

August 2016

Komplekti *ipsogen*[®] JAK2 Muta *Quant*[®] Kit käsiraamat

 12 (katalooginr 673522)

 24 (katalooginr 673523)

1. versioon

IVD

Kvantitatiivne *in vitro* diagnostika

Kasutamiseks seadmetega Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS,
Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSAMAA

R3

MAT

1072501EE



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN seab standardid järgmises:

- DNA, RNA ja valkude puhastamine;
- nukleiinhappe ja valgu analüüs;
- mikroRNA uurimine ja RNA interferents;
- proovivõtu ja analüüsimeetodite automatiseerimine.

Meie eesmärk on aidata teil saavutada edu ja läbimurdeid. Lisateabe saamiseks külastage veebilehte www.qiagen.com.

Sisukord

Sihtotstarve	4
Ülevaade ja selgitus	4
Protseduuri põhimõte	6
Kaasasolevad materjalid	9
Komplekti sisu	9
Vajalikud, kuid mitte kaasasolevad materjalid	10
Hoiatused ja ettevaatusabinõud	11
Üldised ettevaatusabinõud	11
Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine	11
Protseduur	13
Proovi DNA ettevalmistamine	13
Protokoll	
■ qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM seadmel 72-katsutilise rootoriga	14
■ Protokoll: qPCR ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 seadmel	18
■ Protokoll: qPCR seadmel LightCycler 1.2	24
Tulemuste tõlgendamine	28
Tõrkeotsingujuhend	32
Kvaliteedikontroll	36
Piirangud	36
Sooritusnäitajad	37
Mittekliinilised uuringud	37
Kliinilised uuringud	38
Viited	40
Tähised	41
Kontaktteave	41
Tellimisteave	42

Sihtotstarve

Komplekt *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* on *in vitro* kvantitatiivne analüüs, mis on ette nähtud JAK2 V617F/G1849T alleeli tuvastamiseks ja kvantitatiivseks määramiseks isikute, kellel kahtlustatakse müeloproliferatiivset neoplasm (Myeloproliferative Neoplasm, MPN), perifeersest verest ekstraheeritud genoomses DNA-s.

JAK2 V617F/G1849T mutatsiooni puudumine ei välista teiste JAK2 mutatsioonide esinemist. Analüüs võib teatada valenegatiivsetest tulemustest juhul, kui nukleotiidides 88504 kuni 88622 paiknevad täiendavad mutatsioonid (1).

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

Ülevaade ja selgitus

2005. aastal tuvastati korduv somaatiline mutatsioon V617F, mis mõjutab Januse türosiinkinaasi 2 (JAK2) geeni (2–5), mis tõi kaasa suure läbimurde müeloproliferatiivsete kasvajate (Myeloproliferative Neoplasm, MPN) mõistmisel, klassifitseerimisel ja diagnoosimisel. JAK2 on mitme tsütokiini (sh erütropoetiini) kriitiline intratsellulaarne signaalmolekul.

JAK2 V617F mutatsioon tuvastatakse > 95%-l tõelise polütsüteemiaga (Polycythemia Vera, PV) patsientidest, 50–60%-l essentsiaalse trombotsüteemiaga (ET) patsientidest ja 50%-l primaarse müelofibroosiga (PMF) patsientidest. JAK2 V617F on tuvastatud ka mõnel harval juhul kroonilise müelomonotsüütilise leukeemia, müelodüsplastilise sündroomi, süsteemse mastotsütoosi ja kroonilise neutrofiilse leukeemia korral, kuid 0% CML-i korral (6).

Mutatsioon vastab JAK2 nukleotiidi 1849 ühe nukleotiidi muutusele eksonis 14, mille tulemuseks on unikaalne valiini (V) asendamine fenüülalaniiniga (F) valgu positsioonis 617 (JH2 domeenis). See viib JAK2 konstitutiivse aktiveerimiseni, vereloome muundamiseni *in vitro* ja erütropoetiinist sõltumatu erütroidikoloonia (Erythropoietin-independent Erythroid Colony, EEC) kasvule kõigil PV patsientidel ning suurel osal ET ja PMF patsientidest (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. JAK2 V617F mutatsiooni tuvastamine on nüüd osa WHO 2008. aasta referentskriteeriumitest BCR-ABL negatiivse MPN-i (Tabel 1) diagnoosimiseks ja selle mutatsiooni olemasolu on diagnostilise kinnituse peamine kriteerium.

