

Auguste 2016

Manuel du kit *ipsogen*[®] JAK2 *MutaQuant*[®]

 12 (référence 673522)

 24 (référence 673523)

Version 1

IVD

Diagnostics *in vitro* quantitatifs

À utiliser sur des appareils Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®]
7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System
et LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMAGNE

R3

MAT

1072501FR



Sample & Assay Technologies

QIAGEN : Sample and Assay Technologies

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyse d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche de microARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter **www.qiagen.com**.

Contenu

Utilisation prévue	4
Résumé et explication	4
Principe de la procédure	7
Matériel fourni	11
Contenu du kit	11
Matériel nécessaire mais non fourni	12
Avertissements et précautions	13
Précautions générales	14
Conservation et manipulation des réactifs	14
Procédure	16
Préparation des échantillons d'ADN	16
Protocoles	
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM avec rotor de 72 tubes	17
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou LightCycler 480	22
■ Réalisation d'une qPCR sur un LightCycler 1.2	28
Interprétation des résultats	33
Guide de résolution des problèmes	37
Contrôle qualité	41
Limites	41
Caractéristiques de performance	42
Études non cliniques	42
Études cliniques	43
Bibliographie	45
Symboles	46
Coordonnées	46
Pour commander	47

Utilisation prévue

Le kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* est un test quantitatif *in vitro* qui permet la détection et la quantification de l'allèle JAK2 V617F/G1849T à partir d'ADN génomique extrait d'échantillons de sang périphérique de patients chez lesquels un néoplasme myéloprolifératif (NMP) est suspecté.

L'absence de la mutation JAK2 V617F/G1849T n'exclut pas la présence d'autres mutations JAK2. Ce test peut générer des résultats faux négatifs en cas de mutations supplémentaires localisées sur les nucléotides 88504 à 88622 (1).

Remarque : Le kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, avec des réactifs et des appareils validés. Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit, et/ou modification quelconque de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

Résumé et explication

En 2005 (2-5) l'identification de V617F, une mutation somatique récurrente touchant le gène Janus tyrosine kinase 2 (JAK2), a constitué une avancée majeure dans la compréhension, la classification et le diagnostic des néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). JAK2 est une molécule de signalisation intracellulaire essentielle pour de nombreuses cytokines, y compris l'érythropoïétine.

La mutation JAK2 V617F est détectée chez plus de 95 % des patients atteints de maladie de Vaquez (ou polyglobulie de Vaquez - PV), 50 à 60 % de ceux qui présentent une thrombocythémie essentielle (TE), et 50 % de ceux atteints de myélofibrose primitive (MFP). JAK2 V617F a également été observée dans quelques rares cas de leucémie myélomonocytaire chronique, de syndrome myélodysplasique, de mastocytose systémique et de leucémie neutrophile chronique, mais jamais dans le contexte d'une LMC (6).

Cette mutation correspond au changement d'un seul nucléotide en position 1849 de la séquence JAK2, situé dans l'exon 14, entraînant la substitution d'une valine (V) par une phénylalanine (F) en position 617 de la protéine (domaine JH2). Ceci entraîne l'activation constitutive de JAK2, une transformation hématopoïétique *in vitro*, et la pousse spontanée de colonies érythroïdes sans adjonction d'EPO (EEC) chez tous les patients qui présentent une PV et une grande partie de ceux atteints de TE et de MFP (7). La mutation JAK2 V617F constitue un facteur clé de la transformation des cellules hématopoïétiques dans les NMP, mais les mécanismes pathologiques exacts capables d'induire, à partir d'une même mutation unique, des entités cliniques et biologiques si différentes ne sont pas encore totalement élucidés.

Le diagnostic des NMP est généralement basé sur des critères cliniques, cytogénétiques et histologiques de la moelle osseuse. La découverte d'un

marqueur moléculaire, spécifique à une maladie, a permis de simplifier le processus de diagnostic ainsi que d'améliorer sa précision. La détection de la mutation JAK2 V617F fait désormais partie des critères de référence de l'OMS 2008 pour le diagnostic des NMP BCR-ABL négatifs (tableau 1) et sa présence constitue un critère majeur pour la confirmation du diagnostic.

Tableau 1. Critères de l'OMS pour le diagnostic des NMP (adaptés d'après la référence 8)

Critères diagnostiques de la polyglobulie de Vaquez (PV)	
Majeur	<p>1. Hémoglobine (Hgb) > 18,5 g/dl⁻¹ (hommes) ou > 16,5 g/dl⁻¹ (femmes), ou Hgb ou hématocrite (Hct) > 99^e centile de la plage de référence associée à l'âge, au sexe ou à l'altitude de résidence, ou Hgb > 17 g/dl⁻¹ (hommes) ou > 15 g/dl⁻¹ (femmes) si associée à une augmentation importante ≥ 2 g/dl⁻¹ par rapport aux valeurs de référence ne pouvant être attribuée à la correction d'une carence en fer, ou Masse érythrocytaire élevée > 25 % supérieure à la valeur théorique normale moyenne.</p> <p>2. Présence de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ou similaire.</p>
Mineur	<p>1. Myéloprolifération impliquant les 3 lignées hématopoïétiques sur la biopsie ostéoméduillaire.</p> <p>2. Taux d'érythropoïétine sérique au-dessous des valeurs normales de référence.</p> <p>3. Pousse de colonies érythroïdes endogènes (EEC).</p>
Critères diagnostiques de la thrombocytémie essentielle (TE)	
Majeur	<p>1. Numération des plaquettes ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹.</p> <p>2. Prolifération de mégacaryocytes ayant une grande taille et une morphologie mature. Prolifération érythroïde ou granulocytaire discrète ou absente.</p> <p>3. Non réponse aux critères de l'OMS pour le diagnostic d'une leucémie myéloïde chronique (LMC), d'une PV, d'une myélofibrose primitive (MFP), d'un syndrome myélodysplasique (SMD) ou de tout autre néoplasme myéloïde.</p> <p>4. Présence de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ou de tout autre marqueur de clonalité, ou Absence de signes de thrombocytose réactionnelle.</p>
Mineur	-
Critères diagnostiques de la myélofibrose primitive (MFP)	
Majeur	<p>1. Prolifération de mégacaryocytes avec atypies et fibrose réticulinique et/ou collagénique, ou En l'absence de fibrose réticulinique, les modifications des mégacaryocytes doivent être accompagnées d'une augmentation de la cellularité, d'une hyperplasie granuleuse et souvent d'une diminution de l'érythropoïèse (c'est-à-dire MFP préfibrotique).</p> <p>2. Non réponse aux critères de l'OMS pour une LMC, une PV, un SMD ou tout autre néoplasme myéloïde.</p> <p>3. Présence de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ou de tout autre marqueur de clonalité, ou</p>

Aucun signe de fibrose médullaire réactionnelle.

- Mineur
1. Leuco-érythroblastose.
 2. Élévation du taux lactate déshydrogénase sérique (LDH).
 3. Anémie.
 4. Splénomégalie palpable.

Des experts internationaux ont récemment proposé des critères pour la conduite d'essais thérapeutiques dans le domaine de la PV et de la TE. Reposant sur des données relatives aux allogreffes, à l'interféron alpha ou à l'hydroxyurée, la quantification de JAK2 V617F a été intégrée en tant qu'outil potentiellement utile dans le suivi de la réponse thérapeutique (9). Une diminution de la quantité de JAK2 V617F a été observée en réponse à certains nouveaux médicaments anti-JAK2 en cours de développement clinique (10).

Principe de la procédure

Différentes techniques ont été proposées pour calculer la proportion de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) dans des échantillons d'ADN. Parmi ces méthodes, celles qui reposent sur l'amplification en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (qPCR) sont privilégiées car leur sensibilité accrue permet de surveiller la quantité d'allèles de façon longitudinale. Nombre de ces techniques présentent une sensibilité modérée de 1 à 10 %, par exemple, la discrimination allélique TaqMan[®], le Pyrosequencing[®], l'analyse de la courbe de fusion et le séquençage direct. Certaines d'entre elles, comme la courbe de fusion et le séquençage ne sont que semi-quantitatives, tandis que d'autres, comme le Pyrosequencing, nécessitent un traitement post-PCR, requièrent des instruments difficilement disponibles ou bien impliquent des coûts d'installation prohibitifs pour des tests de routine en laboratoire. Une approche très sensible (sensibilité < 0,1 %) suppose l'utilisation d'une amorce SNP spécifique, permettant une amplification sélective de l'allèle muté ou sauvage, facilement détectable sur un instrument de PCR en temps réel. Le principe du kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* s'appuie sur cette technique.

La qPCR est une technique qui permet une quantification précise des produits de PCR lors de la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR. Les données de qPCR peuvent être rapidement obtenues sans procédure post-PCR par détection en temps réel de signaux fluorescents durant et/ou immédiatement après le cycle de PCR, ce qui réduit considérablement le risque de contamination des produits de PCR. Il existe actuellement 3 principales techniques de qPCR : l'analyse qPCR qui utilise le marqueur SYBR Green I[®], celle qui utilise l'hydrolyse des sondes, et celle qui utilise l'hybridation des sondes.

