

# Komplekti *ipsogen*<sup>®</sup> JAK2 MutaScreen Kit kasutusjuhend



10 (katalooginr 673022)



24 (katalooginr 673023)

1. versioon

**IVD**

Kvantitatiivne in vitro diagnostika

Ette nähtud kasutamiseks koos seadmetega Rotor-Gene<sup>®</sup> Q,  
Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> ja LightCycler<sup>®</sup>



**REF**

673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
SAKSAMAA

**R3**

**MAT**

1072500ET



## **QIAGEN-i proovivõtu- ja analüüsimeetodid**

QIAGEN pakub uuenduslikke ning kõrgetasemelisi proovivõtu- ja analüüsi-meetodeid, mis võimaldavad bioloogilisi proove isoleerida ja tuvastada. Meie kõrgetasemelised tooted ja teenused tagavad proovide ja tulemuste hea kvaliteedi.

### **QIAGEN tegeleb järgmiste valdkondadega:**

- DNA, RNA ja proteiinide puhastamine;
- nukleiinhappe ja proteiini analüüs;
- mikro-RNA uurimine ja RNA interferents;
- proovivõtu- ja analüüsimeetodite automatiseerimine.

Meie eesmärk on aidata teil saavutada edu ja läbimurdeid. Lisateabe saamiseks külastage veebilehte **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Sisukord

<b>Sihtotstarve</b>	<b>4</b>
<b>Ülevaade ja selgitus</b>	<b>4</b>
<b>Protseduuri põhimõtted</b>	<b>6</b>
<b>Kaasasolevad materjalid</b>	<b>8</b>
Komplekti sisu	8
<b>Vajalikud materjalid, mida kaasas pole</b>	<b>9</b>
<b>Hoiatused ja ettevaatusabinõud</b>	<b>10</b>
Üldised ettevaatusabinõud	10
<b>Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine</b>	<b>11</b>
<b>Protseduur</b>	<b>12</b>
Proovi DNA ettevalmistamine	12
Nukleiinhapete säilitamine	12
Protokollid	
■ qPCR koos 72 katsutiga rootoriga seadmetel Rotor Gene Q	12
■ qPCR seadmetel Applied Biosystems ja ABI PRISM	21
■ qPCR seadmel LightCycler 480	30
■ qPCR seadmel LightCycler 2.0	38
<b>Tulemuste tõlgendamine</b>	<b>43</b>
Graafilise esitamise ja kvaliteedikontrolli kriteerium	43
Normalisseritud FAM/VIC-suhtarvu arvutamine ja genotüpiseerimine	44
Tõrkeotsingujuhend	46
<b>Kvaliteedikontroll</b>	<b>48</b>
<b>Piirangud</b>	<b>48</b>
<b>Sooritusnäitajad</b>	<b>48</b>
Mittekliinilised uuringud	48
Kliinilised uuringud	49
<b>Viited</b>	<b>55</b>
<b>Tähised</b>	<b>56</b>
<b>Kontaktteave</b>	<b>56</b>
<b>Tellimisteave</b>	<b>57</b>

## Sihtotstarve

Komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit on ette nähtud genoomse DNA mutatsiooni JAK2 V617F/G1849T tuvastamiseks patsientidel, kelle puhul kahtlustatakse müeloproliferatiivse kasvaja olemasolu. Mutatsiooni JAK2 V617F/G1849T puudumine ei välista muid JAK2 mutatsioone. Test võib anda väärnegatiivseid tulemusi, kui koodonites 615–619 (1) leidub muid mutatsioone.

**Märkus.** Komplekti tuleks kasutada vastavalt käesolevas juhendis toodud juhistele ning koos valideeritud reaktiivide ja seadmetega. Toote raviskeemiväline kasutus ja/või komponentide muutmine vabastab QIAGEN-i vastutusest.

## Ülevaade ja selgitus

Aastal 2005 (2–5) tuvastati Janus-türosiin-kinaasi 2 (JAK2) geeni mõjutav korduv somaatiline mutatsioon V617F. Tänu sellele toimus tohutu läbimurre müeloproliferatiivsete kasvajate (MPN) mõistmises, klassifikatsioonis ja diagnoosimises. JAK2 on mitme tsütokiini (sh erütropoetiini) kriitiline intratsellulaarne signaalmolekul.

Mutatsioon JAK2 V617F tuvastatakse tõelise polütsüteemiaga (PV) patsientidel >95% juhtudest, essentsiaalse trombotsüteemiaga (ET) patsientidel 50–60% juhtudest ning primaarse müelofibroosiga (PMF) patsientidel 50% juhtudest. JAK2 V617F on tuvastatud ka mõne harva kroonilise müelomonotsüütilise leukeemia, müelodüsplastilise sündroomi, süsteemse mastotsütoosi ja kroonilise neutrofiilse leukeemia puhul, kuid kroonilise müeloidse leukeemia (CML) puhul (6) on see tuvastatud 0% juhtudest.

Mutatsioon vastab JAK2 nukleotiidi 1849 eksonis 14 toimunud ühe nukleotiidi muutusele, mille tulemuseks on unikaalse valiini (V) asendumine fenüülalaniiniga (F) proteiini (JH2 ala) asendis 617. See võib viia JAK2 konstitutiivse aktiveerimiseni, vereloome transformatsioonini *in vitro* ja erütropoetiinist sõltumatu erütroidkoloonia (EEC) kasvuni kõigil PV-ga patsientidel ning paljudel ET ja PMF-iga patsientidel (7). JAK2 V617F on MPN-i puhul vereloomerakkude transformatsiooni põhitegur, kuid samasuguse unikaalse mutatsiooniga eri kliiniliste ja bioloogiliste üksusteni viivaid täpseid patoloogilisi mehhanisme pole välja selgitatud.

Tavaliselt põhineb MPN-i diagnoos kliinilisel luuüdi histoloogial ja tsütogeneetilisel kriteeriumil. Haigusepõhise molekulaarmarkeri avastamine lihtsustas protsessi ja suurendas diagnostika täpsust. Mutatsiooni JAK2 V617F tuvastamine on nüüd osa geeni BCR-ABL negatiivse MPN-i (tabel 1) diagnoosi kriteeriumist viite WHO 2008 järgi ning selle mutatsiooni olemasolu on diagnostilise kinnituse tähtis kriteerium.

**Tabel 1. WHO kriteerium MPN-i diagnoosimiseks (kohandatud 8. viite järgi)**

Tõelise polütsüteemia (PV) diagnoosimise kriteerium	
Peamine	<p>1. Hemoglobiin (Hgb) <math>&gt;18,5 \text{ g/dl}^{-1}</math> (mehed) või <math>&gt;16,5 \text{ g/dl}^{-1}</math> (naised) või  Hgb või hematokrit (Hct) <math>&gt;99\%</math> vanuse, soo või elukoha kõrguse viitevahemikus või  Hgb <math>&gt;17 \text{ g/dl}^{-1}</math> (mehed) või <math>&gt;15 \text{ g/dl}^{-1}</math> (naised), kui seda seostatakse püsiva <math>\geq 2 \text{ g/dl}^{-1}</math> suuruse kasvuga (võrreldes algse väärtusega), mis ei saa tuleneda rauapuuduse parandamisest, või  ennustatud väärtusest <math>&gt;25\%</math> suurem punaliblede hulk</p> <p>2. Mutatsiooni <i>JAK2V617F</i> või sarnase mutatsiooni olemasolu</p>
Lisa	<p>1. Luuüdi kolmerealine müeloproliferatsioon  2. Alanormaalse seerumi erütropoetiini tase  3. Endogeense erütroidkoonia (EEC) kasv</p>
Essentsiaalse trombotsüteemia (ET) diagnoosimise kriteerium	
Peamine	<p>1. Trombotsüütide arv <math>\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}</math>  2. Suure ja küpse morfoloogiaga megakarüotsüüdi proliferatsioon; granülotsüütide või erütroidproliferatsiooni vähesus või puudumine  3. Mittevastavus WHO kriteeriumitele, mis on määratud kroonilise müeloidse leukeemia (CML), primaarse müelofibroosi (PMF), müelodüsplastilise sündroomi (MDS) või muu müeloidse kasvaja jaoks</p> <p>4. <i>JAK2V617F</i> või muu klonaalmarker või reaktiivsete trombotsüütide esinemise puudumine</p>
Lisa	-
Primaarse müelofibroosi (PMF) diagnoosimise kriteerium	
Peamine	<p>1. Megakarüotsüüdi proliferatsioon ja ebatüüpilisus koos retikuliini ja/või kollageeni fibroosiga või retikuliini fibroosi puudumise korral megakarüotsüüdi muutuste kaasnemine, üdi rakkude hulga suurenemine, granülotsütaarne proliferatsioon ja sageli suurenenud erütropoees (nt eelfibroosne PMF)  2. Ei vasta WHO kriteeriumile, mis on esitatud CML-i, PV, MDS-i kohta, või muu müeloidne kasvaja</p> <p>3. <i>JAK2V617F</i> või muu klonaalmarker või reaktiivsete üdifibrooside esinemise puudumine</p>
Lisa	<p>1. Leukoerütroblastoos  2. Suurenenud seerumi laktaadi dehüdrogenaas (LDH)  3. Aneemia  4. Palpeeritav splenomegalia</p>

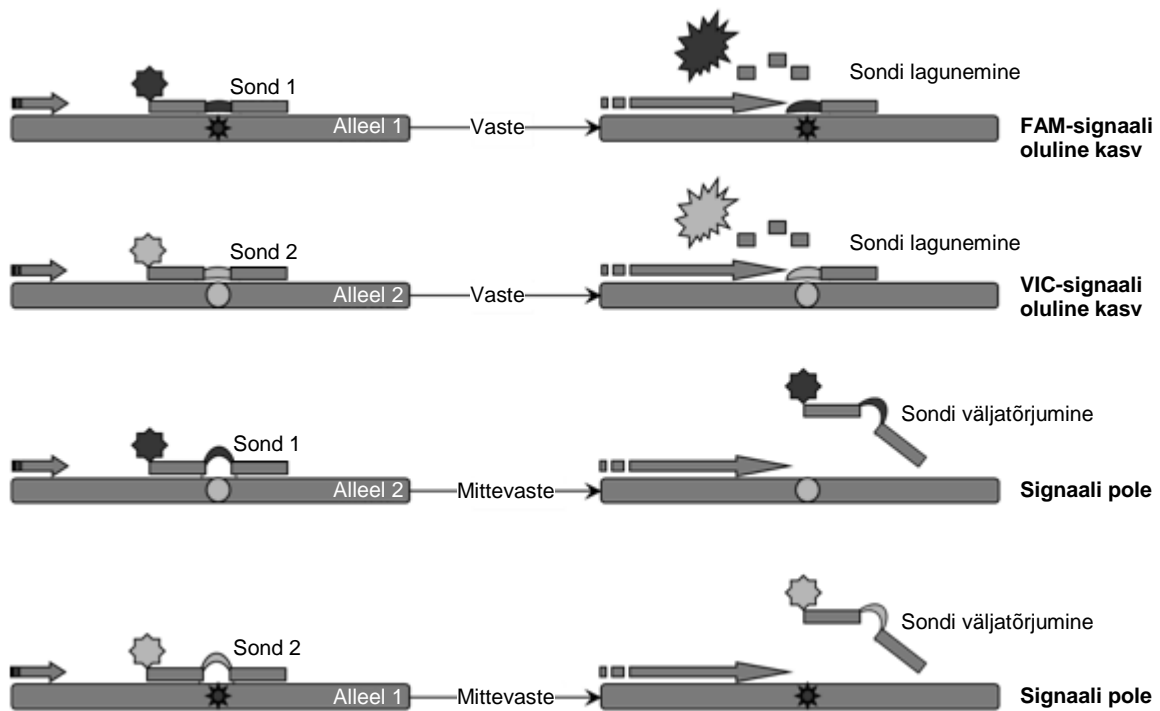
Rahvusvahelised eksperdid pakkusid hiljuti välja kriteeriumi PV ja ET terapeutiliste katsete jaoks. Vastavalt allografti, alfainterferooni või hüdroksüurea andmetele on võimalik mutatsiooni JAK2V617F kvantifitseerimine kui ravile reageerimise jälgimiseks potentsiaalselt kasulik tööriist (9). Leiti, et mõnele uuele anti-JAK2 sihtivale ravimile reageerimise tulemusena vähenes mutatsiooni JAK2 V617F hulk (10).

## Protseduuri põhimõtted

Alleelide välistamisanalüüsis kasutatakse kompleksse analüüsi tarvis kahte TaqMan<sup>®</sup>-i sondi. Üks on alleeli 2 järgnevuse (nt metsiktüüpi alleel) täpne vaste ning teine alleeli 1 järgnevuse (nt mutatsiooniga alleel) täpne vaste. Iga sond on 5'-otsas ehk reporteris (nt FAM<sup>™</sup> või VIC<sup>®</sup>) fluorestsentsvärviga märgistatud ning sisaldab 3'-otsas mittefluorestsentsvärvilist kustutusvärvi. Sandid sisaldavad ka Minor Groove Binderit (MGB<sup>™</sup>), mis võimaldab lühemaid sonde kasutada stabiilsemalt ja tagab seega täpsema alleelide välistamise.

PCR-i laiendamisfaasi käigus lõhustab *Taq* DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasiaktiivsus täpse vaste sondi, eraldades reportervärvi kustutusvärvist ning vabastades nii tuvastatava fluorestsentsvärvi. Mittetäpse vaste sond tõrjutakse välja, *Taq*-i DNA polümeraas ei lõhusta seda ning reportervärv ei vabane. Tekkinud fluorestsentsignaali (VIC või FAM) kogutakse PCR-i lõpus (lõpp-punktis) kokku ning see viitab kohe näidises (metsikut tüüpi alleel, muteerunud alleel või mõlemad) sihtjärjestus(t)e olemasolule ilma pikkade ja vaevanõudvate PCR-i järeltoiminguteta, mis võivad saastumise riski suurendada. Sihtjärjestuse tegelik kvantiteet ei ole kindlaks määratud.

Komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit kasutab seda tehnoloogiat illustratsioonil näidatud viisil (vt Joonis 1).



**Joonis 1. TaqMan-i sondi kompleksne analüüs.** Komplekt *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* kasutab seda tehnoloogiat alleelide välistamiseks.

## Kaasasolevad materjalid

### Komplekti sisu

<b><i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i></b> <b>(komplekt <i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i>)</b>		<b>(10)</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalooginr</b>		<b>673022</b>	<b>673023</b>
<b>Reaktsioonide arv</b>		<b>24</b>	<b>10</b>
V617F Positive Control (positiivne kontroll)*	PC-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control <sup>†</sup> (negatiivne kontroll)	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample (proovi piirväärtus)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix JAK2 V617F <sup>‡</sup> (praimerite ja sondide segu)	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
<i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit Handbook</i> (komplekti <i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i> kasutusjuhend (inglise keeles))		1	1

\* Positiivne kontroll: 100% V617F DNA.

<sup>†</sup> Negatiivne kontroll: 100% metsikut tüüpi DNA; 0% V617F.

<sup>‡</sup> *JAK2* geeni kindlate äraspidiste ja päripidiste praimerite segu, kindel V617F FAM-sond ja metsikut tüüpi VIC-sond.

**Märkus.** Tsentrifuugige katsuteid õrnalt enne kasutamist.

**Märkus.** Komplekti *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* abil tundmatute näidiste analüüsimiseks on vaja genoomne DNA ekstraheerida. DNA ekstraheerimiseks vajalikud reaktiivid (nt QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, kategoorianr 51304) ei ole komplektis kaasas ja need tuleb valideerida koos komplektiga.



## Vajalikud materjalid, mida kaasas pole

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge toote tarnija pakutava vastava ohutuskaardiga (SDS).

### Reaktiivid

- Nukleaasivaba PCR Grade Water
- Nukleaasivaba 1x TE puhver, pH 8,0 (nt Thermo Fisher Scientific Inc., kategoorianr 12090015)
- Puhver ja *Taq*-i DNA polümeraas: valideeritud reaktiivid on TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., kategoorianr 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kategoorianr 04535286001)
- 0,8–1% agarosgeeli reaktiivid 0,5x TBE elektroforeespuhvr

### Materjalid

- Nukleaasivabad aerosoolikindlad steriilsed PCR-pipetiotsikud ja hüdrofoobsed filtrid
- 0,5 ml või 0,2 ml RNAasi- ja DNAasivabad PCR-katsutid
- Jää

### Seadmed

- PCR-i jaoks loodud pipetid\* (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Lauatsentrifuug\* koos rootoriga 0,2 ml / 0,5 ml reaktsioonikatsutite jaoks (vajalik kiirus 10 000 p/min)
- DNA koguse määramiseks spektrofotomeeter
- Reaalajas PCR-seade\*: Rotor-Gene Q 5plex HRM või muu Rotor-Gene'i seade; LightCycler 2.0 või 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS või ABI PRISM 7900HT SDS ja seotud spetsiifiline materjal
- Pulsivälja geeli elektroforeesi varustus\*

\* Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja vastavalt tootja soovitudele kalibreeritud.

# Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Kasutamiseks in vitro diagnostikas

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge vastava ohutuskaardiga (SDS). Need on saadaval mugavas ja kompaktses PDF-vormingus veebiaadressil [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Seal saate vaadata kõiki QIAGEN-i komplekti ja selle osade ohutuskaarte ning need välja printida.

Hävitage proovivõtu- ja analüüsijäätmed vastavalt kohalikele ohutusnõuetele.

## Üldised ettevaatusabinõud

qPCR-testide jaoks on vaja häid laboritingimusi, sealhulgas tuleb hooldada molekulaarbioloogias kasutatavat varustust, mis vastab kehtivatele eeskirjadele ja asjakohastele standarditele.

Komplekt on ette nähtud kasutamiseks in vitro diagnostikas. Selle komplektiga kaasas olevad reaktiivid ja juhendid on optimaalseks kasutuseks valideeritud. Reaktiivide edasise lahjendamise või inkubeerimisaegade ja temperatuuride muutmise tagajärjel võivad admed olla vigased või neis võib esineda lahknepuusi. PPM-VF reaktiiv võib päikesevalguse käes muutuda. Kõik reaktiivid on loodud spetsiaalselt selle testiga kasutamiseks. Testi optimaalseks toimimiseks ei tohiks midagi asendada.

Olge eriti ettevaatlik, et vältida järgmist:

- DNAasi saastumist, mis võib põhjustada DNA-malli lagunemist;
- DNA või PCR-i ülekande saastumist, mis põhjustab väärpositiivse signaali.

Ülaltoodu vältimiseks soovitame järgmist.

- Kasutage nukleasivabu laboritarvikuid (nt pipette, pipetiotsikuid, reaktsiooniviaale) ning kandke analüüsi tegemise ajal kindaid.
- Kasutage uusi aerosoolikindlaid pipetiotsikuid iga pipeteerimistoimingu jaoks, et vältida proovide ja reaktiivide ristsaastumist.
- Valmistage vastavate vahendite (pipettide, otsade jms) abil ette eel-PCR-põhisegu selleks ette nähtud alas, kus pole DNA maatrikseid (DNA, plasmiid). Lisage mall eraldi tsooni (eelistatavalt eraldi ruumi) spetsiaalse vahendi (pipett, ots vms) abil.

## Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine

Komplektid tarnitakse kuivjäässe pakituna ja need tuleb kättesaamisel säilitada –30 °C kuni –15 °C juures.

- Kaitske praimereid ja sondide segusid (PPM-VF katsuti) valgusega kokkupuute eest.
- Enne avamist segage ja tsentrifugeerige katsuteid õrnalt.
- Hoidke komplekti kõiki osi algpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui ka avamata osadele. Siltidel märgitudest erinevatel tingimustel säilitatud komponendid ei pruugi õigesti töötada ja võivad mõjutada analüüsitulemusi.

Iga reaktiivi kõlblikusaeg on märgitud vastava komponendi sildil. Õigete säilitustingimuste juures on toode töökorras kuni sildile kantud kõlblikusaja lõpuni.

Pole ühtki märki, mis viitaks toote ebastabiilsusele. Küll aga tuleks positiivseid ja negatiivseid kontrole teha koos tundmatute proovidega.

# Protseduur

## Proovi DNA ettevalmistamine

Genoomne DNA tuleb võtta kas täisverest, puhastatud perifeerse vere lümfotsüütidest, mitmetuumsetest rakkudest või granülotsüütidest. Tulemuste võrdlemiseks soovitame kasutada sama rakufraktsiooni ja DNA ekstraheerimismeetodit. DNA ekstraheerimine tuleks teostada mis tahes tava- või kommertsmeetodi alusel.

DNA hulga määramiseks mõõdetakse optiline sügavus 260 nm juures. DNA kvaliteedi kindlaks tegemiseks kasutatakse spektromeetrit või geelelektroforeesi.

$A_{260}/A_{280}$  määr peaks olema 1,7–1,9. Väiksem vahemik viitab tavaliselt proteiini või orgaaniliste kemikaalide saastele. Elektroforeesanalüüs, kus kasutatakse 0,8–1% agarosgeeli, peab võimaldama eraldatud DNA visualiseerimist 20 kb eraldi ribana. Kerge laialivalgumine on lubatud.

Tulemuseks saadud DNA lahjendatakse 5 ng/μl tasemele TE puhvril. qPCR-reaktsioon optimeeritakse 25 ng puhastatud genoomse DNA jaoks.

## Nukleiinhapete säilitamine

Lühiajaliseks (kuni 24 tunniseks) säilitamiseks soovitame puhastatud nukleiinhappeid talletada temperatuuril 2–8 °C. Pikaajaliseks (üle 24 tunniseks) säilitamiseks on soovitatav säilitamistemperatuur –20 °C.

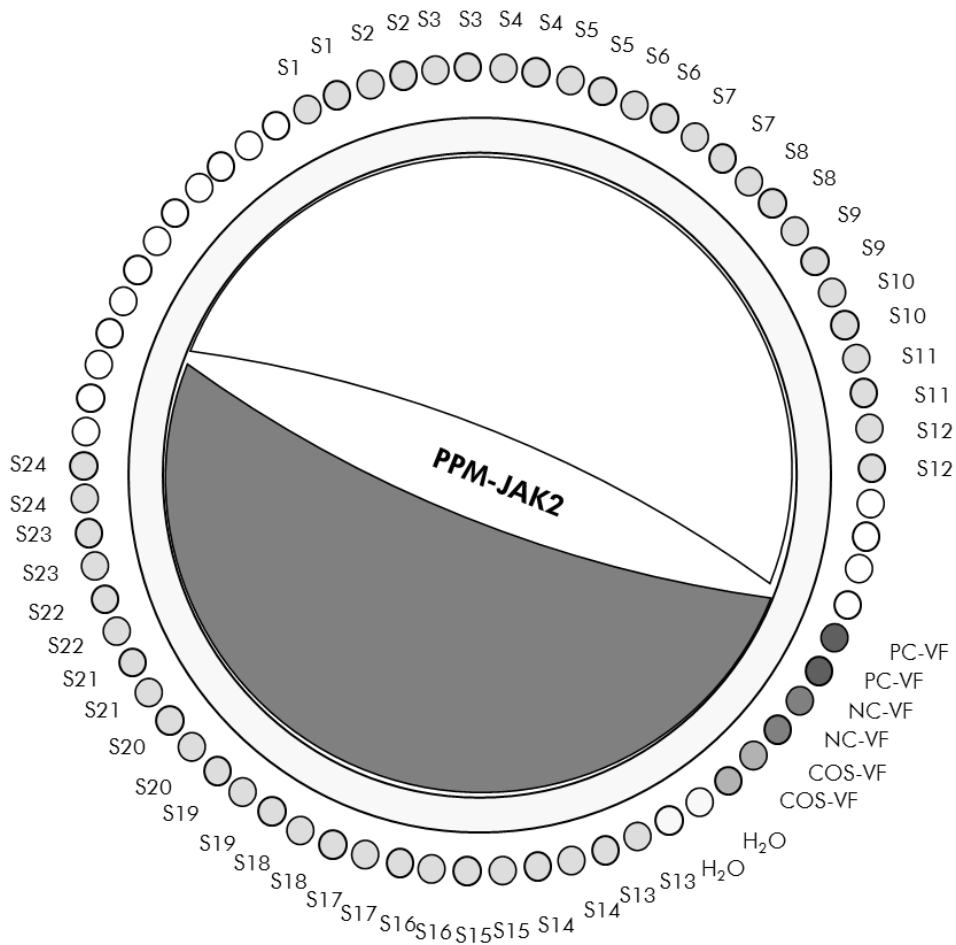
## Protokoll: qPCR koos 72 katsutiga rootoriga seadmetel Rotor Gene Q

Selle seadme kasutamisel soovitame kõiki mõõtmisi teha kaks korda (vt tabel 2).

**Tabel 2. 72 katsutiga rootoriga seadmete Rotor Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor Gene Q 5plex HRM reaktsioonide arv**

Proovid	Reaktsioonid
<b>JAK2 V617F praimerite ja sondide segu (PPM-VF) (56 reaktsiooni)</b>	
24 DNA proovi	24 x 2 reaktsiooni
3 DNA kontrolli	3 x 2 reaktsiooni (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, igaüht testiti kaks korda)
Veekontroll	2 reaktsiooni

## Proovi töötlemine 72 katsutiga rootoriga seadmetel Rotor Gene Q



**Joonis 2. Soovitatav rootori seadistus komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit testimiseks. PC-VF: positiivne kontroll; NC-VF: negatiivne kontroll; COS-VF: proovi piirväärtus; S: DNA proov; H<sub>2</sub>O: veekontroll.**

**Märkus.** Asetage testitav proov alati rootori asukohta 1. Vastasel juhul ei teosta seade kalibreerimist ning saadakse valed fluorestsentsandmed.

Täitke kõik muud asukohad tühjade katsutitega.

### qPCR 72 katsutiga rootoriga seadmetel Rotor Gene Q

**Märkus.** Tehke kõiki toiminguid jää abil.

#### Protseduur

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.**  
Komponendid tuleb sügavkülmikust välja võtta umbes 10 min enne protseduuri algust.
- 2. Segage vibratsiooniseadistiga ja tsentrifuugige õrnalt kõiki katsuteid (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).**

### 3. Valmistage töödeldavate proovide arvu põhjal järgnev qPCR-segu.

Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabel 3 kirjeldab ühe reaktiivi segu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, mis on arvutatud reaktiivi 25 µl suuruse lõppkoguse saavutamiseks.

Vastavalt reaktiivide arvule saab sama praimeri ja sondi seguga valmistada eelsegu. Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Rotor-Gene'i seadmete puhul saab komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit abil analüüsida ühe eksperimendi käigus 24 proovi kahes eksemplaris (joonis 2), kahe eksperimendi käigus 20 proovi kahes eksemplaris või kolme eksperimendi käigus 15 proovi kahes eksemplaris.

**Tabel 3. qPCR-segu ettevalmistamine**

Komponent	Reaktsioonide arv (µl)				Lõppkontsentratsioon
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR-i põhisegu, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Praimerite ja sondide segu, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Nukleaasivaba PCR Grade Water	5	285	145	95	–
Proov (lisatakse 5. toimingus)	5	igaüks 5	igaüks 5	igaüks 5	–
Lõppkogus	25	igaüks 25	igaüks 25	igaüks 25	–

\* 24 proovi; 1 eksperiment/komplekt.

† 10 proovi; 2 eksperimenti/komplekt.

‡ 5 proovi; 3 eksperimenti/komplekt.

### 4. Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige qPCR-segu ettevaatlikult (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).

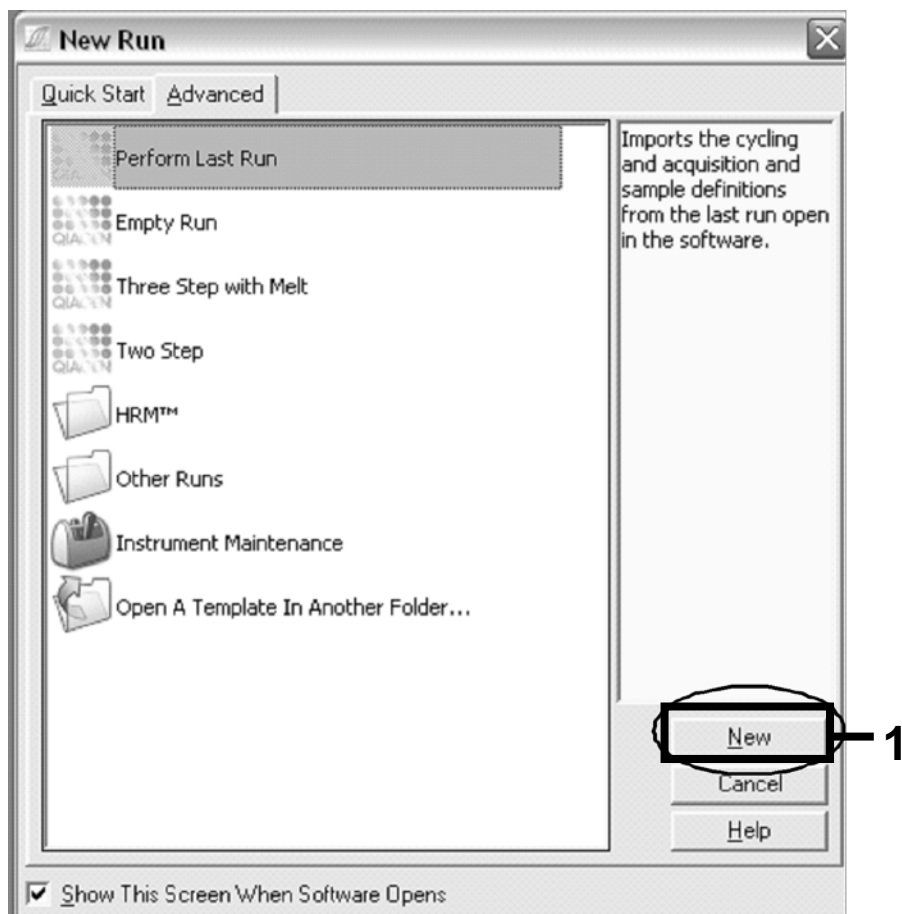
### 5. Jagage igasse katsutisse 20 µl qPCR-eelsegu.

6. Lisage vastavasse katsutisse 5 µl proovi DNA materjali või kontrolli (kokku 25 µl).
7. Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.
8. Sulgege PCR-katsutid. Asetage katsutid vastavalt tootja soovitudele 72 katsutiga rootorisse. Täitke kõik muud asukohad tühjade katsutitega.
9. Veenduge, et lukustusrõngas (Rotor-Gene'i seadme tarvik) asub rootori peal, et vältida katsutite avanemist töö ajal. Asetage rootor vastavalt tootja soovitudele Rotor-Gene Q seadmesse.
10. JAK2 DNA tuvastamiseks looge järgmiste juhiste abil temperatuuriprofiil.

<b>Üldiste analüüsiparameetrite seadmine</b>	<b>Joonis 3 ja 4</b>
<b>DNA amplifikatsioon</b>	<b>Joonis 5</b>
<b>Fluorestsentskanali tundlikkuse kohandamine</b>	<b>Joonis 6</b>

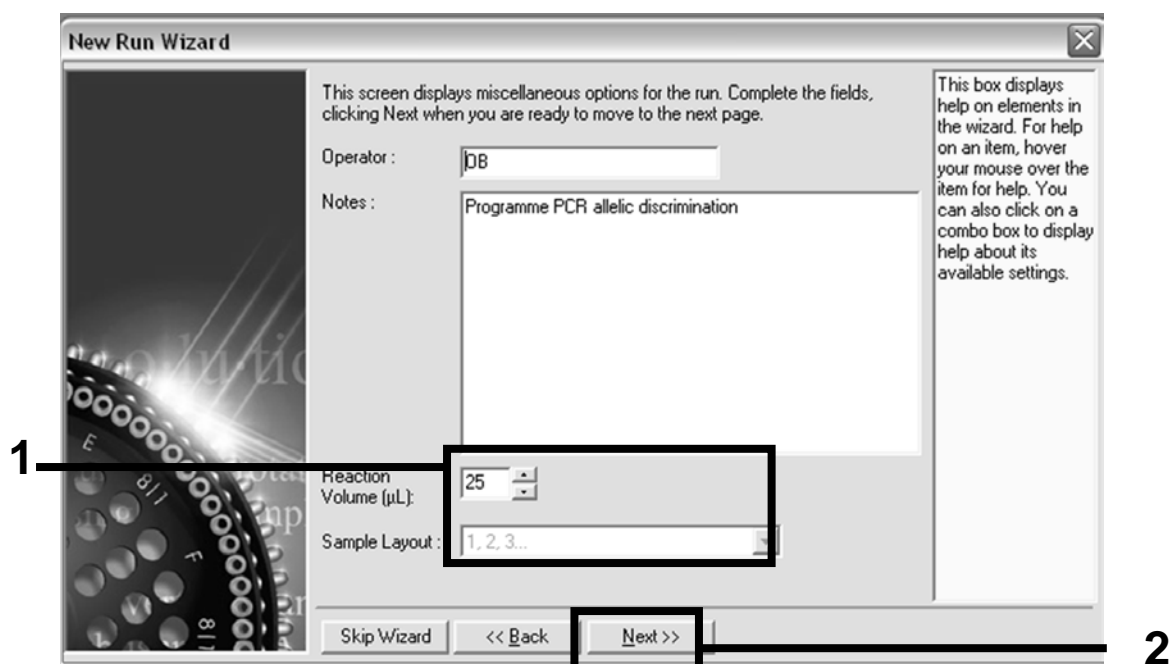
Lisateavet Rotor-Gene'i seadmete programmeerimise kohta leiate seadme kasutusjuhendist. Illustratsioonides on tarkvara sätted paksu musta raamiga esile toodud. Illustratsioonid on Rotor-Gene Q seadmetega kaasas.