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

Tõelise polütsüteemia (Polycythemia Vera, PV) diagnoosimise kriteeriumid	
Peamised	<p>1. Hemoglobiin (Hgb) > 18,5 g.dl⁻¹ (meestel) või > 16,5 g.dl⁻¹ (naistel) või Hgb või hematokrit (Hct) > 99. protsentiili vanuse, soo või elukoha kõrguse võrdlusvahemikust või Hgb > 17 g/dl⁻¹ (mehed) või > 15 g/dl⁻¹ (naised), kui seda seostatakse püsiva ≥ 2 g/dl⁻¹ suuruse kasvuga (võrreldes algse väärtusega), mis ei saa tuleneda rauapuuduse parandamisest, või ennustatud väärtusest > 25% 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 erütroidkoloonia (Endogenous Erythroid Colony, EEC) kasv</p>
Essentsiaalse trombotsüteemia (ET) diagnoosimise kriteeriumid	
Peamised	<p>1. Trombotsüütide arv $\geq 450 \times 10^9$ l⁻¹ 2. Suure ja küpse morfoloogiaga megakarüotsüüdi proliferatsioon; granülotsüütide või erütroidproliferatsiooni vähesus või puudumine 3. Ei vasta WHO kroonilise müeloidleukeemia (Chronic Myeloid Leukemia, CML), PV, primaarse müelofibroosi (PMF), müelodüsplastilise sündroomi (MDS) või muu müeloidse neoplasmia kriteeriumidele</p> <p>4. <i>JAK2V617F</i> või muu klonaalmarker või reaktiivsete trombotsüütide esinemise puudumine</p>
Lisa	-
Primaarse müelofibroosi (PMF) diagnoosimise kriteeriumid	
Peamised	<p>1. Megakarüotsüüdi proliferatsioon ja ebatüüpilisus koos retikuliini ja/või kollageeni fibroosiga või retikuliinfibroosi puudumisel peab megakarüotsüütide muutustega kaasnema suurenenud luuüdi rakulisus, granülotsüütiline proliferatsioon ja sageli vähenenud erütropoees (st prefibrootiline 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 laktatdehüdrogenaasi (lactate dehydrogenase LDH) sisaldus 3. Aneemia 4. Palpeeritav splenomegalia</p>

Rahvusvahelised eksperdid pakkusid hiljuti välja kriteeriumi PV ja ET terapeutiliste katsete jaoks. Allograffi, alfa-interferooni või hüdroksüurea kohta saadud andmete põhjal on JAK2V617F kvantifitseerimine lisatud ravivastuse jälgimiseks potentsiaalselt kasulikuks vahendiks (9). JAK2 V617F koormuse vähenemist on täheldatud vastusena mõnele uuele kliinilises arenduses olevale JAK2-vastasele ravimile (10).

