

September 2017

Handbok för *ipsogen*[®] JAK2 RGQ PCR Kit



För användning med instrumentet Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

Version 1

Kvantitativ in vitro-diagnostisk



673623



1107956



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland



1107956SV

Innehåll

Avsedd användning.....	4
Sammanfattning och förklaring.....	4
Användningsprinciper.....	6
Material som medföljer.....	9
Kitets innehåll	9
Material som behövs men inte medföljer.....	10
Varningar och säkerhetsåtgärder.....	12
Allmänna säkerhetsåtgärder.....	12
Förvaring och hantering av reagenser.....	14
Leveransvillkor.....	14
Förvaring.....	14
Stabilitet.....	14
Förvaring och hantering av prover.....	15
Procedur.....	15
Extraktion och beredning av genomiskt DNA från helblod.....	15
Kvalificering och kvantifiering av DNA.....	22
Normalisering av prov med genomiskt DNA.....	22
Protokoll: qPCR på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	23
Tolkning av resultat.....	32
Felsökningsguide.....	37
Kvalitetskontroll.....	39
Begränsningar.....	39
Testets egenskaper.....	40
LOB (limit of blank).....	40
Detektionsgräns (LOD).....	40
Linjäritet.....	41
Repetierbarhet och reproducerbarhet.....	41
Interfererande substanser.....	41
Klinisk utvärdering och metodjämförelse.....	42

Referenser	44
Symboler	45
Kontaktinformation.....	46
Beställningsinformation	47

Avsedd användning

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet är ett in vitro-kvantitativt test avsett för detektion av allelen JAK2 V617F/G1849T i genomiskt DNA extraherat från helblod. Testet är avsett för att vara till hjälp vid diagnos av myeloproliferativ neoplasm (MPN) tillsammans med andra faktorer inom området klinisk patologi.

Sammanfattning och förklaring

En återkommande somatisk mutation, V617F, som påverkar Janus-tyrosinkinas 2-genen (JAK2) identifierades 2005 (1–4), vilket ledde till ett stort genombrott när det gällde att förstå, klassificera och diagnostisera MPN. JAK2 är en mycket viktig intracellulär signalmolekyl för ett antal cytokiner, inklusive erythropoietin.

JAK2 V617F-mutationen detekteras hos > 95 % av patienterna med polycytemia vera (PV), 50–60 % av patienterna med essentiell trombocytomi (ET) och hos 50 % av patienterna med primär myelofibros (PMF). I sällsynta fall har JAK2 V617F även detekterats i samband med myelomonocytisk leukemi, myelodysplastiskt syndrom (MDS), systemisk mastocytos och kronisk neutrofil leukemi, men till 0 % i samband med kronisk myeloisk leukemi (CML) (5).

Mutationen korresponderar till en enskild nukleotidförändring i JAK2-nukleo-tiden 1849 i exon 14, vilket resulterar i en unik substitution av valin (V) till fenylalanin (F) vid position 617 i proteinet (JH2-domänen). Mutationen leder till konstitutiv aktivering av JAK2, hematopoietisk transformering in vitro och erythropoietin-oberoende tillväxt av erytroidkolonier (EEC) hos alla patienter med PV och en stor andel av patienterna med ET och PMF (6). JAK2 V617F utgör en viktig drivkraft vid transformering av hematopoietiska celler i MPN, men de exakta patologiska mekanismer med samma unika mutation som leder till sådana olika kliniska och biologiska entiteter har ännu inte tydliggjorts fullt ut.

Traditionellt sett har diagnos av MPN-sjukdomar baserats på kliniska, benmärgs-histologiska och cytogenetiska kriterier. Upptäckten av en sjukdomsspecifik molekylär markör resulterade i både en förenklad process och förbättrad diagnostisk precision. Detektion av JAK2 V617F-mutationen är nu en del av referenskriterierina hos World Health Organization (WHO) 2008 för diagnos av BCR ABL-negativ MPN (Tabell 1), och förekomst av den här mutationen är ett huvudkriterium för bekräftad diagnos.

Tabell 1. WHO-kriterier för diagnos av MPN (med utgångspunkt från referens 7)

Kriterier för diagnos av PV	
Huvudkriterier	1. Hemoglobin (Hgb) > 18,5 g.dl ⁻¹ (män) eller > 16,5 g.dl ⁻¹ (kvinnor) eller Hgb eller hematokrit > 99:e percentilen av referensintervallet för ålder, kön eller boendehöjd över havet eller Hgb > 17 g.dl ⁻¹ (män) eller > 15 g.dl ⁻¹ (kvinnor) vid associering med en ihållande ökning på ≥ 2 g.dl ⁻¹ från baslinjen som inte kan tillskrivas en korrigerig av järnbrist, eller förhöjd volymandel röda blodkroppar > 25 % över det predikerade normala medelvärdet 2. Förekomst av JAK2V617F eller liknande mutation
Underordnade kriterier	1. Trilinjär myeloproliferation i benmärgen 2. Serumerythropoietinnivå under det normala 3. EEC-tillväxt
Kriterier för diagnos av ET	
Huvudkriterier	1. Antal trombocyter ≥ 450 × 10 ⁹ l ⁻¹ 2. Megakaryocytproliferation med stor och mogen morfologi. Ingen eller liten granulocyt- eller erytroidproliferation 3. Uppfyller inte WHO-kriterierna för CML, PV, PMF, MDS eller annan myeloisk neoplasm 4. Förekomst av JAK2V617F eller annan klonal markör, eller Inga tecken på reaktiv trombocytos
Underordnade kriterier	–
Kriterier för diagnos av PMF	
Huvudkriterier	1. Megakaryocytproliferation och -atypi i samband med antingen retikulin- och/eller kollagenfibros. Eller, om inte retikulinfibros förekommer måste megakaryocytförändringarna åtföljas av ökad cellularitet för benmärgen, granulocytisk proliferation och ofta minskad erythropoiesis (dvs. prefibrotisk PMF) 2. Uppfyller inte WHO-kriterierna för CML, PV, MDS eller annan myeloisk neoplasm 3. Förekomst av JAK2V617F eller annan klonal markör, eller Inga tecken på reaktiv benmärgsfibros
Underordnade kriterier	1. Leukoerytoblastos 2. Förhöjt serumlaktatdehydrogenas 3. Anemi 4. Palpabel splenomegali

CML: Kronisk myeloisk leukemi; EEC: Endogen erytroidkoloni; ET: Essentiell trombocytemi; Hgb: Hemoglobin;

MDS: Myelodysplastiskt syndrom; PMF: Primär myelofibros; PV: polycytemia vera; WHO: Världshälsoorganisationen.

Sedan 2006 finns det flera metoder som huvudsakligen är baserade på PCR-teknik eller sekvensering för att detektera förekomst och eventuellt även kvantifiera JAK2V617F med hjälp av laboratorieutvecklade tester. De här testerna har olika analytisk prestanda, framför allt avseende precision och sensitivitetsnivå. Denna skillnad kan ha betydelse för behovet av benmärgsanalys, tiden som krävs för att fastställa en slutgiltig diagnos och eventuellt även den diagnostiska prestandan.

Användningsprinciper

Flera olika typer av teknik har föreslagits för kvantitativ bestämning av andelen enkel-nukleotid-polymorfismer (SNP) i DNA-prover. Vissa typer, till exempel smältkurvor och sekvensering, är endast semikvantitativa. Metoder som baseras på kvantitativ polymeraskedjereaktion (qPCR) i realtid är att föredra på grund av deras högre sensitivitet. Användning av en SNP-specifik primer tillåter selektiv amplifiering av mutant (MT)- eller vildtyp (WT)-allelen som enkelt kan detekteras med hjälp av ett instrument för realtids-qPCR. Detta möjliggör en sensitivitet på < 0,1 %, vilket är i linje med det för närvarande accepterade cut-off-värdet för JAK2 på 1 % som används för klinisk positivitet. Det ska dock påpekas att vissa kliniska experter betraktar all JAK2-förekomst som kliniskt signifikant vid tidpunkten för diagnos, och att det därför finns behov av en sensitiv metod som qPCR (8). *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet är baserat på denna teknik.

Användning av qPCR möjliggör korrekt kvantifiering av PCR-produkter under den exponentiella fasen av PCR-amplifieringsprocessen. Kvantitativa PCR-data kan erhållas snabbt, utan bearbetning efter PCR, genom realtidsdetektion av fluorescenssignaler under och/eller efter PCR-cykling, vilket därmed avsevärt minskar risken för PCR-kontaminering. För närvarande finns 3 tillgängliga huvudtyper av qPCR-teknik: qPCR-analys med SYBR® Green I-färg, qPCR-analys med hydrolysprober och qPCR-analys med hybridiseringsprober.

I den här analysen används principen qPCR-oligonukleotidhydrolys. Under PCR hybridiseras forward- och reverse-primrar till en specifik sekvens. En annan färgbunden oligonukleotid ingår i samma mix. Den här proben, som består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporterfärg och en nedströms 3'-quencher utan färg, hybridiserar till en målsekvens inom PCR-produkten. qPCR-analysen med hydrolysprober utnyttjar 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymeraset. När proben är intakt fluorescerar inte reporterfärgen så länge reportern och quenchern är i närheten av varandra, vilket främst uppnås genom energiöverföring av Förster-typ.

Om målobjektet är närvarande under PCR binder både forward- och reverse-primrarna specifikt till proben och flankerar den. 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i DNA-polymeraset klyver bara proben mellan reportern och quenchern om de tre oligonukleotiderna hybridiserar till target. Probfragmenten förskjuts från target och polymeriseringen av strängen fortsätter. Probens 3'-ände blockeras för att förhindra att proben förlängs under PCR (Bild 1). Den här processen uppstår i varje cykel och interfererar inte med den exponentiella ackumuleringen av produkten.

Ökningen av fluorescenssignalen detekteras bara om målsekvensen är komplementär till primrarna och proben och därför amplifieras under PCR. På grund av de här tre kraven detekteras inte icke-

specifik amplifiering. Sålunda är ökningen av fluorescensen direkt proportionell mot målamplifieringen under PCR.