Ce test exploite le principe de la qPCR par hydrolyse des oligonucléotides doublement marqués. Au cours de la PCR, les amorces sens et anti-sens sont hybridées à une séquence spécifique. Ce mélange contient également un oligonucléotide doublement marqué. Cette sonde, composée d'un oligonucléotide marqué avec un marqueur de fluorescence (reporter) 5' et un chélateur de fluorescence (quencher) 3' en aval, s'hybride à une séquence cible au sein du produit de PCR. L'analyse qPCR au moyen des sondes hydrolysées exploite l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase *Thermus aquaticus* (Taq). Quand la sonde est intacte, la proximité du reporter et du quencher entraîne la suppression de la fluorescence du reporter, essentiellement en raison d'un transfert d'énergie de type Förster.

Durant la PCR, si la cible d'intérêt est présente, la sonde se fixe spécifiquement entre les sites où sont hybridées les amorces sens et anti-sens. L'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase clive la sonde entre le reporter et le quencher si celle-ci est hybridée à la cible. Les fragments de sonde sont alors déplacés de la cible et la polymérisation du brin se poursuit. L'extrémité 3' de la sonde est bloquée pour empêcher l'extension de cette dernière au cours de la PCR (figure 1). Ce processus intervient à chaque cycle et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit.

L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire de la sonde et donc amplifiée durant la PCR. Du fait de ces exigences, l'amplification non spécifique n'est pas détectée. Ainsi, l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible durant la PCR.

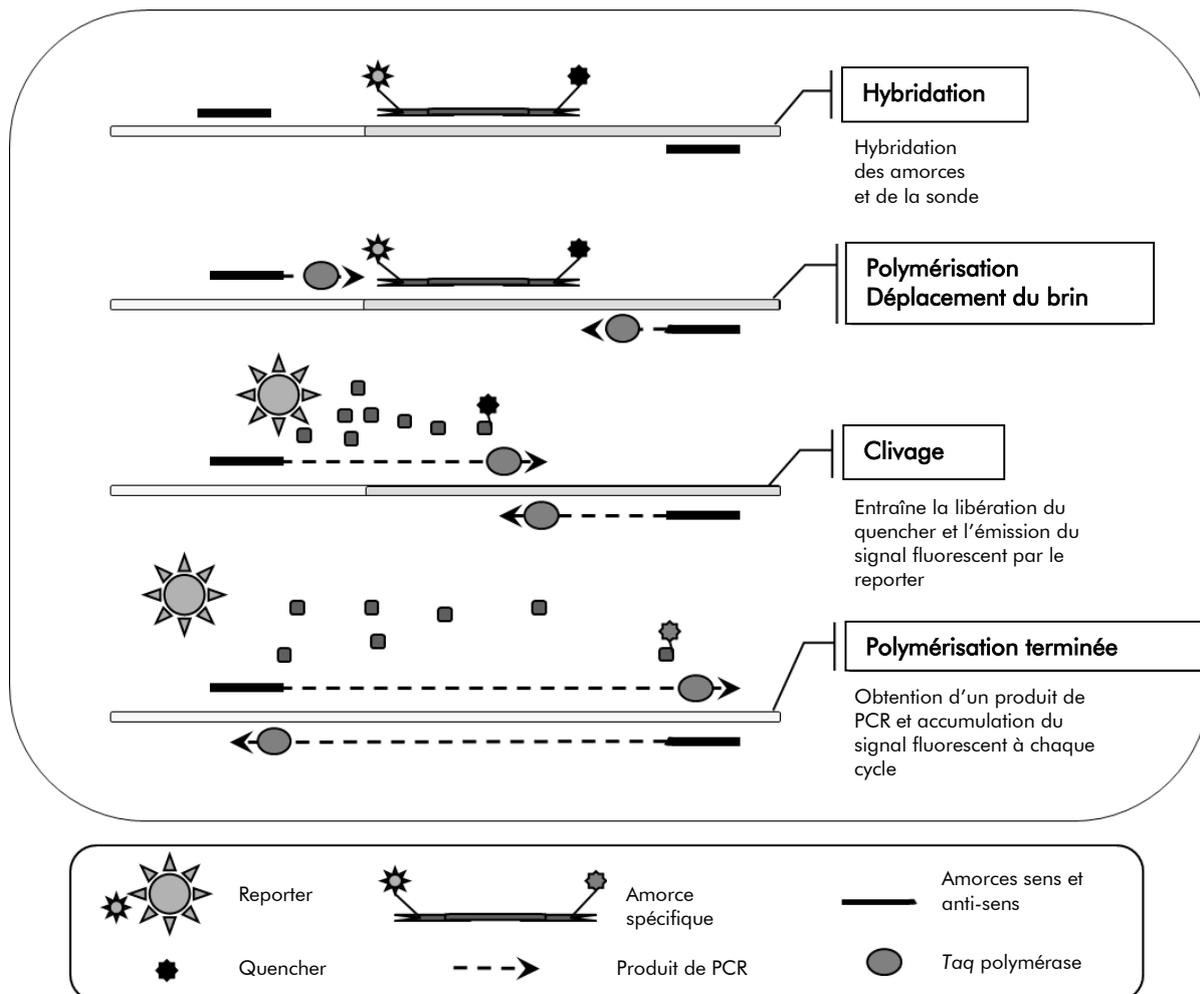


Figure 1. Principe de la réaction.

La technologie de PCR quantitative spécifique d'un allèle, utilisée dans ce kit d'analyse, permet la détection sensible, précise et hautement reproductible des SNP. Cette technique repose sur l'utilisation d'amorces sens spécifiques de l'allèle sauvage et de l'allèle V617F (11). Seul l'appariement exact entre l'amorce et l'ADN cible permet une extension et une amplification durant la PCR (figure 2).

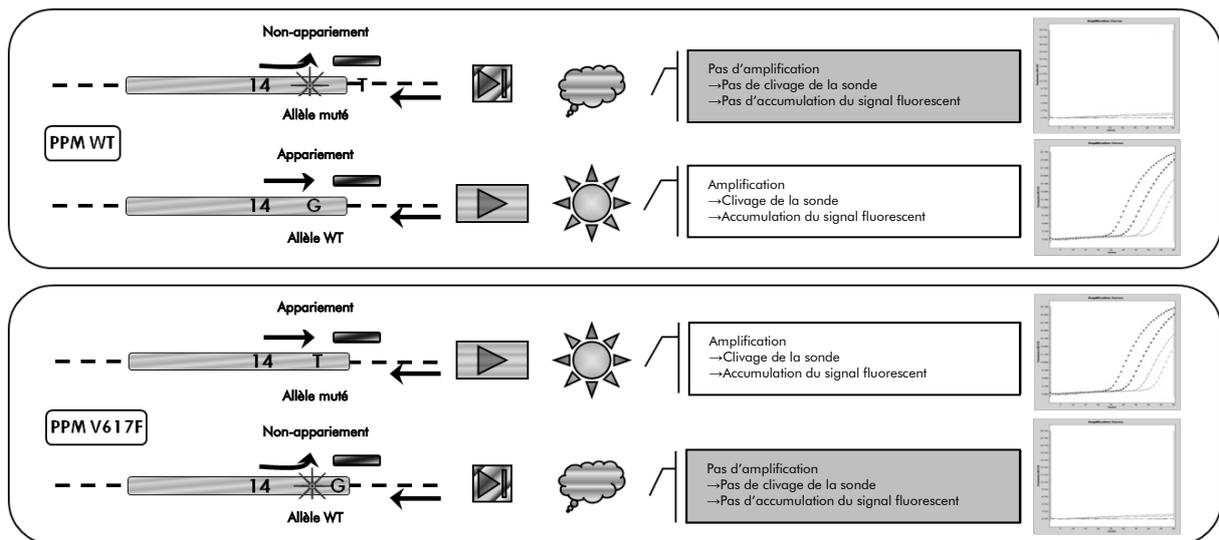


Figure 2. PCR spécifique d'un allèle. L'utilisation d'un mélange sonde et amorces sauvage ou V617F permet la détection spécifique de l'allèle sauvage ou de l'allèle muté en deux réactions distinctes pour le même échantillon. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de copies VF par rapport à l'ensemble des copies JAK2.