11. Käivitage Rotor-Gene'i tarkvara. Klõpsake dialoogiboksis New Run (Uus tööseria) nuppu New (Uus).



Joonis 3. Dialogiboks New Run (Uus tööseeria).

## 12. Seadke viisardis New Run Wizard (Uue tööseeria viisard) koguseks 25 µl ja klõpsake nuppu Next (Edasi).



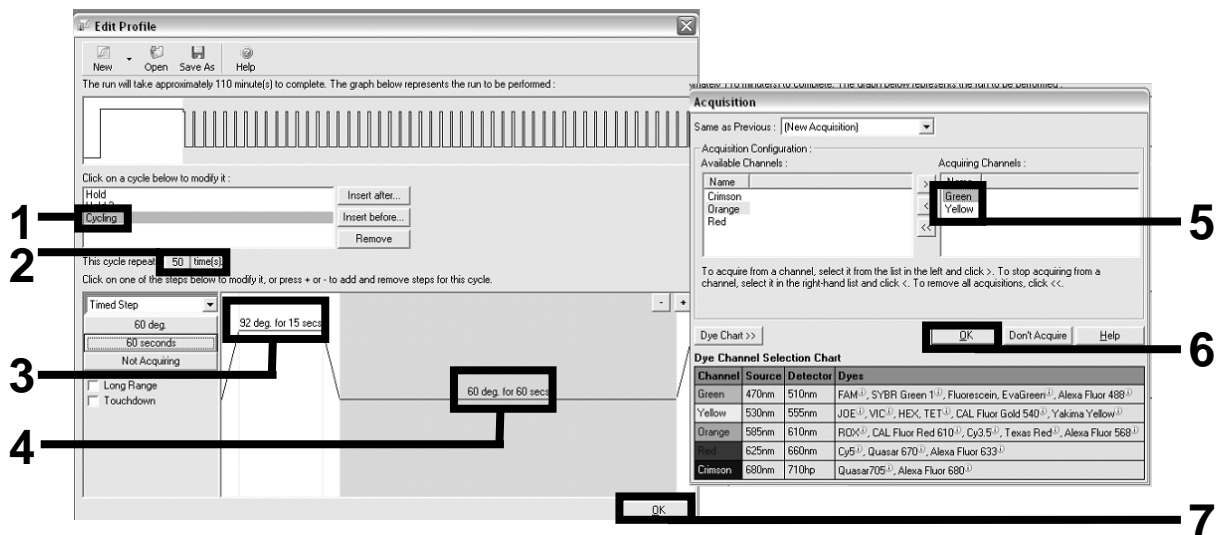
Joonis 4. Üldiste analüüsiparameetrite seadmine.



13. Klõpsake dialoogiboksis New Run Wizard (Uue tööseeria viisard) nuppu Edit Profile (Redigeeri profiili) ning programmeerige temperatuuriprofiil tabelis 4 ja joonisel 5 kirjeldatud juhiste järgi. Lisage kindlasti iga tsükli kanalitele Green (FAM) (Roheline (FAM)) ja Yellow (VIC) (Kollane (VIC)) viimane mõõtmine temperatuuril 60 °C.

Tabel 4. Temperatuuriprofiil

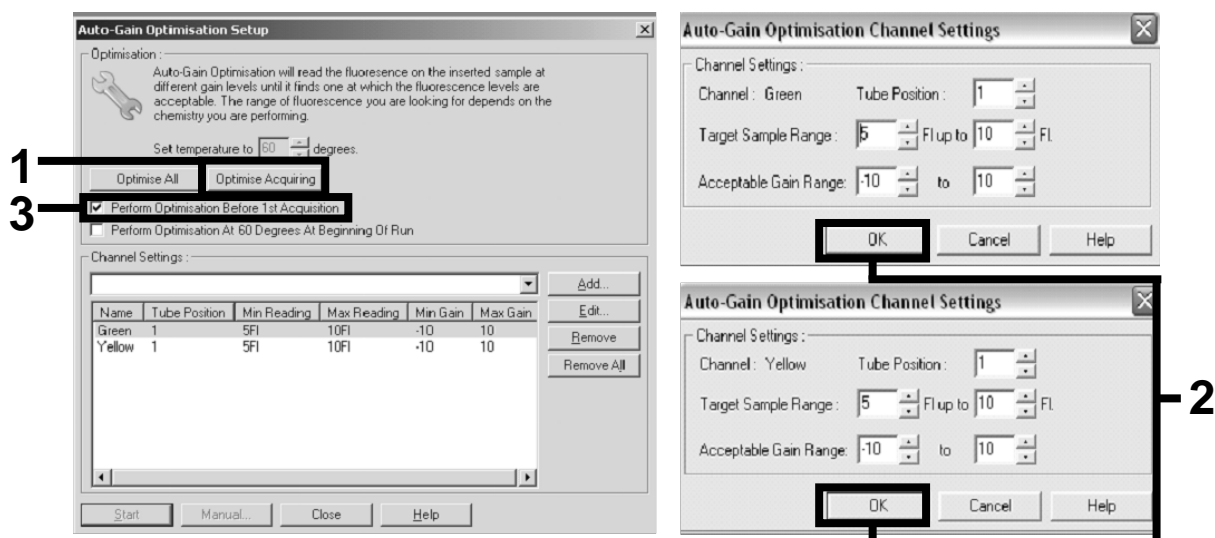
<b>Hold (Hoidmine)</b>	Temperatuur: 50 kraadi Aeg: 2 min
<b>Hold 2 (2. hoidmine)</b>	Temperatuur: 95 kraadi Aeg: 10 min
<b>Cycling (Tsükkel)</b>	50 korda 92 kraadi 15 s 60 kraadi 1 min; üks FAM-fluorestsentsi mõõtmine kanalis Cycling A Green (Tsükkel A Roheline) VIC fluorestsentsi mõõtmine kanalis Cycling A Yellow (Tsükkel A Kollane)



Joonis 5. DNA amplifikatsioon.

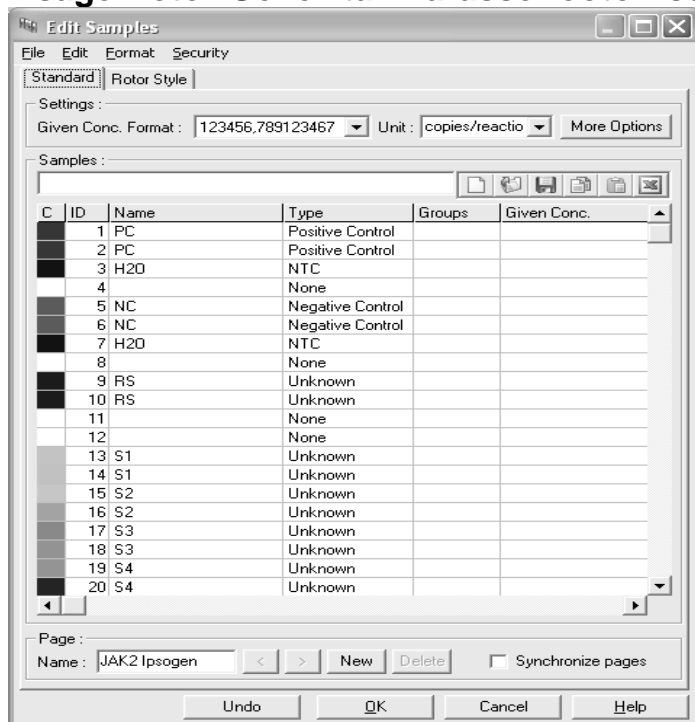
14. Fluorestsentskanalite tuvastamisvahemik tuleb määrata vastavalt PCR-katsutite fluorestsentsi intensiivsustele. Dialoogiboksi Auto-Gain Optimisation Setup (Automaatse kogumise optimeerimise seadistamine) avamiseks klõpsake dialoogiboksis New Run Wizard (Uue tööseeria viisard) olevat nuppu Gain Optimisation (Optimeeri kogumist). Klõpsake nuppu Optimise Acquiring (Optimeeri hankimist) (joonis 6) ja seejärel iga kanali (Green ja Yellow (Roheline ja Kollane), joonis 6) dialoogiboksisides Auto-Gain Optimisation

**Channel Settings (Automaatse kogumise optimeerimiskanali sätted) olevat nuppu OK. Veenduge, et iga kanali (joonis 6) ruut Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Optimeeri enne esimest hankimist) oleks märgitud.**



**Joonis 6. Fluorestsentskanali tundlikkuse kohandamine.**

15. Kanali kalibreerimisega määratud väärtused salvestatakse automaatselt ning kuvatakse programmeerimistoimingu viimases menüüaknas. Klõpsake programmi käivitamiseks nuppu Start Run (Käivita tööseeria).
16. Lisage Rotor-Gene'i tarkvarasse rootori seadistus (joonis 7).



**Joonis 7. Rotor-Gene'i seadistus: Edit Samples (Proovide redigeerimine).**

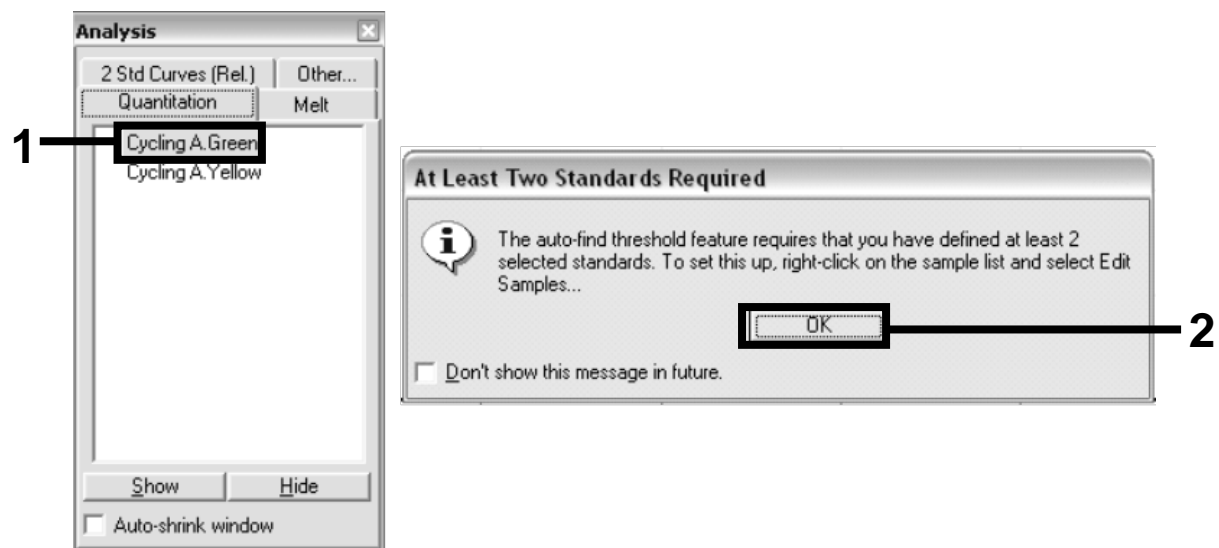
## Rotor-Gene Q 5plex HRM seadme seadistuse lõpp-punkti analüüsi- protseduur

### 17. Klõpsake pärast PCR-programmi lõppu tööriistaribal käsku Analysis (Analüüs) (joonis 8).



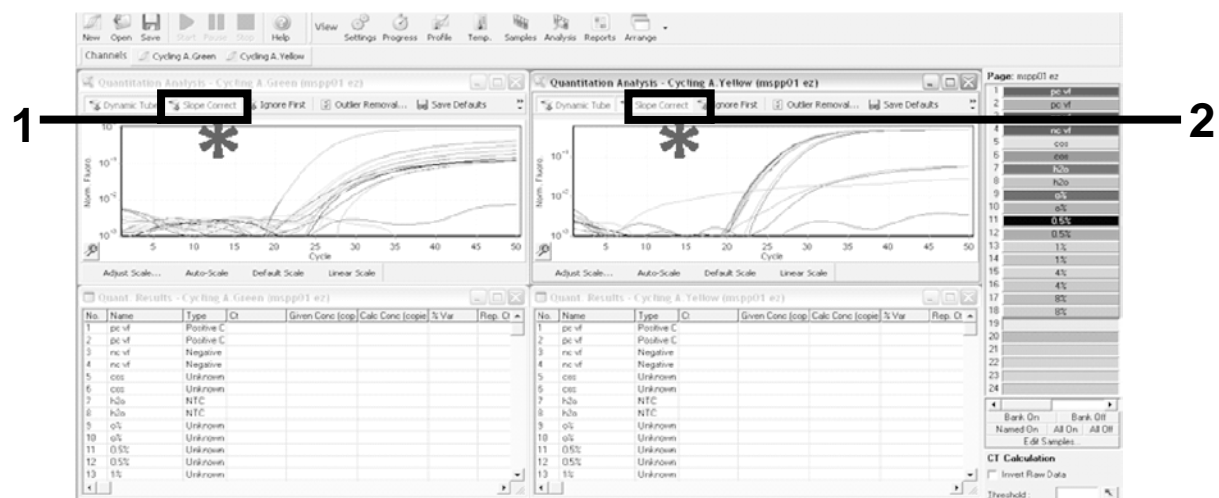
Joonis 8. Analüüs.

### 18. Topeltklõpsake dialoogiboksis Analysis (Analüüs) (joonis 9) valikut Cycling A Green (Tsükel A Roheline) ja seejärel nuppu OK. Korrake toimingut valiku Cycling A Yellow (Tsükel A Kollane) puhul.



Joonis 9. Kogus: Cycling A Green (Tsükel A Roheline).

### 19. Kuvatakse uus aken (joonis 10). Klõpsake mõlemal paneelil nuppu Slope Correct (Kõvera parandamine) (vt joonis 10).



Joonis 10. Säte Slope Correct (Kõvera parandamine).



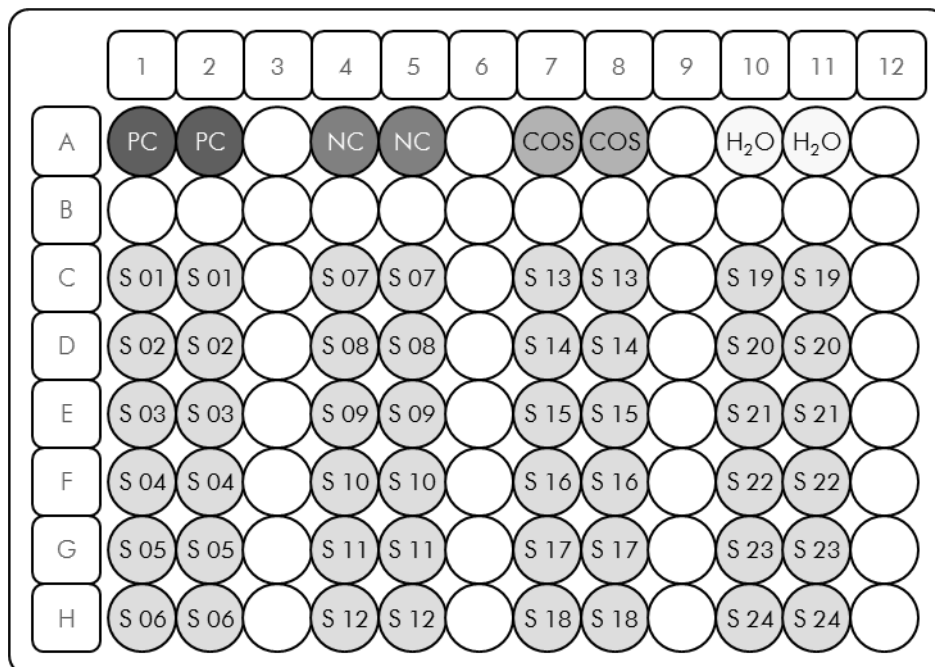
## Protokoll: qPCR seadmetel Applied Biosystems ja ABI PRISM

96 auguga plaadi qPCR-seadme kasutamisel soovitame kõiki mõõtmisi teha kaks korda (vt tabel 5).

**Tabel 5. Seadmete Applied Biosystems 7300 ja 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 või ABI PRISM 7900HT reaktsioonide arv**

Proovid	Reaktsioonid
<b>JAK2 V617F praimerite ja sondide segu (PPM-VF) (56 reaktsiooni)</b>	
24 DNA proovi	24 x 2 reaktsiooni
3 DNA kontrolli	3 x 2 reaktsiooni (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, igaüht testiti kaks korda)
Veekontroll	2 reaktsiooni

### Seadmete Applied Biosystems 7300 ja 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 või ABI PRISM 7900HT proovi töötlemine



**Joonis 12. Soovitatav plaadi seadistus komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit testimiseks. PC:** positiivne kontroll; **NC:** negatiivne kontroll; **COS:** proovi piirväärtus; **S:** DNA proov; **H<sub>2</sub>O:** veekontroll.