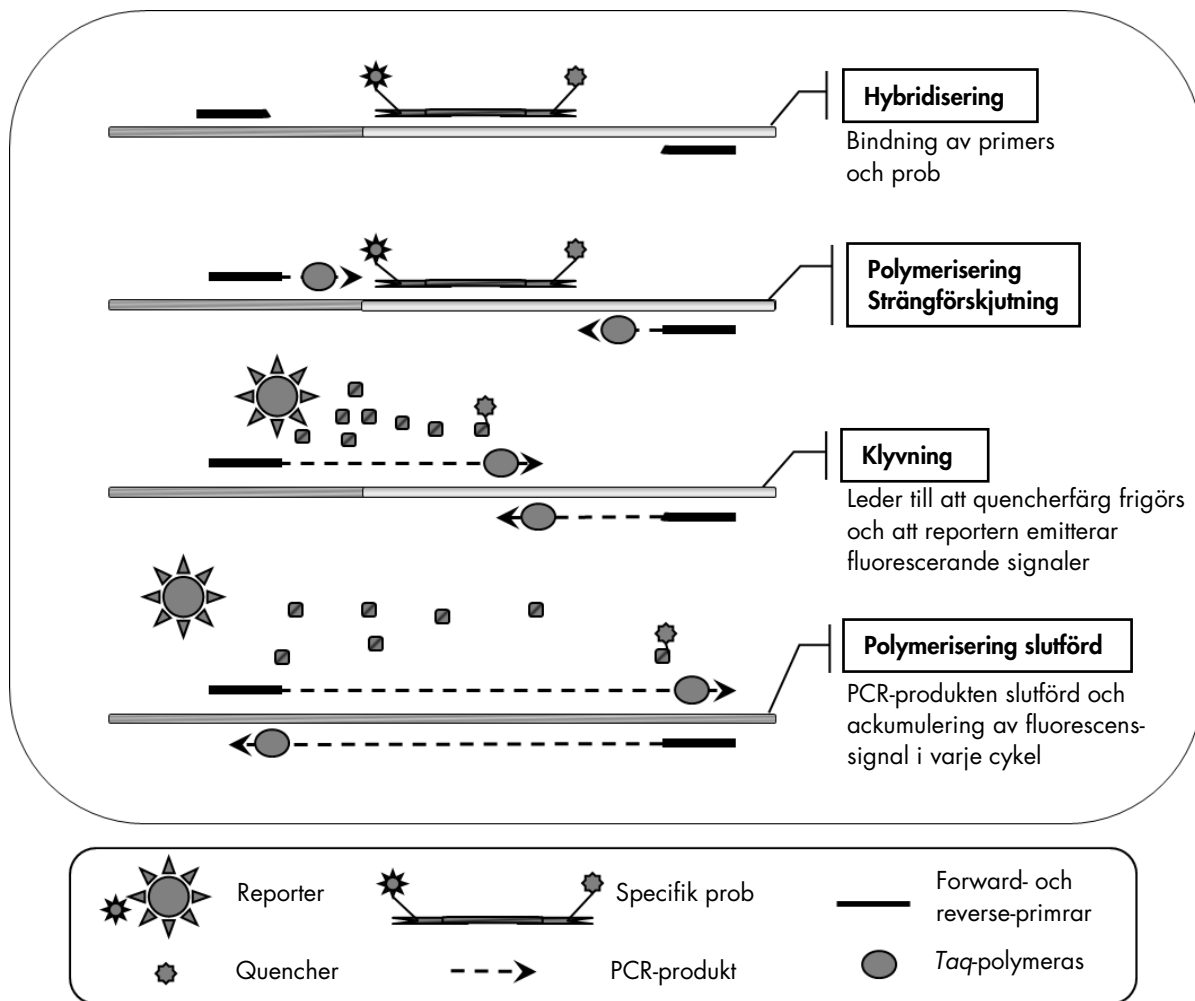


Bild 1. Reaktionsprincip. Den kvantitativa allelspecifika PCR-tekniken som används i det här analyskitet möjliggör sensitiv och korrekt detektion av SNP med hög reproducerbarhet. Den här tekniken baseras på användning av specifika reverse-primrar för vildtyp- och V617F-allelerna (8). Endast en perfekt matchning mellan primer och mål-DNA möjliggör förlängning och amplifiering vid PCR (se Bild 2).

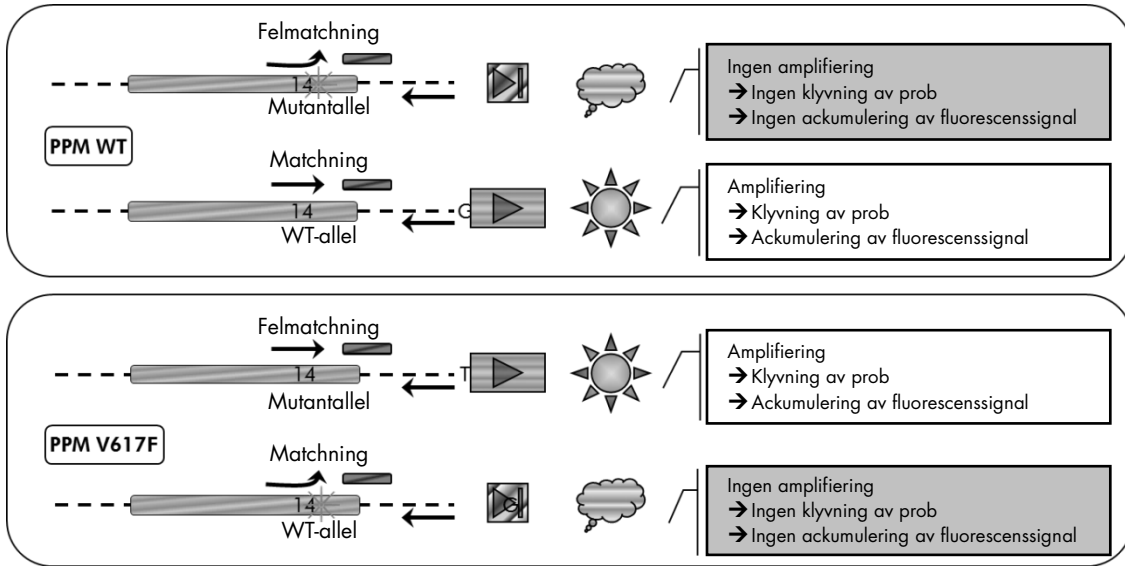


Bild 2. Allelspecifik PCR. Användning av vildtyp- eller V617F-primrar och probmix möjliggör specifik detektion av vildtyp- eller muterad allel i två separata reaktioner som genomförs med samma prov. Resultaten kan uttryckas som procentandelen VF-kopior av det totala antalet JAK2-kopior.

Material som medföljer

Kitets innehåll

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (24)		
Katalognr		673623
Antal reaktioner		24
JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantkontroll, 100 % V617F-allel)	Röd	33 µl
JAK2 WT Control (JAK2 WT-kontroll, 100 % vildtypallel)	Grön	33 µl
JAK2 MT Quant Standard 1 (JAK2 MT Quant-standard 1, 5 x 10 ¹ V617F-kopior/5 µl)	Röd	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 2 (JAK2 MT Quant-standard 2, 5 x 10 ² V617F-kopior/5 µl)	Röd	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 3 (JAK2 MT Quant-standard 3, 5 x 10 ³ V617F-kopior/5 µl)	Röd	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 4 (JAK2 MT Quant-standard 4, 5 x 10 ⁴ V617F-kopior/5 µl)	Röd	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 1 (JAK2 WT Quant-standard 1, 5 x 10 ¹ vildtypkopior/5 µl)	Grön	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 2 (JAK2 WT Quant-standard 2, 5 x 10 ² vildtypkopior/5 µl)	Grön	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 3 (JAK2 WT Quant-standard 3, 5 x 10 ³ vildtypkopior/5 µl)	Grön	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 4 (JAK2 WT Quant-standard 4, 5 x 10 ⁴ vildtypkopior/5 µl)	Grön	20 µl
JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reaktionsmix)*	Röd	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reaktionsmix)†	Grön	1010 µl
Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymeras, HotStarTaq® 5 enheter/µl)	Mint	85 µl
TE buffer for sample dilution (TE-buffert för spädning av prov)	Vit	1,9 ml
Water for no template control (NTC) (vatten för kontroll utan mall (NTC))	Vit	1,9 ml
ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit Handbook (engelsk handbok)		1

* PCR-reaktionsmix som innehåller alla komponenter som behövs utom Taq DNA-polymeras och mål-DNA för MT-allelen.

† PCR-reaktionsmix som innehåller alla komponenter som behövs utom Taq DNA-polymeras och mål-DNA för WT-allelen.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Förbrukningsartiklar och reagenser för manuell DNA-extraktion

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104)
- Etanol (96–100 %)

Obs: Använd inte denaturerad alkohol eftersom den innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

Förbrukningsartiklar och reagenser för automatisk DNA-extraktion

- QIAasymphony® DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (provberedningspatroner, 8 brunnar) (kat.nr 997002)
- 8-Rod Covers (8-stavarsskydd) (kat.nr 997004)
- Filter-Tips, 1.500 µl (filterspetsar 1 500 µl) (kat.nr 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (filterspetsar 200 µl) (kat.nr 990332)
- Elution Microtubes CL (eluerings-mikrorör CL) (kat.nr 19588)
- Tip disposal bags (avfallspåsar för spetsar) (kat.nr 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (mikrorör 2,0 ml typ H) (Sarstedt®, kat.nr 72.694, www.sarstedt.com)

Förbrukningsartiklar och reagenser för PCR

- Nukleasfria aerosolresistenta sterila PCR-pipettspetsar med hydrofobiskt filter
- 1,5 ml eller 2,0 ml nukleasfria PCR-rör
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (rör på remsa och lock, 0,1 ml) för Rotor-Gene Q (kat.nr 981103 eller 981106)
- Is

Utrustning

- Mikropipetter (justerbara)* avsedda för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)
- Engångshandskar
- Vortexblandare
- Värmeblock för lysning av prover vid 56 °C
- Bänkcentrifug* med rotor för 0,5 ml/1,5/2,0 ml reaktionsrör (med kapacitet för 13 000–14 000 rpm)
- Spektrofotometer

Utrustning för automatisk provberedning

- Instrumentet QIASymphony SP (kat.nr 9001297), programversion 4.0 eller högre, medföljande tillbehör samt protokollet Blood_200_V7_DSP
- Röradapter 3B (Insert 2.0 ml v2, sample carrier (samplecarr.) (24), Qsym, kat.nr 9242083)

Utrustning för PCR


- Realtids-PCR-instrument†: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM och medföljande tillbehör
- Installerat program Rotor-Gene AssayManager® v2.1.x (x ≥ 0)
- Installerat plugin-program Rotor-Gene AssayManager Gamma v1.0.x (x ≥ 0)
- Importerad JAK2 CE-analysprofil (ipsogen_JAK2_blood_CE_V1_0_x (x ≥ 0))

* Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN®-kit och kitkomponent.

<p>VARNING</p> 	<p>VARNING: Tillsätt INTE blekmedel eller sura lösningar direkt i avfallet från provberedningen.</p>
---	--

Allmänna säkerhetsåtgärder

Användning av qPCR-tester kräver god laboratoriesed, inklusive underhåll av utrustning, som är speciellt anpassad till molekylärbiologi och som uppfyller tillämpliga regler och relevanta standarder.