Matériel fourni

Contenu du kit

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Référence		673522	673523
Nombre de réactions		12	24
V617F positive control (100% V617F allele) (Témoin positif V617F [100 % allèle V617F])	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (100% wild-type allele) (Témoin négatif V617F [100 % allèle sauvage])	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution, 50 copies (Dilution standard M1-VF, 50 copies) (5 x 10 ¹ copies de V617F/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution, 500 copies (Dilution standard M2- VF, 500 copies) (5 x 10 ² copies de V617F/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution, 5 000 copies (Dilution standard M3- VF, 5 000 copies) (5 x 10 ³ copies de V617F/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution, 50 000 copies (Dilution standard M4-VF, 50 000 copies) (5 x 10 ⁴ copies de V617F/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution, 50 copies (Dilution standard WT-1, 50 copies) (5 x 10 ¹ copies sauvages/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution, 500 copies (Dilution standard WT-2, 500 copies) (5 x 10 ² copies sauvages/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution, 5 000 copies (Dilution standard WT- 3, 5 000 copies) (5 x 10 ³ copies sauvages/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl

ipsogen JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Référence		673522	673523
Nombre de réactions		12	24
WT-4 Standard Dilution, 50 000 copies (Dilution standard WT-4, 50 000 copies) (5 x 10 ⁴ copies sauvages/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT (Mélange sonde et amorces JAK2 sauvage)*	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F (Mélange sonde et amorces JAK2 V617F) [†]	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
ipsogen JAK2 MutaQuant Kit Handbook (anglais)		1	1

* Mélange d'amorces sens et anti-sens pour le gène contrôle JAK2 sauvage associé à une sonde FAM™–TAMRA™ spécifique.

[†] Mélange d'amorces sens et anti-sens pour la mutation JAK2 V617F associé à une sonde FAM–TAMRA spécifique.

Remarque : passer au vortex et centrifuger brièvement les dilutions standard et les mélanges sonde et amorce avant utilisation.

Matériel nécessaire mais non fourni

En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées disponibles auprès du fournisseur du produit.

Réactifs

- Eau exempte de nucléase pour PCR
- Tampon et ADN polymérase *Taq* : les réactifs validés sont TaqMan Universal PCR Master Mix (mélange maître PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, réf. 4304437) et LightCycler TaqMan Master (mélange maître PCR 5x) (Roche, réf. 04535286001) ou LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe® (mélange maître 5x) (Roche, réf. 03515567001).

Consommables

- Cônes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants
- Tubes pour PCR exempts de nucléase de 0,5 ml ou 1,5 ml
- Glace

Équipement

- Pipette microlitre* spéciale PCR (1–10 μ l ; 10–100 μ l ; 100–1 000 μ l)
- Micro-centrifugeuse* avec rotor pour tubes de réaction et microplaques de 0,5 ml/1,5 ml (capable d'atteindre les 13 000 à 14 000 tpm)
- Système de PCR en temps réel :* Rotor-Gene Q 5plex HRM® ou autre séquenceur Rotor-Gene ; LightCycler 1.2 ou 480 ; ABI PRISM 7900HT SDS ; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ; et matériel spécifique associé
- Biophotomètre

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF (pratique et compact) à l'adresse www.qiagen.com/safety où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les SDS pour chaque kit et élément de kit QIAGEN.

Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de tests conformément aux règles de sécurité locales.

* S'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

Précautions générales

Les tests de qPCR nécessitent la mise en place de bonnes pratiques de laboratoire, et notamment la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et conformes aux réglementations et aux normes en vigueur.

Ce kit est destiné au diagnostic *in vitro*. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales. Des dilutions supplémentaires des réactifs ou une modification des temps d'incubation et des températures peuvent engendrer des données aberrantes ou erronées. Les réactifs PPM-WT et PPM-VF peuvent être altérés s'ils sont exposés à la lumière. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés dans le cadre de ce test. Pour garantir les performances optimales du test, aucune substitution ne doit être faite.

Prendre des précautions afin de prévenir :

- les contaminations par les DNases, qui peuvent causer la dégradation de la matrice d'ADN.
- toute contamination croisée par l'ADN ou les produits de PCR susceptible de générer des signaux faux positifs.

Nous recommandons par conséquent :

- d'utiliser des consommables exempts de nucléase (par ex. pipettes, cônes, tubes) et de porter des gants lors de l'expérience.
- d'utiliser de nouveaux cônes aérosol-résistants à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
- de préparer le pré-mélange pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, cônes, etc.) dans une zone où aucune matrice d'ADN (ADN, plasmides ou produits PCR) n'est introduite. Ajouter les échantillons dans une zone séparée (de préférence dans une autre pièce) avec du matériel dédié (pipettes, cônes, etc.).

Conservation et manipulation des réactifs

Les kits sont expédiés en carboglace et doivent être stockés entre -15 °C et -30 °C à réception.

- Limiter l'exposition des mélanges sonde et amorces à la lumière (tubes PPM-WT et PPM-VF).
- Mélanger et centrifuger doucement les tubes avant leur ouverture.
- Stocker tous les composants du kit dans leur contenant d'origine.

Ces conditions de stockage s'appliquent aux composants ouverts ou non. Tous les composants stockés dans des conditions autres que celles mentionnées sur l'étiquetage peuvent ne pas fonctionner correctement et affecter les résultats des tests.

Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions de stockage adéquates, le produit conservera ses performances jusqu'à la date imprimée sur l'étiquetage.

Il n'y a pas de signe visible indiquant une chute de stabilité du produit. Cependant les témoins positifs et négatifs doivent être analysés systématiquement en parallèle de l'échantillon à quantifier.

Procédure

Préparation des échantillons d'ADN

L'ADN génomique doit être obtenu à partir de sang total, de lymphocytes purifiés du sang périphérique extraits du sang total, de cellules polynucléaires ou de granulocytes. Pour obtenir des résultats qui puissent être comparés, il est recommandé d'utiliser la même fraction cellulaire et la même méthode d'extraction de l'ADN. L'ADN peut être extrait par le biais d'une méthode interne ou d'un kit disponible dans le commerce.

La quantité d'ADN doit être déterminée en mesurant la densité optique (DO) de l'échantillon à 260 nm et sa qualité par spectrophotométrie ou électrophorèse sur gel*.

- Le ratio DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,7 et 1,9 ; une valeur inférieure à cette fourchette indique une contamination par une protéine ou la présence de produits chimiques organiques.
- L'analyse électrophorétique sur gel contenant 0,8 à 1 % d'agarose* doit permettre d'identifier l'ADN isolé sous la forme d'une bande distincte d'environ 20 kb (un léger frottis donnera des résultats acceptables).

L'ADN produit doit être dilué à 5 ng/ μ l dans un tampon TE 1x de pH 8, et stocké entre +4 °C et +8 °C pendant 1 semaine ou à -20 °C si une durée de stockage plus longue est nécessaire.

Les échantillons de l'ADN contenant 25 ng d'ADN génomique purifié offrent une réaction de qPCR optimale.

* En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées disponibles auprès du fournisseur du produit.

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM avec rotor de 72 tubes

Avec ces appareils, il est recommandé de dupliquer toutes les mesures, comme indiqué dans le tableau 2.

Tableau 2. Nombre de réactions sur un appareil Rotor-Gene Q avec rotor de 72 tubes

Échantillons	Réactions
Avec le mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 standards M-VF	8 réactions, chacun testé en double
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
2 ADN témoins	4 réactions : témoin positif (PC-VF) et témoin négatif (NC-VF), chacun testé en double
Contrôle H ₂ O	2 réactions
Avec le mélange sonde et amorces JAK2 sauvage (PPM-WT)	
4 standards sauvages	8 réactions, chacun testé en double
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
2 ADN témoins	4 réactions : PC-VF et NC-VF, chacun testé en double
Contrôle H ₂ O	2 réactions

Analyse des échantillons sur un appareil Rotor-Gene® Q avec rotor de 72 tubes

Il est recommandé d'analyser au moins 8 échantillons d'ADN à l'aide du kit pour 24 réactions (réf. 673523) et au moins 6 échantillons d'ADN à l'aide du kit pour 12 réactions (réf. 673522) au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces.