**qPCR seadmetel Applied Biosystems 7300 ja 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 või ABI PRISM 7900HT**

**Märkus.** Tehke kõiki toiminguid jää abil.

**Protseduur**

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.**  
Komponendid tuleb sügavkülmikust välja võtta umbes 10 min enne protseduuri algust.
- 2. Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige õrnalt kõiki katsuteid (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).**
- 3. Valmistage töödeldavate proovide arvu põhjal järgnev qPCR-segu.**  
Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabel 6 kirjeldab ühe reaktiivi segu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, mis on arvutatud reaktiivi 25 µl suuruse lõppkoguse saavutamiseks. Vastavalt reaktiivide arvule saab sama praimer ja sondi seguga valmistada eelsegu. Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Seadmete Applied Biosystems 7300 ja 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 või ABI PRISM 7900HT puhul saab komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit abil analüüsida ühe eksperimendi käigus 24 proovi kahes eksemplaris (joonis 12), kahe eksperimendi käigus 20 proovi kahes eksemplaris või kolme eksperimendi käigus 15 proovi kahes eksemplaris.

**Tabel 6. qPCR-segu ettevalmistamine**

Komponent	Reaktsioonide arv (µl)				Lõppkontsentratsioon
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR-i põhisegu, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Praimerite ja sondide segu, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Nukleaasiva ba PCR Grade Water	5	285	145	95	–
Proov (lisatakse 4. toimingus)	5	igaüks 5	igaüks 5	igaüks 5	–
Lõppkogus	25	igaüks 25	igaüks 25	igaüks 25	–

\* 24 proovi; 1 eksperiment/komplekt.

† 10 proovi; 2 eksperimenti/komplekt.

‡ 5 proovi; 3 eksperimenti/komplekt.

4. Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige qPCR-segu ettevaatlikult (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).
5. Jagage igasse auku 20 µl qPCR-eelsegu.
6. Lisage vastavasse auku 5 µl proovi DNA materjali või kontrolli (kokku 25 µl).
7. Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.
8. Sulgege plaat ja tsentrifuugige ettevaatlikult (300 x g, umbes 10 s).
9. Asetage plaat vastavalt tootja soovitudele termotsüklerisse.
10. Programmeerige termotsükler tabelis 7 näidatud termotsükleri programmi abil ning käivitage tööseeria.

**Tabel 7. Seadmete Applied Biosystems ja ABI PRISM temperatuuri-profiil**

<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 50 °C Aeg: 2 min
<b>2. hoidmine</b>	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 min
<b>Tsükkel</b>	50 korda 92 °C 15 s 60 °C 1 min

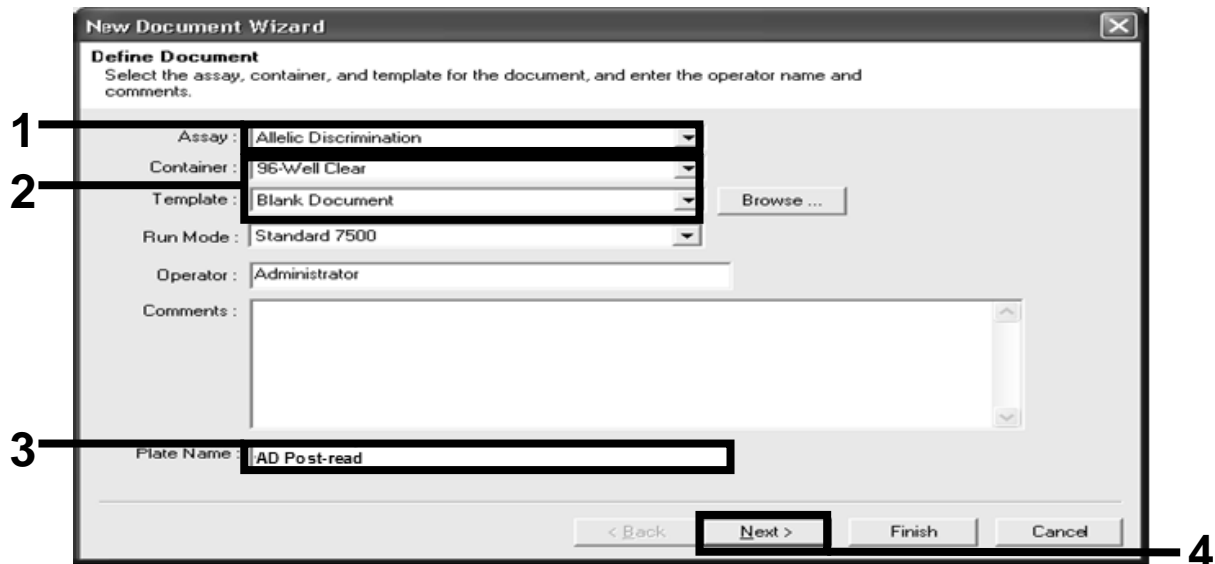
### **Seadmete Applied Biosystems ja ABI PRISM lugemisjärgse tööseeria analüüs**

Seadmete Applied Biosystems 7300 ja 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 või ABI PRISM 7900HT programmeerimise üksikasjad leiate seadme kasutusjuhendist. Parema ülevaate saamiseks on tarkvara sätted paksu musta raamiga esile toodud.

- 11. Pärast tööseeria lõpetamist valige Start/Program (Käivita/Programm) ja seejärel File/New (Fail/Uus).**
- 12. Klõpsake dialoogiboksis New Document Wizard (Uue dokumendi viisard) ripploendit Assay (Analüüs) ning valige Allelic Discrimination (Alleelide eristamine) (joonis 13).**



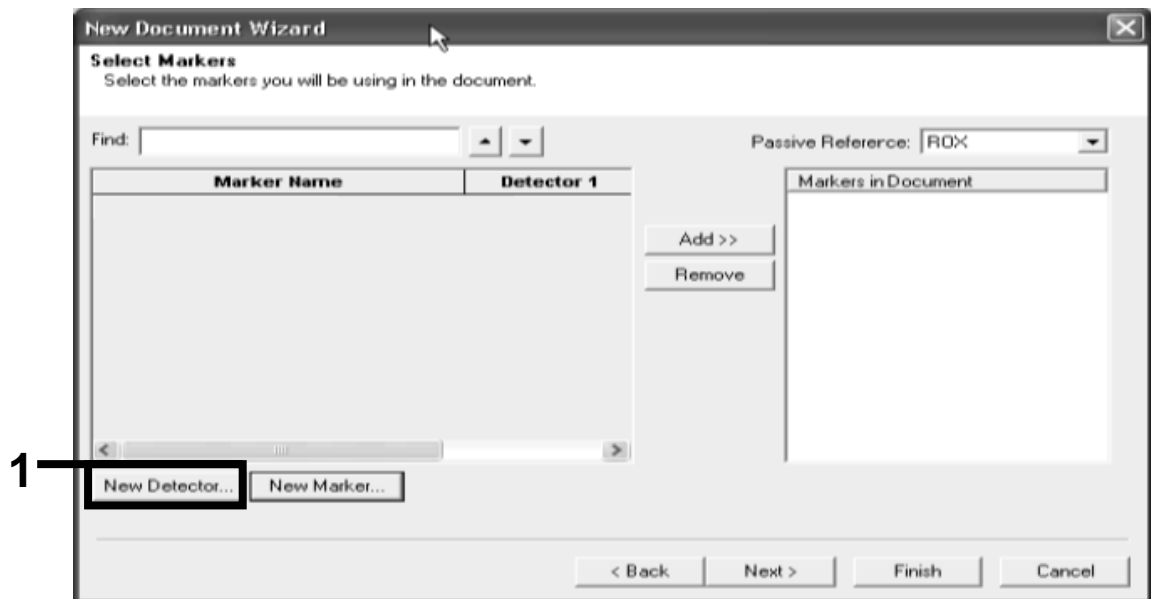
13. Aktsepteerige väljade Container (Pakend) ja Template (Mall) vaikesätted [96-Well Clear (96 augu tühjendamine) ja Blank Document (Tühi dokument), joonis 13]. Tippige väljale Plate Name (Plaadi nimi) väärtus *AD Post-read* (joonis 13) ning seejärel klõpsake nuppu Next > (Edasi >), et avada dialoogiboks Select Markers (Markerite valimine).



Joonis 13. Uue lugemisjärgse tööseria loomise eelsätted (New Document Wizard (Uue dokumendi viisard)).

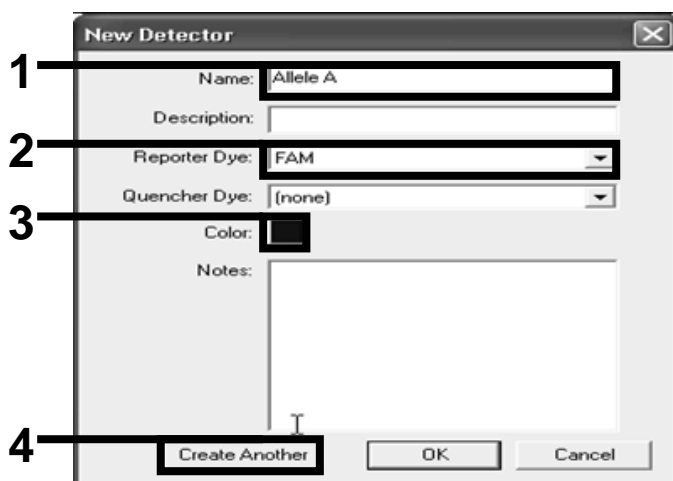
14. Kui dialoogiboksi Select Markers (Markerite valimine) paneelil Markers in Document (Dokumendi markerid) on teie rakendusele sobivad markerid, jätkake toiminguga 18. Kui ei, jätkake toiminguga 15.

15. Looge detektorid ja markerid järgmiselt. Klõpsake nuppu New Detector (Uus detektor) (joonis 14).



Joonis 14. Paneel Markers in Document (Dokumendi markerid) ei sisalda teie rakendusele sobivat markerit.

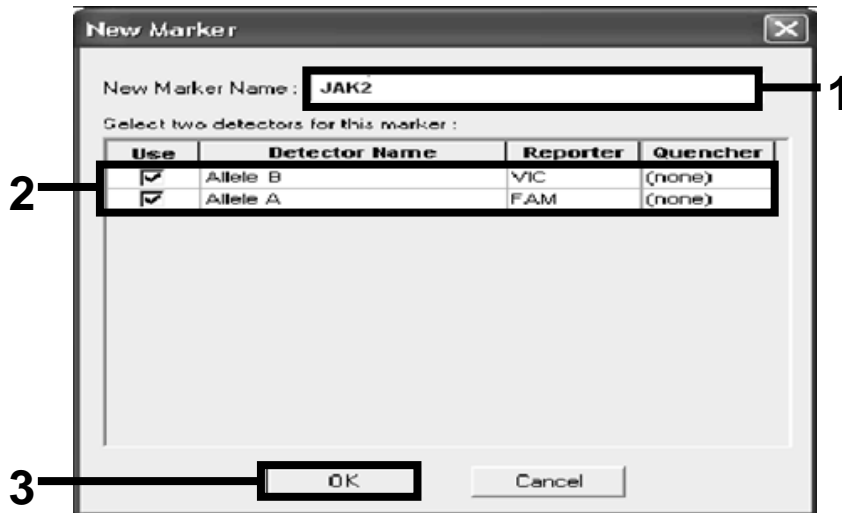
16. Tippige dialoogiboksi New Detector (Uus detektor) väljale Name (Nimi) väärtus *Allele A* (joonis 15). Jätke välja Reporter Dye (Reportervärv) väärtuseks FAM. Klõpsake nuppu Color (Värv), valige värv ja seejärel klõpsake nuppu OK (joonis 15). Klõpsake nuppu Create Another (Loo uus) (joonis 15).



Joonis 15. Detektorite loomine.

17. Tippige järgmise dialoogiboksi New Detector (Uus detektor) väljale Name (Nimi) väärtus *Allele B*. Valige välja Reporter Dye (Reportervärv) väärtuseks VIC. Klõpsake nuppu Color (Värv), valige värv ja seejärel klõpsake nuppu OK.

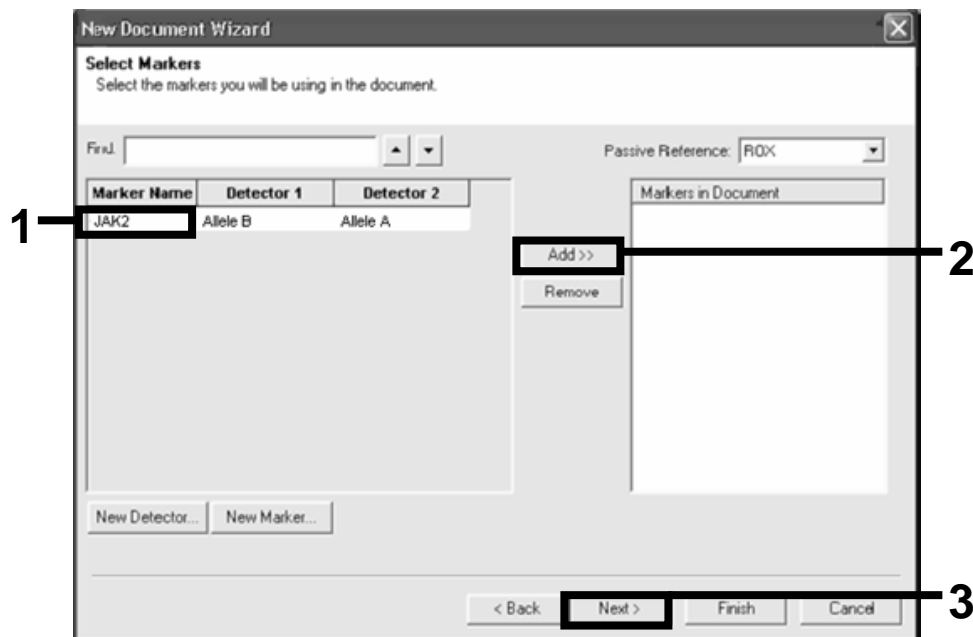
18. Klõpsake dialoogiboksis Select Markers (Markerite valimine) nuppu New Marker (Uus marker) (vt joonis 14).
19. Tippige dialoogiboksi New Marker (Uus marker) väljale New Marker Name (Uue markeri nimi) väärtus *JAK2* (joonis 16). Valige 16. ja 17. toimingus loodud (või juba määratud) detektorid Allele A ja Allele B ning klõpsake nuppu OK (joonis 16).



Joonis 16. Markerite loomine.

20. Valige dialoogiboksis Select Markers (Markerite valimine) eelnevalt loodud väärtus *JAK2* või sobiv eelmääratud marker ning klõpsake nuppu Add >> (Lisa >>) (joonis 17).

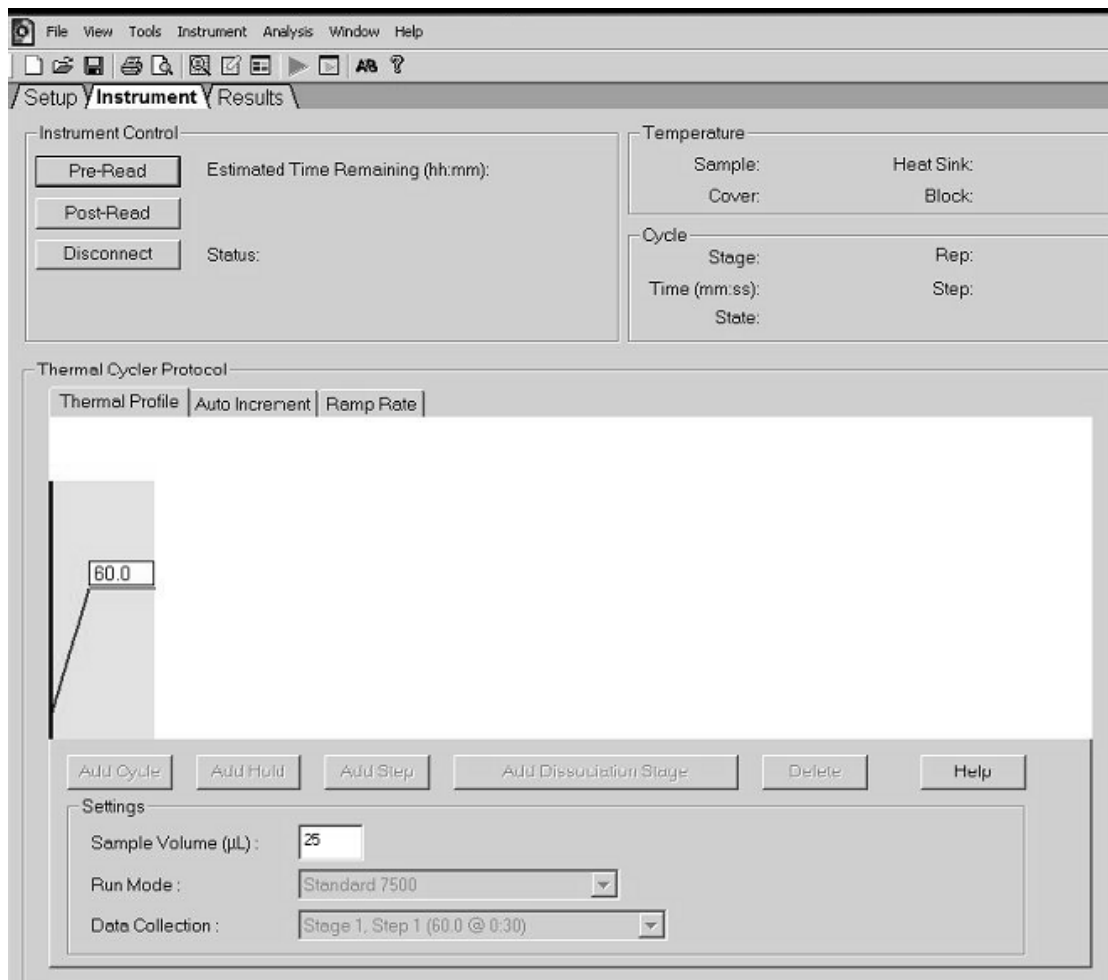
**Märkus.** Markeri eemaldamiseks valige see ja klõpsake käsku Remove (Eemalda).