Det här kitet är avsett för in vitro-diagnostisk användning. Reagenserna och instruktionerna som medföljer detta kit har validerats för optimal prestanda.

- Testet är avsett för användning med helblodsprover som har antikoagulerats med kalium-EDTA och förvarats i 2 °C till 8 °C i maximalt 96 timmar innan DNA-extraktion.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.
- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.
- Reagenser till *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet är optimalt utspädda. Späd inte ut reagenser ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda.
- Använd inte reaktionsvolym (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µl.
- Alla reagenser som medföljer *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Byt inte ut något reagens från ett kit mot samma reagens från ett annat *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kit (även om det kommer från samma batch), eftersom detta kan påverka prestandan.

- Ytterligare instruktioner om varningar och säkerhetsåtgärder samt fler procedurbeskrivningar finns i användarhandboken till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM och i användarhandboken till RGAM 2.1.
- Ändring av inkuberingstider och temperaturer kan orsaka felaktiga eller icke överensstämmande data.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Reaktionsmixar kan ändras om de utsätts för ljus.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra att mixarna kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial som finns i reagenserna JAK2 MT och JAK2 WT Quant Standard samt i kontrollreagenserna JAK2 Mutant och JAK2 WT.
- Iaktta största försiktighet för att undvika överföring av smitta via carry-over av DNA- eller PCR-produkter, vilket kan orsaka en falskt positiv signal.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra kontaminering av DNase, vilket kan orsaka försämring av mall-DNA.
- Använd separata för ändamålet avsedda pipetter för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av mall.
- Öppna inte instrumentet Rotor-Gene Q MDx förrän körningen har avslutats.
- Öppna inte Rotor-Gene Q-rören när körningen har avslutats.
- Iaktta största noggrannhet med betoning på felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel för att säkerställa korrekt provtestning.
- Se till att proverna hanteras på ett systematiskt sätt för att säkerställa att identifieringen alltid blir korrekt så att proverna går att spåra.

Vi rekommenderar följande hantering:

- Använd nukleasfritt laboriematerial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och bär handskar när du utför analysen.
- Använd nya aerosolresistanta pipettspetsar för alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser.
- Bered för-PCR-huvudmix med därför avsedda tillbehör (pipetter, spetsar etc.) i ett anpassat utrymme där inget DNA-material (DNA, plasmid eller PCR-produkter) förs in. Tillsätt mall i ett separat utrymme (helst i ett annat rum) med hjälp av specialanpassat material (pipetter, spetsar etc.).

Säkerhetsinformation relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIASymphony DNA DSP Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

Förvaring och hantering av reagenser

Leveransvillkor

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet levereras på torris. Om någon komponent i *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet (förutom enzym) inte är frusen vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handbok eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Förvaring

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet måste vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 °C till -15 °C i en fryr med konstant temperatur och skyddat mot ljus.

Information om förvaring relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIASymphony DNA DSP Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

Stabilitet

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet hållbart fram till det utgångsdatum som anges på förpackningens etikett.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C fram till det utgångsdatum som anges på förpackningens etikett. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte 5 frys-/upptiningscyklar, vilket är det maximalt tillåtna.

Information om stabilitet relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIASymphony DNA DSP Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

- Blanda försiktigt genom att vända röret 10 gånger och centrifugera alla rör utom enzymet innan de öppnas.
- Utgångsdatum för reagenserna anges på etiketterna till varje enskild produkt. Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren har produkten full prestanda under hela stabilitetstiden så länge komponenter från samma batchar används.
- Vid QIAGENs procedurer för kvalitetskontroll används funktionstest av varje individuell kitlot. Blanda därför inte reagenser från olika kit även om de kommer från samma lot.

Förvaring och hantering av prover

Helblodsprover

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet är avsett för användning med genomiska DNA-prover som extraherats från helblodsprover som har antikoagulerats med kalium-EDTA och förvarats på något av följande sätt:

- i 2 °C till 8 °C i maximalt 96 timmar,
- i 15 °C till 25 °C i maximalt 96 timmar, eller
- fruset i –15 °C till –30 °C i maximalt 1 månad

Obs: Helblodsprover måste levereras under samma förhållanden som vid förvaring för att undvika temperaturförändringar under förvaring och leverans.

Prover med genomiskt DNA

När genomiskt DNA extraheras kan proverna förvaras och levereras i –30 °C till –15 °C i maximalt 15 månader, antingen direkt efter extraktion eller efter spädning i TE-buffert.

Procedur

Extraktion och beredning av genomiskt DNA från helblod

Genomiskt DNA ska extraheras med antingen QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) eller instrumentet QIASymphony SP i kombination med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236).

Kontrollera att reagenserna som ska användas inte har passerat utgångsdatum och att de har transporterats och förvarats under rätt förhållanden.

Obs: *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet är endast validerat för användning i kombination med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) eller QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236). Använd inte någon annan produkt för DNA-extraktion.

Manuell extraktion av genomiskt DNA med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Manuell extraktion av genomiskt DNA måste utföras med QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) enligt motsvarande *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (handbok för QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Saker som ska göras före start

- **Ekvilibrera blodproverna till rumstemperatur (15–25 °C) och säkerställ att de har homogeniserats ordentligt.**
- **Bereda lyseringsbufferten**

Om det har bildats fällning i lyseringsbufferten (AL) löser du upp den genom att inkubera i 56 °C.
- **Bereda QIAGEN-proteas**

Tillsätt 1,2 ml proteaslösningsmedel (PS) i flaskan med lyofiliserat QIAGEN-proteas (QP) och blanda försiktigt. Blanda genom att vända flaskan flera gånger för att undvika skumbildning. Kontrollera att QIAGEN-proteaset (QP) är helt upplöst.

Obs: Tillsätt inte QP direkt i lyseringsbufferten (AL).
- **Bereda tvättbuffert 1**

Mät upp 25 ml etanol (96–100 %) med en mätcylinder och tillsätt det i flaskan som innehåller 19 ml koncentrat av tvättbuffert 1 (AW1). Förvara den rekonstituerade tvättbufferten 1 (AW1) i rumstemperatur (15–25 °C).

Obs: Blanda alltid den rekonstituerade tvättbufferten 1 (AW1) genom att vända flaskan flera gånger innan du startar proceduren.
- **Bereda tvättbuffert 2**

Mät upp 30 ml etanol (96–100 %) med en mätcylinder och tillsätt det i flaskan som innehåller 13 ml koncentrat av tvättbuffert 2 (AW2). Förvara den rekonstituerade tvättbufferten 2 (AW2) i rumstemperatur (15–25 °C).

Obs: Blanda alltid den rekonstituerade tvättbufferten 2 (AW2) genom att vända flaskan flera gånger innan du startar proceduren.
- **Bereda elueringsbufferten**

En flaska elueringsbuffert (AE) ingår i kitet. För att förhindra kontaminering av elueringsbufferten (AE) rekommenderar vi starkt användning av pipettspetsar med aerosolbarriär vid pipettering av elueringsbuffert (AE) från flaskan och att korken till flaskan byts ut omedelbart efteråt.

Ekvilibrera elueringsbufferten (AE) till rumstemperatur (15–25 °C).
- Ställ in ett värmeblock på 56 °C för användning i steg 4.

Procedur

1. Pipettera 20 µl QIAGEN-proteas (QP) i ett lyseringsrör (LT).

Obs: Kontrollera utgångsdatumet för det rekonstituerade proteaset innan användning.

2. Tillsätt 200 µl blodprov i lyseringsröret (LT).
3. Tillsätt 200 µl lyseringsbuffert (AL) i lyseringsröret (LT), sätt på korken och blanda genom att vortexa i pulser i 15 sekunder.

Obs: För att säkerställa en effektiv lysering måste provet och lyseringsbufferten (AL) blandas noga för att lösningen ska bli homogen.

Obs: Eftersom lyseringsbuffert (AL) har hög viskositet ska du säkerställa att rätt volym lyseringsbuffert (AL) tillsätts genom att pipettera mycket noga eller genom att använda en lämplig pipett.



Tillsätt inte QIAGEN-proteas (QP) direkt i lyseringsbufferten (AL).

4. Inkubera i 56 °C (±1 °C) i 10 minuter (±1 minut).
5. Centrifugera lyseringsröret (LT) i ungefär 5 sekunder vid full hastighet för att få bort droppar från insidan av korken.
6. Tillsätt 200 µl etanol (96–100 %) i lyseringsröret (LT), sätt på korken och blanda noga genom att vortexa i pulser i ≥ 15 sekunder.
7. Centrifugera lyseringsröret (LT) i ≥ 5 sekunder vid full hastighet för att få bort eventuella vätskedroppar från insidan av korken.
8. Tillsätt försiktigt allt lysat från steg 7 i QIAamp Mini spin-kolumnen utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.


Obs: Om du bearbetar flera prover ska du endast öppna ett lyseringsrör (LT) åt gången.
9. Stäng locket till QIAamp Mini spin-kolumnen och centrifugera i ca 6 000 x g i 1 minut. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent tvättrör (WT) och kassera röret som innehåller filtratet.

Obs: Om lysatet inte har passerat genom membranet fullständigt efter centrifugering i 6 000 x g (8 000 rpm) centrifugerar du igen i full hastighet (upp till 20 800 x g) i 1 minut.

Obs: Om lysatet fortfarande inte passerar genom membranet under centrifugeringen kasserar du provet och upprepar isoleringen och reningen med nytt provmaterial.
10. Öppna QIAamp Mini spin-kolumnen försiktigt och tillsätt 500 µl tvättbuffert 1 (AW1) utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.
11. Stäng locket till QIAamp Mini spin-kolumnen och centrifugera i ca 6 000 x g (8000 rpm) i 1 minut. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent tvättrör (WT) och kassera röret som innehåller filtratet.

12. Öppna QIAamp Mini spin-kolumnen försiktigt och tillsätt 500 µl tvättbuffert 2 (AW2) utan att blöta ned kanten. Undvik att vidröra membranet på QIAamp Mini spin-kolumnen med pipettspetsen.
13. Stäng locket till QIAamp Mini spin-kolumnen och centrifugera i full hastighet (ca 20 000 x g eller 14 000 rpm) i 1 minut. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent tvättrör (WT) och kassera röret som innehåller filtratet.
14. Centrifugera i full hastighet (ca 20 000 x g eller 14 000 rpm) i 3 minuter för att torka membranet helt.
15. Placera QIAamp Mini spin-kolumnen i ett rent elueringsrör (WT) och kassera tvättröret (WT) som innehåller filtratet. Öppna locket till QIAamp Mini spin-kolumnen försiktigt och tillsätt 50 till 200 µl elueringsbuffert (AE) i mitten av membranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur (15–25 °C) i 1 minut. Centrifugera i ca 6000 x g (8000 rpm) i 1 minut för att eluera DNA:t.
16. Kassera använda provrör, plattor och avfall i enlighet med lokala säkerhetsregler.