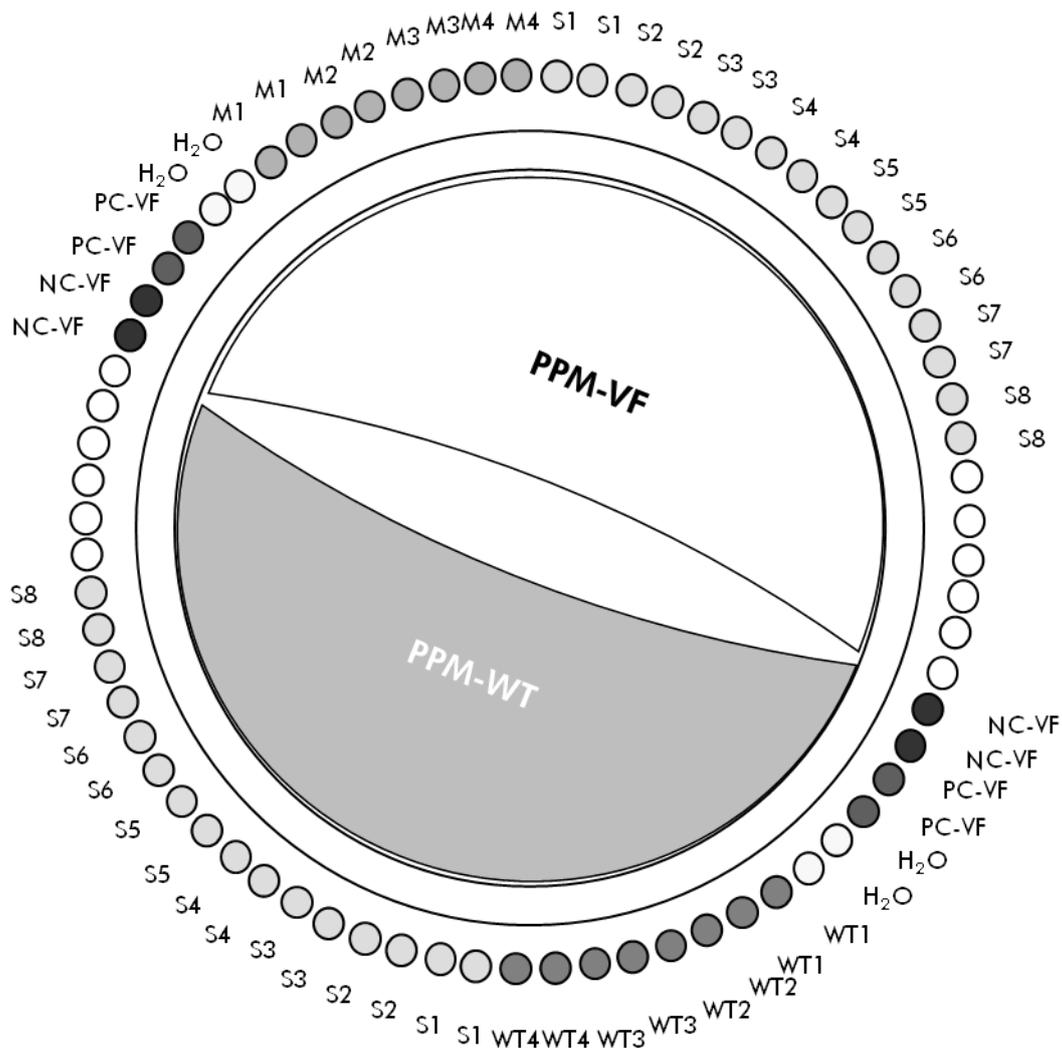


Figure 3. Suggestion de configuration du rotor pour chaque expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant pour 24 échantillons. PC-VF : témoin positif V617F ; NC-VF : témoin négatif V617F ; M-VF : standards V617F ; M-WT : standards sauvages ; S : échantillon d'ADN ; H₂O : contrôle H₂O.

Remarque : veiller à toujours positionner un échantillon à tester en position 1 du rotor. Dans le cas contraire, durant la phase de calibration, l'instrument n'effectuera pas de calibration et des données de fluorescence erronées seront acquises.

Compléter toutes les autres positions avec des tubes vides.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene® Q avec rotor de 72 tubes

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

- 1. Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**

2. Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Les tableaux 3 et 4 décrivent le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 μ l. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPM-VF, soit PPM-WT). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 3. Préparation du mélange de qPCR

Composant	Pré-mélange V617F		Concentration finale
	1 réaction (μ l)	30 + 1 réactions (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Mélange sonde et amorces, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	201,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	–
Volume total	25,0	25 chacun	–

Tableau 4. Préparation du mélange de qPCR

Composant	Pré-mélange WT		Concentration finale
	1 réaction (µl)	30 + 1 réactions (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Mélange sonde et amorces, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	201,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	–
Volume total	25,0	25 chacun	–

- 3. Déposer 20 µl de pré-mélange qPCR (VF ou WT) par tube.**
- 4. Ajouter 5 µl du matériel à quantifier (25 ng d'échantillon d'ADN génomique ou de témoin) dans le tube correspondant (volume total 25 µl).**
- 5. Mélanger doucement en pipetant.**
- 6. Placer les tubes dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.**
- 7. Paramétrer le programme de thermocyclage du Rotor-Gene Q comme indiqué dans le tableau 5.**

Tableau 5. Profil de température

Mode d'analyse :	Quantitation
Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 min
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 min
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes 62 °C pendant 1 min pour l'acquisition de la fluorescence FAM dans le canal Green : Single

- 8. Sur un appareil Rotor-Gene Q, sélectionner le paramètre d'analyse « Slope Correct » (Correction de la pente). Il est recommandé de définir la valeur de seuil à 0,03. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 5.**

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou LightCycler 480

En cas d'utilisation d'un appareil de qPCR à plaque de 96 puits, il est recommandé de dupliquer toutes les mesures, comme indiqué dans le tableau 6.

Tableau 6. Nombre de réactions en cas d'utilisation d'un appareil de qPCR à plaque de 96 puits

Échantillons	Réactions
Avec le mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 standards M-VF	8 réactions, chacun testé en double
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
2 ADN témoins	4 réactions : PC-VF et NC-VF, chacun testé en double
Contrôle H ₂ O	2 réactions
Avec le mélange sonde et amorces JAK2 sauvage (PPM-WT)	
4 standards sauvages	8 réactions, chacun testé en double
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
2 ADN témoins	4 réactions : PC-VF et NC-VF, chacun testé en double
Contrôle H ₂ O	2 réactions

Analyse des échantillons sur un appareil ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou LightCycler 480

Il est recommandé d'analyser 8 échantillons d'ADN à l'aide du kit pour 24 réactions (réf. 673523) et au moins 6 échantillons d'ADN à l'aide du kit pour 12 réactions (réf. 673522) au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces.

Le schéma de plaque représenté par la figure 4 montre un exemple d'une telle expérience réalisée au moyen du kit pour 24 réactions (réf. 673523), et celui de la figure 5 illustre la même expérience conduite avec le kit pour 12 réactions (réf. 673522).

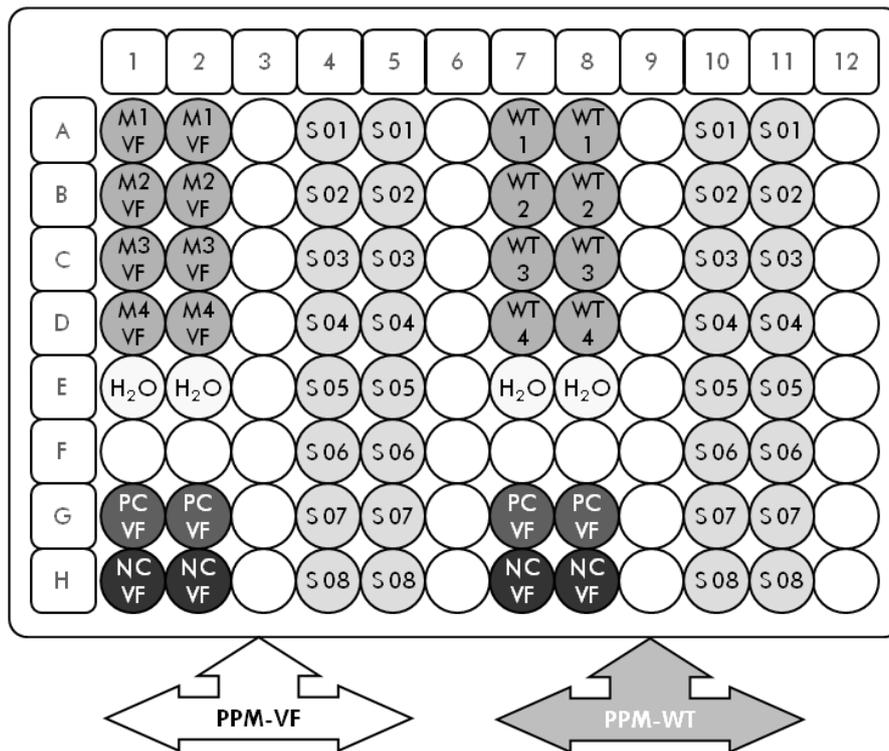


Figure 4. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience réalisée à l'aide du kit pour 24 réactions (réf. 673523). PC-VF : témoin positif V617F ; NC-VF : témoin négatif V617F ; M-VF : standards V617F ; M-WT : standards sauvages ; S : échantillon d'ADN ; H₂O : contrôle H₂O.