Protseduuri põhimõte

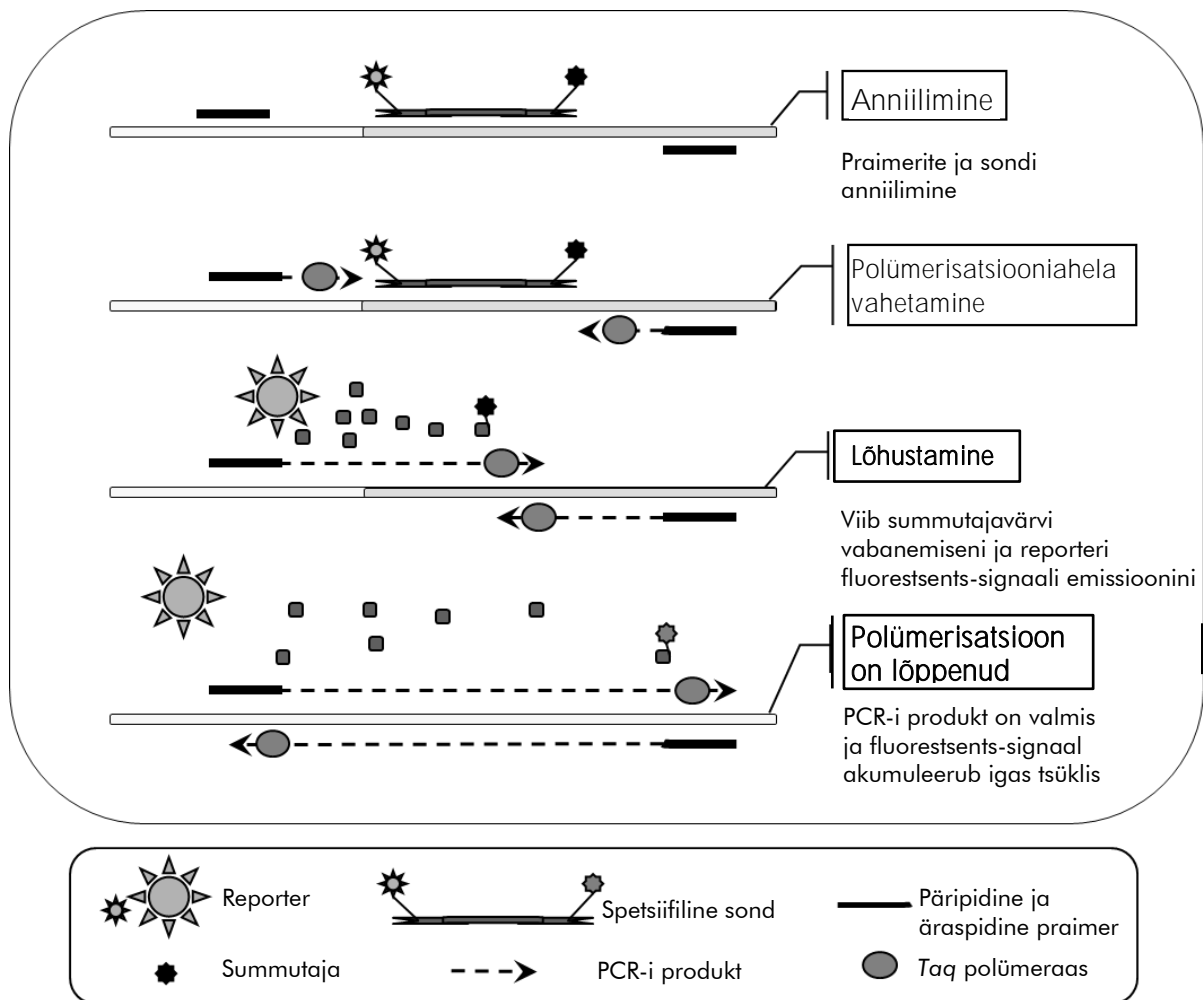
Ühenukleotiidsete polümorfismide (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) osakaalu kvantitatiivseks määramiseks DNA proovides on pakutud mitmeid erinevaid tehnikaid. Neist eelistatakse reaalka kvantitatiivsel polümeraasi ahelreaktsioonil (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) põhinevaid meetodeid nende kõrgema tundlikkuse tõttu, mis võimaldab jälgida alleeli koormust pikisuunas. Paljud neist meetoditest on mõõduka tundlikkusega 1–10%, näiteks TaqMan® alleelne diskrimineerimine, Pyrosequencing®, sulamiskõvera analüüs ja otsene sekveneerimine. Mõned neist, näiteks sulamiskõvera analüüs ja sekveneerimine, on ainult poolkvantitatiivsed, teised, näiteks pürosekveneerimine, vajavad PCR-järgset töötlemist või seadmeid, mis pole hõlpsasti kättesaadavad või millel on tavapärase laboratoorsete testide jaoks liiga kõrged seadistuskulud. Väga tundlik lähenemine tundlikkusega < 0,1% nõuab SNP-spetsiifilise praimerid kasutamist, mis võimaldab mutantse või metsiktüüpi alleeli selektiivset amplifikatsiooni, mis on reaalka qPCR-seadmega hõlpsasti tuvastatav. Komplekt *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit põhineb sellel tehnikal.