Automatisk extraktion av genomiskt DNA med QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Automatisk extraktion av genomiskt DNA måste utföras med instrumentet QIASymphony och provberedningsmodulen i kombination med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) och genom att följa instruktionerna i *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (handbok för QIASymphony DSP DNA Kit). Funktioner i JAK2-protokollet är markerade med symbolen  i proceduren som beskrivs nedan.

Tillsammans med QIASymphony SP möjliggör QIASymphony DSP DNA Mini-kitet automatisk DNA-rening från humant helblod (genom att använda protokollet Blood_200_V7_DSP på QIASymphony).

- Ingen förbehandling krävs
- Rören överförs direkt till QIASymphony SP
- Rening av DNA utförs med magnetiska partiklar

Viktigt att tänka på före start

-  Den helblodsvolym som ska extraheras är 300 µl.
- Se till att du känner till hur QIASymphony SP används. Användningsinstruktioner finns i de användarmanualer som medföljer instrumentet.

- Underhåll av instrumentet är valfritt och behöver inte utföras för att instrumentet ska fungera, men det rekommenderas starkt för att undvika risk för kontaminering.
- Innan du använder en reagenskassetten för första gången ska du kontrollera att buffertarna QSL1 och QSB1 inte innehåller fällning. Om det behövs tar du bort trågen som innehåller buffertarna QSL1 och QSB1 från reagenskassetten och inkuberar i 30 minuter i 37 °C. Skaka då och då för att lösa upp fällning. Se till att du sätter tillbaka trågen i rätt positioner. Om reagenskassetten redan är perforerad ska du försluta trågen med återanvändbara tätningssremor, och därefter inkuberar du hela reagenskassetten i 30 minuter i 37 °C i vattenbad och skakar då och då.
- Skaka inte reagenskassetten (RC) kraftigt eftersom det då kan bildas skum som kan orsaka problem vid detektion av vätskenivån.

Saker som ska göras före start

- Se till att de magnetiska partiklarna är fullständigt resuspenderade innan du startar proceduren. Vortexa tråget med de magnetiska partiklarna kraftigt i minst 3 minuter innan första användning.
- Se till att perforeringslocket placeras på reagenskassetten och att locket till tråget med de magnetiska partiklarna har tagits bort eller, om du använder en delvis använd reagenskassetten, se till att de återanvändbara tätningssremorna är borttagna.
- Se till att enzymrören är öppna.
- Om proverna är streckkodade placerar du proverna i provrörstället så att streckkoderna är riktade mot streckkodsläsaren på vänster sida av QIASymphony SP.

Procedur

1. Stäng alla lådor och huven.
2. Slå på QIASymphony SP och vänta tills fönstret "Sample Preparation" (provberedning) visas och initieringsproceduren har slutförts.

Obs: Strömbrytaren sitter vid det nedre vänstra hörnet av QIASymphony SP.

3. Logga in på instrumentet.
4. Kontrollera att lådan "Waste" (avfall) är korrekt förberedd – gör en inventering och kontrollera att t.ex. spetsnedkastet och behållaren för vätskeavfall är på plats. Byt ut avfallspåsen för spetsar om det behövs.
5. Sätt in det aktuella elueringsracket i lådan "Eluate" (eluat).
Ladda inte en platta med 96 brunnar på "elueringsplats 4".
Använd endast "elueringsplats 1" tillsammans med motsvarande kyladapter.

Om du använder en platta med 96 brunnar, kontrollera att plattan har rätt riktning eftersom en felaktig placering kan göra att proverna blandas ihop vid nedströmsanalys.

6. Sätt in de aktuella reagenskassetterna och förbrukningsmaterialen i lådan "Reagents and Consumables" (förbrukningsartiklar och reagenser).

Obs: Kontrollera att pipetteringsspetsarna är korrekt fixerade.

7. Gör en inventering av lådan "Reagents and Consumables" (förbrukningsartiklar och reagenser).



8. Överför **300 µl** av det helblodsprov som ska extraheras till ett mikrorör (2,0 ml typ H) och placera röret i 3b 2 ml-adaptern i provrörsstället. Sätt in provrören i lådan "Sample" (prov).

9. Använd sedan pekskärmen och ange den information som krävs för varje batch med prover som ska bearbetas:

- Provinformation: ändra standardformat för rör (välj knappen "Select All" (välj alla) och välj sedan "Sarstedt reference 72.694" från området "Tube Insert" (röradapter))
- Protokoll som ska köras: välj knappen "Select All" [Välj alla] och välj sedan kategorin "DNA Blood" [DNA-blod] → Blood_200_V7_DSP för helblodsprover



- Elueringsvolym och output-position: 100 µl för helblodsprotokollet.

Obs: Efter att du har angett information om batchen ändras statusen från "LOADED" (laddad) till "QUEUED" (köad). När en batch har köats visas knappen "Run" (kör).

10. Starta körningen.

- Tryck på knappen "Run" (kör) för att starta körningen.
- Läs meddelandet som visas och bekräfta det.

Obs: Vi rekommenderar att du väntar bredvid instrumentet tills det har utfört detektion av vätskenivån i internkontrollrören och att statusen för QIASymphony SP-stället ändras till "RUNNING" (körning pågår).

Obs: Pausa eller avbryt inte körningen när bearbetning pågår (såvida det inte inträffar en olycka) eftersom det gör att proverna kommer att flaggas som "unclear" (ej tydligt).

Obs: Det går att ladda prover kontinuerligt och lägga till dem i körningen (tills det att reagenserna laddas). Tryck på knappen "Run" (kör) för att starta reningsproceduren.

11. I slutet av protokollet för körningen ändras statusen för batchen från "RUNNING" (körning pågår) till "COMPLETED" (slutförd). Ta ut elueringsracket med de renade nukleinsyrorerna från lådan "Eluate" (eluat).

Vi rekommenderar att du tar ut eluatplattan från lådan "Eluate" (eluat) omedelbart efter att körningen är slutförd. Beroende på temperaturen och fuktigheten kan elueringsplattor som

lämnas kvar i QIASymphony SP efter att körningen är slutförd utsätts för kondens eller avdunstning.

Obs: Generellt sett överförs inte magnetiska partiklar till eluaten. Om du ser svarta partiklar i ett eluat kan dessa magnetiska partiklar tas bort på följande sätt:

Sätt in röret med DNA:t i en lämplig magnetisk separator (t.ex. QIAGEN 12-Tube Magnet (QIAGEN 12-rörsmagnet), kat.nr 36912) tills de magnetiska partiklarna har separerats. Om det finns DNA på en mikroplatta, sätt in mikroplattan i en lämplig magnetisk separator (t.ex. QIAGEN 96-Well Magnet Type A (magnet för att separera magnetiska partiklar i brunnar på plattor med 96 brunnar), kat.nr 36915) tills de magnetiska partiklarna har separerats. Om du inte har tillgång till en lämplig magnetisk separator centrifugerar du röret med DNA:t i 1 minut på full hastighet i en mikrocentrifug för att pelletera eventuella återstående magnetiska partiklar.

12. Exportera QIASymphony SP-resultatfilen: den här rapporten genereras för varje elueringsplatta.

- Sätt in USB-minnet i någon av USB-portarna på framsidan av QIASymphony SP;
- Klicka på knappen "Tools" (verktyg);
- Välj "File Transfer" (filöverföring);
- På fliken "In-/Output Files" (inkommande/utgående filer) väljer du "Results Files" (resultatfiler) och klickar på "Transfer" (överför).
Spara namnet på filexporten i följande format: åååå-mm-dd hh:mm:ss_ID för elueringsrack.

13. Kontrollera kolumnen "Validity of result" (giltighet för resultat) för varje prov i QIASymphony SP-resultatfilen

- Vid giltig och ej tydlig status: fortsätt till DNA-kvalificering och -kvantifiering
- Vid ogiltig status: provet avisas. Upprepa extraktionssteget.

14. Om en reagenskasset bara är delvis använd försluter du den med de medföljande återanvändbara tätningsremsorna och stänger rören som innehåller proteinas K med skruvlocken omedelbart efter att protokollkörningen har slutförts för att undvika avdunstning.

15. Kassera använda provrör, plattor och avfall i enlighet med lokala säkerhetsregler.

16. Rengör QIASymphony SP.

Följ underhållsinstruktionerna i de användarmanualer som medföljer instrumentet. Se till att du rengör spetskyddet regelbundet för att minimera risken för korskontaminering.

17. Stäng instrumentlådorna och stäng av QIASymphony SP.

Kvalificering och kvantifiering av DNA

En blank med ATE- eller AE-buffert ska användas för att kalibrera spektrofotometern. De här buffertarna måste användas på grund av att de elueringsbuffertar som används i kiten för extraktion av genomiskt DNA innehåller konserveringsmedlet natriumazid, som absorberas vid 260 nm.

- A_{260}/A_{280} -kvoten måste vara $\geq 1,7$ eftersom lägre kvoter vanligen indikerar proteinkontaminering eller förekomst av organiska kemikalier och påverkar PCR-steget.
- DNA-kvantiteten fastställs genom att mäta den optiska densiteten vid 260 nm.
- Den totala mängden renat DNA = koncentrationen x provets volym i μl .
- Om A_{260}/A_{280} -kvoten är under 1,7 och om koncentrationen av genomiskt DNA är under 10 ng/ μl får bearbetningen av provet inte fortsätta.

Normalisering av prov med genomiskt DNA

DNA:t måste spädas till 10 ng/ μl i TE-bufferten som medföljer *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet.

Rotor-Gene Q PCR är optimerad för 50 ng renat genomiskt DNA spätt till en slutlig volym på 5 μl .

Protokoll: qPCR på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Viktigt att tänka på före start

- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet måste köras på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med Rotor-Gene AssayManager v2.1. Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx innan du startar protokollet. Detaljerad information finns i användarhandböckerna för instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 och Gamma-plugin-programmet.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 möjliggör automatisk tolkning av PCR-resultaten. Cykelparametrarna är låsta för körningen.

Saker som ska göras före start

Programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 måste installeras på datorn som är ansluten till Rotor-Gene Q. Du kan ladda ned programmet från QIAGENs webbplats: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Detaljerad information om installation av Rotor-Gene AssayManager v2.1 finns i *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (användarhandbok för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

- Gamma-plugin-programmet krävs för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet. Du kan ladda ned detta plugin-program från QIAGENs webbplats på adressen: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Detta plugin-program måste installeras på en dator som redan har Rotor-Gene AssayManager v2.1 installerat.
- *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet behöver även en analysprofil. Den här analysprofilen (.iap-fil) innehåller alla parametrar som behövs för cykling och analysering av qPCR-analysen. Den kan laddas ned från den särskilda webbsidan för *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet på QIAGENs webbplats: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Analysprofilen måste importeras till Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet.