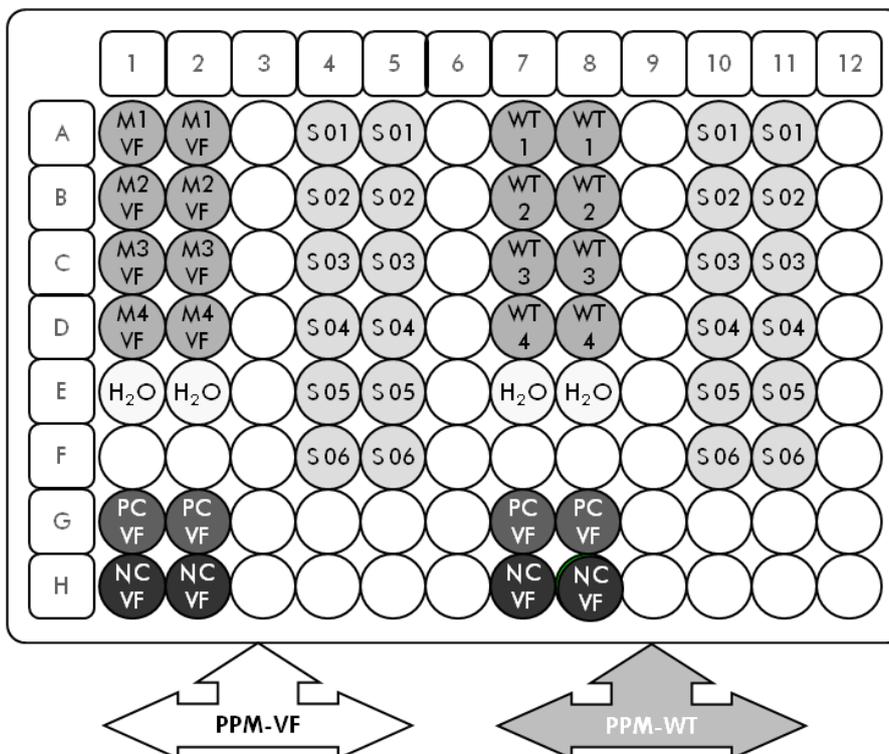


Figure 5. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience réalisée à l'aide du kit pour 12 réactions (réf. 673522). PC-VF : témoin positif V617F ; NC-VF : témoin négatif V617F ; M-VF : standards V617F ; M-WT : standards sauvages ; S : échantillon d'ADN ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou LightCycler 480

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

1. **Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**
2. **Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Les tableaux 7 et 8 décrivent le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 μ l. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPM-VF, soit PPM-WT). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 7. Préparation du mélange de qPCR

Composant	Pré-mélange V617F			Concentration finale
	1 réaction (μ l)	26 + 1 réactions (μ l)	30 + 1 réactions (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mélange sonde et amorces, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	175,5	201,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25,0	25 chacun	25 chacun	–

Tableau 8. Préparation du mélange de qPCR

Composant	Pré-mélange WT			Concentration finale
	1 réaction (µl)	26 + 1 réactions (µl)	30 + 1 réactions (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Mélange sonde et amorces, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	175,5	201,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25,0	25 chacun	25 chacun	–

3. Déposer 20 µl de pré-mélange qPCR (VF ou WT) par puits.
4. Ajouter 5 µl du matériel à quantifier (25 ng d'échantillon d'ADN génomique ou de témoin) dans le puits correspondant (volume total 25 µl).
5. Mélanger doucement en pipetant.
6. Fermer la plaque et centrifuger brièvement (300 x g, pendant environ 10 secondes)
7. Placer la plaque dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.
8. Paramétrer le programme de thermocyclage et régler l'instrument pour l'acquisition de la fluorescence FAM de la sonde doublement marquée tel qu'indiqué dans le tableau 9 pour les appareils ABI PRISM 7900HT SDS ou Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ou dans le tableau 10 pour le LightCycler 480.

Tableau 9. Profil de température pour les appareils ABI PRISM 7900HT SDS et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Mode d'analyse :	Courbe standard - Quantification absolue
Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes 63 °C pendant 1 minute et 30 secondes avec acquisition de la fluorescence FAM ; quencher : TAMRA

Tableau 10. Profil de température pour le LightCycler 480

Mode d'analyse :	Quantification absolue (« Abs Quant »)
Formats de détection	Sélectionner « Simple Probe » (Sonde simple) dans la fenêtre « Detection formats ».
Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes 63 °C pendant 1 minute et 30 secondes avec acquisition de la fluorescence FAM correspondant à (483 nm – 533 nm) pour le LC version 01 et (465 nm - 510 nm) pour le LC version 02.

- 9. Pour les appareils ABI PRISM 7900HT et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, suivre l'étape 8a. Pour le LightCycler 480, se référer à l'étape 8b.**

- 9a. ABI PRISM 7900HT, et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System :** Il est recommandé de définir un seuil de 0,1 Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 9.
- 9b. LightCycler 480 :** il est recommandé de recourir au mode d'analyse « Fit point » avec bruit de fond à 2,0 et seuil à 2,0. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 10.

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un LightCycler 1.2

En cas d'utilisation de séquenceurs capillaires, il est recommandé de mesurer les échantillons en double, et les témoins en simple exemplaire, tel qu'indiqué dans le tableau 11.

Tableau 11. Nombre de réactions pour le LightCycler 1.2

Échantillons	Réactions
Avec le mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 standards M-VF	4 réactions, chacun testé une seule fois
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
2 ADN témoins	2 réactions : PC-VF et NC-VF, chacun testé une fois
Contrôle H ₂ O	1 réaction
Avec le mélange sonde et amorces JAK2 sauvage (PPM-WT)	
4 standards sauvages	4 réactions, chacun testé une seule fois
n échantillons d'ADN	n x 2 réactions
2 ADN témoins	2 réactions : PC-VF et NC-VF, chacun testé une fois
Contrôle H ₂ O	1 réaction

Analyse des échantillons sur un LightCycler 1.2

Il est recommandé de tester 4 échantillons d'ADN au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces. Le schéma représenté par la figure 6 montre un exemple d'une telle expérience.

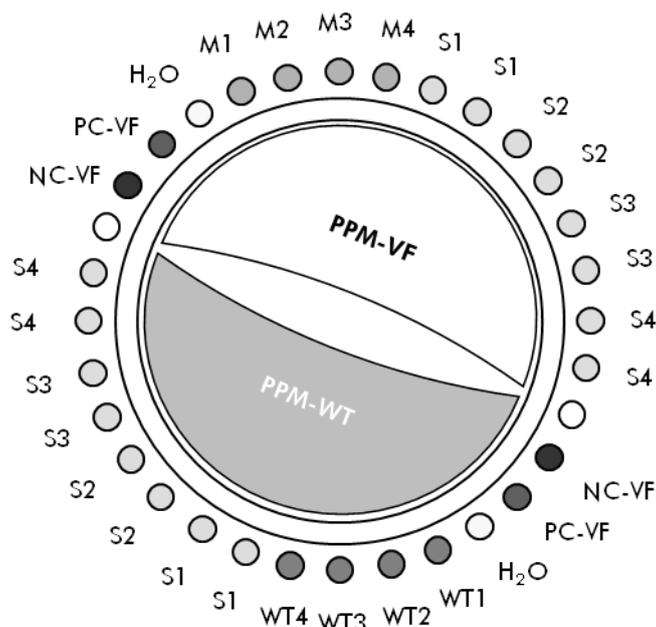


Figure 6. Suggestion de configuration du rotor pour chaque expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*. PC-VF : témoin positif V617F ; NC-VF : témoin négatif V617F ; M-VF : standards V617F ; M-WT : standards sauvages ; S : échantillon d'ADN ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un LightCycler 1.2

Remarque : En raison de certaines exigences technologiques, les expériences sur LightCycler doivent être effectuées à l'aide des réactifs prévus à cet effet. Il est recommandé d'utiliser le réactif LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe et de se conformer aux instructions du fabricant pour la préparation du mélange maître 5x.

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

1. **Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**
2. **Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Les tableaux 12 et 13 décrivent le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 20 μ l. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPM-VF, soit PPM-WT). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 12. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction (μl)	Pré-mélange V617F 15 + 1 réactions (μl)	Concentration finale
Mélange LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x, préparé extemporanément	4,0	64,0	1x
Mélange sonde et amorces, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	10,2	163,2	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	–
Volume total	20,0	20 chacun	–

Tableau 13. Préparation du mélange de qPCR

Composant	Pré-mélange WT		Concentration finale
	1 réaction (µl)	15 + 1 réactions (µl)	
Mélange LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x, préparé extemporanément	4,0	64,0	1x
Mélange sonde et amorces, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	10,2	163,2	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	–
Volume total	20,0	20 chacun	–

- 3. Déposer 15 µl de pré-mélange qPCR (VF ou WT) par capillaire.**
- 4. Ajouter 5 µl du matériel à quantifier (25 ng d'échantillon d'ADN génomique ou de témoin) dans le tube correspondant (volume total 20 µl).**
- 5. Mélanger doucement en pipetant.**
- 6. Disposer les capillaires dans les adaptateurs fournis avec l'appareil et centrifuger brièvement (700 x g, pendant environ 10 secondes).**
- 7. Placer les capillaires dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.**
- 8. Paramétrer le programme de thermocyclage du LightCycler 1.2 comme indiqué dans le tableau 14.**

Tableau 14. Profil de température

Mode d'analyse :	Quantification
Maintien 1	Température : 55 °C Durée : 2 minutes Rampe : 20
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes Rampe : 20
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes ; rampe : 20 66 °C pendant 1 minute ; rampe : 20 ; avec acquisition de la fluorescence FAM : Single

9. Avec un séquenceur LightCycler 1.2, l'utilisation du mode F1/F2 et « 2nd derivative analysis » (2^e analyse dérivative) est recommandée. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 14.