Joonis 17. Markerite valimine.

21. Klõpsake nuppu Next > (Edasi >).
22. Proove sisaldavate aukude jaoks markeri valimiseks klõpsake ja lohistage seda dialoogiboksis Setup Sample Plate (Prooviplaadi seadistamine). Klõpsake nuppu Finish (Valmis).
23. Valige vahekaart Instrument (Seade) ning määrake proovi koguseks 25 µl.
24. Valige File/Save (Fail/Salvesta) ning seejärel klõpsake käsku Save (Salvesta), et säilitada plaadi loomisel määratud nimi.
25. Laadige reaktsiooniplaat seadmesse vastavalt tootja soovitudele.
26. Käivitage lugemisjärgne tööseeria. Klõpsake nuppu Post-Read (Lugemisjärgne).

Seade käivitab ühest tsüklist koosneva 60-sekundilise tööseeria 60 °C juures. Selle jooksul kogub seade igast august FAM- ja VIC-fluorestsentsi (joonis 18).



Joonis 18. Lugemisjärgne tööseeria.

**27. Valige File/Export (Fail/Eksport) ja seejärel klõpsake tulemuste Excelisse eksportimiseks käsku Results (Tulemused). Tulemused kuvatakse joonisel 19 näidatud viisil.**

12	Comments:					VIC-proof 1			FAM-proof 1			
13	SDS v1.2											
14												
15	Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method
16	A1	sample 1	VIC	Unknown	247.897	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.184	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call
17	A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call
18	A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call
19	A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call
20	A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call
21	A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.806	5.278	Undetermined	100.00	Manual Call
22	A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.948	Undetermined	100.00	Manual Call
23	A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call
24	A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call
25	A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call
26	A11	C-	VIC	Unknown	269.500	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call
27	A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call
28	B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call
29	B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call
30	B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call
31	B4	ER	VIC	Unknown	404.145	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call
32	B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call
33	B6	H2O	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.346	Undetermined	100.00	Manual Call
34	B7	H2O	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call
35	B8	H2O	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call

**Joonis 19. Tulemuste näidis Exceli failis.**

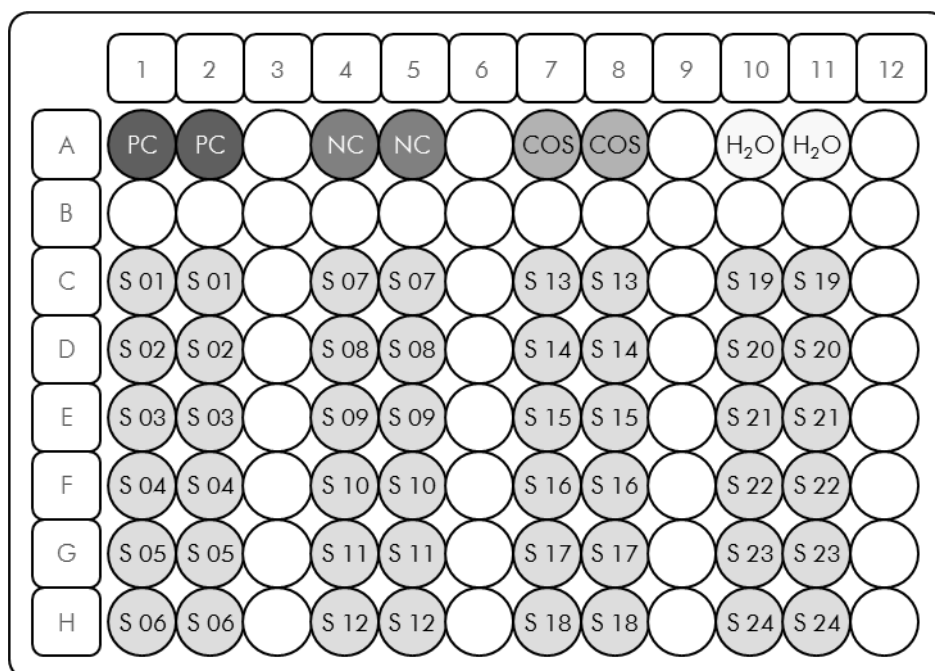
## Protokoll: qPCR seadmel LightCycler 480

96 auguga plaadi qPCR-seadme kasutamisel soovitame kõiki mõõtmisi teha kaks korda (vt tabel 8).

**Tabel 8. Seadme LightCycler 480 reaktsioonide arv**

Proovid	Reaktsioonid
<b>Koos JAK2 V617F praimerite ja sondide seguga (PPM-JAK2)</b>	
24 DNA proovi	24 x 2 reaktsiooni
3 DNA kontrolli	3 x 2 reaktsiooni (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, igaüht testiti kaks korda)
Veekontroll	2 reaktsiooni

### Proovi töötlemine seadmega LightCycler 480



**Joonis 20. Soovitatav plaadi seadistus komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit testimiseks. PC: positiivne kontroll; NC: negatiivne kontroll; COS: proovi piirväärtus; S: DNA proov; H<sub>2</sub>O: veekontroll.**

## qPCR seadmel LightCycler 480

**Märkus.** Tehke kõiki toiminguid jää abil.

### Protseduur

**1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.**

Komponendid tuleb sügavkülmikust välja võtta umbes 10 min enne protseduuri algust.

**2. Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige õrnalt kõiki katsuteid (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).**

**3. Valmistage töödeldavate proovide arvu põhjal järgnev qPCR-segu.**

Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabel 9 kirjeldab ühe reaktiivi segu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, mis on arvutatud reaktiivi 25 µl suuruse lõppkoguse saavutamiseks. Vastavalt reaktiivide arvule saab sama praimerit ja sondi seguga valmistada eelsegu. Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Seadmel LightCycler 480 saab komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit abil analüüsida ühe eksperimendi käigus 24 proovi kahes eksemplaris (joonis 20), kahe eksperimendi käigus 20 proovi kahes eksemplaris või kolme eksperimendi käigus 15 proovi kahes eksemplaris.

**Tabel 9. qPCR-segu ettevalmistamine**

Komponent	Reaktsioonide arv (µl)				Lõppkontsentratsioon
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR-i põhisegu, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Praimerite ja sondide segu, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Nukleaasiva ba PCR Grade Water	5	285	145	95	–
Proov (lisatakse 6. toimingus)	5	igaüks 5	igaüks 5	igaüks 5	–
Lõppkogus	25	igaüks 25	igaüks 25	igaüks 25	–

\* 24 proovi; 1 eksperiment/komplekt.

† 10 proovi; 2 eksperimenti/komplekt.

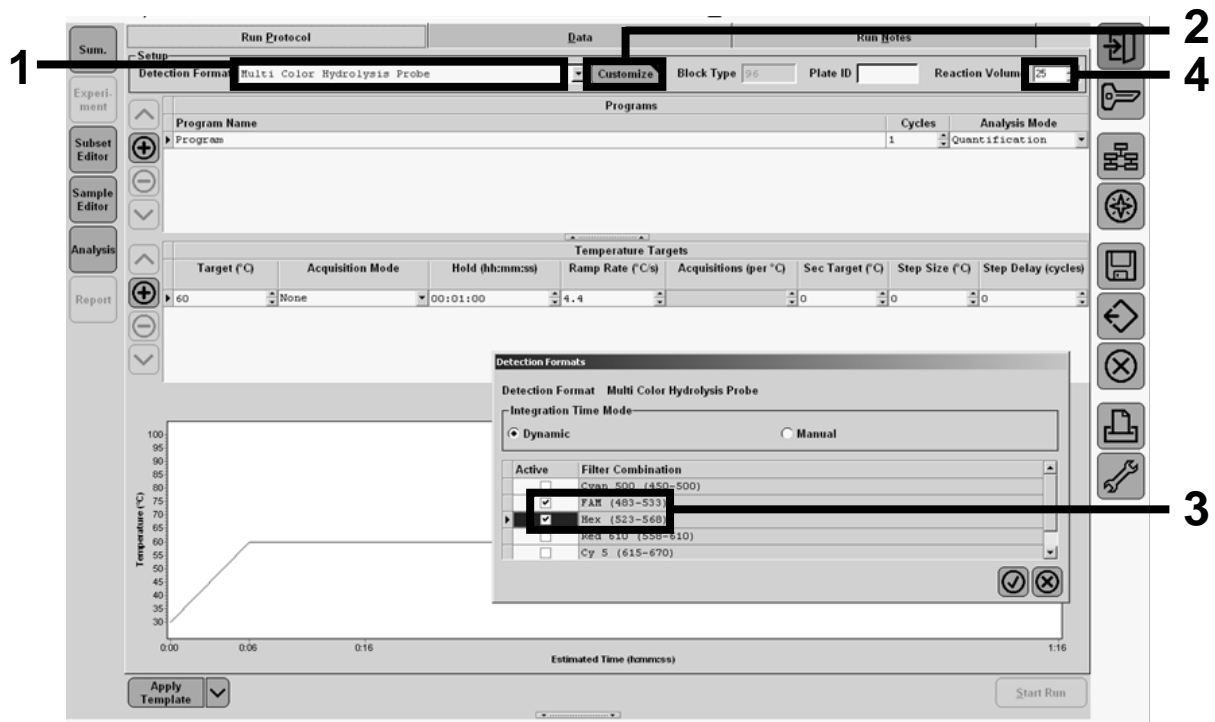
‡ 5 proovi; 3 eksperimenti/komplekt.

4. **Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige qPCR-segu ettevaatlikult (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).**
5. **Jagage igasse auku 20 µl qPCR-eelsegu.**
6. **Lisage vastavasse auku 5 µl proovi-DNA materjali või kontrolli (kokku 25 µl).**
7. **Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.**
8. **Sulgege plaat ja tsentrifuugige ettevaatlikult (300 x g, umbes 10 s).**
9. **Asetage plaat vastavalt tootja soovitudele termotsüklerisse.**
10. **Klõpsake avalehel nuppu New Experiment (Uus eksperiment).**
11. **LightCycler 480 I puhul jätkake toiminguga 11a. LightCycler 480 II puhul jätkake toiminguga 11b.**

Seadme LightCycler 480 programmeerimise üksikasjad leiate seadme kasutusjuhendist. Parema ülevaate saamiseks on tarkvara sätted paksu musta raamiga esile toodud.

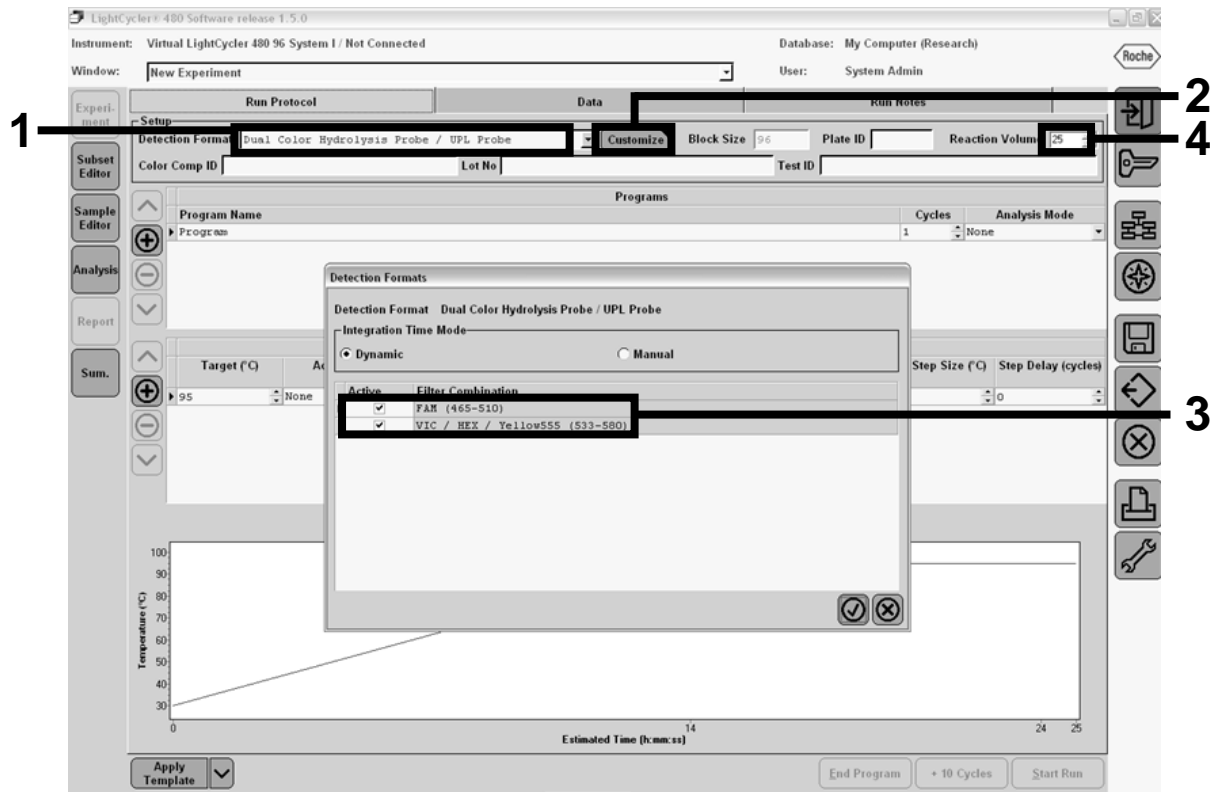


11a. LightCycler 480 I: valige Multi Color Hydrolysis Probe (Värviline hüdrolüüsisonnd), klõpsake nuppu Customize (Kohanda) ning veenduge, et kanalid FAM (483–533) ja Hex (533–568) (nt VIC) oleksid valitud (joonis 21). Seadke reaktsiooni hulgaks 25 µl (joonis 21) ning jätkake toiminguga 12.



Joonis 21. LightCycler 480 I: määramisvormingu seadmine.

11b. LightCycler 480 II: valige Dual Color Hydrolysis Probe (Kahevärviline hüdrolüüsisond), klõpsake nuppu Customize (Kohanda) ning veenduge, et kanalid FAM (465–510) ja VIC / HEX / (533–580) oleksid valitud (joonis 22). Seadke reaktsiooni mahuks 25 µl (joonis 22) ning jätkake toiminguga 12.



Joonis 22. LightCycler 480 II: määramisvormingu seadmine.

**12. Programmeerige termotsükler tabelis 10 näidatud termotsükleri programmi abil ning käivitage tööseeria.**

**Märkus.** Seadme plaadi seadistuse kirjeldamisel valige jaotises Step 1: select workflow (1. toiming: töövoo valimine) väärtus Endpt Geno (Lõpp. geno.).

