskimääräisen normaalin ennustearvon</p> <p>2. JAK2V617F tai samanlainen mutaatio</p>
Sivukriteerit	<p>1. Luuytimen kolmen solulinjan myeloproliferaatio</p> <p>2. Pienentynyt seerumin erytropoietiiniipitoisuus</p> <p>3. Erytropoietiinista riippumattomien erytroosisten pesäkkeiden kasvu</p>
ET:n diagnostiset kriteerit	
Pääkriteerit	<p>1. Verihiutaleiden määrä $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$</p> <p>2. Laajentuneiden ja kypsien megakaryosyyttien proliferaatiota. Ei lainkaan tai vähän granulosyyttistä tai erytroidista proliferaatiota</p> <p>3. Kroonisen myeloosien leukemian, polysytemian veran, idiopaattisen myelofibroosin, myelodysplastisen oireyhtymän tai muiden myeloproliferatiivisten kasvainten kriteerit eivät täyty</p> <p>4. JAK2V617F tai muu klonaalinen löydös</p> <p>Ei näytöä reaktiivisesta trombocytoosista</p>
Sivukriteerit	–
PMF:n diagnostiset kriteerit	
Pääkriteerit	<p>1. Megakaryosyyttien proliferaatio ja atypia sekä retikuliini- ja/tai kollageenifibroosi tai Megakaryosyyttilöydökset ja proliferaatiivinen luuydin ilman retikuliinifibroosia, granulosyyttistä proliferaatiota ja usein vähentynyt erytropoiesi (idiopaattinen myelofibroosi)</p> <p>2. Kroonisen myeloosien leukemian, polysytemian veran, myelodysplastisen oireyhtymän tai muiden myeloproliferatiivisten kasvainten kriteerit eivät täyty</p> <p>3. JAK2V617F tai muu klonaalinen löydös</p> <p>Ei näytöä reaktiivisesta luuytimen fibroosista</p>
Sivukriteerit	<p>1. Leukoerythroblastosis</p> <p>2. Kohonnut seerumin laktatidehydrogenaasitaso</p> <p>3. Anemia</p> <p>4. Palpoituvaa suurentunutta pernaa</p>

CML: Chronic myeloid leukemia (krooninen myeloinen leukemia); EEC: endogenous erythroid colony (erytropoietiinista riippumaton erythrooinen pesäke); ET: essential thrombocythemia (essentiaalinen trombositopenia); Hb: hemoglobiini (hemoglobiini); MDS: myelodysplastic syndrome (myelodysplastinen oireyhtymä); PMF: primary myelofibrosis (idiopaattinen myelofibroosi); PV: polycythemia vera (polysytemia vera); WHO: World Health Organization (Maailman terveysjärjestö).

Vuodesta 2006 JAK2V617F:n havaitsemiseen ja mahdolliseen kvantifiointiin on ollut saatavilla useita laboratorioissa kehitettyjä testimenetelmiä, jotka periaatteessa perustuvat PCR-tekniikoihin tai sekvensointiin. Näillä testeillä on erilainen analyttinen suorituskyky, erityisesti tarkkuuden ja herkkyyden osalta. Tämä ero voi vaikuttaa luuydinanalyysin tarpeeseen, lopullisen diagnoosin määrittämiseen kuluvaan aikaan ja mahdollisesti diagnoosin tekemiseen.

Menetelmän toimintaperiaate

Useita erilaisia tekniikoita on ehdotettu yksittäisen nukleotidin polymorfismin (single nucleotide polymorphisms, SNP) osuuden määrittämiseen kvantitatiivisesti DNA-näytteistä. Jotkin, kuten sulamiskäyrät ja sekvensointi, ovat vain puolikvantitatiivisia. Reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen polymeraasiketjureaktioon (qPCR) perustuvia menetelmiä suositetaan niiden suuren herkkyyden vuoksi. SNP-spesifisen alukkeiden käyttö mahdollistaa mutatoituneen (mutant, MT) tai villityypin (wild-type, WT) alleelin selektiivisen monistuksen niin, että se on helposti havaittavissa reaaliaikaisella qPCR-laitteella. Tämä mahdollistaa < 0,1 %:n herkkyyden, joka on linjassa tällä hetkellä hyväksytyin, kliiniseen positiivisuuteen käytetyn JAK2-rajain 1 % kanssa. On kuitenkin huomattava, että jotkut kliiniset asiantuntijat katsovat kaiken JAK2-kuorman esiintymisen kliinisesti merkittäväksi diagnosointihetkellä ja siten on olemassa herkän menetelmän, kuten qPCR:n, tarve (8). *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit perustuu tähän tekniikkaan.

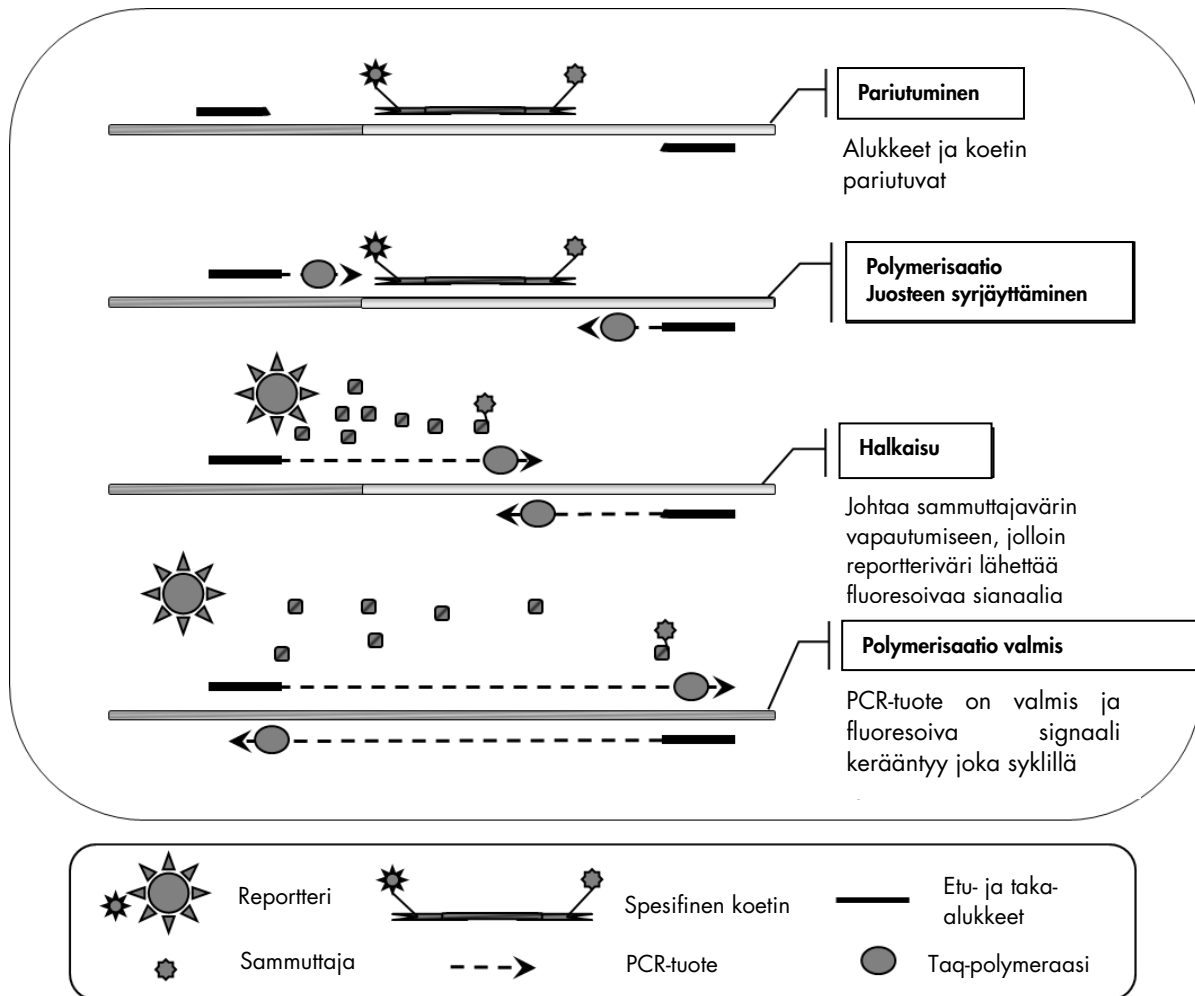
qPCR:n käyttäminen mahdollistaa PCR-tuotteiden tarkan monistuksen PCR-monistumisprosessin eksponentiaalisessa vaiheessa. Kvantitatiiviset PCR-tiedot saadaan nopeasti ilman PCR:n jälkeistä käsittelyä tunnistamalla fluoresenssisignaali reaaliaikaisesti PCR-syklin aikana ja/tai jälkeen, mikä vähentää merkittävästi PCR-tuotekontaminaation vaaraa. Tällä hetkellä qPCR-tekniikoissa on kolme päätyyppiä: qPCR-analyysi SYBR® Green I Dye -väriä käyttämällä, qPCR-analyysi hydrolyysikoettimia käyttämällä ja qPCR-analyysi hybridisaatiokoettimia käyttämällä.

Tämä testi hyödyntää qPCR-oligonukleotidien hydrolyysiä. PCR:n aikana etu- ja taka-alukkeet hybridisoituvat tiettyyn sekvenssiin. Samassa seoksessa on toinen väriaineeseen linkitetty aluke. Tämä koetin, joka koostuu 5'-reportterivärillä merkitystä oligonukleotidista ja värjäämättömästä 3'-sammuttajasta, hybridisoituu kohdesekvenssiin PCR-tuotteessa. qPCR-analyysi hydrolyysikoettimilla hyödyntää *Thermus aquaticus* (*Taq*) -DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleaasiaktiivisuutta. Koettimen ollessa ehjä reportterivärin läheisyys sammuttajaan tukahduttaa reportterin fluoresenssin pääasiassa Förster-tyyppisellä energiansiirrolla.

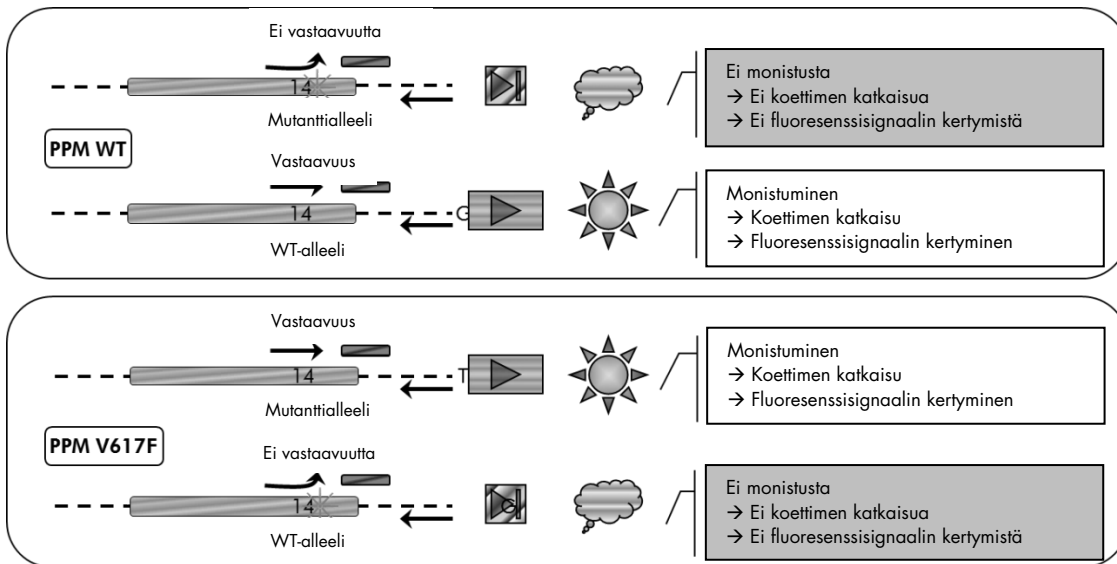
Jos kohdesekvenssi on PCR-ajossa läsnä, sekä etu- että taka-alukkeet pariutuvat koettimen molemmin puolin. DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleaasiaktiivisuus leikkaa koettimen reportterin ja sammuttajan välistä vain, jos kolme oligonukleotidiä hybridisoituu kohteeseen. Sen jälkeen koettimen palaset irtoavat kohteesta ja juosteen polymerisaatio jatkuu. Koettimen 3'-päätä on estetty, jotta koetin ei piteneisi PCR:n aikana (Kuva 1, seuraava sivu). Tämä prosessi tapahtuu jokaisessa syklistä eikä se häiritse tuotteen eksponentiaalista kertymistä.