Interprétation des résultats

Principe d'analyse des données

Les données relatives aux valeurs associées au « Cycle threshold » (C_T) et au « Crossing Point » (C_P) peuvent être exportées depuis l'appareil de qPCR et copiées-collées dans un fichier Excel® à des fins d'analyse. Ces valeurs permettent ensuite de calculer les valeurs C_P et C_T moyennes, et les valeurs C_T moyennes associées aux standards peuvent ensuite être représentées sur un graphe afin d'obtenir une courbe standard pour chaque standard utilisé (sauvage et V617F) à partir de l'équation suivante et du tableau 15.

$y = C_P$ moyenne ; $x = \log_{10} \text{CN}$ où CN = nombre de copies du gène dans l'échantillon de 5 μl

Tableau 15. Données quantitatives associées aux standards sauvage et V617F

Étalon	Nombre de copies (CN)	$\log_{10} \text{CN}$
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

Remarque : chaque technicien doit mesurer sa propre reproductibilité dans son laboratoire.

Courbe standard et critères de qualité

Les figures 7 et 9 montrent des exemples de résultats obtenus à l'aide du kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*, et les figures 8 et 10 illustrent la courbe théorique calculée sur 4 dilutions standard.

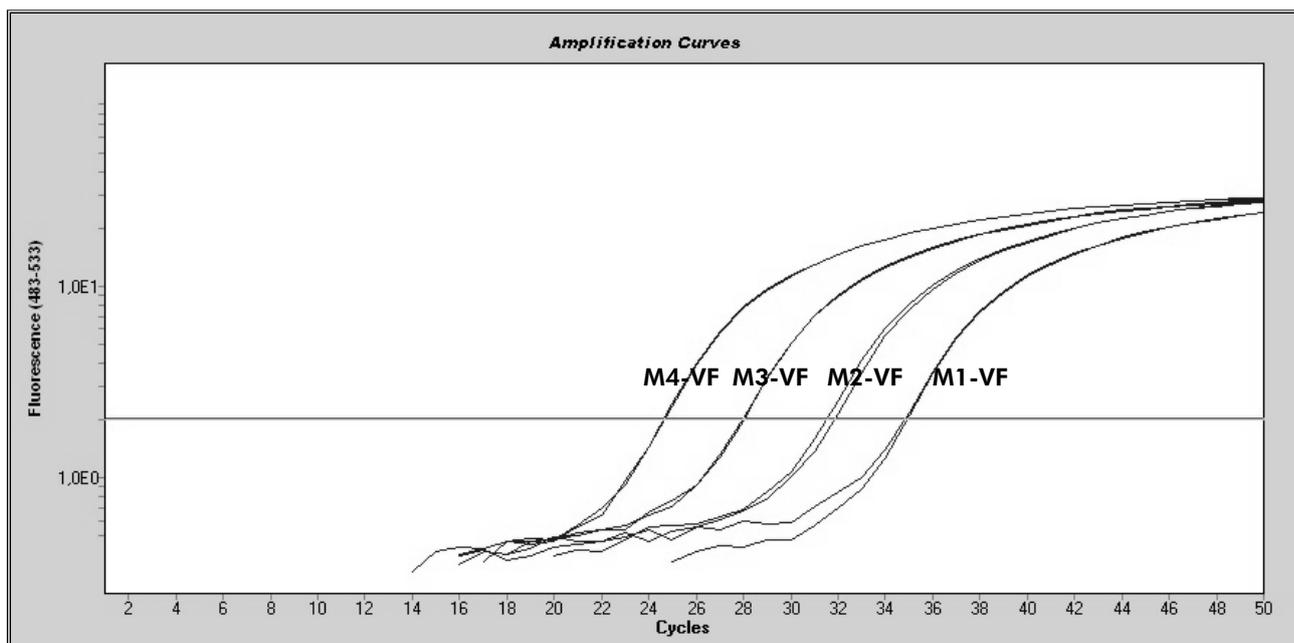


Figure 7. Graphique d'amplification de 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 et 5×10^4 copies du plasmide JAK2 V617F (témoins M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF, respectivement).

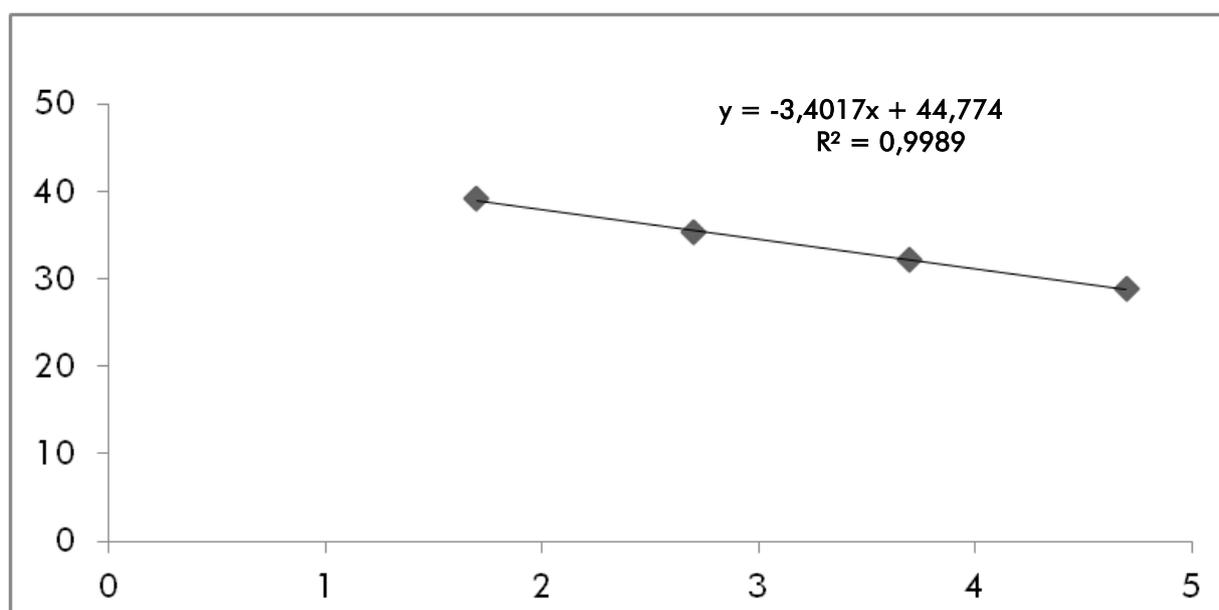


Figure 8. Courbe standard pour JAK2 V617F.

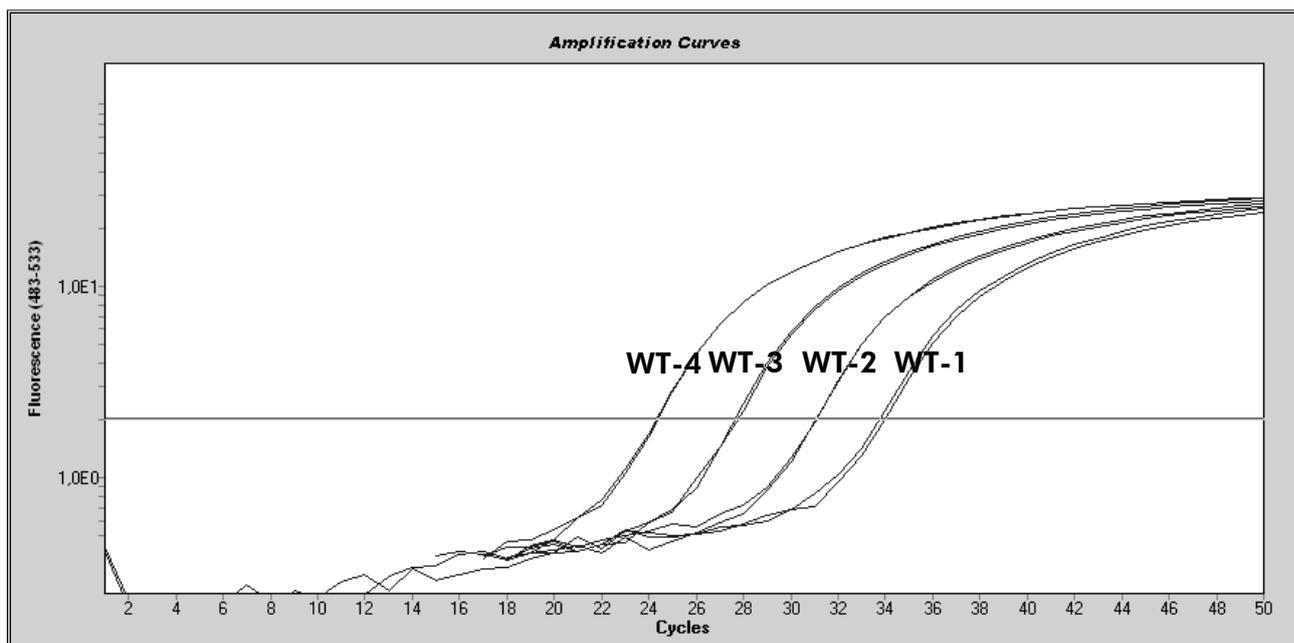


Figure 9. Graphique d'amplification de 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 et 5×10^4 copies du plasmide JAK2 sauvage (témoins WT-1, WT-2, WT-3 et WT-4, respectivement).