qPCR-i kasutamine võimaldab PCR-i produktide täpset kvantifitseerimist PCR-i amplifitseerimisprotsessi eksponentsiaalse faasi ajal. Kvantitatiivse PCR-i andmeid on võimalik kiiresti saada ilma PCR-järgse töötlemiseta fluorestsentssignaalide reaalka tuvastamisega PCR-tsükli ajal ja/või pärast seda, vähendades seeläbi drastiliselt PCR-i produkti saastumise riski. Praegu on saadaval 3 peamist tüüpi qPCR-i tehnikat: qPCR-analüüs SYBR® Green I värvi abil, qPCR-analüüs hüdrolüüsisonidide abil ja qPCR-analüüs hübriidsatsioonisonidide abil.

Selles analüüsis kasutatakse qPCR-i topeltvärvi oligonukleotiidi hüdrolüüsi põhimõtet. PCR-i ajal hübriidiseeruvad päripidised ja äraspidised praimerid konkreetse järjestusega. Samas segus sisaldub kahe-värvi oligonukleotiid. See proov, mis koosneb 5'-otsas reportervärviga ja 3'-otsas summutajavärviga märgistatud oligonukleotiidist, hübriidiseerub sihtmärk-järjestusega PCR-produktis. Hüdrolüüsiproovidega qPCR analüüs kasutab ära *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasist aktiivsust. Kui proov on intaktne, summutab reportervärvi lähedus summutajavärvile reporteri fluorestsentsi peamiselt Förster-tüüpi energia ülekande teel.

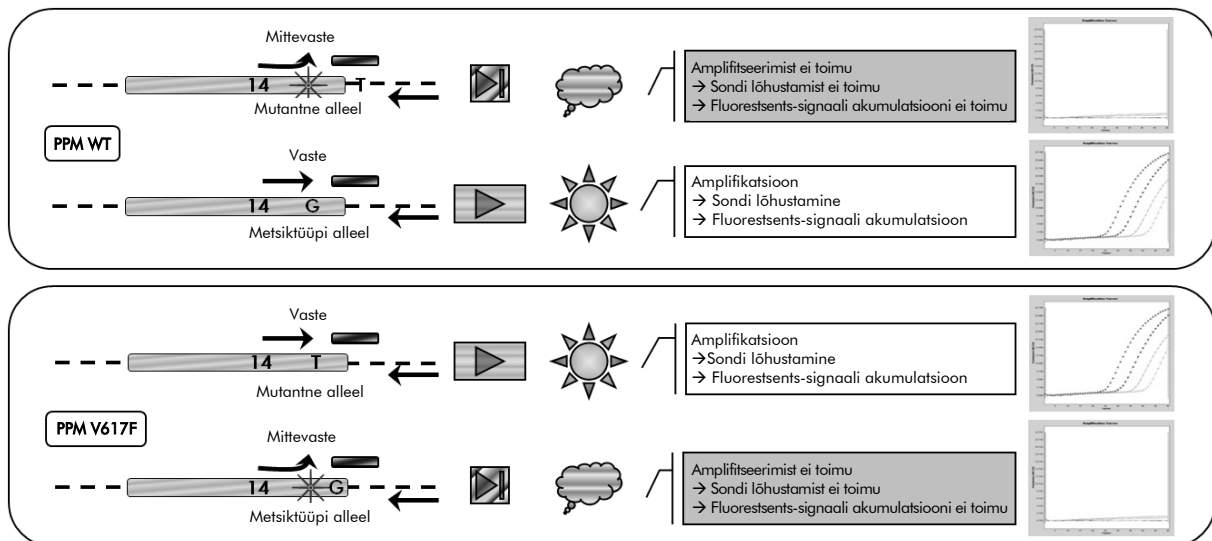
PCR ajal, kui huvipakkuv märklaud on olemas, anniilub sond spetsiifiliselt päripidise ja äraspidise praimerite vahel. DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasne aktiivsus lõhustab sondi reporteri ja summutaja vahel ainult siis, kui sond on sihtmärgile hübridiseerunud. Sondi fragmendid tõrjutakse seejärel sihtmärgilt eemale ja ahela polümeriseerumine jätkub. Sondi 3'-ots on blokeeritud, et vältida proovi pikendamist PCR-i käigus (Joonis 1). See protsess toimub igas tsüklis ega sega produkti eksponentsiaalset akumulereerumist.