Fluoresenssisignaalin voimistuminen havaitaan vain, jos kohdesekvenssi on komplementaarinen alukkeisiin ja koettimeen nähden ja täten monistuu PCR-ajon aikana. Näiden vaatimusten vuoksi

epäspesifistä monistusta ei havaita. Siksi fluoresenssin lisääntyminen on suoraan suhteessa kohteen monistumiseen PCR:n aikana.



Kuva 1. Reaktioperiaate. Tässä määritystarvikesarjassa käytetty kvantitatiivinen alleelispesifinen PCR-tekniikka mahdollistaa herkän, tarkan ja hyvin toistettavan SNP:eiden havaitsemisen. Tämä tekniikka perustuu spesifisten taka-alukkeiden käyttöön villityypin ja V617F-alleeleista (8). Vain täydellinen vastaavuus alukkeen ja kohde-DNA:n välillä mahdollistaa pitenemisen ja monistamisen PCR:ssä (Kuva 2).



Kuva 2. Alleelispesifinen PCR. Villityypin tai V617F-alkkeiden ja koetinseksoksen käyttö mahdollistaa villityypin tai mutatoituneen alleelin spesifisen tunnistuksen kahdessa erillisessä reaktiossa, jotka toteutetaan samalla näytteellä. Tulokset voidaan ilmaista VF-kopioiden prosenttimääränä JAK2-kopioiden kokonaismäärästä.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (24)		
Tuotenumero		673623
Reaktioiden määrä		24
JAK2 Mutant Control (100 % V617F-alleeli)	Punainen	33 µl
JAK2 WT Control (100 % villityypin alleeli)	Vihreä	33 µl
JAK2 MT Quant Standard 1 (5 x 10 ¹ V617F kopiota / 5 µl)	Punainen	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 2 (5 x 10 ² V617F kopiota / 5 µl)	Punainen	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 3 (5 x 10 ³ V617F kopiota / 5 µl)	Punainen	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 4 (5 x 10 ⁴ V617F kopiota / 5 µl)	Punainen	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 1 (5 x 10 ¹ villityypikopiota / 5 µl)	Vihreä	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 2 (5 x 10 ² villityypikopiota / 5 µl)	Vihreä	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 3 (5 x 10 ³ villityypikopiota / 5 µl)	Vihreä	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 4 (5 x 10 ⁴ villityypikopiota / 5 µl)	Vihreä	20 µl
JAK2 MT Reaction Mix*	Punainen	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix†	Vihreä	1010 µl
Taq DNA polymerase (HotStarTaq® 5 yksikköä/µl)	Mintunvihreä	85 µl
TE-puskuri näytteen laimennukseen	Valkoinen	1,9 ml
Vettä mallittomaan kontrolliin (NTC)	Valkoinen	1,9 ml
ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -käsikirja (suomi)		1

* PCR-seos, joka sisältää kaikki tarvittavat komponentit, paitsi Taq-DNA-polymeraasin ja MT-alleelin kohde-DNA:n.

† PCR-seos, joka sisältää kaikki tarvittavat komponentit, paitsi Taq-DNA-polymeraasin ja WT-alleelin kohde-DNA:n.

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (safety data sheets SDSs), jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Tarvikkeet ja reagenssit manuaaliseen DNA:n eristämiseen

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit -sarja (tuotenumero 61104)

- Etanolia (96–100 %)

Huomautus: älä käytä denaturoitua alkoholia, koska se sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

Tarvikkeet ja reagenssit automaattiseen DNA:n eristämiseen

- QIAasymphony® DSP DNA Mini Kit -sarja (tuotenumero 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (tuotenumero 997002)
- 8-Rod Covers (tuotenumero 997004)
- Filter-Tips, 1 500 µl (tuotenumero 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (tuotenumero 990332)
- Elution Microtubes CL (tuotenumero 19588)
- Tip disposal bags (kärkien hävityspussit) (tuotenumero 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, tuotenumero 72.694, www.sarstedt.com)

PCR-tarvikkeet ja -reagenssit

- Nukleasittomia aerosolisuojattuja steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- 1,5 ml:n tai 2,0 ml:n nukleasittomia PCR-putkia
- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, Rotor-Gene Q -laitetta varten (tuotenumero 981103 tai 981106)
- Jäätä

Laitteet

- Mikropipettejä (säädettäviä), * jotka on tarkoitettu PCR:ään (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Kertakäyttökäsineitä
- Vortex-sekoitin
- Lämpölevy näytteiden 56 °C:ssa tapahtuvaa llysiä varten
- Pöytämallinen sentrifugi*, jossa on roottori 0,5/1,5/2,0 ml:n reaktioputkia varten (ja joka kykenee saavuttamaan nopeuden 13 000–14 000 rpm)
- Spektrofotometri

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Laite näytteen automaattiseen valmisteluun

- QIASymphony SP -laite* (tuotenumero 9001297), ohjelmistoversio 4.0 tai uudempi, sekä laitteen mukana toimitetut tarvikkeet, mukaan lukien Blood_200_V7_DSP-protokolla
- Tube Insert 3B (tuki, 2,0 ml v2, näyteteline (24), Qsym, tuotenumero 9242083)

Laitteet PCR:ää varten


- Reaaliaikainen PCR-laite*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ja toimitetut lisävarusteet
- Asennettu Rotor-Gene AssayManager® v2.1, ohjelmisto 2.1.x (x≥0)
- Asennettu Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0.x (x≥0)
- Tuotu JAK2 CE Assay Profile (ipsogen_JAK2_blood_CE_V1_0_x (X≥0))

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voi tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustietoja.

<p>HUOMIO</p> 	<p>HUOMIO: ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näyte- tai preparointijätteeseen.</p>
--	--

Yleiset varotoimet

qPCR-testit edellyttävät hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, kuten molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden kunnossapitoa sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämä sarja on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on validoitu suorituskyvyltään optimaaliseksi.

- Testi on tarkoitettu tehtäväksi kokoverinäytteistä, joiden hyytyminen on estetty kalium-EDTA:lla ja jotka on säilytetty 2–8 °C:ssä korkeintaan 96 tuntia ennen DNA:n eristämistä.
- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.
- Hävitä näytteet ja testijäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan reagenssit on laimennettu optimaalisesti. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Älä käytä alle 25 µl:n reaktiitolavuuksia (reaktioseos + näyte).
- Kaikki *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä vaihda mitään yhden sarjan reagenssia toisen *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan samaan reagenssiin, vaikka ne olisivat samasta erästä, koska se voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- Katso lisätietoja varoituksista, varotoimista ja menettelytavoista julkaisusta Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöoppaasta ja RGAM 2.1 -käyttöoppaasta.

- Inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Reaktioseoksissa saattaa tapahtua muutoksia, jos ne altistuvat valolle.
- Seosten sekoittuminen JAK2 MT- ja JAK2 WT Quant Standards -reagenssien ja JAK2 MT- ja JAK2 WT Control -reagenssien sisältämiin synteettisiin materiaaleihin on estettävä huolellisesti.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta DNA tai PCR-tuote ei aiheuttaisi kulkeutumiskontaminaatiota ja siitä seuraavaa väärää positiivista signaalia.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta ei tapahtuisi DNAaasi-kontaminaatiota, joka saattaisi hajottaa malli-DNA:n.
- Käytä reaktioseosten valmistuksessa ja mallien lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Älä avaa Rotor-Gene Q -putkia, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Varmista, että testaat oikean näytteen. Varo väärän näytteen käyttämistä, latausvirhettä ja pipetointivirheitä.
- Varmista näytteiden oikea tunnistus ja jäljitettävyyys käsittelemällä näytteitä järjestelmällisesti.

Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita:

- Käytä nukleasittomia laboratoriovälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja) ja käytä käsineitä testiä tehdessäsi.
- Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojattuja pipettikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.
- Preparoi esi-PCR-päaseos vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipetit, kärjet, jne.) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita). Lisää malli erillisellä alueella (mieluiten erillisessä huoneessa), jolla on tarvittavat materiaalit (pipetit, kärjet ja muut).

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 61104) ja QIASymphony DNA DSP Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 937236) turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavasta käsikirjasta.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja toimitetaan kuivajään päällä. Jos *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja (entsyymiä lukuun ottamatta) ei ole toimitushetkellä jäässä, ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen tekniseen tukipalveluun tai jälleenmyyjään (katso yhteystiedot takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa –30...–15 °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 61104) ja QIASymphony DNA DSP Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 937236) varastointiin liittyvät tiedot vastaavasta käsikirjasta.

Stabiilius

Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on stabiili laatikon etiketissä mainittuun vanhenemispäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan –30...–15 °C:n lämpötilassa pakkauksen etiketissä ilmoitettuun vanhenemispäivään asti. Sarjan toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään viisi.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 61104) ja QIASymphony DNA DSP Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 937236) stabiiliuteen liittyvät tiedot vastaavasta käsikirjasta.

- Sekoita varovasti kääntämällä putki ylösalaisin 10 kertaa ja sentrifugoimalla kaikki putket entsyymiä lukuun ottamatta ennen avaamista.
- Reagenssien vanhenemispäivät on ilmoitettu kunkin osan merkinnöissä. Oikeissa säilytysolosuhteissa tuote pysyy toimintakykyisenä stabiiliusajan, kunhan käytetään samoja komponenttieriä.
- QIAGEN-yhtiön laaduntarkkailumenettelyihin kuuluu julkaistun pakkauksen toiminnallinen testaus jokaisesta yksittäisestä pakkauksen valmistuserästä. Siksi eri sarjojen reagensseja ei saa sekoittaa edes samasta erästä.

Näytteen käsittely ja säilytys

Kokoverinäytteet

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit on tarkoitettu käytettäväksi genomisten DNA-näytteiden kanssa, jotka on saatu kalium-EDTA:lla antikoaguloituista kokoverinäytteistä ja säilytetty jollakin seuraavista tavoista:

- 2–8 °C:ssa enintään 96 tuntia
- 15–25°C:ssa enintään 96 tuntia
- Pakastettuna –15...–30 °C:ssa enintään 1 kuukausi

Huomautus: kokoverinäytteet on kuljetettava samoissa olosuhteissa kuin missä ne säilytetään, jotta säilytyksen ja kuljetuksen aikana ei esiinny lämpötilanvaihtelua.