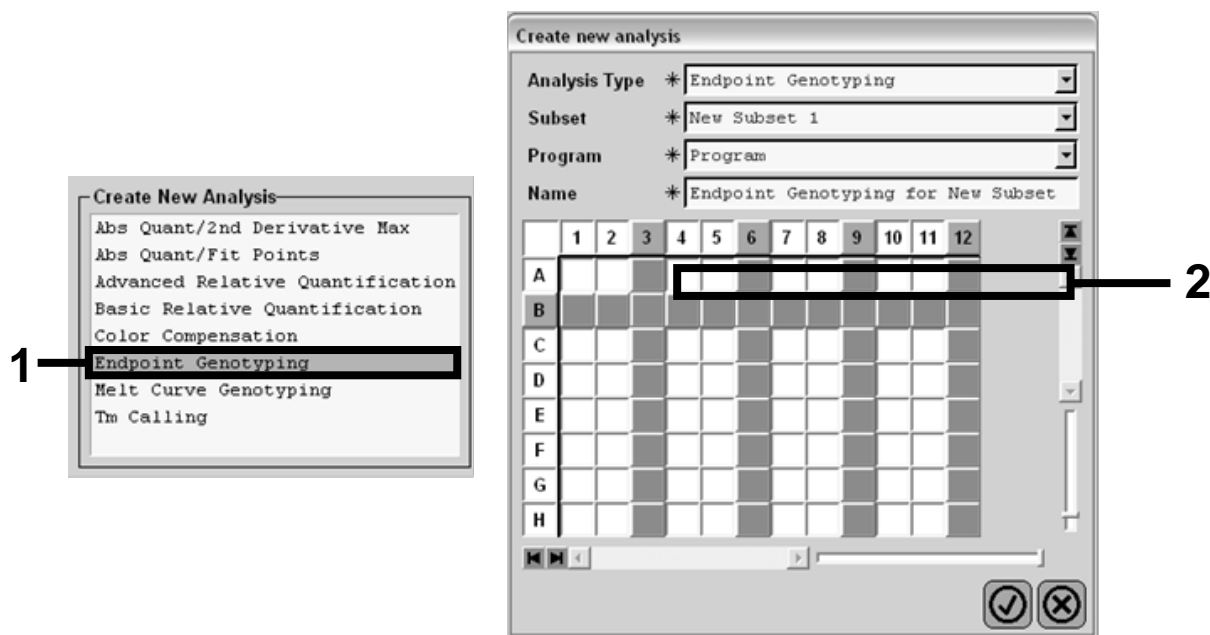
**Tabel 10. Seadme LightCycler 480 temperatuuriprofiil**

<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 50 °C Aeg: 2 min
<b>2. hoidmine</b>	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 min
<b>Tsükel</b>	50 korda 92 °C 15 s; üks 60 °C 1 min; üks
<b>3. hoidmine</b>	60 °C 1 min; üks

**Seadme LightCycler 480 lõpp-punkti analüüsiprotseduur**

**13. Pärast tööseeria lõpetamist valige Analysis (Analüüs).**

**14. Valige dialoogiboksis Create New Analysis (Uue analüüsi loomine) analüüsitüüp Endpoint Genotyping (Lõpp-punkti genotüpiseerimine) ning seejärel menüüs Subset (Alamhulk) analüüsitav alamhulk (joonis 23).**



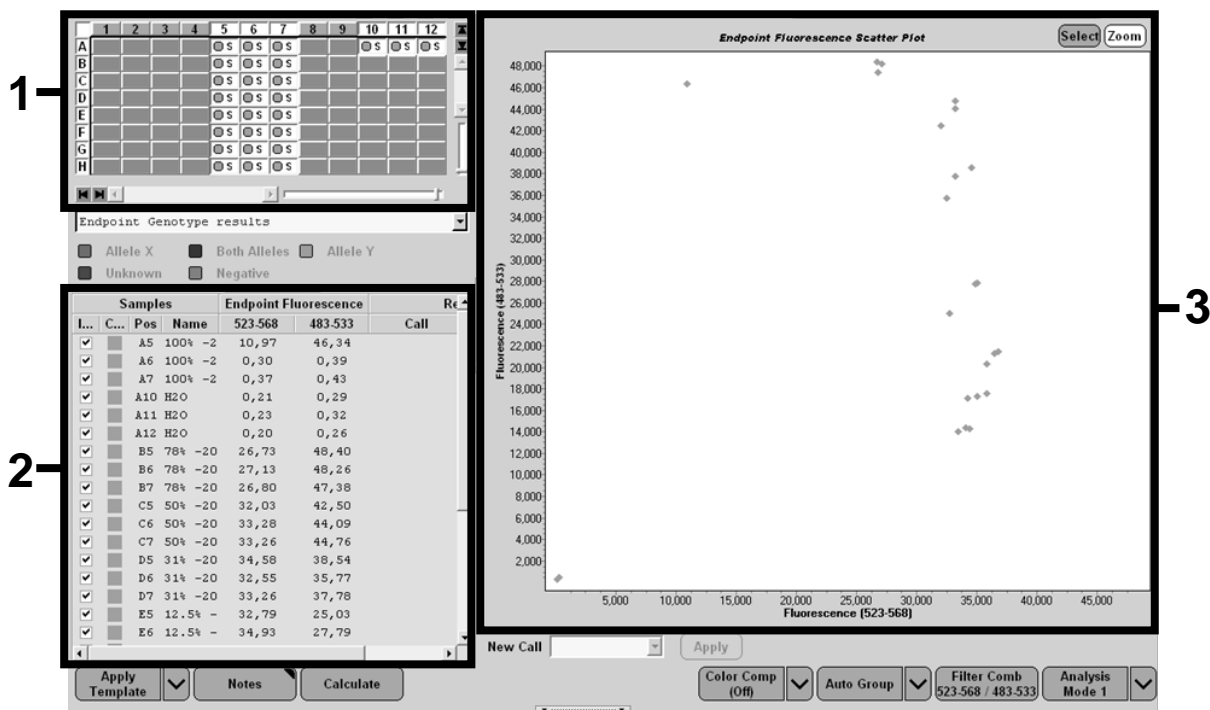
**Joonis 23. Analüüsitüübi ja analüüsitava alamhulga valimine.**

15. Valige järgmises aknas fluorestsents Hex (nt VIC) alleelile Allele X ning fluorestsents FAM alleelile Allele Y (joonis 24).



Joonis 24. Alleelidele Allele X ja Allele Y fluorestsentsi valimine.

16. Järgmises aknas (joonis 25) kuvatakse plaadi seadistus (1, vasakul üleval), iga proovi fluorestsentsi tulemused (2, vasakul all) ning alleelide eristamise hajuvusdiagramm (3, paremal; 50. PCR-tsüklis mõõdetud FAM- ja VIC-fluorestsents).



Joonis 25. Andmete kokkuvõte.

17. Andmete eksportimiseks paremklõpsake proovitulemuste malli ning seejärel valige käsk Export Table (Eksportidi tabel). Fail salvestatakse tekstifaili (.txt) vormingus.

18. Tulemuste kuvamiseks ja analüüsimiseks avage fail Excelis. Tulemused kuvatakse joonisel 26 näidatud viisil.

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

Joonis 26. Tulemuste näidis Exceli failis.

## Protokoll: qPCR seadmel LightCycler 2.0

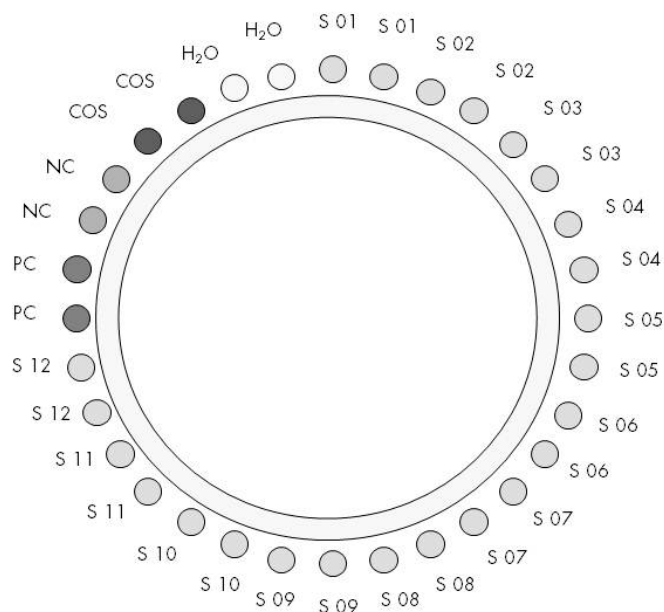
**Märkus.** Teatud tehnoloogiliste nõuete tõttu tuleb LightCycler 2.0 eksperimentides kasutada kindlaid reaktiive. Soovitame kasutada reaktiivi LightCycler TaqMan Master. Järgige põhisegu 5x valmistamiseks tootja juhiseid.

32 kapillaariga rootori kasutamisel soovitame kõiki mõõtmisi teha kaks korda (vt tabel 11).

**Tabel 11. Seadme LightCycler 2.0 reaktsioonide arv**

Proovid	Reaktsioonid
<b>JAK2 V617F praimerite ja sondide segu (PPM-VF) (32 reaktsiooni)</b>	
12 DNA proovi	12 x 2 reaktsiooni
3 DNA kontrolli	3 x 2 reaktsiooni (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, igaüht testiti kaks korda)
Veekontroll	2 reaktsiooni

### Proovi töötlemine seadmel LightCycler 2.0



**Joonis 27. Soovitatav rootori seadistus komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit testimiseks.** PC: positiivne kontroll; NC: negatiivne kontroll; COS: proovi piirväärtus; S: DNA proov; H<sub>2</sub>O: veekontroll.

## qPCR seadmel LightCycler 2.0

**Märkus.** Tehke kõiki toiminguid jää abil.

### Protseduur

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.**  
Komponendid tuleb sügavkülmikust välja võtta umbes 10 min enne protseduuri algust.
- 2. Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige õrnalt kõiki katsuteid (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).**
- 3. Valmistage töödeldavate proovide arvu põhjal järgnev qPCR-segu.**

Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabel 12 kirjeldab ühe reaktiivi segu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, mis on arvutatud reaktiivi 20 µl suuruse lõppkoguse saavutamiseks. Vastavalt reaktiivide arvule saab sama praimeride ja sondide seguga valmistada eelsegu. Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Seadme LightCycler 2.0 puhul saab kasutada ühes eksperimendis 12 proovi kahes eksemplaris analüüsimiseks komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit (joonis 27).

**Tabel 12. Seadme LightCycler 2.0 jaoks qPCR-segu ettevalmistamine**

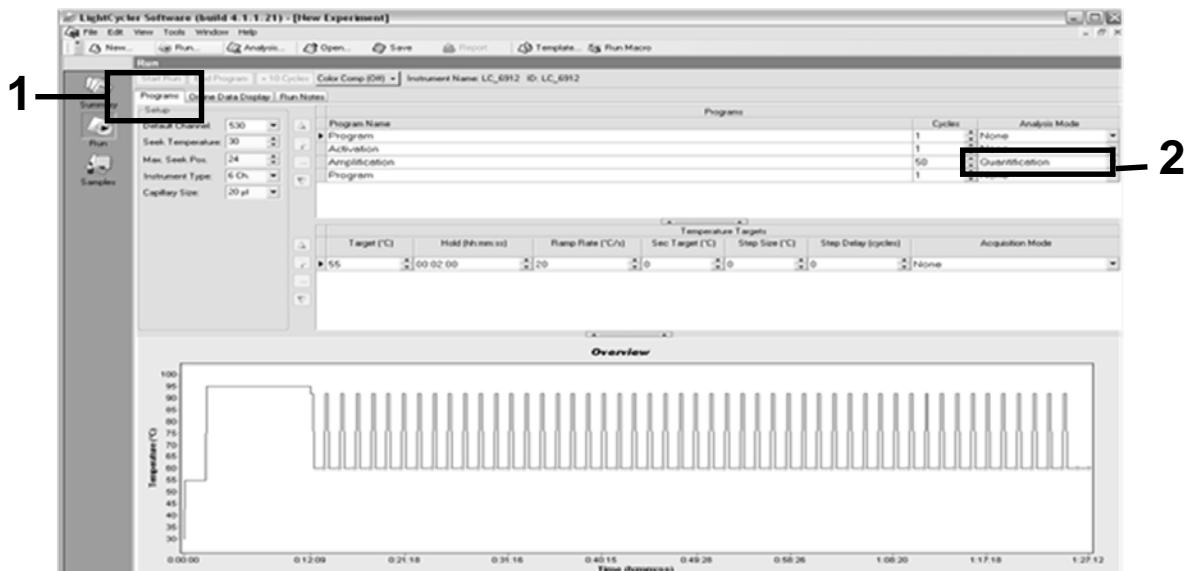
Komponent	Reaktsioonide arv (µl)		Lõppkontsentratsioon
	1	32+1	
LightCycler TaqMan-i põhisegu, 5x	4	132	1x
Praimerite ja sondide segu, 10x	2	66	1x
Nukleaasivaba PCR Grade Water	9	297	–
Proov (lisatakse 4. toimingus)	5	igaüks 5	–
Lõppkogus	20	igaüks 20	–

- 4. Segage vibratsioonisegistiga ja tsentrifuugige qPCR-segu ettevaatlikult (umbes 10 s, 10 000 p/min, et koguda kokku katsuti põhjas olev vedelik).**

5. Jagage igasse kapillaari 15 µl qPCR-eelsegu.
6. Lisage vastavasse kapillaari 5 µl proovi-DNA materjali või kontrolli (kokku 20 µl).
7. Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.
8. Asetage kapillaarid seadmega kaasas olevasse adapterisse ning tsentrifugeerige ettevaatlikult (700 x g, umbes 10 s).
9. Laadige proovid vastavalt tootja soovitudele termotsüklerisse.
10. Programmeerige termotsükler (joonis 28) tabelis 13 näidatud viisil.

Seadme LightCycler 2.0 programmeerimise üksikasjad leiate seadme kasutusjuhendist. Parema ülevaate saamiseks on tarkvara sätted paksu musta raamiga esile toodud.

**Märkus.** Veenduge, et valitud on kvantifitseerimine ja FAM-fluorestsentsi üks mõõtmine ning VIC-fluorestsentsi üks mõõtmine nii amplifikatsiooni/ tsükli etapis kui ka lõpphoidmisel temperatuuril 60 °C.



Joonis 28. Seadme LightCycler 2.0 programmeerimiskuva.

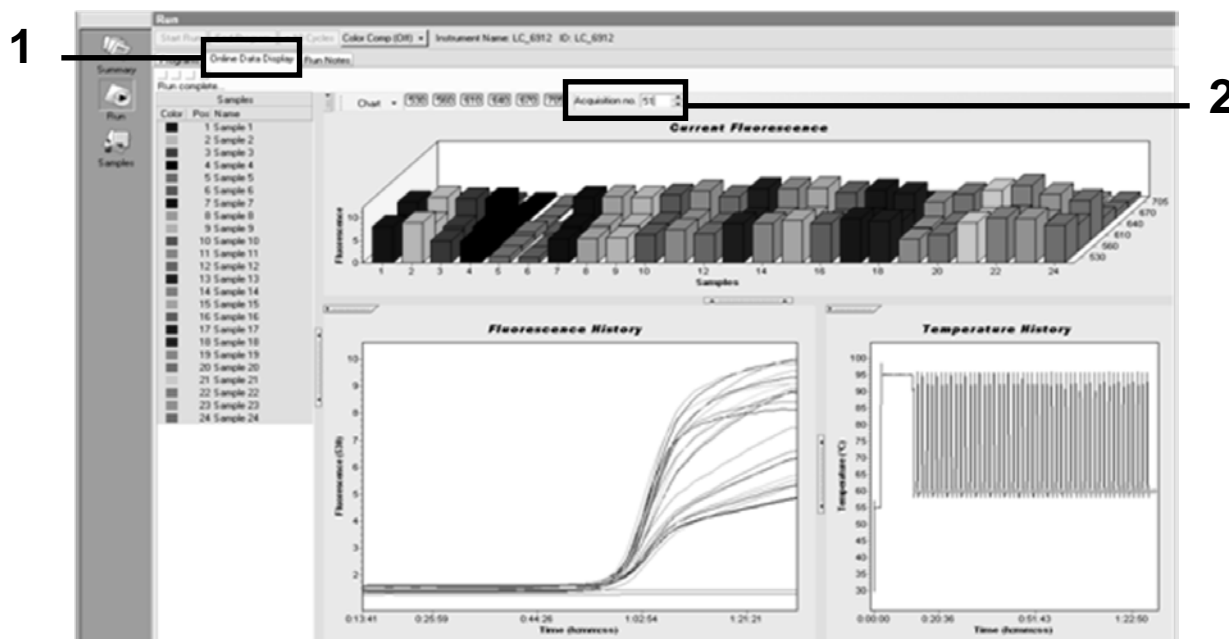


**Tabel 13. Seadme LightCycler 2.0 temperatuuriprofiil**


<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 55 °C Aeg: 2 min Kalle: 20
<b>2. hoidmine</b>	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 min Kalle: 20
<b>Tsükkel</b>	50 korda 92 °C 15 s; kalle: 20 60 °C 1 min; kalle: 20
<b>3. hoidmine</b>	60 °C 1 min; kalle: 20

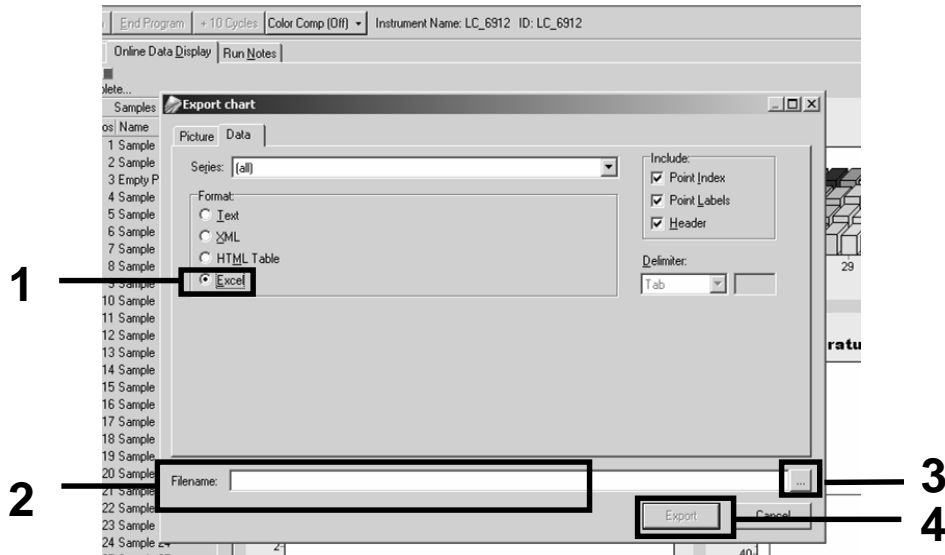
**Seadme LightCycler 2.0 lõpp-punkti analüüsiprotseduur**

11. Pärast amplifikatsiooni tööseeria lõpetamist klõpsake vahekaarti Online Data Display (Võrguandmete kuvamine) (joonis 29). Avage akna Current Fluorescence (Praegune fluorestsents) vasakus ülaservas olev kuvamenüü ning seejärel kirjutage väljale Acquisition no. (Hankenr) väärtus 51.