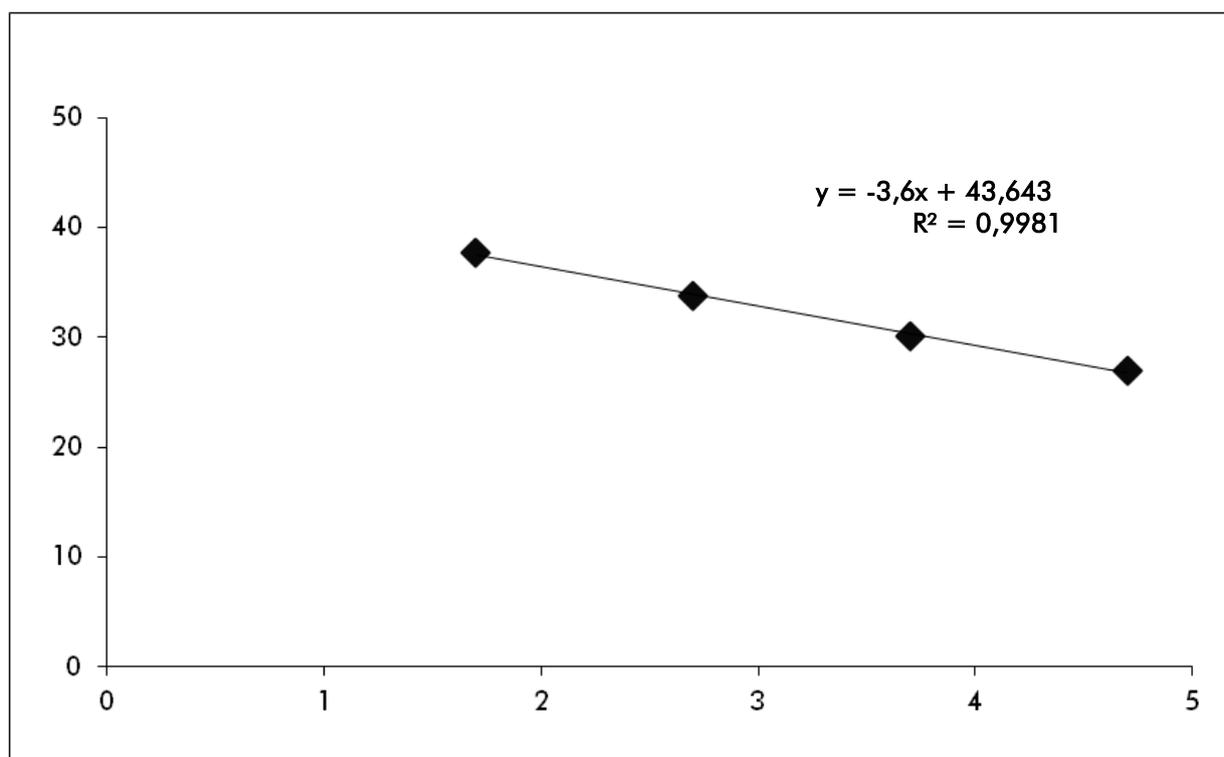


Figure 10. Courbe standard pour JAK2 sauvage.

Les standards étant des dilutions au dixième, la pente théorique de la courbe est de $-3,32$. Une pente comprise entre $-3,0$ et $-3,9$ est acceptable tant que R^2 est $> 0,95$ (12). Toutefois, une valeur de détermination $R^2 > 0,98$ est souhaitable pour obtenir des résultats précis (13).

Ces équations de courbe standard peuvent alors être utilisées pour calculer le nombre de copies \log_{10} de V617F et du gène sauvage dans les échantillons inconnus.

L'équation de la courbe standard V617F doit servir à convertir les moyennes des valeurs brutes C_P/C_T (obtenues avec le mélange PPM-VF) des échantillons inconnus et témoins, en nombre de copies de JAK2 V617F (CN_{V617F}).

$$CN_{V617F} = \frac{\log_{10} (C_{pV617F} \text{ moyenne} - \text{Intersection de la courbe standard}_{V617F})}{\text{Pente de la courbe standard}_{V617F}}$$

L'équation de la courbe standard de l'allèle sauvage doit servir à convertir les moyennes des valeurs brutes C_P/C_T (obtenues avec le mélange PPM-WT) des échantillons inconnus et témoins, en nombre de copies de JAK2 sauvage (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(C_{WT} \text{ moyenne} - \text{Intersection de la courbe standard}_{WT})}{\text{Pente de la courbe standard}_{WT}}$$

Expression des résultats

Les résultats sont relatifs à 25 ng d'ADN génomique total et doivent être exprimés en pourcentage de JAK2 V617F comme suit :

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

Reproductibilité entre les réplicats

Les données obtenues doivent être cohérentes entre les réplicats.

Témoins positif et négatif

Le témoin positif ou PC-VF doit donner un pourcentage de JAK2 V617F supérieur à 99,9 %.

Le témoin négatif ou NC-VF doit donner un pourcentage de JAK2 V617F inférieur à 0,1 %.

Si ces témoins ne fonctionnent pas correctement, se reporter à la section « Guide de résolution des problèmes », page 37, pour résoudre le problème.

Contrôles H₂O

Les témoins négatifs doivent générer une valeur CN égale à zéro pour la détection de JAK2 V617F et JAK2 sauvage.

Un résultat H₂O positif découle d'une contamination croisée. Voir la section « Guide de résolution des problèmes » ci-dessous pour résoudre le problème.

Guide de résolution des problèmes

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre d'assistance technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir la section « Coordonnées », page 46).

Commentaires et suggestions

Courbe standard WT ou V617F non linéaire

Inversion de tubes, inversion pendant la répartition, contamination croisée, dégradation partielle du standard, réactif de RQPCR, amplification non spécifique ou erreur du programme de PCR

Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.

Conserver le kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* entre -15 et -30 °C et garder les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière. Voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 14.

Éviter la congélation et la décongélation répétées.

Signal nul ou de faible intensité pour un échantillon standard

Standard non distribué, ou utilisation du même mélange PPM

Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.

Répéter l'analyse PCR.

Commentaires et suggestions

Le contrôle négatif (H₂O) est positif

Contamination croisée, contamination du réactif, erreur de l'appareil, inversion de puits ou de capillaire, ou dégradation de la sonde

Remplacer tous les réactifs critiques.

Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables conformément aux pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées.

Garder les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière.

Vérifier les faux positifs sur les courbes de fluorescence.

Aucun signal, même avec le témoin standard

a) Le canal de détection choisi est incorrect

Définir le canal sur F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

b) Erreur de pipetage ou réactifs omis

Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.

Répéter l'analyse PCR.

c) Pas de programme d'acquisition des données

Vérifier la programmation des cycles.

Sélectionner le mode d'acquisition « Single » (simple) à la fin de chaque phase d'hybridation de la PCR.

Signal nul ou de faible intensité avec les échantillons mais témoins standard OK

Effets inhibiteurs du matériel de l'échantillon dus à une purification insuffisante

Toujours vérifier la qualité de l'ADN (DO₂₆₀/DO₂₈₀) et la concentration avant l'analyse.

Recommencer la préparation de l'ADN.

Commentaires et suggestions

L'intensité de fluorescence est trop faible

- a) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit
- Aliquoter les réactifs pour les stocker.
Conserver le kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* entre -15 et -30 °C et garder les mélanges sonde et amorces à l'abri de la lumière. Voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 14.
Éviter la congélation et la décongélation répétées.
- b) Quantité initiale très faible d'ADN cible
- Vérifier la quantité d'échantillon d'ADN.
- Remarque** : Selon la méthode de préparation de l'ADN choisie, des effets inhibiteurs peuvent survenir

Les contrôles négatifs sont positifs

- Contamination croisée
- Remplacer tous les réactifs critiques.
Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs.
Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables conformément aux pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées.