Genomiset DNA-näytteet

Kun genomisen DNA on eristetty, näytteitä voidaan säilyttää ja kuljettaa –30...–15 °C:ssa enintään 15 kuukautta, joko heti eristämisen jälkeen tai TE-puskurilla laimennuksen jälkeen.

Toimenpide

Genomisen DNA:n eristäminen ja valmistaminen kokoverestä

Genominen DNA on eristettävä käyttämällä joko QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjaa (tuotenumero 61104) tai QIASymphony SP -laitetta yhdessä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan kanssa (tuotenumero 937236).

Varmista, että käytettävät reagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty oikeissa olosuhteissa.

Huomautus: *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan (tuotenumero 61104) tai QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (tuotenumero 937236) kanssa käytettäväksi. Mitään muuta DNA:n eristämistuotetta ei saa käyttää.

Manuaalinen genomisen DNA:n eristys QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla

Manuaalinen genomisen DNA:n eristys tehdään QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla (tuotenumero 61104) *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit* -käsikirjan ohjeiden mukaan.

Ennen aloittamista suoritettavat valmistelut

- **Anna verinäytteiden tasaantua huoneenlämpöön (15–25 °C) ja varmista, että näytteet ovat homogenoituneet hyvin.**

- **Valmistele Lysis Buffer**

Jos Lysis Buffer (AL) -puskuriin on muodostunut saostumaa, liuota se inkuboimalla 56 °C:ssa.

- **QIAGEN Protease -proteasin valmisteleminen**

Lisää 1,2 ml Protease Solvent (PS) -liuotinta lyofilisoituun QIAGEN Protease (QP) -pulloon ja sekoita huolellisesti. Vaahtoamisen välttämiseksi tee sekoitus kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja. Varmista, että QIAGEN Protease (QP) on liennut kokonaan.

Huomautus: Älä lisää QP:tä suoraan Lysis Buffer (AL) -puskuriin.

- **Wash Buffer 1 -puskurin valmisteleminen**

Lisää 25 ml etanolia (96–100 %) mittasylinteriä käyttämällä pulloon, joka sisältää 19 ml Wash Buffer 1 (AW1) -tiivistettä. Säilytä rekonstruoitu Wash Buffer 1 (AW1) huoneenlämpötilassa (15–25 °C).

Huomautus: Sekoita rekonstruoitu Wash Buffer 1 (AW1) aina kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja ennen toimenpiteen aloittamista.

- **Wash Buffer 2 -puskurin valmisteleminen**

Lisää 30 ml etanolia (96–100 %) mittasylinteriä käyttämällä pulloon, joka sisältää 13 ml Wash Buffer 2 (AW2) -tiivistettä. Säilytä rekonstruoitu Wash Buffer 2 (AW2) huoneenlämpötilassa (15–25 °C).

Huomautus: Sekoita rekonstruoitu Wash Buffer 2 (AW2) aina kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja ennen toimenpiteen aloittamista.

- **Elution Buffer -puskurin valmisteleminen**

Sarjan mukana toimitetaan yksi pullo Elution Buffer (AE) -puskuria. Elution Buffer (AE) -puskurin kontaminoitumisen estämiseksi on erittäin suositeltavaa käyttää aerosolin syntymisen estäviä pipettikärkiä, kun Elution Buffer (AE) -puskuria pipetoidaan pullosta. Lisäksi pullon korkki on asetettava takaisin paikalleen heti.

Anna Elution Buffer (AE) -puskurin tasaantua huoneenlämpöön (15–25 °C).

- Aseta lämpölevy 56 °C:seen; lämpölevyä käytetään vaiheessa 4.

Toimenpide

1. Pipetoi 20 µl QIAGEN Protease (QP) -proteasia lyysiputkeen (lysis tube, LT).

Huomautus: Tarkista rekonstruoitujen proteasin vanhentumispäivämäärä ennen käyttöä.

2. Lisää lyysiputkeen (LT) 200 µl verinäytettä.

3. Lisää lysisiputkeen (LT) 200 µl Lysis Buffer (AL) -puskuria, sulje korkki ja sekoita pulssivorteksilla 15 sekunnin ajan.

Huomautus: tehokkaan lysisin takaamiseksi on tärkeää, että näyte ja Lysis Buffer (AL) ovat sekoittuneet läpikotaisin ja että liuos on homogeeninen.

Huomautus: koska Lysis Buffer (AL) -puskurin viskositeetti on suuri, varmista, että lisäät oikean määrän Lysis Buffer (AL) -puskuria pipetoimalla huolellisesti oikeanlaisella pipetillä.



Älä lisää Qiagen Protease (QP) -proteaasia suoraan Lysis Buffer (AL) -puskuriin.


4. Inkuboi 56 °C:ssa (± 1 °C) 10 minuutin ajan (± 1 minuuttia).
5. Sentrifugoi lysisiputkea (LT) noin 5 sekunnin ajan täydellä nopeudella, jotta pisarat poistuvat korkin sisäpuolelta.
6. Lisää lysisiputkeen (LT) 200 µl etanolia (96–100 %), sulje korkki ja sekoita läpikotaisesti pulssivorteksilla ≥ 15 sekunnin ajan.
7. Sentrifugoi lysisiputkea (LT) noin ≥ 5 sekuntia täydellä nopeudella, jotta mahdolliset pisarat poistuvat korkin sisäpuolelta.
8. Lisää varovasti kaikki vaiheesta 7 saatu lysaatti QIAamp Mini spin column -putkeen kastelematta sen reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini spin column -putken kalvoa pipetin kärjellä.

Huomautus: jos käsittelet useita näytteitä, avaa vain yksi lysisiputki (LT) kerrallaan.

9. Sulje QIAamp Mini spin column -putken korkki ja sentrifugoi nopeudella n. 6 000 \times g 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen pesuputkeen (wash tube, WT) ja heitä suodosta sisältävä putki pois.
Huomautus: jos lysaatti ei ole täysin läpäissyt kalvoa nopeudella 6 000 \times g (8 000 rpm) sentrifugoinnin jälkeen, sentrifugoi uudelleen täydellä nopeudella (enintään 20 800 \times g) 1 minuutin ajan.
Huomautus: Jos lysaatti ei vielä kukaan läpäise kalvoa sentrifugoinnin aikana, hylkää näyte ja toista eristys ja puhdistus uudella näytemateriaalilla.
10. Avaa QIAamp Mini spin column -putki varovasti ja lisää 500 µl Wash Buffer 1 (AW1) -puskuria. Varo kastelemasta putken reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini spin column -putken kalvoa pipetin kärjellä.
11. Sulje QIAamp Mini spin column -putken korkki ja sentrifugoi nopeudella n. 6 000 \times g (8 000 rpm) 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen pesuputkeen (WT) ja heitä suodosta sisältävä putki pois.
12. Avaa QIAamp Mini spin column -putki varovasti ja lisää 500 µl Wash Buffer 2 (AW2) -puskuria. Varo kastelemasta putken reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini spin column -putken kalvoa pipetin kärjellä.

13. Sulje QIAamp Mini spin column -putken korkki ja sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 × g tai 14 000 rpm) 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen pesuputkeen (WT) ja heitä suodosta sisältävä putki pois.
14. Sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 × g tai 14 000 rpm) kolmen minuutin ajan, jotta kalvo kuivuisi täysin.
15. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen eluutioputkeen (elution tube, ET) ja heitä suodosta sisältävä pesuputki (WT) pois. Avaa QIAamp Mini spin column -putken korkki varovasti ja lisää 50–200 µl Elution Buffer (AE) -puskuria kalvon keskelle. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämpötilassa (15–25 °C) 1 minuutin ajan. Sentrifugoi nopeudella 6 000 × g tai 8 000 rpm) 1 minuutin ajan DNA:n eluomiseksi.
16. Hävitä käytetyt näyteputket, levyt ja jäte paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.


Automaattinen genomisen DNA:n uutto QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjalla

Automaattinen genomisen DNA:n eristys on tehtävä QIASymphony-laitteen näytteen valmistelumuodulilla yhdessä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (tuotenumero 937236) kanssa ja noudattamalla *QIASymphony DSP DNA Kit -käsikirjan ohjeita*. JAK2-protokollan ominaisuudet on korostettu -merkillä seuraavassa toimenpiteessä.

QIASymphony SP:n avulla QIASymphony DSP DNA Mini Kit mahdollistaa automaattisen DNA:n puhdistuksen ihmisen kokoverestä (käyttämällä Blood_200_V7_DSP-protokollaa QIASymphonyssä).

- Esikäsitelyä ei tarvita
- Putket siirretään suoraan QIASymphony SP -laitteeseen
- DNA:n puhdistus tapahtuu magneettisten hiukkasten avulla

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

-  Eristettävä kokoverimäärä on 300 µl.
- Varmista, että tiedät, miten QIASymphony SP -instrumenttia käytetään. Katso käyttöohjeet laitteen mukana toimitetuista käyttöoppaista.
- Valinnainen ylläpito ei ole välttämätöntä instrumentin toiminnan kannalta, mutta se on erittäin suositeltavaa kontaminaatoriskin vähentämiseksi.

- Ennen kuin käytät reagenssikasettia ensimmäistä kertaa, tarkista, että Buffer QSL1- ja Buffer QSB1 -puskureissa ei ole saostumaa. Tarvittaessa poista Buffer QSL1- ja Buffer QSB1 -puskureita sisältävät urat reagenssikasetista ja inkuboi 30 minuutin ajan 37 °C:ssa välillä ravistaen, jotta saostuma liukenisi. Varmista, että asetat urat takaisin oikeaan paikkaan. Jos reagenssikasetti on jo puhkaistu, varmista, että urat on tiivistetty Reuse Seal Strips -liuskoilla, ja inkuboi koko reagenssikasettia 30 minuutin ajan 37 °C:ssa välillä ravistaen vesihauteessa.
- Yritä välttää reagenssikasetin (RC) voimakasta ravistelua, sillä se voi johtaa vaahoutumiseen, joka saattaa vaikeuttaa nestetason detektointia.

Ennen aloittamista suoritettavat valmistelut

- Varmista ennen toimenpiteen aloittamista, että magneettiset hiukkaset ovat suspendoituneet täysin. Vorteksoi magneettisia hiukkasia sisältävää uraa voimakkaasti vähintään 3 minuutin ajan ennen ensimmäistä käyttökertaa.
- Varmista, että reagenssikasetin päälle on asetettu puhkaisukansi ja että magneettipartikkelien uran kansi on poistettu, tai, jos reagenssikasetti on osittain käytetty, varmista, että Reuse Seal Strips -liuskat on poistettu.
- Muista avata entsyymiputket.
- Jos näytteet on viivakoodattu, suuntaa näytteet putkitelineessä siten, että viivakoodit ovat kohti QIASymphony SP -laitteen vasemmalla puolella olevaa viivakoodinlukijaa.