**Joonis 29. Tulemused ja ajalugu vahekaardil Online Data Display (Võrguandmete kuvamine).**

12. Paremklõpsake graafiku Current Fluorescence (Praegune fluorestsents) lähedal ja klõpsake käsku Export (Ekspordi).
13. Klõpsake dialoogiboksi Export chart (Kaardi eksportimine) raadionuppu Excel (joonis 30). Lisage nimi dialoogiboksi väljale Filename (Faili nimi). Klõpsake nuppu  ja valige tulemusfaili ekspordi sihtkoht. Klõpsake nuppu Export (Ekspordi).



Joonis 30. Valige ekspordi vorming ja andmefaili sihtkoht.

14. Tulemuste kuvamiseks ja analüüsimiseks avage fail Excelis. Seadme LightCycler 2.0 tulemused kuvatakse joonisel näidatud viisil.

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

Joonis 31. LightCycler 2.0 tulemuste näidis Exceli failis.

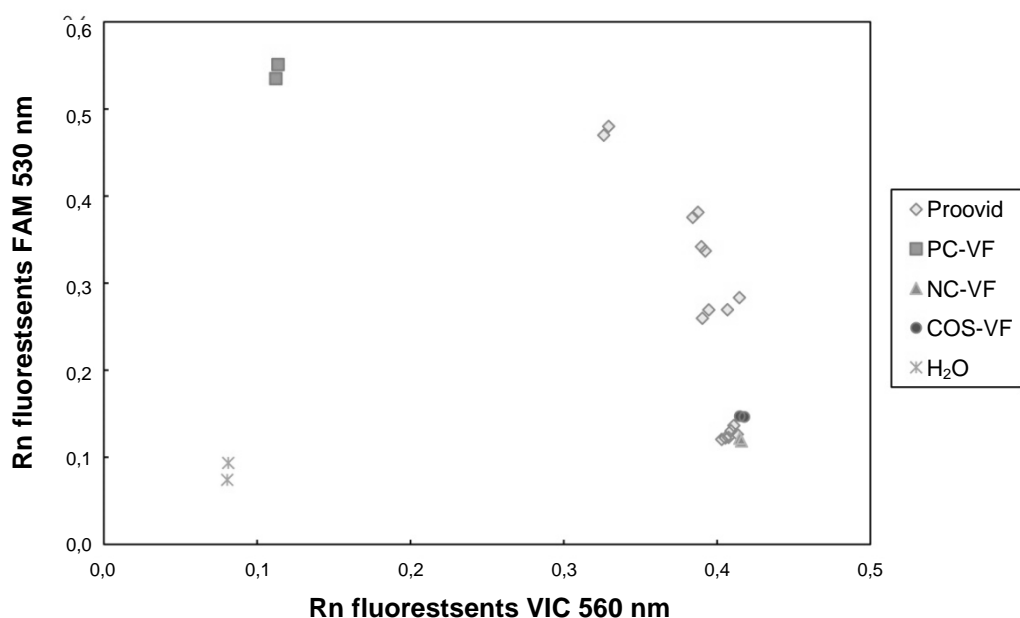
## Tulemuste tõlgendamine

Hankige järgmiste seadmete jaoks eksporditud andmete ekstraktimiseks sobiv fail: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või mõni muu Rotor-Gene'i seade, LightCycler 2.0 või 480; Applied Biosystems 7300 või 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS või 7900HT SDS; ning kontrollige fluorestsentsitasemeid (peavad koopiates ühtima).

Valmistage ette fluorestsentsandmete graafiline esitus (hajuvusdiagramm). X-telg kujutab VIC-fluorestsentsi, Y-telg FAM-fluorestsentsi.

## Graafilise esitamise ja kvaliteedikontrolli kriteerium

Hajuvusdiagrammi näidis on toodud joonisel 32.



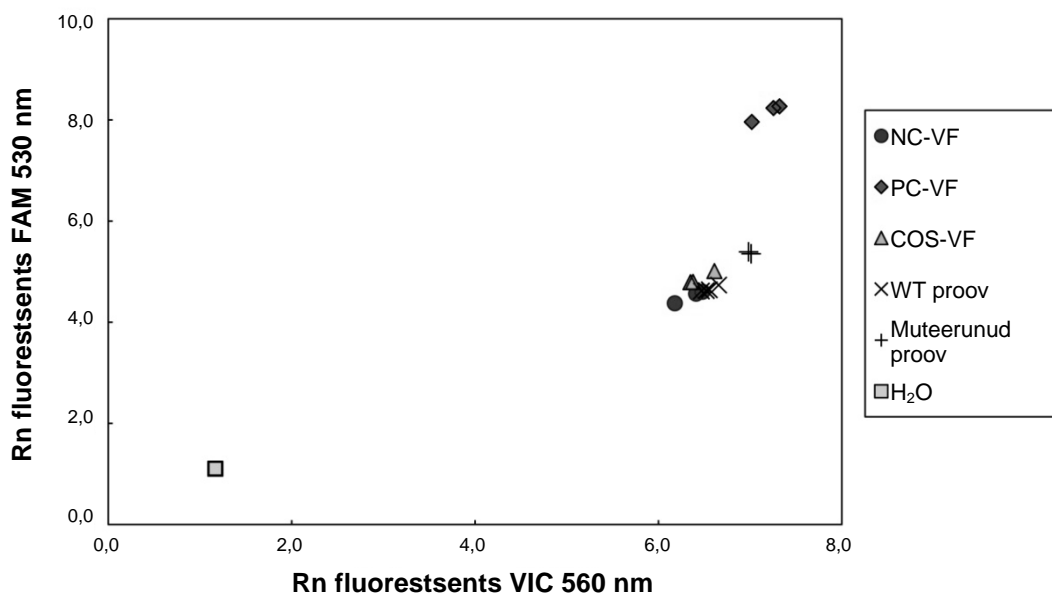
**Joonis 32. Alleelide eristamiskatse hajuvusdiagramm** Seadmed: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM ja LightCycler 480.

Proovid peaksid asuma negatiivseid kontrollid (NC) ja positiivseid kontrollid (PC) ühendaval kaarel.

Mis tahes kontrolli vale asend võib viidata sellele, et eksperiment oli vigane.

- Positiivsed kontrollid peaksid asuma vasakus ülaservas.
- Negatiivsed kontrollid peaksid asuma paremas allservas.
  - Negatiivse kontrolli vale asend võib viidata saastumisele.
- Proovi piirväärtus peaks ilmuma negatiivsete kontrollide kohal.
- Veekontrollid peaksid asuma vasakus ülaservas.
  - Veekontrolli vale asend (FAM-mõõtmise puhul NC-st kõrgemal või PC-st või VIC-ist kõrgemal) võib viidata saastumisele.

**Märkus.** Kontrollide asend võib seadme LightCycler 2.0 andmete analüüsimisel erineda (vt joonist 33). Veekontrollid peaksid siiski asuma vasakus ülaservas.



Joonis 33. Alleelide eristamiskatse hajuvusdiagramm. Seade: LightCycler 2.0.

## Normalisatsioonid FAM/VIC-suhtarvu arvutamine ja genotüüpiseerimine

Arvutage iga proovi FAM/VIC-suhtarv. Arvutage positiivse kontrolli (PC), proovi piirväärtuse (COS) ja negatiivse kontrolli (NC) FAM/VIC-suhtarv. Suhtarvud peavad koopiates ühtima. Arvutage koopiade keskmine suhtarv.

Normaliseeritud suhtarvu (NRatio) arvutamiseks proovi piirväärtuse (COS) ja kõikide proovide jaoks kasutatakse järgmist võrrandit:

$$NSuhtarv_{\text{Proov}} = \frac{\text{Suhtarv}_{\text{Proov}}}{\text{Suhtarv}_{\text{NC}}}$$

**Märkus.** Testi hall tsoon (GZ) on väärtuste ala, kus eristamine ei ole piisavalt täpne. Hallis tsoonis olev väärtus näitab, et sihtmärkerit ei saa pidada olemasolevaks ega puuduvaks. Hall tsoon tuleb igaks eksperimendiks eraldi arvutada.

Arvutage hall tsoon ehk ebakindel ala COS-i normaliseeritud suhtarvu põhjal ( $NSuhtarv_{\text{COS}}$ ):

$$\text{Hall tsoon } [(NSuhtarv_{\text{COS}} \times 0,94); (NSuhtarv_{\text{COS}} \times 1,06)]$$

Võrrelge iga proovi normaliseeritud suhtarvu halli tsooni valemi  $NSuhtarv_{COS}$  tulemusega. Tulemuste tõlgendamist kirjeldatakse tabelis 14 ning andmete arvutamise ja tõlgendamise näidis on toodud tabelis 15.

**Tabel 14. Normaliseeritud suhtarvude abil genotüpiseerimise tulemuste tõlgendamine**

Tulemused	Tõlgendus
$NSuhtarv_{Proov} > NSuhtarv_{COS} \times 1,06$	Tuvastati mutatsioon JAK2 V617F
$NSuhtarv_{Proov} < NSuhtarv_{COS} \times 0,94$	Mutatsiooni JAK2 V617F ei tuvastatud
$NSuhtarv_{Proov}$ halli tsooni valemi $NSuhtarv_{COS}$ piires	Tulemused ei ole ühesed

**Tabel 15. Fluorestsentsandmete arvutamise ja tõlgendamise näidis**

Näidis	VIC	FAM	Suhtarv	Keskmine suhtarv	NSuhtarv	Tõlgendus
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutatsiooni ei tuvastatud
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Tuvastati mutatsioon
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Proovi piirväärtus
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutatsiooni ei tuvastatud
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Tuvastati mutatsioon
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Tulemused ei ole ühesed
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Tulemused ei ole ühesed
S 4	2,322	2,191	0,944			
<b>GZ</b>	<b>1,205</b>	<b>1,359</b>				

## Tõrkeotsingujuhend

See tõrkeotsingujuhend võib aidata tekkivaid probleeme lahendada. Lisateabe saamiseks vaadake meie tehnilise toe veebilehel olevat korduma kippuvate küsimuste lehte: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN-i tehnilise toega tegelevad teadlased vastavad meeeldi selle juhendi teabe ja protokollidega või proovivõtu- ja analüüsimeetoditega seotud mis tahes küsimustele (kontaktteabe leiate teemast Kontaktteave, lk 56).

### Kommentaariid ja ettepanekud

---

#### Positiivne kontroll, negatiivne signaal

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| a) Pipeteerimistõrge                | Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.<br>Korrake PCR-i tööseeriat.   |
| b) Komplekti osade vale hoiustamine | Hoiustage komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit temperatuuril –30 kuni –15 °C ning hoidke praimerite ja sondide segu (PPM) valguse eest kaitstuna. Vt teemat Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine, lk 11.<br>Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.<br>Jagage reaktiivide kogused säilitamiseks. |

#### Negatiivsed kontrollid on positiivsed

- |                |   |
|----------------|---|
| Ristsaastumine | Asendage kõik kriitilised reaktiivid.<br>Korrake eksperimenti iga reaktiivi uue kogusega.<br>Ülekanduva saaste vältimiseks kasutage proove, komplekti osi ja materjale vastavalt üldtunnustatud tavale. |
|----------------|---|

#### Signaali pole (ka positiivse kontrolli puhul)

- |   |  |
|---|--|
| a) Pipeteerimistõrge või vahele jäänud reaktiivid                         | Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.<br>Korrake PCR-i tööseeriat. |
| b) Proovimaterjali inhibeeriv toime, mida põhjustab ebapiisav puhastamine | Valmistage DNA uuesti ette.  |
| c) LightCycler: valitud on vale tuvastuskanal                             | Seadke kanali sätteks F1/F2 või 530 nm / 640 nm.                                       |

## Kommentaariid ja ettepanekud

---

- d) LightCycler: andmete kogumist pole programmeeritud
- Kontrollige tsükli programme.  
Valige PCR-programmi iga anniilimissegmendi lõpus omandamisrežiimiks Üksik (single).

### Puuduv või nõrk proovide signaal, kuid positiivsed kontrollid on korras

- DNA kehv kvaliteet või madal kontsentratsioon
- Kontrollige alati enne alustamist DNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.

### LightCycler: liiga nõrk fluorestsentsi tugevus

- a) Komplekti osade vale säilitamine
- Säilitage komplekti *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* temperatuuril  $-30$  kuni  $-15$  °C ning hoidke praimerite ja sondide segu (PPM) valguse eest kaitstuna. Vt teemat Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine, lk 11.  
Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.  
Jagage reaktiivide kogused säilitamiseks.
- b) Väga väike siht-DNA algkogus
- Suurendage proovi DNA kogust.  
**Märkus.** Sõltuvalt valitud DNA ettevalmistusmeetodist võib esineda inhibeeriv toime.

### LightCycler: varieeruv fluorestsentsi tugevus

- a) Pipeteerimistõrge
- Pipeteerimistõrke põhjustatud varieerumise vähendamiseks saab andmeid režiimis F1/F2 või 530 nm/640 nm analüüsida.
- b) Kapillaaride ebapiisav tsentrifugimine
- Kapillaari ülasoones võib veel olla valmistatud PCR-segu või on kapillaari otsa jäänud õhumull.  
Tsentrifugige alati reaktsiooniseguga laaditud kapillaare seadme kasutusjuhendis kirjeldatud viisil.
- c) Kapillaari otsa välispind on must
- Kandke alati kapillaaride käsitlemisel kindaid.

## Kvaliteedikontroll

Vastavalt QIAGEN-i ISO sertifikaadiga kvaliteedihalduse süsteemile on iga komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen partiid testitud eelnevalt määratud nõuete kohaselt, et tagada toote ühtlane kvaliteet. Analüüsisertifikaadid on tellimisel saadaval aadressil [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Piirangud

Kasutajad peavad olema enne seadme kasutamist saanud selle tehnoloogiaga töötamiseks vastava väljaõppe. Komplekti tuleks kasutada vastavalt käesolevas juhendis toodud juhistele koos teemas Vajalikud materjalid, mida kaasas pole (lk 9) kirjeldatud valideeritud seadmega.

Mis tahes saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete leidudega. Kasutaja vastutab enda laboris QIAGEN-i toimivusnäitajate uuringutes käsitlemata protseduurideks kasutatava süsteemi toimivuse valideerimise eest.

Pöörake tähelepanu karbile ja komponentide siltidele prinditud kõlblikkusajale. Ärge kasutage kõlblikkusaja ületanud komponente.

## Sooritusnäitajad

### Mittekliinilised uuringud

Mittekliinilised uuringud viidi läbi komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit analüütiliste tulemuste saamiseks.

### Täpsus

Metsikut tüüpi DNA mutatsiooniga JAK2 V617F rakuliinist pärineva genoomse DNA kolme lahjendusastet testiti komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. Lahjendused vastasid 1%, 2% ja 3% mutatsioonikogusele. Igal astmel saadi sõltumatud lahjenduspartiid ning nende replikaate testiti kolme sõltumatu eksperimendi käigus. Iga DNA proovi suhtarve ( $Suhtar_{V_{Proov}}$ ) võrreldi negatiivse kontrolli suhtarvuga (JAK2 100% metsikut tüüpi DNA,  $Suhtar_{NC}$ ). Tulemused on kokkuvõtlikult esitatud tabelis 16.