Obs: *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet kan bara köras om vissa konfigurationsinställningar har gjorts i programmet Rotor-Gene AssayManager.

För en systemomfattande processsäkerhet måste följande obligatoriska konfigurationsinställningar göras för det stängda läget:

- "Material number required" (materialnummer krävs)
- "Valid expiry date required" (giltigt utgångsdatum krävs)
- "Lot number required" (lotnummer krävs)

Installation av Gamma-plugin-programmet och import av analysprofilen

Installation och import av Gamma-plugin-programmet och analysprofilen beskrivs i *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application) och i *Gamma Plug-in User Manual* (användarhandbok till Gamma-plugin-programmet).

- Ladda ned både Gamma-plugin-programmet och den senaste versionen av JAK2 CE-analysprofilen från QIAGENs webbplats.
- Starta installationsprocessen genom att dubbelklicka på filen RGAM_V2_1_Gamma_Plugin.Installation.V1_0_0.msi och sedan följa instruktionerna för installation. En detaljerad beskrivning av den här processen finns i avsnittet om installation av plugin-program i *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application).

Obs: För en systemomfattande processsäkerhet väljer du fliken "Settings" [Inställningar] och markerar kryssrutorna för "Material number required" [Materialnummer krävs], "Valid expiry date required" [Giltigt utgångsdatum krävs] och "Lot number required" [Lotnummer krävs] för det stängda läget (avsnittet Arbetslista). Markera kryssrutorna om de inte redan är markerade.
- När plugin-programmet har installerats måste en person med administratörsrättigheter för programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 importera ipsogen_JAK2_blood_CE-analysprofilen på följande sätt:
 1. Logga in i programmet Rotor-Gene AssayManager som administratör.
 2. Välj konfigurationsmiljön.
 3. Välj fliken "Assay Profiles" (analysprofiler).
 4. Klicka på knappen "Import" (importera).
 5. I dialogrutan väljer du analysprofilen ipsogen_JAK2_blood_CE som ska importeras och klickar på "Open" (öppna).
 6. När analysprofilen har importerats kan den användas i miljön "Setup" (installation).

Obs: Samma version av en analysprofil kan inte importeras två gånger.

Provbearbetning på Rotor-Gene Q MDx-instrument med rotor med 72 rör

Vi rekommenderar testning av åtta prover med genomiskt DNA i samma analys för att optimera användningen av kontroller, standarder och reaktionsmixar.

Tabell 2 anger antalet reaktioner som kan köras med rotorn med 72 rör.

I schemat nedan i Bild 3 finns ett exempel på konfiguration av laddningsblock eller rotor för ett experiment med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet.

Siffrorna markerar position i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Tabell 2. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q MDx-instrument med rotor med 72 rör

Prover	Antal reaktioner
Med JAK2 MT-reaktionsmix	
8 prover med genomiskt DNA	8
JAK2 MT Quant-standarder	4
JAK2 MT-kontroll (mutant)	1
JAK2 WT-kontroll (vildtyp)	1
Vatten för kontroll utan mall (NTC)	1
Med JAK2 WT-reaktionsmix	
8 prover med genomiskt DNA	8
JAK2 WT Quant-standarder (vildtyp)	4
JAK2 MT-kontroll (mutant)	1
JAK2 WT-kontroll (vildtyp)	1
Vatten för NTC	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	

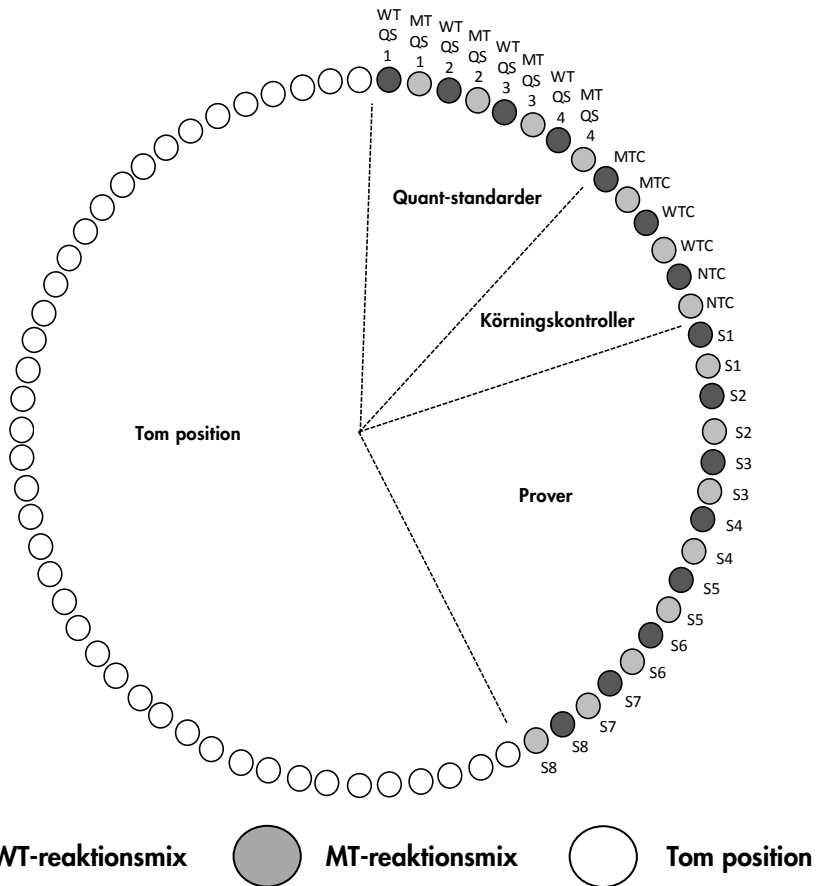


Bild 3. Platt- och rotorkonfiguration för en analys med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet. WTC: JAK2 WT-kontroll; MTC: JAK2 MT-kontroll; WT-QS: JAK2 WT-standarder; MT-QS: JAK2 MT Quant-standarder; S: prov med genomiskt DNA; NTC: kontroll utan mall (vatten).



Rören måste sättas in i rotorn enligt bild 3 eftersom inställningen för automatisk analys i analysprofilen är baserad på denna organisation. Om du använder en annan layout blir resultaten avvikande.

Obs: Fyll alla lediga positioner med tomma rör.

qPCR på Rotor-Gene Q MDx-instrument med rotor med 72 rör

1. Skapa en arbetslista för de prover som ska bearbetas på följande sätt.

- Slå på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
- Öppna programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 och logga in som användare med operatörsbehörighet i stängt läge.
- Klicka på knappen "New work list" (ny arbetslista) i work list manager ("Setup"-miljön).
- Välj "JAK2-CE assay profile" [JAK2-CE-analysprofil] i listan med tillgängliga analysprofiler i analyssteget.
- Klicka på knappen "Move" (flytta) för att överföra den valda analysprofilen till listan med "Selected assay profiles" (valda analysprofiler). Analysprofilen ska nu visas i listan "Selected assay profiles" (valda analysprofiler).
- Ange antalet prover i det motsvarande fältet.
- Ange följande information om JAK2-kitet som är tryckt på locket till förpackningen
 - Materialnummer: 1079182
 - Giltigt utgångsdatum
 - LotnummerAlternativt så kan streckkoden för kitet anges eller skannas.
- Välj steget "Samples" (prover). En lista med provinformation visas. Denna lista representerar den förväntade layouten för rotorn.
- Ange providentificeringsnumren i listan samt eventuell valfri provinformation som en kommentar för varje prov.
- Välj steget "Properties" (egenskaper) och ange ett namn på arbetslistan.
- Markera kryssrutan "is applicable" (är tillämplig).
- Spara arbetslistan.
- Arbetslistan kan skrivas ut, vilket kan vara till hjälp vid förberedelse och konfiguration av qPCR. Om du vill skriva ut arbetslistan trycker du på knappen "Print work list" (skriv ut arbetslista). Provinformationen inkluderas som en del av denna arbetslista.

Obs: Arbetslistan kan skapas när experimentet har ställts in på instrumentet, eller innan proverna sätts in i instrumentet eftersom filen med arbetslistan kan sparas.

2. Konfigurera qPCR-experimentet.

- Tina alla komponenter som behövs förutom Taq DNA-polymeraset, som måste förvaras i frysnär det inte används. Placera rören som innehåller komponenterna som ska tinas på is.
 - **Obs:** Låt inte upptiningstiden överstiga 30 minuter eftersom materialet då kan försämrast.
 - Rengör bänkytan som ska användas för beredning av PCR-mix för att säkerställa att mall- eller nukleaskontaminering undviks.
 - Blanda försiktigt genom att vända rören med standarder, kontroller och reaktionsmixar 10 gånger och centrifugera dem kort innan de används.
3. Bered följande qPCR-mixar enligt det antal prover som ska bearbetas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen på reaktionen.

I Tabell 3 och Tabell 4 beskrivs pipetteringsschemat för beredning av en MT- och en WT-reagensmix, beräknat för att uppnå slutliga reaktionsvolymen på 25 µl. Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel och för att möjliggöra 8 prover plus kontroller

Tabell 3. Beredning av qPCR-mixar för detektion av JAK2-mutantsekvens

Komponent	1 reaktion (µl)	15+1* reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
JAK2 MT-reaktionsmix	19,8	316,8	1x
Taq DNA-polymeras	0,2	3,2	1x
Prov (som ska läggas till i steg 4)	5	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	–

* En extra reaktionsvolym ingår som dödvolum.

Tabell 4. Preparation of qPCR mixes for JAK2 WT sequence detection

Komponent	1 reaktion (µl)	15+1* reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
JAK2 WT-reaktionsmix	19,8	316,8	1x
Taq DNA-polymeras	0,2	3,2	1x
Prov (som ska läggas till i steg 4)	5	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	–

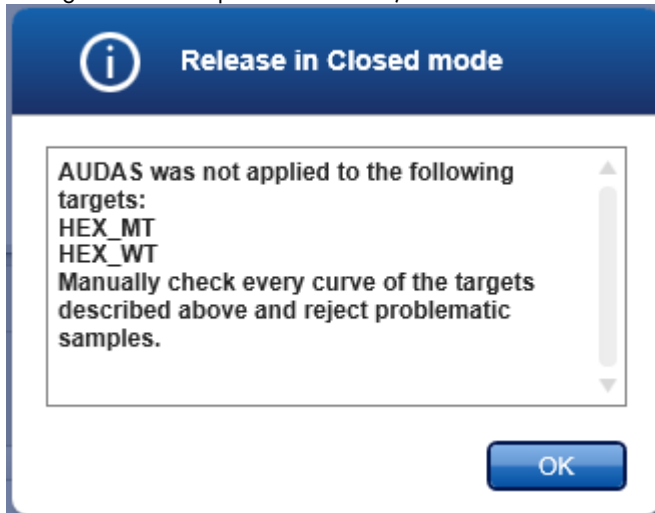
* En extra reaktionsvolym ingår som dödvolum.