Toimenpide

1. Sulje kaikki vetolaatikat ja kuomu.
2. Käynnistä QIASymphony SP; odota, kunnes Sample Preparation (Näytteen valmistelu) -näyttö tulee näkyviin ja alustusprosessi on päättynyt.
Huomautus: Virtakytkin sijaitsee QIASymphony SP -laitteen alavasemmassa reunassa.
3. Kirjaudu sisään instrumenttiin.
4. Varmista, että Waste (Jäte) -vetolaatikko on valmisteltu asianmukaisesti, ja tutki sen sisältö, mukaan lukien kärkikouru ja nestemäisen jätteen säiliö. Vaihda kärkien jättepussi tarvittaessa.
5. Lataa tarvittava eluutieline Eluate (Eluaatti) -vetolaatikkoon.
Älä lataa 96-kuoppalevyä aukkoon Elution slot 4 (Eluutioaukko 4).
Käytä vain aukkoa Elution slot 1 (Eluutioaukko 1) ja vastaavaa jäähdäyssovitinta.
Kun käytät 96-kuoppaista levyä, varmista, että levyn suunta on oikea, koska virheellinen suunta voi aiheuttaa näytteiden sekaantumista alavirran analyysissä.

6. Lataa vaadittavat reagenssikasetit ja kulutustarvikkeet Reagents and Consumables (Reagenssit ja kulutustarvikkeet) -vetolaatikkoon.

Huomautus: Varmista, että pipetointikärjet on kiinnitetty oikein.

7. Tutki Reagents and Consumables (Reagenssit ja kulutustarvikkeet) -laatikon sisältö.



8. Siirrä **300 µl** eristettävää kokoverinäytettä mikroputkeen (2,0 ml tyyppi H) ja aseta se putkitelineen 3b 2 ml:n sovittimeen. Lataa näyteputket Sample (Näyte) -vetolaatikkoon.

9. Käytä kosketusnäyttöä ja kirjoita tarvittavat tiedot jokaisesta käsiteltävästä näyte-erästä:

- Näytetiedot: vaihda oletusarvoinen putken muoto valitsemalla Select All (Valitse kaikki) ja valitsemalla sitten Sarstedt reference 72.694 (Sarstedt-viite 72.694) Tube Insert (Putkien syöttö) -taulukosta.
- Ajettava protokolla: valitse Select All (Valitse kaikki) -painike ja luokka DNA Blood (DNA-veri) → Blood_200_V7_DSP kokoverinäytteelle.



- Eluutiotilavuus ja ulostulosijainti: valitse kokoveriprotokollalle vaihtoehto 100 µl.

Huomautus: kun erän tiedot on syötetty, tila LOADED (LADATTU) muuttuu tilaksi QUEUED (JONOSSA). Heti kun jokin erä on jonossa, Run (Aja) -painike tulee näkyviin.

10. Ajon käynnistäminen

- Käynnistä ajo painamalla Run (Aja) -painiketta.
- Lue ja vahvista näyttöön tuleva viesti.

Huomautus: On suositeltavaa odottaa laitteen luona, kunnes se on tunnistanut sisäisten kontrolliputkien nestetason ja QIASymphony SP -laitteen kuljettimen tilaksi muuttuu RUNNING (AJO MENEILLÄÄN).

Huomautus: Älä keskeytä tai lopeta ajoa käsittelyn aikana (paitsi hätätilanteessa), koska tällöin näytteet saavat merkinnän "unclear" (epäselvä).

Huomautus: Näytteitä voi ladata jatkuvasti ja lisätä niitä tähän ajoon (siihen asti kunnes reagenssit on ladattu). Aloita puhdistusprosessi painamalla Run (Aja) -painiketta.

11. Protokolla-ajon lopuksi erän tila RUNNING (AJO KESKEN) muuttuu tilaksi COMPLETED (VALMIS). Ota puhdistetut nukleiinihapot sisältävä eluutioteline Eluate (Eluaatti) -vetolaatikosta.

On suositeltavaa poistaa eluaattilevy Eluate (Eluaatti) -vetolaatikosta heti ajon päättymisen jälkeen. Jos eluutirolevyt jätetään QIASymphony SP -laitteeseen ajon päätyttyä, niihin saattaa tiivistyä kosteutta tai niistä saattaa haihtua kosteutta.

Huomautus: Magneettiset hiukkaset eivät yleensä kulkeudu eluaatteihin. Jos jossakin eluaatissa on mustia magneettisia hiukkasia, voit poistaa ne seuraavasti:

Aseta DNA:ta sisältävä putki sopivaan magneettiseen erottimeen (esimerkiksi QIAGEN 12-Tube Magnet, tuotenumero 36912), kunnes magneettiset hiukkaset on eroteltu. Jos DNA on kuoppalevyillä, aseta kuoppalevy sopivaan magneettiseen erottimeen (esimerkiksi QIAGEN 96-Well Magnet Type A, tuotenumero 36915), kunnes magneettiset hiukkaset on eroteltu. Jos mitään sopivaa magneettista erotinta ei ole käytettävissä, sentrifugoi DNA:ta sisältävää putkea mikrosentrifugissa 1 minuutin ajan täydellä nopeudella, jotta magneettisista hiukkasista muodostuisi pelletti.

12. Vie QIASymphony SP -tulostiedosto: tämä raportti luodaan jokaiselle eluutiolevylle.

- Aseta USB-muistitikku johonkin QIASymphony SP -laitteen etuosassa olevaan USB-porttiin.
- Napsauta Tools (Työkalut) -painiketta.
- Valitse File Transfer (Tiedoston siirto).
- Valitse In-/Output Files (Syöte-/tulostiedostot) -välilehdestä Results Files (Tulostiedostot) ja sitten Transfer (Siirrä).

Viedyn tiedoston nimen pitäisi olla seuraavassa muodossa: yyyy-mm-ddhh:mm:ss_Elution rack ID

13. Tarkista QIASymphony SP -tulostiedostosta Validity of result (Tuloksen kelvollisuus) -sarake jokaisen näytteen osalta.

- Kelvollinen ja epäselvä tila: jatka DNA:n kvalifointiin ja kvantifointiin.
- Virheellinen tila: näyte on hylätty. Käsittele eristysvaihe uudelleen.

14. Jos reagenssikasetti on käytetty vain osittain, tiivistä se Reuse Seal Strips -liuskoilla ja sulje proteinaasi K:ta sisältävät putket kierrekorkeilla heti protokollan päätyttyä, jotta niistä ei haihdu nestettä.

15. Hävitä käytetyt näyteputket, levyt ja jäte paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

16. Puhdista QIASymphony SP -laite.

Nouda instrumentin mukana toimitettujen käyttöoppaiden huolto-ohjeita. Muista puhdistaa kärkien suojukset säännöllisesti ristikontaminaation välttämiseksi.

17. Sulje laitteen vetolaatikat ja katkaise QIASymphony SP:stä virta.

DNA:n kvalifiointi ja kvantifiointi

Tyhjää ATE- tai AE-puskuria on käytettävä kalibroimaan spektrofotometri. Näiden puskureiden käyttäminen on tarpeen, koska genomisen DNA:n eristyssarjoissa käytetyt eluutiopuskurit sisältävät säilöntäaineena natriumatsidia, joka absorboituu 260 nm:ssä.

- A_{260}/A_{280} -suhteen täytyy olla $\geq 1,7$, koska pienemmät suhteet ovat yleensä merkki proteiinin kontaminaatiosta tai orgaanisten kemikaalien esiintymisestä ja vaikuttavat PCR-vaiheeseen.
- DNA:n määrä selvitetään mittaamalla optinen tiheys 260 nm:ssä.
- Puhdistetun DNA:n kokonaismäärä = pitoisuus \times näytteen tilavuus (μ l).
- Jos A_{260}/A_{280} -suhde on pienempi kuin 1,7 ja jos genomisen DNA:n pitoisuus on alle 10 ng/ μ l, näytettä ei saa käsitellä enempää.

Genomisten DNA-näytteiden normalisointi

Laimenna DNA:n pitoisuudeksi 10 ng/ μ l TE-puskurissa, joka on toimitettu *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana.

Rotor-Gene Q PCR -laite on optimoitu 50 ng:lle puhdistettua genomista DNA:ta, jonka lopullinen laimennettu tilavuus on 5 μ l.

Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella ja tulokset on tulkittava automaattisesti Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistolla. Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Katso lisätietoja laitteen, Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaista.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 mahdollistaa PCR-tulosten automaattisen tulkinnan. Sykliparametrit ovat lukittuina ajon aikana.

Ennen aloittamista suoritettavat valmistelut

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto on asennettava Rotor-Gene Q -laitteeseen liitetulle tietokoneelle. Sen voi ladata QIAGEN-verkkosivuilta osoitteesta www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmistosta on *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaassa*.

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit edellyttää erityisesti Gamma Plug-in -lisäosaa. Tämä lisäosa voidaan ladata QIAGEN-verkkosivuilta www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Tämä lisäosa on asennettava tietokoneeseen, jolla on jo Rotor-Gene AssayManager v2.1 asennettuna.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan kanssa tarvitaan myös testiprofiili. Testiprofiili (.iap-tiedosto) sisältää kaikki parametrit, joita tarvitaan qPCR-testin sykleihin ja analyysiin. Se voidaan ladata *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan QIAGEN-verkkosivuilta www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Testiprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon.
Huomautus: *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarja voidaan ajaa vain, kun tietyt asetukset on määritetty Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistossa.

Järjestelmänlaajuisen prosessiturvallisuuden vuoksi seuraavat pakolliset asetukset on asetettava suljetun tilan mukaisesti:

- Material number required (Materiaalinumero pakollinen)
- Valid expiry date required (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen)
- Lot number required (Eränumero pakollinen)

Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja testiprofiilin tuominen

Gamma Plug-in -lisäosan ja testiprofiilin asennus ja tuonti on selostettu *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaassa* ja *Gamma Plug-in -käyttöoppaassa*.

- Lataa sekä Gamma Plug-in että viimeisin JAK2 CE -testiprofiilin versio QIAGENin verkkosivuilta.
- Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla *RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi*-tiedostoa. Noudata näkyviin tulevia asennusohjeita. Yksityiskohtaisia tietoja tästä prosessista on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaan* osassa *Installing Plugins* (Lisäosien asentaminen).

Huomautus: Järjestelmänlaajuisen prosessiturvallisuuden vuoksi valitse *Settings (Asetukset)* -välilehdestä valintaruudut *Material number required* (Materiaalinumero pakollinen), *Valid expiry date required* (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen) ja *Lot number required* (Eränumero pakollinen) suljettua tilaa varten (osasta *Work list [Työluettelo]*). Jos nämä eivät ole valittu, valitse ne napsauttamalla.

- Lisäosan onnistuneen asennuksen jälkeen henkilön, jolla on Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston järjestelmänvalvojan oikeudet, on tuotava *ipsogen_JAK2_blood_CE*-testiprofiili seuraavalla tavalla:
 1. Kirjaudu Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon käyttäjänä, jolla on järjestelmänvalvojan oikeudet.
 2. Valitse *Configuration (Kokoonpano)* -ympäristö.
 3. Valitse *Assay Profiles (Testiprofiilit)* -välilehti.
 4. Napsauta *Import (Tuo)* -painiketta.
 5. Valitse tuotava testiprofiili *ipsogen_JAK2_blood_CE* valintaikkunassa ja valitse *Open (Avaa)*.
 6. Kun testiprofiilin tuonti on valmis, sitä voidaan käyttää *Setup (Asetukset)* -ympäristössä.

Huomautus: Testiprofiilin samaa versiota ei voi tuoda kahdesti.

Näytteiden käsittely Rotor Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

On suositeltavaa testata kahdeksaa genomisen DNA:n näytettä samassa kokeessa jotta kontrollien, standardien ja reaktioseosten käyttö olisi optimaalista.