**Tabel 16. Mittekliiniliste uuringute andmed täpsuse kohta**

Mutatsioonitase	$Suhtar_{V_{Proov}} > Suhtar_{NC}$	%CV (suhtarv)
1% V617F DNA	100% (n = 183)	6,8
2% V617F DNA	100% (n = 72)	4,5
3% V617F DNA	100% (n = 135)	5,1



## Laboratooriumidevahelised analüütilised andmed

Mitme laboratooriumi uuringus osales 13 laborit. Analüütilised andmed koguti metsikut tüüpi DNA mutatsiooniga JAK2 V617F genoomse DNA lahjendustest. Igas laboris tehti kolm eksperimenti. Iga eksperimendi jaoks testiti rakuliinides järgmisi DNA proove:

- 1 negatiivne kontroll (NC) 0% V617F
- 1 positiivne kontroll (NC) 100% V617F
- 1 proovi piirväärtus (COS) 2% V617F
- 3 vahemutatsiooni proovi (20%, 50% ja 80%)

Eksperimentideks kasutati 7 eri seadet:

- ABI PRISM 7000 SDS
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
- ABI PRISM 7700 SDS
- ABI PRISM 7900 SDS
- LightCycler 2.0
- iCycler®

Tulemused on kokkuvõtlikult esitatud tabelis 17.

**Tabel 17. Laboratooriumidevahelised analüütilised andmed koguti metsikut tüüpi DNA mutatsiooniga JAK2 V617F rakuliinist pärineva genoomse DNA lahjendustest**

Proovide määramine	Positiivsed proovid	Negatiivsed proovid
JAK2 V617F	177*	0
Metsikut tüüpi JAK2	0	36

\* Positiivsed proovid hõlmasid 36 positiivset kontrolli (PC-VF), 36 proovi piirväärtust (COS-VF; 2% V617F); 34 proovi 20% JAK2 V617F-i sisaldusega; 35 proovi 50% JAK2 V617F-i sisaldusega; 36 proovi 80% JAK2 V617F-i sisaldusega.

## Kliinilised uuringud

### Komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja meetodi ARMS® võrdlus

141 MPN-i kahtlusega patsiendi DNA proove testiti paralleelselt komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ning ARMS-printsiibil põhineva qPCR-analüüsiga (11). Võrdluse tulemused on toodud tabelis 18 (2 x 3 võimalikkuse tabel) ja tabelis 19 (protsentuaalne kokkulangevus).

**Tabel 18. Meetodite võrdlus: komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja ARMS**

		ARMS-testimismeetodi tulemused		
		JAK2 V617F >2%	Metsikut tüüpi JAK2 V617F <2%	Kokku
Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit testimis- meetodi tulemused	JAK2 V617F Tuvastati mutatsioon	91	0	91
	Tulemused ei ole ühesed	1	2	3
	JAK2 WT Mutatsiooni ei tuvastatud	1	46	47
<b>Kokku</b>		<b>93</b>	<b>48</b>	<b>n = 141</b>

**Tabel 19. Meetodite võrdlus: komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja ARMS**

	Kokkulangevus	95% CI* (%)
Positiivsed andmed Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit ja ARMS-i kokkulangevus	<b>98,9</b>	94,1–99,8
Negatiivsed andmed Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit ja ARMS-i kokkulangevus	<b>100</b>	92,3–100
<b>Kokkulangevus kokku</b>	<b>99,3</b>	<b>96,0–99,9</b>

\* Usaldusvahemik arvatati vastavalt CLSI EP12-A juhendile „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” (Kvalitatiivse testi sooritusvõime hindamise kasutaja protokoll, kinnitatud juhend).

### **Komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja sekveneerimise võrdlus**

51 MPN-i kahtlusega patsiendi DNA proove testiti paralleelselt komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ning referentstehnikaga (kuldstandard), st otsese sekveneerimisega. Sekveneerimistõrke tõttu ei saanud ühte proovi tõlgendada. 50 sõltumatu proovi tulemuste võrdlus on kokku võetud tabelis 20 (2 x 3 võimalikkuse tabel) ja tabelis 21 (protsentuaalne kokkulangevus).

**Tabel 20. Meetodite võrdlus: komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja sekveneerimine**

		Otsese sekveneerimise tulemused		
		JAK2 V617F >2%	Metsikut tüüpi JAK2 (JAK2 V617F <2%)	Kokku
Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit testimis-meetodi tulemused	JAK2 V617F Tuvastati mutatsioon	26	1	27
	Tulemused ei ole ühesed	0	1	1
	JAK2 WT Mutatsiooni ei tuvastatud	2	20	22
<b>Kokku</b>		<b>28</b>	<b>22</b>	<b>n = 50</b>

**Tabel 21. Meetodite võrdlus: komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja sekveneerimine**

	Kokkulangevus (%)	95% CI* (%)
Positiivsed andmed		
Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit ja sekveneerimise kokkulangevus	<b>92,9</b>	77,4–98,0
Negatiivsed andmed		
Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit ja sekveneerimise kokkulangevus	<b>95,2</b>	77,3–99,2
<b>Kokkulangevus kokku</b>	<b>93,9</b>	<b>83,5–97,9</b>

\* Usaldusvahemik arvutati vastavalt CLSI EP12-A juhendile „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” (Kvalitatiivse testi sooritusvõime hindamise kasutaja protokoll, kinnitatud juhend).

### Laboratooriumidevaheline 228 patsiendi proovi uuring

Patsientide DNA proove analüüsiti tavameetodiga 13 laboratooriumidevahelises uuringus osalevas laboris. Igas laboris tehti kolm eksperimenti rakuliinide DNA-ga samal viisil nagu mittekliiniliste täpsuse andmete puhul (vt ülalpool) ning laboris saadaolevalt 10 patsiendilt pärineva DNA-ga.

Teadaoleva JAK2 genotüübiga 228 proovi testiti paralleelselt komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ning tavameetodite abil (sh kvalitatiivne PCR, alleelispetsiifiline PCR, fluorestsentsi resonantsenergia ülekande (FRET), sekveneerimine, alleelispetsiifiline oligonukleotiidi PCR, RFLP ja alleelide eristamine. Võrdluste tulemused on toodud tabelis 22 (2 x 3 võimalikkuse tabel) ja tabelis 23 (protsentuaalne kokkulangevus).

**Tabel 22. Meetodite võrdlus: komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja tavameetodid**

		Tavameetodi testimise tulemused		
		Tuvastati mutatsioon JAK2 V617F	Mutatsiooni ei tuvastatud Metsikut tüüpi JAK2	Kokku
Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit testimis-meetodi tulemused	JAK2 V617F Tuvastati mutatsioon	139	3	142
	Tulemused ei ole ühesed	5	17	22
	JAK2 WT Mutatsiooni ei tuvastatud	3	61	64
<b>Kokku</b>		<b>147</b>	<b>81</b>	<b>n = 228</b>

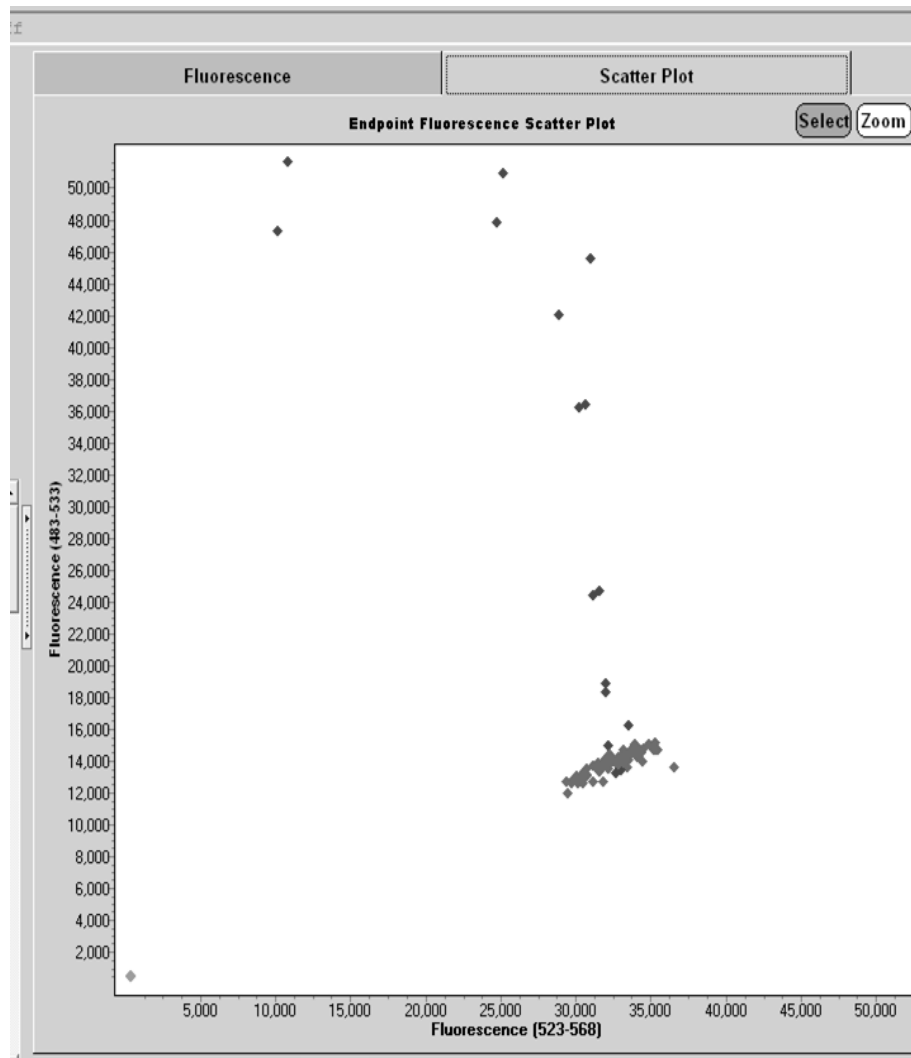
**Tabel 23. Meetodite võrdlus: komplekt *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ja tavameetodid**

	<b>Kokkulangevus (%)</b>	<b>95% CI* (%)</b>
Positiivsed andmed Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit ja koduste meetodite kokkulangevus	<b>97,9</b>	94,0–99,3
Negatiivsed andmed Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit ja tavameetodite kokkulangevus	<b>95,3</b>	87,1–98,4
<b>Kokkulangevus kokku</b>	<b>97,1</b>	<b>93,8–98,7</b>

\* Usaldusvahemik arvatati vastavalt CLSI EP12-A juhendile „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” (Kvalitatiivse testi sooritusvõime hindamise kasutaja protokoll, kinnitatud juhend).

## Usaldusväärsus: tervete doonorite proovide testimine

Komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit abil analüüsiti 103 terve veredoonori DNA proovi. Kõikides proovides tuvastati metsikut tüüpi JAK2. Joonisel 34 on toodud 38 proovi analüüs seadme LightCycler 480 abil.



**Joonis 34. Tervete doonorite analüüs.** Seadme LightCycler 480 abil 38 terve doonori (◆) analüüsimine komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit (kategoorianr 673123). Positiivsed tulemused kahes eksemplaris (◆) vastavad komplektiga kaasas olevale referentskaalale. VIC-fluorestsentsi väärtused on kujutatud X-teljel ja FAM-väärtused Y-teljel.

## Viited

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

## Tähised

Pakendil ja sildil võivad olla järgmised tähised:



Sisaldab reaktiive, millest piisab <N> reaktsiooni jaoks



Kõlblik kuni



In vitro diagnostikaks ettenähtud meditsiiniseade



Katalooginumber



Partii number



Materjali number



Globaalne kaubaartikli number (GTIN)



Temperatuuripiirangud



Tootja



Kasutamiseks tutvuge juhistega

## Kontaktteave

Tehnilise toe ja lisateabe saamiseks külastage meie tehnilise toe keskust veebiaadressil [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), helistage numbril 00800-22-44-6000 või võtke ühendust mõne QIAGEN-i tehnilise toe osakonnaga või kohaliku müügiesindajaga (vt tagakaant või külastage veebilehte [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



## Tellimisteave

Toode	Sisukord	Katalooginr
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (10)	10 reaktsioonile: V617F positiivne kontroll, V617F negatiivne kontroll, V617F proovi piirväärtus, praimerite ja sondide metsikut tüüpi JAK2 ning JAK2 V617F-i segu.	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (24)	24 reaktsioonile: V617F positiivne kontroll, V617F negatiivne kontroll, V617F proovi piirväärtus, praimerite ja sondide metsikut tüüpi JAK2 ning JAK2 V617F-i segu.	673023
<b>Rotor-Gene Q MDx – IVD-valideeritud reaalaajaline PCR-analüüs kliinilistes rakendustes</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaalaajaline PCR-tsükler ja analüsaator High Resolution Melt koos 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, tarvikud, 1-aastane garantii osadele ja tööle; installimine ja koolitus ei kuulu komplekti	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaalaajaline PCR-tsükler ja analüsaator High Resolution Melt koos 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, tarvikud, 1-aastane garantii osadele ja tööle, installimine ning koolitus	9002033

Ajakohase litsentsiteabe ja tootepõhised lahtiütlemised leiate vastavast QIAGEN-i komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN-i komplekti käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) või tellimisel QIAGEN-i tehniliselt toelt või kohalikult müügiesindajalt.

See leht on teadlikult tühjaks jäetud.

Toode on ette nähtud kasutamiseks in vitro diagnostikas. Kaubamärgi *ipsogen* tooteid ei tohi ilma QIAGEN-i kirjaliku loata edasi müüa ega edasimüümiseks muuta või müüdavate toodete valmistamiseks kasutada.

Selles dokumendis sisalduvat teavet võidakse ette teatamata muuta. QIAGEN ei võta endale vastutust dokumendis esineda võivate vigade eest. See dokument on avaldamise hetkel täielik ja täpne. QIAGEN ei vastuta mitte mingil juhul seoses selle dokumendi kasutamisega või sellest tulenevalt põhjustatud kaudsete, spetsiaalsete, paljude erinevate või põhjuslike kahjude eest.

Kaubamärgi *ipsogen* toodetele on antud garantii, et need vastavad märgitud tehnilistele andmetele. QIAGEN-i ainsaks kohustuseks ja kliendi ainsaks hüvitiseks on toote ettenähtud funktsiooni täitmise ebaõnnestumise korral toodete tasuta asendus.

Seda toodet müüakse ettevõttega Epoch Biosciences sõlmitud litsentsilepingu alusel ja see on ette nähtud kasutamiseks ainult in vitro diagnostikas. Toodet ei tohi kasutada muudeks uuringuteks, kaubanduslikel eesmärkidel, kliinilisteks uuringuteks ega muuks in vitro diagnostikast erinevaks kasutuseks.

Mutatsioon JAK2 V617F ja selle kasutused on patendiõigustega kaitstud (sh Euroopa patent EP1692281, USA patent 7,429,456 ja 7,781,199, USA patendirakendused US20090162849 ja US20120066776 ning muude riikide patendid).

Selle toote ostmine ei taga õigusi selle kasutamiseks mutatsiooni JAK2 V617F sihtivate ravimite kliinilistes uuringutes. QIAGEN töötab selleks välja spetsiaalseid litsentsiprogramme. Võtke ühendust meie juriidilise teabe osakonnaga aadressil [jak2licenses@qiagen.com](mailto:jak2licenses@qiagen.com).

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

### Piiratud litsentsileping

Selle toote kasutamine tähendab, et komplekti *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit ostja või kasutaja nõustub järgmiste tingimustega.

1. Komplekti *ipsogen*JAK2 MutaScreen Kit tohib kasutada ainult vastavalt komplekti *ipsogen* *JAK2 MutaScreen Kit kasutusjuhendile* ning koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna enda intellektuaalse omandi all litsentse komplekti komponentide kasutamiseks koos sellesse komplekti mittekuuluvate osadega, v.a komplekti *ipsogen* *JAK2 MutaScreen Kit kasutusjuhendis* kirjeldatud juhtudel. Lisaprotokollid on saadaval veebilehel [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. QIAGEN ei anna garantiid, et komplekt ja/või selle kasutus ei riku kolmandate osapoolte õigusi, v.a selgesõnalised litsentsid.
3. Komplekt ja selle osad on litsentsitud ühekordseks kasutuseks ning neid ei tohi taaskasutada, parandada ega edasi müüa.
4. QIAGEN ütleb lahti muudest väljendatud või kaudsetest litsentsidest, v.a selgesõnalistest litsentsidest.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustuvad, et ei tee ise ega luba kellelgi teisel teha midagi, mis võiks kaasa aidata või viia ülaltoodud keelatud toiminguteni. QIAGEN võib selle piiratud litsentsilepingu keelde jõustada mis tahes kohtus ning taotleda tagasi kõik piiratud litsentsilepingu või komplekti ja/või selle komponentidega seotud mis tahes intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks kulunud juurdlus- ja kohtukulud, sh advokaaditasud.

Uuendatud litsentsitingimused leiate veebilehelt [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN. Kõik õigused kaitstud.

---

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