- Vortexa och centrifugera en kort stund innan du fördelar 20 µl av qPCR-förmixen per rör.
 - Vortexa och centrifugera DNA en kort stund (prover med genomiskt DNA plus QS och kontroller). Tillsätt sedan 5 µl material som ska kvantifieras i motsvarande rör så att den totala volymen blir 25 µl. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
 - **Obs:** Var noga med att byta spets mellan varje rör så att du undviker eventuell ospecifik kontaminering från mall eller reaktionsmix, vilket leder till falskt positiva resultat.
 - Sätt tillbaka alla *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit-komponenter i frysen för att undvika att materialet försämrast.
4. Förbered Rotor-Gene Q MDx och starta körningen på följande sätt.
- Placera rotorn med 72 brunnar på rotorhållaren i Rotor-Gene Q MDx.

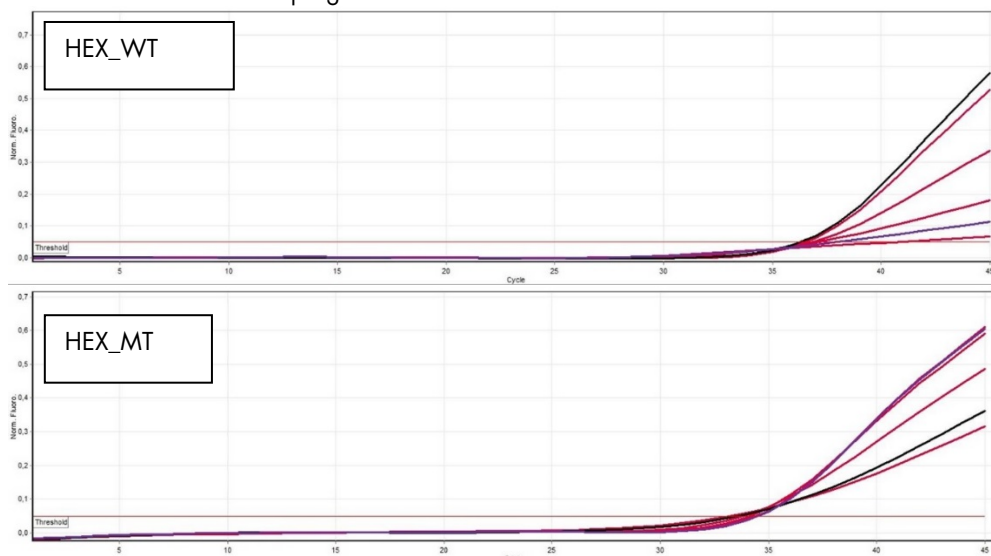
- Fyll rotorn med rör på remsa enligt deras tilldelade positioner, med början på position 1 enligt Bild 3, och med tomma förslutna rör på remsa i alla oanvända positioner.
Obs: Se till att det första röret sätts in på position 1 och att rören på remsa placeras i rätt riktning och på rätt positioner enligt Bild 3.
 - Sätt dit låsringen.
 - Ladda Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med rotorn och låsringen och stäng instrumentluckan.
 - I programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 väljer du antingen den motsvarande arbetslistan i work list manager eller klickar på knappen "Apply" (tillämpa) om arbetslistan fortfarande är öppen.
Obs: Om arbetslistan som är dedikerad till experimentet inte har skapats ännu loggar du in i Rotor-Gene AssayManager v2.1 och följer steg 2 innan du fortsätter enligt nedan.
 - Ange namnet på experimentet.
 - I "Cycler selection" (val av cykler) väljer du den cykler som ska användas.
 - Kontrollera att låsringen sitter fast på rätt sätt och bekräfta på skärmen att låsringen är fastsatt.
 - Klicka på knappen "Start run" (starta körning).
 - Körningen JAK2 RGQ PCR ska då starta.
5. Gör följande för att slutföra körningen.
- När körningen har slutförts klickar du på "Finish run" (slutför körning).
 - Visa/lås upp och godkänna körningen:
 - För användare som är inloggade med behörigheten Approver: Klicka på "Release and go to approval" (visa/lås upp och fortsätt till godkänna).
 - För användare som är inloggade med behörigheten Operator: Klicka på "Release" (visa/lås upp).

6. Visa/lås upp resultaten.

- Om du klickade på "Release and go to approval" (visa/lås upp och fortsätt till godkänna) visas resultaten för experimentet.
- Följande AUDAS-avisering (Automatisk Dataskanning) visas. Kontrollera HEX-målen manuellt i avsnittet "Ritytor och information" i rådatadiagrammen för avvikelser (t.ex. ökningar som beror på maskinvarufel).



Observera att diagrammen för HEX-målen för intern kontroll inte uppvisar typiskt sigmoidala former (som i exempeldiagrammen nedan) och måste anses som giltiga diagram. Observera även att alla övriga interna validitetskriterier (t.ex. C_T -brytfrekvenser) automatiskt kontrolleras av programvaran.



- Om en användare med behörighet som användare klickade på "Release" (visa/lås upp) måste någon med behörigheten "Approver" logga in och välja miljön "Approval".

- Filtrera fram analysen som ska godkännas genom att välja filteralternativ och klicka på knappen "Apply" (tillämpa).
- AUDAS-aviseringen (Automatisk Dataskanning) ovan visas. Kontrollera HEX-målen manuellt i avsnittet "Ritytor och information" i rådatadiagrammen för avvikelser (t.ex. ökningar som beror på maskinvarufel).
- Observera att diagrammen för HEX-målen för intern kontroll inte uppvisar typiskt sigmoidala former (som i exempeldiagrammen ovan) och måste anses som giltiga diagram. Observera även att alla övriga interna validitetskriterier (t.ex. C_T-brytfrekvenser) automatiskt kontrolleras av programvaran.
- Granska resultaten och klicka på knappen "Release/Report data" (visa/lås upp/rapportera data).
- Klicka på "OK". Rapporten genereras i .pdf-format och sparas automatiskt i den fördefinierade mappen.

Som standard är sökvägen till denna mapp:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Obs: Du kan välja en annan mapp i miljön "Configuration" (konfiguration).

Obs: För felsökning krävs ett supportpaket från körningen. Supportpaket kan genereras från miljön för godkännande eller arkivering (Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application (*Rotor-Gene AssayManager Core Application User Manual*), avsnittet "Troubleshooting", "Creating a support package"). Dessutom kan historiken från tiden för incidenten \pm 1 dag vara till god hjälp. Historiken finns i Service-miljön (Användarhandboken till Rotor-Gene AssayManager v2.1-huvudprogrammet (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*), avsnitt 1.5.5.5).

7. Ta ut materialet från Rotor-Gene Q MDx-instrumentet och kassera rören på remsa i enlighet med lokala säkerhetsföreskrifter.

Tolkning av resultat

Analysen är helt automatisk.

Rotor-Gene AssayManager v2.1* analyserar först amplifieringskurvorna, och kan ogiltigförklara avvikande kurvor beroende på deras form och brusamplitud. Om så är fallet associeras en flagga med den ogiltigförklarade kurvan.

Resultaten för testproverna analyseras och anges automatiskt av Rotor-Gene AssayManager v2.1, men måste godkännas och läsas upp av en användare med behörigheten "Approver" (godkännare). Provresultat som behöver godkännas har tre ytterligare knappar för godkännande i slutet av den dedikerade raden. Dessa knappar används till att acceptera eller avvisa provresultaten. Mer information finns i *Gamma Plug-in User Manual* (användarhandbok för Gamma-plugin-programmet).

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserar sedan körningskontrollerna:

- NTC kontrolleras avseende frånvaro av specifik amplifiering (JAK2 WT och JAK2 MT) och avseende närvaro av amplifiering av internkontrollen.
- WT och MT QS: Valideringen baseras på R^2 och lutningsvärdena för dessa båda.
- WTC: Det totala antalet JAK2-kopior (TCN) måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer procentandelen JAK2-mutation att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om den har statusen WT enligt testet.
- MTC: Det totala antalet JAK2-kopior måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer procentandelen JAK2-mutation att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om dess status är högt positiv för JAK2-mutationen.

Obs: Rapporten som genereras i slutet av körningen visar resultaten som erhållits med körningskontroller, med ogiltigförklarande flaggor framför ogiltiga data.

Om alla kontrollerna i körningen överensstämmer kommer Rotor-Gene AssayManager v2.1 att analysera de okända proverna.

- I provet måste det totala antalet kopior vara stort nog för att resultaten ska kunna tolkas. Procentandelen JAK2-mutation beräknas sedan och resultatet anges. Om ingen specifik amplifiering observeras i ett rör (antingen WT eller MT) så kontrolleras internkontrollens amplifiering för att vara säker på att detta inte är en artefakt. Minst ett C_T -värde måste

* Enbart aktiverat för FAM-mål.

observeras i varje rör (WT och MT) för att ett prov ska valideras av Rotor-Gene AssayManager v2.1 och för att motsvarande resultat ska vara giltigt.

Obs: Om både körningskontrollerna och provresultaten är giltiga visar rapporten antalet kopior och procentandelen mutation framför varje prov.

- I tabell 5 visas de ogiltigförklarande provflaggorna som kan tilldelas enskilda rör av Rotor-Gene AssayManager v2.1 under analysen, tillsammans med en förklaring av vad flaggan betyder.
- I Tabell 6 (page 36) visas de ogiltigförklarade provflaggorna och en förklaring av flaggornas betydelse.