Taulukko 2 sisältää reaktioiden määrän, jotka voidaan ajaa 72 putken roottorilla.

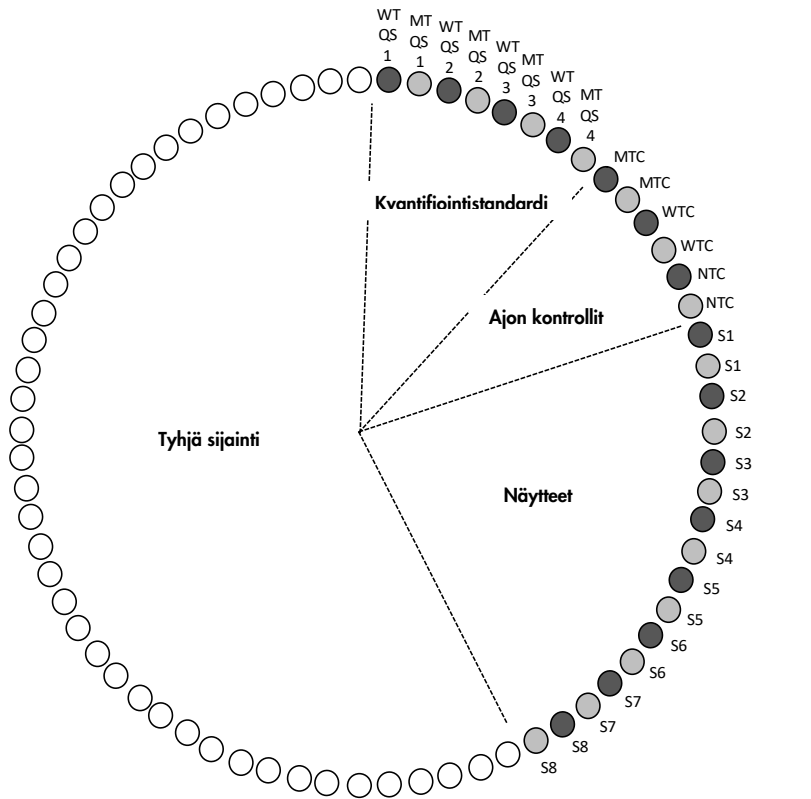
Kuva 3 esittää esimerkin latauslevyn tai roottorin asetuksista *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla tehtävässä kokeessa.

Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Taulukko 2. Reaktioiden määrä Rotor Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Näytteet	Reaktioiden määrä
JAK2 MT Reaction Mix	
8 genomisen DNA:n näytettä	8
JAK2 MT Quant Standards	4
JAK2 MT Control (mutantti)	1
JAK2 WT Control (villityyppi)	1
Vettä mallittomaan kontrolliin (NTC)	1
JAK2 WT Reaction Mix	
8 genomisen DNA:n näytettä	8
JAK2 WT Quant Standards (villityyppi)	4
JAK2 MT Control (mutantti)	1
JAK2 WT Control (villityyppi)	1
Water for NTC (vesi NTC:tä varten)	1

1	WT QS1	9	MT C	17	S2	25	S6	33	○	41	○	49	○	57	○	65	○
2	MT QS1	10	MT C	18	S2	26	S6	34	○	42	○	50	○	58	○	66	○
3	WT QS2	11	WT C	19	S3	27	S7	35	○	43	○	51	○	59	○	67	○
4	MT QS2	12	WT C	20	S3	28	S7	36	○	44	○	52	○	60	○	68	○
5	WT QS3	13	NT C	21	S4	29	S8	37	○	45	○	53	○	61	○	69	○
6	MT QS3	14	NT C	22	S4	30	S8	38	○	46	○	54	○	62	○	70	○
7	WT QS4	15	S1	23	S5	31	○	39	○	47	○	55	○	63	○	71	○
8	MT QS4	16	S1	24	S5	32	○	40	○	48	○	56	○	64	○	72	○



● WT-reaktioseos ● MT-reaktioseos ○ Tyhjä sijainti

Kuva 3. Levyn ja roottorin asetukset tehtäessä testiä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla. WTC: JAK2 WT Control; MTC: JAK2 MT Control; WT-QS: JAK2 WT -standardit; MT-QS: JAK2 MT Quant Standards; S: genomisen DNA:n näyte; NTC: malliton kontrolli (vesi).



Putket on asetettava roottoriin kuvan Kuva 3 mukaisesti, koska testiprofiilissa määritetty automaattinen analyysi perustuu tähän järjestykseen. Jos käytetään eri asettelua, tuloksista tulee poikkeavia.

Huomautus: täytä kaikki lepopaikat tyhjiillä putkilla.

qPCR-ajo Rotor Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

1. Luo käsiteltävistä näytteistä työluettelo seuraavasti.

- Käynnistä Rotor-Gene Q MDx -instrumentti.
- Avaa Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto ja kirjaudu käyttäjänä Operator (Käyttäjä) -roolissa suljetussa tilassa.
- Napsauta työluettelon hallinnan New manual work list (Uusi manuaalinen työluettelo) -painiketta (Setup [Asetukset] -ympäristö).
- Valitse JAK2 CE Assay Profile (JAK2 CE -testiprofiili) käytettävissä olevien testiprofiilien luettelosta Assay (Testi) -vaiheessa.
- Valitse Move (Siirrä), jolloin valittu testiprofiili siirtyy Selected assay profiles (Valitut testiprofiilit) -luetteloon. Testiprofiilin pitäisi nyt näkyä Selected assay profiles (Valitut testiprofiilit) -luettelossa.
- Kirjoita näytteiden lukumäärä vastaavaan kenttään.
- Valitse Kit information (Sarjan tiedot) -joukko ja kirjaa seuraavat JAK2-sarjan tiedot, jotka on painettu laatikon kanteen.
 - Materiaalinumero: 1079182
 - Kelvollinen vanhenemispäivä
 - EränumeroVaihtoehtoisesti voidaan kirjoittaa tai skannata sarjan viivakoodi.
- Valitse Samples (Näytteet) -vaihe. Näkyviin tulee luettelo näytteen tiedoista. Luettelo edustaa roottorin odotettua asettelua.
- Kirjoita tähän luetteloon näytteen tunnistenumero(t) sekä mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot kommenttina jokaisen näytteen kohdalle.
- Valitse Properties (Ominaisuudet) -vaihe ja kirjoita työluettelon nimi.
- Valitse is applicable (on soveltuva) -valintaruutu.
- Tallenna työluettelo.
- Työluettelo voidaan tulostaa ja tämä voi auttaa qPCR:n valmistelussa ja asetusten määrittämisessä. Tulosta työluettelo painamalla Print work list (Tulosta työluettelo) -painiketta. Näytteen tiedot ovat osa työluetteloa.

Huomautus: työluettelo voidaan luoda, kun koe on määritetty laitteessa tai ennen näytteiden lisäämistä laitteeseen, koska työluettelotiedosto voidaan tallentaa.

2. Määritä qPCR-koe.

- Sulata kaikki tarvittavat komponentit paitsi *Taq*-DNA-polymeraasi; kyseistä entsyymiä on säilytettävä pakastimessa, kun sitä ei käytetä. Aseta putket, joissa sulatettavat komponentit ovat, jäähauteeseen.
Huomautus: Älä anna komponenttien sulaa yli 30 minuuttia, jotta materiaali ei pilaannu.
- Puhdista työpöydän alue, jossa PCR-seos valmistetaan, jotta malli- tai nukleasikontaminaation riski pienenee.
- Sekoita varovasti standardit, kontrollit ja reaktioseokset sisältäviä putkia kääntämällä niitä yösalaisin 10 kertaa ja sentrifugoimalla ennen käyttöä.

3. Valmista seuraavat qPCR-seokset käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukoissa Taulukko 3 ja Taulukko 4 esitetään pipetointijärjestys yhden MT-reagenssiseoksen ja yhden WT-reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktiomäärään 25 µl. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista sekä 8 näytteen ja kontrollien sisällyttämistä varten.

Taulukko 3. qPCR-seosten valmistaminen JAK2 MT -sekvenssin tunnistusta varten

Komponentti	1 reaktio (µl)	15 +1* reaktiota (µl)	Lopullinen määrä
JAK2 MT Reaction Mix	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA -polymeraasi	0,2	3,2	1x
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

* Ylimääräinen reaktiutilavuus on sisällytettyä kuolleena tilavuutena.

Taulukko 4. qPCR-seosten valmistaminen JAK2 WT -sekvenssin tunnistusta varten

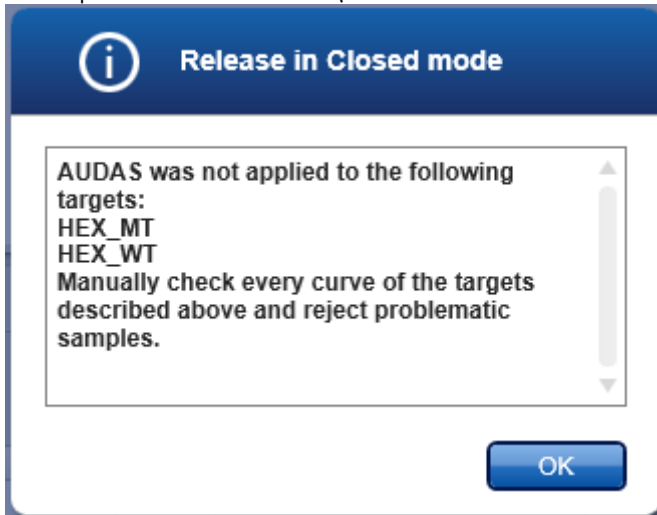
Komponentti	1 reaktio (µl)	15 +1* reaktiota (µl)	Lopullinen määrä
JAK2 WT Reaction Mix	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA -polymeraasi	0,2	3,2	1x
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

* Ylimääräinen reaktiutilavuus on sisällytettyä kuolleena tilavuutena.