L'intensité de fluorescence varie

- a) Erreur de pipetage
- Agiter au vortex et centrifuger tous les réactifs après décongélation.
La variabilité de LightCycler, liée à ce que l'on appelle des « erreurs de pipetage », peut être réduite en analysant les données en mode F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

Commentaires et suggestions

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b) La centrifugation de la plaque, des tubes ou des capillaires est insuffisante, ou le mélange de PCR préparé se trouve peut-être toujours dans le vaisseau supérieur du capillaire, ou une bulle d'air est coincée à l'extrémité du capillaire. | Toujours centrifuger les capillaires chargés avec le mélange de réaction tel que décrit dans le guide de fonctionnement de l'appareil. |
| c) La surface extérieure de l'extrémité du capillaire est sale | Toujours porter des gants durant la manipulation des capillaires. |

Les signaux des témoins positifs WT ou V617F sont obtenus avec les PPM réciproques

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Contamination croisée, contamination du réactif ou inversion de puits ou de capillaire | Remplacer tous les réactifs critiques.
Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs.
Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables conformément aux pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées.
Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Détection inversée du contrôle positif

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Inversion de la répartition des PPM dans le puits ou le capillaire ou dans le pré-mélange | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|

Pas de signal pour un contrôle positif ou les deux

- | | |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------|
| PPM ou ADN témoin oublié | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------|

Bruit de fond élevé

- | | |
|----------------------|----------------------------------------------------------------|
| Perte du fluorophore | La sonde doit être stockée et manipulée à l'abri de la lumière |
|----------------------|----------------------------------------------------------------|

Faible reproductibilité des échantillons dupliqués

- | | |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Erreur de pipetage ou contamination croisée | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction. |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse suivante :

www.qiagen.com/support.

Limites

Les utilisateurs devront avoir été formés à cette technologie et la maîtriser avant d'utiliser ce dispositif. Ce kit doit être utilisé conformément au manuel, sur l'un des appareils validés répertoriés dans la section « Matériel nécessaire mais non fourni », page 12.

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés par rapport à d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. Il incombe aux utilisateurs de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans leur laboratoire non couvertes par les études de performance QIAGEN.

Il convient de porter une attention particulière aux dates limite d'utilisation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants ayant expiré.

Caractéristiques de performance

Études non cliniques

Précision

Une étude de précision a été réalisée sur 12 échantillons d'ADN, extraits de lignées cellulaires correspondant à différentes quantités de l'allèle JAK2 V617F. Au total, 80 mesures ont été réalisées sur chaque échantillon, à l'aide de 3 différents lots du kit *ipsogen* JAK2 MutaQuant. Cette étude de précision a été menée sur un appareil Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Les données analytiques sont résumées dans le tableau 15.

Tableau 15. Données de précision relatives aux échantillons d'ADN

Échantillon	Valeur théorique de JAK2 V617F (%)	n*	Moyenne (%)	CV (%)	Centile	
					5	95
A	0	73	0,004	117,5	0,000	0,015
B	0,05	80	0,101	89,2	0,003	0,284
C	0,5	79	0,449	61,6	0,161	0,950
D	1	68	1,169	41,6	0,611	1,998
E	2	80	2,046	33,5	1,168	3,185
F	4	80	3,733	30,6	2,120	5,560
G	5	77	5,246	22,4	3,647	7,309
H	12.5	80	16,633	16,6	12,792	22,335
I	31	80	28,602	14,8	22,705	34,773
J	50	76	56,181	6,6	50,024	63,724
K	78	80	80,153	3,8	75,352	85,551
L	100	70	99,998	0,003	99,992	100,000

* Les valeurs extrêmes ont été exclues. Celles-ci ont été définies comme les valeurs plus petites que le quartile inférieur moins 3 fois l'intervalle interquartile, ou plus grandes que le quartile supérieur plus 3 fois l'intervalle interquartile sur un graphique en boîte à moustaches (box and whisker plot).

n= nombres d'échantillons validés ; CV= Coefficient de variation global

Limite des blancs et limite de détection

Le bruit de fond ou limite des blancs (LoB), déterminé sur des échantillons des témoins négatifs (8 échantillons, 76 mesures), s'est avéré égal à 0,014 %.

La limite de détection (LoD), déterminée sur des échantillons positifs connus mais présentant une faible expression (7 échantillons, 68 mesures), s'est avérée égale à 0,061 %, avec une limite supérieure de l'intervalle de confiance à 90 % de 0,091 %.

Cette sensibilité optimale peut être obtenue sur des échantillons contenant au moins 10 000 copies du gène JAK2 (sauvage ou V617F).

Les données quantitatives doivent être rapportées comme suit :

- Un taux de JAK2 V617F $\leq 0,014$ % peut être interprété comme une absence de mutation JAK2 V617F.
- Un taux de JAK2 V617F $> 0,014$ % mais $< 0,091$ % peut être interprété comme un résultat non concluant (zone grise).
- Un taux de JAK2 V617F $\geq 0,091$ % peut être interprété comme un résultat positif indiquant qu'une mutation JAK2 V617F a été détectée.

Linéarité

Des études de linéarité ont été effectuées sur 12 échantillons, chacun obtenu à partir d'un mélange différent d'ADN extrait de lignées cellulaires positives ou négatives pour la mutation JAK2 V617F. Chaque échantillon a été testé 5 fois. Les conclusions de cette étude ont montré que le kit *ipsogen JAK2 MutaQuant* génère des résultats linéaires sur toute la gamme dynamique.

Études cliniques

De l'ADN a été extrait d'échantillons de sang et de moelle osseuse prélevés sur 87 patients, puis analysé au moyen du kit *ipsogen JAK2 MutaQuant*. Le pourcentage de mutations JAK2 V617F a également été quantifié et comparé avec les résultats du test de dépistage obtenus avec le kit *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ* (réf. 673223). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

Table 16. Tableau de contingence montrant la concordance entre les résultats obtenus avec les kits *ipsogen JAK2 MutaQuant* et *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ*

		Résultats obtenus avec le kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen EZ</i>			
		Mutation détectée	Résultats non concluants	Mutation non détectée	n
Résultats obtenus avec le kit <i>ipsogen JAK2 MutaQuant</i>	Mutation détectée	40	2	7	49
	Résultats non concluants	0	0	21	21
	Mutation non détectée	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Concordance positive	100 % (intervalle de confiance à 95 % : 91 %, 100 %)				
Concordance négative	71 % (intervalle de confiance à 95 % : 51 %, 85 %)				
Concordance globale	89 % (intervalle de confiance à 95 % : 79 %, 95 %)				

Bibliographie

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413..
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R. L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer sur l’emballage et les étiquettes :

 Σ <N>	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Matériel médical destiné au diagnostic <i>in vitro</i>
	Référence du catalogue
	Numéro de lot
	Référence du matériel
	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Fabricant
	Lire le mode d’emploi

Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d’informations, consulter notre Centre d’assistance technique à www.qiagen.com/Support, appeler le 00800-22-44-6000 ou contacter l’un des Départements du service technique de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Pour 12 réactions : gène contrôle JAK2 sauvage, gène contrôle JAK2 V617F, mélange de sonde et amorces PPM-WT, mélange de sonde et amorces PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Pour 24 réactions : gène contrôle JAK2 sauvage, gène contrôle JAK2 V617F, mélange de sonde et amorces PPM-WT, mélange de sonde et amorces PPM-VF	673523
<p>Rotor-Gene Q MDx — Pour analyse PCR en temps réel validée pour le diagnostic <i>in vitro</i> dans le cadre d'applications cliniques</p>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cycleur thermique en temps réel et analyseur de fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; installation et formation non comprises	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycleur thermique en temps réel et analyseur de fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; installation et formation comprises	9002033

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectif. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être sollicités auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Ce produit est destiné à être utilisé dans le cadre de diagnostics *in vitro*. Les produits *ipsogen* ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente, ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN n'assume aucune responsabilité quant aux erreurs qui pourraient apparaître dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenue responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits *ipsogen* sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

La mutation JAK2 V617F et ses applications sont protégées par des brevets, notamment le brevet européen EP1692281, les brevets US 7,429,456 et 7,781,199, ainsi que les demandes de brevet US20090162849 et US20120066776 et leurs contreparties étrangères.

L'achat de ce produit ne confère aucun droit pour son utilisation dans le cadre d'essais cliniques pour des thérapies ciblant ou utilisant JAK2 V617F. QIAGEN développe des programmes de licences spécifiques pour ce type d'utilisation. Veuillez contacter notre département Licences et Propriété Intellectuelle à l'adresse suivante : jak2licenses@qiagen.com.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, *MutaQuant*®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene® (Groupe QIAGEN) ; ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); (Life Technologies Corporation); Excel® (Microsoft Corporation); HybProbe®, LightCycler®, TaqMan® (Groupe Roche).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *ipsogen* JAK2 *MutaQuant* ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit JAK2 MutaQuant* et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est mentionné dans le *Manuel du kit JAK2 MutaQuant* et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