Tabell 5. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer

Flagga	Beskrivning
ANALYSIS_FAILED	Analysen är ogiltig eftersom den misslyckades. Kontakta QIAGENs tekniska service.
ASSAY_INVALID	Analysen är ogiltig eftersom minst en extern kontroll är ogiltig.
CONSECUTIVE_FAULT	Ett mål som användes vid beräkningen av det här målet är ogiltigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Amplifieringskurvan med rådata visar en form som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat.
FLAT_BUMP	Amplifieringskurvan med rådata visar en form som liknar en vägbula med svag upphöjning som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat (t.ex. felbestämning av C _T -värde).
INVALID_CALCULATION	Beräkningen för det här målet misslyckades.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	Det detekterade C _T -värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen.
MC_IC_LOW_CT (WT)	Det detekterade C _T -värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen.
MC_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som mutantkontrollen med mutantreaktionsmixen.
MC_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som mutantkontrollen med vildtyp-reaktionsmixen.
MC_LOW_CN	Antalet kopior för mutantkontrollen är för lågt.
MC_LOW_PERCENTAGE	Procentandelen mutation för mutantkontrollen är för låg.
MC_NO_CN	Antal kopior saknas för mutantkontrollen.
MC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C _T -värde för mutantkontrollen med mutantreaktionsmix.
MC_NO_VALUE	Procentandelen mutation för mutantkontrollen saknar värde.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Amplifieringskurvan korsar tröskelvärdet mer än en gång. Ett entydigt C _T -värde kan inte bestämmas.
NO_BASELINE	Ingen initial baseline har hittats. Den efterföljande analysen kan inte utföras.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	Det detekterade C _T -värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med mutantreaktionsmix.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	Det detekterade C _T -värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med vildtyp-reaktionsmix.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som kontrollen utan mall med mutantreaktionsmix.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som kontrollen utan mall med vildtyp-reaktionsmix.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	Det detekterade C _T -värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med mutantreaktionsmix.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	Det detekterade C _T -värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som kontrollen utan mall med vildtyp-reaktionsmix.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C _T har detekterats i kontrollen utan mall.
OTHER_TARGET_INVALID	Ett annat mål för samma prov är ogiltigt.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Den beräknade koncentrationen för det här provet överstiger den tekniska gränsen.

Flagga	Beskrivning
QS_HIGH_SLOPE (MT)	Den övre gränsen för mutantlutningen har överstigits.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	Den övre gränsen för vildtyp-lutningen har överstigits.
QS_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som en eller flera av vildtyp-quantifieringsstandarderna.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Den nedre gränsen för mutantlutningen har inte uppfyllts.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Den nedre gränsen för vildtyp-lutningen har inte uppfyllts.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Den nedre gränsen för mutant-R ² har inte uppfyllts.
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Den nedre gränsen för vildtyp-R ² har inte uppfyllts.
QS_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C _T -värde för en eller flera av mutant-quantifieringsstandarderna.
QS_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C _T -värde för en eller flera av vildtyp-quantifieringsstandarderna.
RUN_FAILED	Analysen är ogiltig eftersom ett problem uppstått med cyklern eller cykleranslutningen.
RUN_STOPPED	Analysen är ogiltig eftersom körningen har stoppats manuellt.
SAMPLE_LOW_CN	Antalet kopior för ett testprov är för lågt.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	Det detekterade C _T -värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med mutantreaktionsmix.
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	Det detekterade C _T -värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med mutantreaktionsmix.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som ett testprov med mutantreaktionsmix.
SAMPLE_NO_CN	Inget antal kopior för ett testprov.
SAMPLE_NO_VALUE	Procentandelen mutation för ett testprov saknar värde.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	Det detekterade C _T -värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med vildtyp-reaktionsmix.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	Det detekterade C _T -värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som ett testprov med vildtyp-reaktionsmix.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som ett testprov med vildtyp-reaktionsmix.
SATURATION	Rådata för fluorescensen mätts kraftigt innan brytpunkten på amplifieringskurvan.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	En topp har detekterats i amplifieringskurvan nära C _T -värdet.
STEEP_BASELINE	En brant stigande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan.
STRONG_BASELINE_DIP	Ett kraftigt fall i baslinjen för rådata för fluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan.
STRONG_NOISE	Högt brus har detekterats utanför tillväxtfasen i amplifieringskurvan.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Högt brus har detekterats i tillväxtfasen (exponentiella fasen) i amplifieringskurvan.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	En vågliknande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Procentandelen mutation för vildtyp-kontrollen är för hög.

Flagga	Beskrivning
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	Det detekterade C _T -värdet är högre än förväntat för en internkontroll i samma rör som vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix.
WTC_IC_LOW_CT (MT)	Det detekterade C _T -värdet är lägre än förväntat för en internkontroll i samma rör som vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som vildtyp-kontrollen med mutantreaktionsmix.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C _T -värde för internkontrollen i samma rör som vildtyp-kontrollen med vildtyp-reaktionsmix.
WTC_LOW_CN	Antalet kopior för vildtyp-kontroll är för lågt.
WTC_NO_CT (WT)	Inget detekterbart C _T -värde för vildtyp-kontrollen med vildtyp-reaktionsmix.
WTC_NO_CN	Antal kopior saknas för vildtyp-kontrollen.
WTC_NO_VALUE	Procentandelen mutation för vildtyp-kontrollen saknar värde.

Tabell 6. Varningsprovflaggor och beskrivning av termer

Flagga	Beskrivning
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Ändringen av procentandel fluorescens för det här provet i förhållande till det provrör med störst fluorescensändring är lägre än en definierad gräns.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Reaktionseffektiviteten för det här provet har inte uppnått en definierad gräns.
SPIKE	En topp i rådatafluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan, men utanför det område där C _T bestäms.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vetenskapsmännen på QIAGENs tekniska support svarar gärna på dina frågor om information och protokoll i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation, se "Kontaktinformation", sidan 46).

Information om felsökning relaterat till extraktionskiten QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104) och QIASymphony DNA DSP Mini Kit (kat.nr 937236) finns i handböckerna till respektive kit.

Kommentarer och förslag

Automatisk extraktion

Prov flaggat som "unclear" (ej tydligt)	Detta kan bero på en paus under extraktionskörningen. Om extraktionskörningen slutförts, fortsätt till mätning av kvot och koncentration optisk densitet (OD). Om inte, upprepa extraktionskörningen.
Prov flaggat som "unprocessed" (ej bearbetat)	Detta beror på ett initialt fel i provvolymen. Verifiera blodvolymen genom pipettering. Om volymen är för låg, öka den så att provet är 300 µl och starta om körningen.
Prov flaggat som "invalid" (ej giltigt)	Ett fel uppstod under extraktionskörningen. Upprepa extraktionssteget för det här provet.
Temperaturfel vid nedkylningsblocket	Ett felmeddelande om nedkylningstemperaturen som visas i slutet av körningen innebär att proverna har förvarats i rumstemperatur (15–25 °C) från slutet av extraktionskörningen. Om proverna har förvarats i rumstemperatur mindre än 12 timmar ska kvaliteten på genomiskt DNA inte ha ändrats och genomiskt DNA kan kvantifieras. Om det gått längre tid än 12 timmar kan proverna med genomiskt DNA ha försämrats. Om så är fallet, upprepa extraktionen.
Fel vid borttagning av elueringsplattan	I slutet av körningen kan ett felmeddelande visas om elueringsplattan tagits bort utan att den aktuella åtgärden kontrollerats i fönstret. Detta kan åtgärdas genom att markera den aktuella kryssrutan.

Allmän hantering för bedömning av JAK2-mutationsstatus med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet

Totala antalet kopior överensstämmer inte och motsvarande prov är ogiltigt: amplifieringen är för låg

- | | |
|---|---|
| a) Kontrollera kvoten A_{260}/A_{280} | Om den är < 1,7 ska en ny DNA-extraktion utföras. |
| b) Kontrollera DNA-koncentrationen | <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR-kitet är optimerat för en koncentration på 10 ng/µl.
Om DNA-koncentrationen inte ligger på den nivån, diluera eller extrahera om DNA från helblod. |
| c) Om båda parametrarna överensstämmer kan pipetteringsvolymerna vara felaktiga | Kontrollera och kalibrera om pipetterna innan qPCR-steget upprepas. |

Kommentarer och förslag

Run Körningskontroll misslyckas på en QS-standard

- | | |
|------------------------------------|--|
| a) Felvänd flaska | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. |
| b) Felvändning under distribution | Förvara kitets innehåll i -30 till -15 °C och håll reaktionsmixarna skyddade mot ljus. |
| c) Korskontaminering | Undvik att tina och frysa upprepade gånger. |
| d) Standarden delvis försämrade | |
| e) PCR-reagenser delvis försämrade | |
| f) Icke-specifik amplifiering | |

Ingen eller låg signal för en standard

- | | |
|--|---|
| a) Distributionsproblem | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. |
| b) Användning av samma reaktionsmix för WT och MT QS | Upprepa PCR-körningen. |

Kontroll utan mall (NTC) för H₂O är positiv

- | | |
|-------------------------|--|
| a) Korskontaminering | Byt ut alla kritiska reagenser. |
| b) Reagenskontaminering | Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta. |
| c) Felvänt rör på remsa | Håll reaktionsmixarna skyddade mot ljus. |
| d) Prob försämrade | Leta efter falskt positivt resultat på fluorescenskurvan. |

Ingen signal, inte ens i standardkontroller

Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser

Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen.

Inga eller låga signaler i prover, men kontrollkörning ok

Effekter av hämmare i provmaterialet, orsakat av otillräcklig rening

Kontrollera alltid DNA-kvaliteten genom att mäta kvot och koncentration A_{260}/A_{280} innan start.
Upprepa beredning av DNA.

Vildtyp-kontroll (WTC) är positiv, men mutantkontroll (MTC) är inte tillräckligt positiv

Överföring av smitta

Byt ut alla kritiska reagenser.
Upprepa experimentet med nya portioner av alla reagenser.
Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta.
Se till att spetsarna byts mellan pipetteringar av olika reagenser.

Signalen för vildtyp-kontroll (WTC) eller mutantkontroll (MTC) använder rekiproka reaktionsmixar

- | | |
|-------------------------|---|
| a) Korskontaminering | Byt ut alla kritiska reagenser. |
| b) Reagenskontaminering | Upprepa experimentet med nya portioner av alla reagenser. |
| c) Felvänt rör | Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring av smitta.
Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. |

Inverterad detektion av positiv kontroll

- | | |
|--|---|
| a) Korskontaminering | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. |
| b) Omvänd distribution av reaktionsmix i rör eller i förmix. | |

Ingen signal för ett prov eller en kontroll, inte ens för internkontrollen

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) Reaktionsmix har inte lagts till | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Om internkontrollen inte är amplifierad har reaktionsmixen inte lagts till eller är försämrade. |
| b) Reaktionsmix försämrade | Upprepa qPCR-steget med ny reaktionsmix. |

Obs: Om problemet inte beror på någon av orsakerna ovan eller om föreslagna åtgärder inte löser problemet ska du kontakta QIAGENs tekniska support.

Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av hela kitet har utförts på ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Det här kitet är tillverkat enligt standarden ISO 13485:2012. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på www.qiagen.com/support/.

Begränsningar

Det här kitet är avsett för professionell användning.

Produkten är endast avsedd att användas av personal som fått särskild utbildning i molekylärbiologiteknik och är väl förtrogna med detta område.

Kitet ska användas i enlighet med instruktionerna i den här handboken, i kombination med ett validerat instrument som nämns i "Material som behövs men inte medföljer", sidan 10.

Var uppmärksam på de utgångsdatum som anges på förpackningens etikett. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

Alla reagenser som medföljer *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Om dessa riktlinjer inte följs kan prestandan påverkas.

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet är endast validerat för antikoagulerat helblod i kalium-EDTA från patienter med misstänkt MPN.