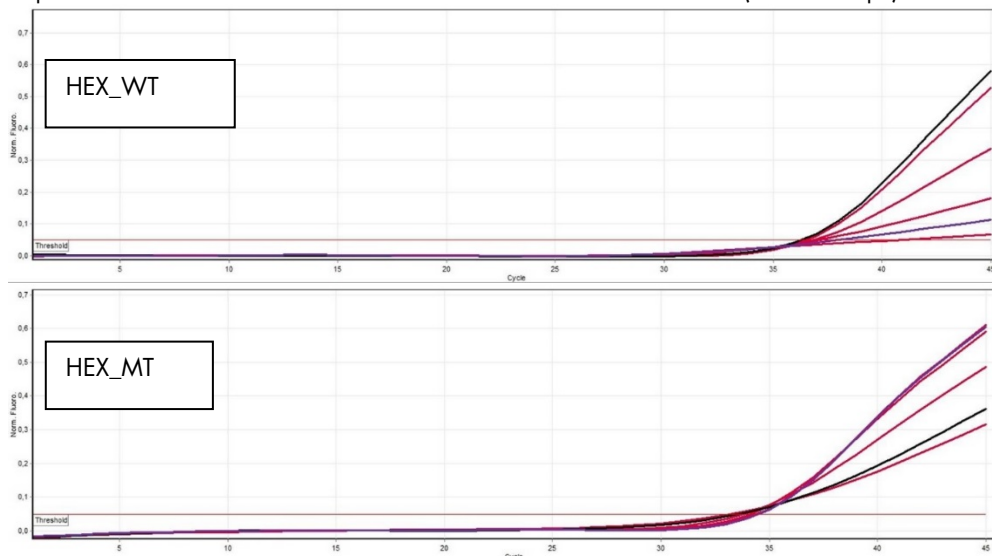
- Vorteksoi ja lyhyesti sentrifugoi ennen kuin siirrät 20 µl qPCR-esiseosta kuhunkin liuskaputkeen.
 - Vorteksoi ja lyhyesti sentrifugoi DNA:ta (genomisen DNA:n näytteitä sekä QS:ää ja kontroleja). Lisää sen jälkeen 5 µl kvantifioitavaa materiaalia vastaavaan putkeen, jolloin kokonaistilavuudeksi tulee 25 µl. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
 - **Huomautus:** Ole huolellinen, että vaihdat kärjet kunkin putken jälkeen epäspesifisen mallin tai reaktioseoksen kontaminaation ja niiden aiheuttamien virheellisten positiivisten tulosten välttämiseksi.
 - Palauta kaikki *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan komponentit pakastimeen, jotta materiaali ei pilaannu.
4. Valmistele Rotor-Gene Q MDx ja aloita ajo seuraavasti.
- Aseta 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -roottoripitimeen.
 - Aseta liuskaputket roottoriin oikeisiin sijainteihinsa; aloita sijainnista 1 kuvan Kuva 3 (sivu 26) esittämällä tavalla. Aseta kaikkiin käyttämättömiin sijainteihin tyhjä, korkilla suljettu putki.
Huomautus: varmista, että ensimmäinen putki on asetettu sijaintiin 1, ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja sijainteihin kuvan Kuva 3 esittämällä tavalla.
 - Kiinnitä lukitusrengas.
 - Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja sulje laitteen kansi.
 - Valitse Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistossa joko vastaava työluettelo työluettelohallinnasta ja valitse Apply (Käytä) tai, jos työluettelo on vielä auki, valitse Apply (Käytä).
Huomautus: jos kokeen omaa työluettelo ei ole luotu, kirjaudu Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon ja noudata kohdan 2 ohjeita ennen toimimista seuraavasti.
 - Kirjoita testin nimi.
 - Valitse käytettävä sykleri Cyclor selection (Syklerin valinta) -ikkunassa.
 - Valitse oikea lukitusrenkaan kiinnitys ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty.
 - Napsauta Start run (Käynnistä ajo) -painiketta.
 - JAK2 RGQ PCR -ajon pitäisi alkaa.
5. Päättää ajo toimimalla seuraavasti.
- Kun ajo on päättynyt, valitse Finish run (Lopeta ajo).
 - Vapauta ja hyväksy ajo:
 - Hyväksyjänä sisäänkirjautuneet henkilöt: Valitse Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään).
 - Käyttäjänä sisäänkirjautuneet henkilöt: Valitse Release (Vapauta).

6. Vapauta tulokset.

- Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään) -vaihtoehdon valinta tuo testin tulokset näkyviin.
- Seuraava AUDAS (Automatic Data Scan) -varoitusta tulee näkyviin. Tarkista raakatietokäyrien HEX-kohteet manuaalisesti Plots and Information (Kaaviot ja tiedot) -osasta poikkeavuuksien varalta (esim. laitteistovirheiden aiheuttamat piikit).



Huomaa, että sisäisen kontrollin HEX-kohteiden käyrissä ei yleensä esiinny sigman muotoa (kuten oheisissa esimerkkikäyrissä), ja ne on katsottava valideiksi käyriksi. Huomaa, että ohjelmisto tarkistaa automaattisesti kaikki muut sisäiset validiuskriteerit (esim. C_T -rajat).



- Jos käyttäjäroolissa oleva käyttäjä napsauttaa Release (Vapauta) -vaihtoehtoa, jonkun toisen käyttäjän on kirjauduttava sisään Approver (Hyväksyjä) -roolissa ja valittava Approval (Hyväksyntä) -ympäristö.

- Suodata hyväksyttävä testi valitsemalla suodatinvaihtoehdot ja napsauttamalla Apply (Käytä) -painiketta.
- Oheinen AUDAS (Automatic Data Scan) -varoitusta tulee näkyviin. Tarkista raakatietokäyrien HEX-kohteet manuaalisesti Plots and Information (Kaaviot ja tiedot) -osasta poikkeavuuksien varalta (esim. laitteistovirheiden aiheuttamat piikit).
- Huomaa, että sisäisen kontrollin HEX-kohteiden käyrissä ei yleensä esiinny sigman muotoa (kuten oheisissa esimerkkikäyrissä), ja ne on katsottava valideiksi käyriksi. Huomaa, että ohjelmisto tarkistaa automaattisesti kaikki muut sisäiset validiuskriteerit (esim. C_T-rajat).
- Tarkista tulokset ja napsauta Release/Report data (Vapauta/raportoi tiedot) -painiketta.
- Valitse OK (OK). Järjestelmä luo raportin .pdf-muodossa ja tallentaa sen automaattisesti ennalta määritettyyn kansioon.

Tämä kansiopolku on oletusarvoisesti:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Vie) > Reports (Raportit)

Huomautus: tätä polkua ja kansiota voi muuttaa Configuration (Kokoonpano) -ympäristössä.

Huomautus: vianmäärittystä varten tarvitaan tukipaketti ajosta. Tukipaketteja voidaan tuottaa hyväksyntä- tai arkistoympäristössä (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöopas*, Vianmäärittämisosa, Tukipaketin luominen). Lisäksi auditointiketju tapahtumahetkeltä ± 1 päivä voi olla hyödyllinen. Auditointilokin voi noutaa Service (Huolto) -ympäristöstä (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöopas*, osa 1.5.5.5).

7. Poista Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan. 0.

Tulosten tulkitseminen

Analyyysi on täysin automaattista.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto analysoi ensin* monistumiskäyriä ja voi merkitä epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä.

Approver (Hyväksyjä) -roolilla varustetun käyttäjän on hyväksyttävä ja vapautettava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston automaattisesti analysoimat ja määrittämät testitulokset. Hyväksyttävissä näytetuloksissa on kolme hyväksyntäpainiketta vastaavan rivin perässä. Näillä

* Käytössä vain FAM-kohteille.

painikkeilla voidaan hyväksyä tai hylätä näytetulokset. Lisätietoja on julkaisussa *Gamma Plug-in -käyttöopas*.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysoi sitten ajon kontrollit:

- NTC: NTC:stä tarkistetaan spesifisen monistuksen (JAK2 WT ja JAK2 MT) puuttuminen ja sisäisen kontrollin monistuminen.
- WT ja MT QS: Validointi perustuu kummankin R²- ja kulmakerroinarvoihin.
- WTC: JAK2-kopioiden kokonaismäärän (TCN) täytyy olla tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee JAK2-mutaatioprosentin. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen tila testin mukaan on WT.
- MTC: JAK2-kopioiden kokonaismäärän täytyy olla tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee JAK2-mutaatioprosentin. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen tilassa näkyy voimakkaasti positiivinen JAK2-mutaatio.
Huomautus: Ajon päätteeksi generoitunut raportti esittää ajon kontrolleista saadut tulokset. Epäkelvollisten tietojen edessä on epäkelpoisuuden merkki.

Jos kaikki ajon kontrollit noudattavat määriytyksiä, Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysoi tuntemattomat näytteet.

- Näytteessä kopioiden kokonaismäärän täytyy olla tarpeeksi suuri, jotta tulokset voidaan tulkita. JAK2-mutaatioprosentti lasketaan sen jälkeen ja tulos tulee näkyviin. Jos putkessa ei havaita spesifistä monistusta (joko WT:tä tai MT:tä), ohjelmisto tarkistaa sisäisen kontrollin monistuksen ja varmistaa näin, ettei se ole artefakti. C_T-arvo on havaittava kussakin putkessa (WT ja MT), jotta Rotor-Gene AssayManager v2.1 validoi näytteen ja vastaava tulos on validi.

Huomautus: jos sekä ajon kontrollit että näytteen tulokset ovat valideja, raportissa näkyy kopioiden määrä ja mutaatioprosentti kunkin näytteen edessä.

- Taulukko 5 esittää epäkelvollisen näytteen merkinnät, jotka voidaan määrittää yksittäiselle putkelle Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston analyysissä, sekä selitykset kunkin merkinnän tarkoituksesta.

Taulukko 6 (sivu 35) esittää näytteen varoitusmerkinnät ja kuvaa termit.

Taulukko 5. Epäkelvollisen näytteen merkinnät ja termien kuvaus

Merkintä	Kuvaus
ANALYSIS_FAILED	Testi on määritetty virheelliseksi, koska analyysi epäonnistui. Ota yhteys QIAGENin tekniseen palveluun.
ASSAY_INVALID	Testi on virheellinen, sillä vähintään yksi ulkoinen kontrolli on virheellinen.
CONSECUTIVE_FAULT	Tämän kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Raakadatan monistuskäyrän muoto poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri.
FLAT_BUMP	Raakadatan monistuskäyrän muoto on litteä töyssi, mikä poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi C _T -arvon määrittäminen on virheellinen).
INVALID_CALCULATION	Tämän kohteen laskelma epäonnistui.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja villityypin reaktioseos.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja villityypin reaktioseos.
MC_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja mutanttireaktioseos.
MC_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin mutanttikontrolli ja villityypin reaktioseos.
MC_LOW_CN	Mutanttikontrollin kopiomäärä on liian pieni.
MC_LOW_PERCENTAGE	Mutanttikontrollin mutaatioprosentti on liian pieni.
MC_NO_CN	Ei kopiomäärää mutanttikontrollille.
MC_NO_CT (MT)	Mutanttikontrollille ei havaittu C _T -arvoa mutanttireaktioseoksessa.
MC_NO_VALUE	Mutanttikontrollin mutaatioprosentilla ei ole arvoa.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Monistuskäyrä ylittää kynnyksarvon useammin kuin kerran. Selvää C _T -arvoa ei voida määrittää.
NO_BASELINE	Lähtötasoa ei löydy. Jatkoanalyysiä ei voi tehdä.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja mutanttireaktioseos.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja villityypin reaktioseos.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja mutanttireaktioseos.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja villityypin reaktioseos.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja mutanttireaktioseos.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin malliton kontrolli ja villityypin reaktioseos.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C _T on havaittu mallittomassa kontrollissa.
OTHER_TARGET_INVALID	Saman näytteen toinen kohde on kelvoton.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Tämän näytteen laskettu pitoisuus ylittää teknisen rajan.
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Mutanttikulmakertoimen yläraja on ylittynyt.

Merkintä	Kuvaus
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Villityyppikulmakertoimen yläraja on ylittynyt.
QS_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin yksi tai useampi villityypin kvantifiointistandardi.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Mutanttikulmakertoimen alaraja ei täyty.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Villityyppikulmakertoimen alaraja ei täyty.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Mutantti-R ² :n alaraja ei täyty.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Villityyppi-R ² :n alaraja ei täyty.
QS_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa yhdessä tai useammassa mutanttikvantifiointistandardissa.
QS_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa yhdelle tai useammalle villityypin kvantifiointistandardille.
RUN_FAILED	Testi määritettiin virheelliseksi, koska syklerissä tai sen liitännässä ilmeni ongelma.
RUN_STOPPED	Testi määritettiin virheelliseksi, koska ajo lopetettiin manuaalisesti.
SAMPLE_LOW_CN	Testinäytteen kopiomäärä on liian pieni.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja mutanttireaktioseos.
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja mutanttireaktioseos.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja mutanttireaktioseos.
SAMPLE_NO_CN	Testinäytteelle ei ole kopiomäärää.
SAMPLE_NO_VALUE	Testinäytteen mutaatioprosentilla ei ole arvoa.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja villityypireaktioseos.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja villityypireaktioseos.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin testinäyte ja villityypireaktioseos.
SATURATION	Floresenssin raakadata saturoituu voimakkaasti ennen monistuskäyrän taipumispistettä.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Monistuskäyrässä havaittiin piikki lähellä C _T -arvoa.
STEEP_BASELINE	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatasssa jyrkästi nouseva perustaso.
STRONG_BASELINE_DIP	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatasssa voimakas pudotus perustasossa.
STRONG_NOISE	Monistuskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Monistuskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatasssa aaltoileva perustaso.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Villityyppikontrollin mutaatioprosentti on liian suuri.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua korkeampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja mutanttireaktioseos.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Havaittu C _T -arvo on odotettua matalampi sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja mutanttireaktioseos.

Merkintä	Kuvaus
WTC_IC_NO_CT (MT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja mutanttireaktioseos.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Ei havaittavaa C _T -arvoa sisäiselle kontrollille samassa putkessa kuin villityypin kontrolli ja villityypin reaktioseos.
WTC_LOW_CN	Villityypikontrollin kopiomäärä on liian pieni.
WTC_NO_CT (WT)	Villityypikontrollille ei havaittu C _T -arvoa villityypin reaktioseoksessa.
WTC_NO_CN	Ei kopiomäärää villityypin kontrollille.
WTC_NO_VALUE	Villityypin kontrollin mutaatioprosentilla ei ole arvoa.

Taulukko 6. Näytteen varoitusmerkinnät ja termien kuvaus

Merkintä	Kuvaus
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Tämän näytteen fluoresenssin muutos suhteessa putkeen, jossa tapahtui suurin fluoresenssin muutos, on pienempi kuin määritetty alaraja.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Tämän näytteen reaktiotehokkuus ei ole yltänyt määritettyyn raja-arvoon.
SPIKE	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa piikki, mutta se on C _T -määritysalueen ulkopuolella.

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisuopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esitellyjä protokollia tai näytteisiin ja testeihin liittyviä tekniikoita (yhteystiedot: Yhteystiedot, sivu 45).

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 61104) ja QIASymphony DNA DSP Mini Kit -eristysarjan (tuotenumero 937236) vianmäärittämiseen liittyvät tiedot vastaavista käsikirjoista.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Automaattinen eristys

Näyte merkitty unclear (epäselvä)	Tämä voi johtua tauosta eristysajan aikana. Jos eristysajo valmistui, jatka OD-suhteen ja pitoisuuden mittaamisvaiheeseen. Jos ei valmistunut, toista eristysajo.
Näyte merkitty unprocessed (käsitlemätön)	Tämä tarkoittaa näytteen alkumäärän virhettä. Tarkista veren määrä pipetoimalla. Jos määrä on liian pieni, suurena näyttemäärä 300 µl:aan ja aloita ajo uudelleen.
Näyte merkitty invalid (epäkelvollinen) Jäähdytyslevyn lämpötilavirhe	Eristysajan aikana tapahtui virhe. Toista tämän näytteen eristysvaihe. Ajon lopussa näkyviin tuleva jäähdytyslämpötilasta ilmoittava virheilmoitus tarkoittaa, että näytteitä pidettiin huoneenlämmössä (15–25 °C) eristysajan lopusta. Jos näytteitä pidettiin huoneenlämmössä alle 12 tuntia, genomisen DNA:n laadun ei pitäisi olla muuttunut ja genomisen DNA voidaan kvantifioida. Jos aika oli yli 12 tuntia, genomisen DNA:n näytteet ovat voineet pilaantua. Tässä tapauksessa eristys on toistettava.
Eluutiolveyn poistovirhe	Ajon lopussa näkyviin toi tulla virheviesti, jos eluutiolvey on poistettu tarkistamatta asianmukaista toimintoa näytöstä. Tämä voidaan korjata napsauttamalla asianmukaista ruutua.

JAK2-mutaatiotestauksen arvioinnin yleinen käsittely *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* -sarjalla

Kopioiden kokonaismäärä ei ole riittävä ja vastaava näyte on epäkelpo: monistus on liian vähäistä

- | | |
|---|---|
| a) Tarkista A_{260}/A_{280} -suhde. | Jos se on alle 1,7, tee uusi DNA:n eristys. |
| b) Tarkista DNA-pitoisuus. | <i>ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit</i> -sarja on optimoitu toimimaan työskentelypitoisuudella 10 ng/µl.
Jos DNA-pitoisuus ei ole tämä pitoisuus, laimenna tai eristä DNA uudelleen kokoverestä. |
| c) Jos molemmat parametrit täyttyvät, pipetointimäärät voivat olla virheelliset.) | Tarkista pipetit ja kalibroi ne uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista. |

Kontrollin ajo epäonnistuu QS-standardilla

Huomautuksia ja ehdotuksia

a) Pullon kääntö ylösalaisin	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
b) Kääntö ylösalaisin jakelun aikana	Säilytä sarjan sisältö $-30...-15$ °C:ssa ja suojaa reaktioosokset valolta.
c) Ristikontaminaatio	Vältä toistuvaa jäädytystä ja sulatusta.
d) Standardin osittainen pilaantuminen	
e) PCR-reagenssien osittainen pilaantuminen	
f) Epäspesifinen monistus)	
Ei signaalia tai heikko signaali yhdestä standardista	
a) Jakeluongelma	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
b) Saman reaktioosoksen käyttö WT ja MT QS:ään)	Suorita PCR-ajo uudelleen.
H₂O:n malliton kontrolli (NTC) on positiivinen	
a) Ristikontaminaatio	Vaihda kaikki kriittisen tärkeit reagenssit.
b) Reagenssin kontaminaatio	Käsittele näytteitä, sarjan osia ja tarvikkeita aina hyvien käytäntöjen mukaisesti, jotta niiden välistä kontaminaatiota ei tapahdu.
c) Liuskaputken kääntö ylösalaisin	Säilytä reaktioosokset suojattuna valolta.
d) Koettimen pilaantuminen)	Tarkista, näkykö fluoresenssikäyrässä virheellinen positiivinen tulos.
Ei signaalia edes standardikontrolleissa	
Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.
Näytteiden signaali on heikko tai poissa, mutta kontrolleissa ei ongelmia	
Riittämättömästä puhdistuksesta johtuvat näytemateriaalin inhibitoriset vaikutukset	Tarkista aina DNA:n laatu mittaamalla A_{260}/A_{280} -suhde ja pitoisuus ennen aloittamista. Toista DNA:n valmistelu.
Villityypin kontrolli (WTC) on positiivinen, mutta mutanttikontrolli (MTC) ei ole tarpeeksi positiivinen	
Kulkeutumiskontaminaatio	Vaihda kaikki kriittisen tärkeit reagenssit. Toista koe käyttämällä kaikista reagensseista uusia alikvootteja. Käsittele näytteitä, sarjan osia ja tarvikkeita aina hyvien käytäntöjen mukaisesti, jotta niiden välistä kontaminaatiota ei tapahdu. Varmista, että kärjet vaihdetaan eri reagenssien pipetoinnin välillä.
Villityypin kontrollin (WTC) tai mutanttikontrollin (MTC) signaali käyttää vastavuoroisia reaktioosoksia	
a) Ristikontaminaatio	Vaihda kaikki kriittisen tärkeit reagenssit.
b) Reagenssin kontaminaatio	Toista koe käyttämällä kaikista reagensseista uusia alikvootteja.
c) Putken kääntäminen ylösalaisin)	Käsittele näytteitä, sarjan osia ja tarvikkeita aina hyvien käytäntöjen mukaisesti, jotta niiden välistä kontaminaatiota ei tapahdu. Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Positiivisen kontrollin käänteinen havainto	
a) Ristikontaminaatio	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
b) Reaktioosokset putkissa tai esiseoksessa ovat vaihtuneet keskenään.)	
Ei signaalia näytteestä tai kontrollista, edes sisäisestä kontrollista	
a) Reaktioososta ei lisätty	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Jos sisäistä kontrollia ei ole monistettu, reaktioososta ei lisätty tai se on pilaantunut.
b) Reaktioosos on pilaantunut)	Toista qPCR-vaihe uudella reaktioosoksella.

Huomautus: jos ongelman syyksi ei voida määrittää mitään yllä mainittua syytä tai jos ongelma ei ratkea ehdotetuilla korjaavilla toimilla, kysy neuvoja QIAGENin teknisestä palvelusta.

Laadunvarmistus

Valmiin sarjan laadunvarmistus on tehty Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla. Tämä sarja on valmistettu ISO 13485:2012 -standardin mukaisesti. Analyysin sertifikaatit ovat saatavana pyydettäessä osoitteessa www.qiagen.com/support/.

Rajoitukset

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja tämän nimenomaisen tekniikan tuntevat henkilöt.

Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun, kohdassa Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen) sivulla 9 esitetyn laitteen kanssa.

Ota huomioon pakkauksen etiketissä ilmoitetut vanhenemispäivämäärät. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Kaikki *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Mikäli tätä ohjetta ei noudateta, sillä saattaa olla vaikutusta suorituskykyyn.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain epäiltyä MPN:ää sairastavien potilaiden kokoverelle, joka on antikoaguloitu kalium-EDTA:lla.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain QIASymphony DNA DSP Mini Kit -sarjan (tuotenumero 937236) tai QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan (tuotenumero 61104) kanssa käytettäväksi.

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarja on validoitu vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella (PCR) ja QIASymphony SP -laitteella (näytteen valmistelu) käytettäväksi.

Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai osien muokkaaminen mitätöi QIAGENin vastuun.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa. Vaikka henkilöillä ei ole JAK2 V617F/G1849T -mutaatiota, hänellä saattaa silti olla muita JAK2-mutaatioita.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Suorituskykyominaisuudet

LOB (Limit of Blank)

LOB-arvo määritettiin CLSI/NCCLS EP17-2A -standardin mukaisesti terveiltä luovuttajilta otetuista kokoverinäytteistä, joiden JAK2-tila oli villityyppinen (30 näytettä, 120 mittausta/reagenssiera, 3 erää).

LOB-tulosten yhteenveto: Taulukko 7.

Taulukko 7. LOB-tulosten yhteenveto

	Mitattu LOB	Tyhjän lopullinen raja
Validointierä 1	0%	
Validointierä 2	0%	0%
Validointierä 3	0%	

Havaitsemisraja

Havaitsemisraja (LOD tai analyttinen herkkyys) määritettiin Probit approach -menetelmällä, joka on kuvattu standardissa CLSI/NCCLS EP17-2A. Tässä tutkimuksessa analysoitiin kuusi heikon tason mutaatiota kolmesta erillisestä näytteestä (MPN-kokoveri-DNA lisättynä WT-kokoveri-DNA:an) kolmella erällä, 60 mittauksella per näyte ja per mutaatio. Saadut tulokset osoittivat analyttisen herkkyyden olevan 0,042 % JAK2 V617F -mutaation osalta.

LOD-tulosten yhteenveto: Taulukko 8.