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet är endast validerat för användning med QIASymphony DNA DSP Mini Kit (kat.nr 937236) eller QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat.nr 61104).

ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet är endast validerat för användning med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (för PCR) och QIASymphony SP (för provberedning).

All användning av produkten tillsammans med andra märken och/eller ändring av komponenterna gör att QIAGENS garanti upphör att gälla.

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med resultat från andra kliniska studier och laboratoriestudier. Frånvaro av JAK2 V617F/ G1849T-mutation utesluter inte förekomst av andra JAK2-mutationer.

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENs egenskapsstudier.

Testets egenskaper

LOB (limit of blank)

Limit of blank (LOB) fastställdes enligt standarden CLSI/NCCLS EP17-2A på helblodsprover från friska blodgivare med en vildtyp-JAK2-status (30 prover, 120 mätningar/lot, 3 loter).

LOB-resultaten sammanfattas i Tabell 7.

Tabell 7. Sammanfattning av LOB-resultat

	Uppmätt limit of blank (LOB)	Slutlig limit of blank (LOB)
Validering lot 1	0 %	
Validering lot 2	0 %	0 %
Validering lot 3	0 %	

Detektionsgräns (LOD)

Detektionsgräns (limit of detection (LOD) eller analytisk sensitivitet) fastställdes baserat på den "Probit approach" som beskrivs i standarden CLSI/NCCLS EP17-2A. I den här studien analyserades 6 lågnivåmutationer för 3 oberoende prover (MPN-DNA från helblod spikat med vildtyp-DNA från helblod), med 3 loter, 60 mätningar per prov och per mutation. Resultaten som erhöles indikerade att den analytiska sensitiviteten var 0,042 % för JAK2 V617F-mutationen.

LOD-resultaten sammanfattas i Tabell 8.

Tabell 8. Sammanfattning av LOD-resultat

	Uppmätt detektionsgräns	Slutlig detektionsgräns
Validering lot 1	0,041 %	
Validering lot 2	0,029 %	0,042 %
Validering lot 3	0,042 %	

Linjäritet

Linjäriteten för kvantifieringen av JAK2-mutation hos MPN-patienter bedömdes enligt standarden CLSI/NCCLS EPO6AE, med en lot från *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet och med testning på 11 mutationsnivåer för 5 olika DNA-inputnivåer. Kvantifieringen av JAK2-mutationsbördan i MPN-prover är linjär, dvs. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet kan kvantifiera prover från LOD-värdet till 100 % mutation så länge som den kvantifierade provkoncentrationen ligger nära 10 ng/μl (mellan 5 och 20 ng/μl)

Repetierbarhet och reproducerbarhet

Precisionsstudien utfördes enligt standarden CLSI/NCCLS EP5-A2. Testning utfördes på 11 mutationsnivåer, varje nivå testades i duplikat på 54 körningar utförda under 27 dagar, vilket gav 108 mätningar per mutationsnivå. Resultaten sammanfattas i Tabell 9.

Tabell 9. Precisionsresultat

Prov	Medelvärde procentandel mutation JAK2	SD _{R+}	SD _{RUN++}	SD _{TOTAL+++}	CV _{TOTAL}
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+: Repeterbarhet.

RUN++: Reproducerbarhet mellan körningar.

TOTAL+++: Total precision (inklusive mellan instrument, mellan användare och mellan loter).

CV_{TOTAL}: Variationskoefficienten för total precision (% JAK2 MT).

Interfererande substanser

Studiens utformning baserades på rekommendationerna i NCCLS-standard EP7 A2 "Interference Testing in clinical Chemistry" (Interferenstest i klinisk kemi). Totalt 17 potentiellt förekommande substanser i blodprover valdes för sin potentiella effekt på PCR (busulfan, citalopramhydrobromid, paroxetinhydrokloridhemihydrat, sertralinhydroklorid, fluoxetinhydroklorid, acetaminofen (paracetamol), okonjurerat bilirubin, kalium-EDTA, Hgb (humant), triglycerider, lisinopriildihydrat,

hydroxyurea, acetylsalicylsyra, salicylsyra, tiotepa, anagrelid, interferon alpha 2b). Resultaten som erhöles visade ingen interfererande effekt för dessa substanser.

Klinisk utvärdering och metodjämförelse

En studie som inkluderade 65 kliniska MPN-blodprover utfördes på 2 franska kliniska center för att jämföra *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet med *ipsogen* JAK2 MutaQuant®-kitet från QIAGEN, vilket användes som referensmetod.

Totalt 65 MPN-blodprover frystes ned och tinades, varpå genomiskt DNA extraherades. Alla prover uppfyllde DNA-kvalitetskontrollerna för båda extraktionsmetoderna för genomiskt DNA.

De uppmätta procentvärdena för JAK2-mutationer från båda metoderna jämfördes med hjälp av Deming-regression. Det fanns en stark korrelation mellan referensmetoden och *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet för prover med JAK2-mutationer med 0 % till 95 % mutationsnivå ($R^2=0,969$), så som visas i Bild 4.

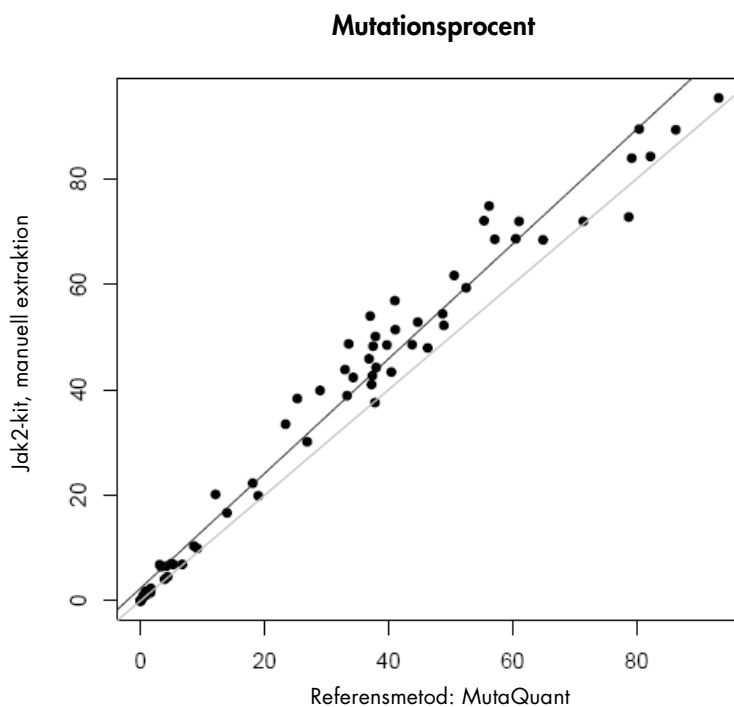


Bild 4. Diagram över mutationsprocentvärden för JAK2 V617F som erhöles med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet och en referensmetod för samma prover.

Mutationsprocentvärdena för JAK2 som erhöles med *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet var globalt högre än procentvärdena som erhöles med referensmetoden, vilket belyser den högre sensitiviteten hos detta nya kit (~ 1log) (9).

Referenser

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.

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> reaktioner



Används senast



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



GSI-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Skyddas mot ljus



Se bruksanvisningen



Varning

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Cat. no.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: Vildtyp JAK2-kontroll, JAK2 V617F-kontroll, JAK2 WT Quant-standarder, JAK2 MT Quant-standarder, JAK2 WT-reaktions-mix, JAK2 MT-reaktionsmix, Taq DNA-polymeras, TE-buffert för spädning, vatten för NTC	673623
Rotor-Gene Q MDx – för IVD-validerad realtids-PCR-analys i kliniska tillämpningar		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Programvara för rutintestning i kombination med Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Programvara med separat licens för installation på en dator	9025620
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml-rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör med lock för 10 000 reaktioner	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	För 50 beredningar: QIAamp Mini Spin-kolumner, buffertar, reagenser, rör, vakuumanslutningar	61104
QIASymphony DSP DNA Mini Kit	För 192 beredningar på vardera 200 µl: inkluderar 2 reagenskassetter och enzymrack och tillbehör	937236
QIASymphony SP och tillbehör		
QIASymphony SP System	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar installation och utbildning, 1 års garanti på delar och arbete	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar 1 års garanti på delar och arbete	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Provberedningspatroner med 8 brunnar för användning med QIASymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	8-stavarsskydd för användning med QIASymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Engångs-pipettspetsar med filter, i rack; (8 x 128). För användning med instrumenten QIAcube® och QIASymphony SP/AS	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Engångs-pipettspetsar med filter, i rack; (8 x 128). För användning med instrumenten QIASymphony SP/AS	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Icke-sterila polypropylenrör (0,85 ml maximal kapacitet, mindre än 0,7 ml förvaringskapacitet, 0,4 ml elueringskapacitet), 2 304 i ställ med 96, inkluderar lockremsor	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 enheter/ml, lösning)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml lyseringsbuffert för 1 000 beredningar	19076

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Den här produkten är avsedd för in vitro-diagnostisk användning. *ipsogen*-produkter får inte säljas vidare, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan föregående skriftligt medgivande från QIAGEN.

Informationen i det här dokumentet kan komma att ändras utan föregående meddelande. QIAGEN ansvarar inte för eventuella fel i detta dokument. Det här dokumentet förväntas vara fullständigt och korrekt vid tidpunkten för publicering. Under inga omständigheter ska QIAGEN hållas ansvarigt för oavsiktliga, särskilda, multipla eller påföljande skador som uppstår i samband med eller genom användning av det här dokumentet.

ipsogen-produkter uppfyller garanterat sina angivna specifikationer. QIAGENS enda skyldighet och kundens enda rättighet är begränsad till ersättning av produkter kostnadsfritt om produkterna inte fungerar som utlovat.

JAK2 V617F-mutationen och användningen därav skyddas av patenträttigheter, inklusive europeiska patent EP1692281, amerikanska patent 7,429,456 och 7,781,199, amerikanska patentansökningar US20090162849 och US20120066776 och utländska motsvarigheter.

Köpet av den här produkten medför inga rättigheter till användning vid kliniska prövningar för läkemedel innehållande JAK2V617F. QIAGEN utvecklar specifika licensprogram för sådana användningsområden. Kontakta gärna vår juridiska avdelning på jak2licenses@qiagen.com.

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

Avtal om begränsad licens

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet godkänner följande villkor:

1. *ipsogen* JAK2 RGQ PCR-kitet får endast användas i enlighet med *handboken till ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet* och endast med de komponenter som finns i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i *handboken till ipsogen JAK2 RGQ PCR-kitet* och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsägar sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kiten och/eller någon av deras komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

HB-1829-005 1107956 157038730 © 2017 QIAGEN, all rights reserved.

Beställningar www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com