Taulukko 8. LOD-tulosten yhteenveto

	Mitattu LOD	Tyhjän lopullinen raja
Validointierä 1	0,041 %	
Validointierä 2	0,029 %	0,042 %
Validointierä 3	0,042 %	

Lineaarisuus

MPN-potilaiden JAK2-mutaation kvantifioinnin lineaarisuus arvioitiin CLSI/NCCLS EP06AE -standardin mukaisesti yhdellä *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan erällä ja testaamalla 11 mutaatiotasoa viidestä eri DNA-syötteestä. JAK2-mutaatiotaakan kvantifiointi MPN-näytteistä on lineaarista; ts. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kykenee kvantifioimaan näytteet LOD-arvosta 100-prosenttiseen mutaatioon, kunhan kvantifioidun näytteen pitoisuus on lähellä 10 ng/μl (välillä 5–20 ng/μl).

Toistettavuus ja uusittavuus

Tarkkuustutkimus tehtiin standardin CLSI/NCCLS EP5-A2 mukaisesti. Testaus tehtiin 11 mutaatiotasolla, kukin taso testattiin duplikaattina 54 ajossa, jotka tehtiin 27 päivän aikana, mikä tuotti 108 mittausta mutaatiotasoa kohti. Tulosten yhteenveto: Taulukko 9.

Taulukko 9. Tarkkuustulokset

Näyte	Keskimääräinen JAK2-mutaatioprosentti	SD _{R+}	SD _{RUN++}	SD _{YHT+++}	CV _{YHT}
S1	72,67	1,99	2,99	5,45	7,50 %
S2	53,96	2,48	3,16	6,52	12,09 %
S3	23,13	1,59	1,95	4,51	19,52 %
S4	11,97	1,10	1,17	2,79	23,27 %
S5	6,01	0,71	0,63	1,57	26,17 %
S6	2,39	0,31	0,36	0,70	29,23 %
S7	1,23	0,17	0,16	0,34	27,38 %
S8	0,63	0,13	0,12	0,24	37,88 %
S9	0,13	0,05	0,03	0,07	52,31 %
S10	0,07	0,03	0,02	0,04	65,01 %
S11	0,007	0,01	0,002	0,01	146,84 %

R+: Toistettavuus.

RUN++: Ajojen toistettavuuden välillä.

YHTEENSÄ+++ : Kokonaistarkkuus (mukaan lukien laitteiden, käyttäjien ja erien välinen tarkkuus).

CV_{YHT}: Kokonaistarkkuuden vaihtelukerroin (%JAK2 MT).

Häiritsevät aineet

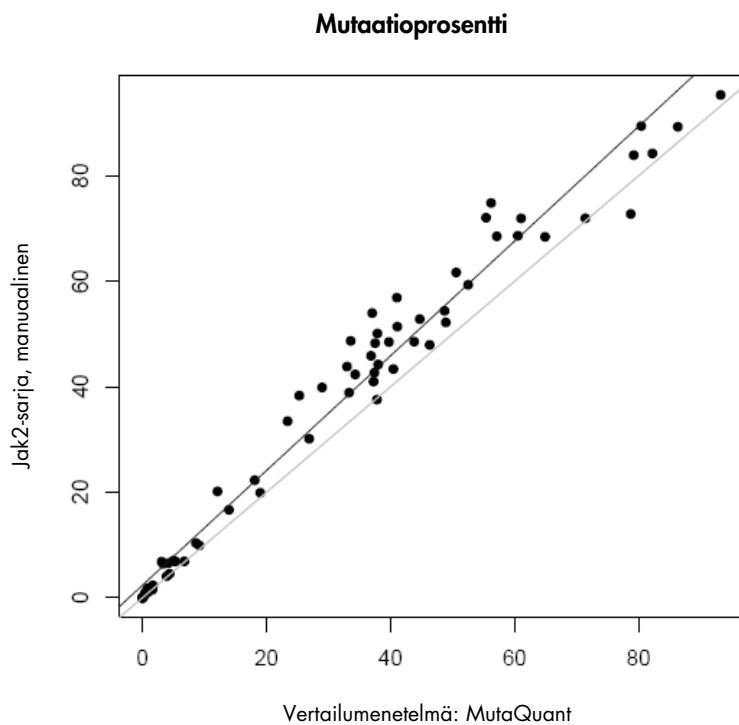
Tutkimusjärjestely perustui NCCLS-standardissa EP7-A2 kuvattuihin suosituksiin häiritsevien aineiden testaamisessa kliinisessä kemiassa. Seuraavat 17 verinäytteissä mahdollisesti olevaa ainetta valittiin niiden PCR-vaikutuksen tutkimiseksi: busulfaani, sitalopraamihydrobromidi, paroksetiinihydrokloridihemihydraatti, sertraliinihydrokloridi, fluoksetiinihydrokloridi, asetaminofeeni [parasetamoli], konjugoitumaton bilirubiini, kalium-EDTA, hemoglobiini [ihmisen], triglyseridit, lisinopriilidehydraatti, hydroksiurea, asetyylisalisyylihappo, salisyylihappo, tiotepa, anagrelidi, alfa-2b-interferoni. Saaduissa tuloksissa ei näkynyt häiritsevää vaikutusta näistä aineista.

Kliininen validointi ja menetelmän vertailu

Tutkimus, johon sisältyi 65 kliinistä MPN-verinäytettä, tehtiin kahdessa ranskalaisessa kliinisessä keskuksessa tarkoituksena verrata *QIAGENin ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* -sarjaa *ipsogen JAK2 MutaQuant® Kit* -sarjaan, jota käytettiin vertailumenetelmänä.

Yhteensä 65 MPN-verinäytettä pakastettiin, sulatettiin ja niistä eristettiin genominen DNA. Kaikki näytteet läpäisivät DNA-laadunvarmistuksen kummankin genomisen DNA:n eristysmenetelmän osalta.

Demingin regressiolla verrattiin kummallakin menetelmällä mitattuja JAK2-mutaatioiden prosenttiosuuksia. Vertailumenetelmän ja *ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit* -sarjan välillä oli voimakas korrelaatio sellaisten näytteiden osalta, joissa oli JAK2-mutaatiotaso 0–95 % ($R^2 = 0,969$), kuten kuvassa Kuva 4.



Kuva 4. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla ja vertailumenetelmällä samoista näytteistä saadut JAK2 V617F -mutaatioprosentit.













ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit -sarjalla saadut JAK2-mutaatioprosentit olivat yleisesti ottaen korkeammat kuin vertailumenetelmällä saadut prosentit, mikä korosti uuden sarjan parempaa herkkyyttä (~ 1 log) (9).

Lähdeviitteet

1. James C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. 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.
3. Kralovics R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Tefferi A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
6. Prchal J.F. and Axelrad A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
7. 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.
8. Lippert E. et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. **99**, e98.
9. Jovanovic J., et al (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2V617F associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* **27**, 2032.

Merkinnät

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

 Σ	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
 <N>	Viimeinen käyttöpäivämäärä
 IVD	Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte
 REF	Luettelonumero
 LOT	Eränumero
 MAT	Materiaalinumero
 GTIN	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Suojaa auringonvalolta
	Katso käyttöohjeet
	Varoitus

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroomme 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Tilautustiedot

Tuote	Sisältö	Luettelonumero
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (24)	24 reaktiota varten: Wild-type JAK2 Gene Control, JAK2 V617F Control Gene, JAK2 WT Quant Standards, JAK2 MT Quant Standards, JAK2 WT Reaction Mix, JAK2 MT Reaction Mix, Taq DNA -polymeraasi, TE-puskuri laimennukseen, vettä NTC:hen	673623
Rotor-Gene Q MDx – IVD-validoituun reaaliaikaiseen PCR-analysiin kliinisessä käytössä		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sis. asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Ohjelmisto rutiinitestaukseen yhdessä Rotor-Gene Q -laitteen kanssa	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Yksi ohjelmistolisenssi asennettavaksi yhdelle tietokoneelle	9025620
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 x 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 preparaattia varten: QIAamp Mini Spin Columns -putket, puskurit, reagenssit, putket, VacConnector-liittimet	61104
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit	192 preparaattia, kukin 200 µl: Sisältää 2 reagenssikasettia ja entsyymitelinettä tarvikkeineen.	937236
QIAsymphony SP ja lisävarusteet		
QIAsymphony SP System	QIAsymphony-näytteenpreparointimoduuli: sisältää asennuksen ja koulutuksen sekä 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalle	9001751
QIAsymphony SP	QIAsymphony-näytteenvalmistelumuoduli: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-kuoppaiset näytteenpreparointikasetit QIAsymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997002
8-Rod Covers (144)	8-sauvaiset kannet QIAsymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 x 128). Käytettäväksi QIAcube®- ja QIAsymphony SP/AS -instrumenttien kanssa	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 x 128). Käytettäväksi QIAsymphony SP-/AS -laitteiden kanssa	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Ei-steriilit polypropyleeniputket (enimmäiskapasiteetti 0,85 ml, säilytyskapasiteetti vähemmän kuin 0,7 ml, eluutiokapasiteetti 0,4 ml); 2 304 kpl 96 kpl:een telineissä; sisältää korkkiliuskat	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 yksikköä/ml, liuos)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml Tissue Lysis Buffer -puskuria 1000 preparaattiin	19076

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä tuote on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. *ipsogen*-tuotteiden jälleenyntiä, muokkaus jälleenyntiä varten tai käyttö kaupallisten tuotteiden valmistukseen on kielletty ilman QIAGENin kirjallista lupaa. Tässä asiakirjassa olevia tietoja saatetaan muuttaa ilman erillistä ilmoitusta. QIAGEN ei ole vastuussa mistään tässä asiakirjassa mahdollisesti olevista virheistä. Tämän asiakirjan uskotaan olevan julkaisuhetkenään kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, moninkertaisista tai seurannaisvahingoista, jotka liittyvät tämän asiakirjan käyttöön tai ovat seurausta sen käytöstä. *ipsogen*-tuotteille on myönnetty takuu siitä, että ne ovat ilmoitettujen ominaisuuksiensa mukaisia. QIAGENin ainoa velvollisuus ja asiakkaan saama ainoa korvaus rajoittuvat tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuussa kerrattulla tavalla. JAK2 V617F -mutaatio ja sen käyttö on suojattu patenttioikeuksilla, mukaan lukien eurooppalainen patentti EP1692281, yhdysvaltalaiset patentit 7,429,456 ja 7,781,199, yhdysvaltalaiset patenttihakemukset US20090162849 ja US20120066776 ja niiden ulkomaiset vastineet. Tämän tuotteen ostaminen ei anna oikeutta sen käyttöön JAK2V617F-mutaatiota varten tarkoitettujen lääkkeiden kliinisissä lääketutkimuksissa. QIAGEN kehittää nimenomaisia lisenssiohjelmia tällaisia tarkoituksia varten. Lakiosastomme palvelee osoitteessa jak2licenses@qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, HotStarTaq®, *ipsogen*®, MutaQuan®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co).

Rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjaa voidaan käyttää ainoastaan *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan käsikirjan ohjeiden mukaisesti ja ainoastaan yhdessä sarjan sisältämien komponenttien kanssa. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia osia saa käyttää tai liittää muihin osiin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit -sarjan käsikirjassa ja lisäprotokollissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com.
2. QIAGEN ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi käännyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyötyksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

HB-1829-005 1107956 157038730 © 2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com