Fluorestsents-signaali suurenemist tuvastatakse ainult siis, kui sihtmärk-järjestus on sondiga komplementaarne ja seetõttu amplifitseeritakse PCR-i käigus. Nende nõuete tõttu ei tuvastata mittespetsiifilist amplifikatsiooni. Seega on fluorestsentsi suurenemine otseselt proportsionaalne sihtmärgi amplifitseerumisega PCR-i käigus.



Joonis 1. Reaktsiooni põhimõte.

Selles analüüsikomplektis kasutatud kvantitatiivne alleelispetsiifiline PCR-tehnoloogia võimaldab SNP-de tuvastamist tundlikul, täpsel ja väga reprodutseeritaval viisil. See meetod põhineb spetsiifiliste päripidiste praimerite kasutamisel metsiktüüpi ja V617F alleeli jaoks (11). Ainult täpne vaste praimer ja sihtmärk-DNA vahel võimaldab pikendamist ja amplifitseerimist PCR-is (Joonis 2).



Joonis 2. Alleelispetsiifiline PCR Metsiktüüpi või V617F praimerite ja sondi segude kasutamine võimaldab metsiktüüpi või muteerunud alleeli spetsiifiliselt tuvastada kahes eraldi läbiviidavas reaktsioonis, kasutades sama proovi. Tulemusi saab väljendada VF-koopiate protsendina JAK2-koopiate koguarvust.

Kaasasolevad materjalid

Komplekti sisu

Komplekt <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Katalooginr		673522	673523
Reaktsioonide arv		12	24
V617F positiivne kontroll (100% V617F alleel)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negatiivne kontroll (100% metsiktüüpi alleel)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF standardlahjendus, 50 koopiat (5 x 10 ¹ V617F koopiat/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF standardlahjendus, 500 koopiat (5 x 10 ² V617F koopiat/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF standardlahjendus, 5000 koopiat (5 x 10 ³ V617F koopiat/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF standardlahjendus, 50 000 koopiat (5 x 10 ⁴ V617F koopiat/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 standardlahjendus, 50 koopiat (5 x 10 ¹ metsiktüüpi koopiat/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 standardlahjendus, 500 koopiat (5 x 10 ² metsiktüüpi koopiat/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 standardlahjendus, 5000 koopiat (5 x 10 ³ metsiktüüpi koopiat/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 standardlahjendus, 50 000 koopiat (5 x 10 ⁴ metsiktüüpi koopiat/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Praimerite ja sondi segu JAK2 WT*	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Praimerite ja sondi segu JAK2 V617F [†]	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
Komplekti <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit juhend (inglise keeles)		1	1

* Spetsiifiliste päripidiste ja äraspidiste praimerite segu metsiktüüpi JAK2 kontrollgeeni jaoks pluss spetsiifiline FAM™–TAMRA™ sond.

† Spetsiifiliste päripidiste ja äraspidiste praimerite segu JAK2 V617F mutatsiooni jaoks pluss spetsiifiline FAM–TAMRA sond.

Märkus. Segage keerisregistil ja tsentrifuugige enne kasutamist standardlahjendusi ning praimerite ja sondi segusid.

Vajalikud, kuid mitte kaasasolevad materjalid

Kemikaalidega töötamise korral kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks lugege toote tarnijalt saadaolevaid asjakohaseid ohutuskaarte (Safety Data Sheets, SDS-e).

Reaktiivid

- Nukleaasidevaba PCR-klassi vesi
- Puhver ja Taq-i DNA polümeraas: Valideeritud reaktiivid on TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, katalooginr 4304437) and LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, katalooginr 04535286001) või LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, katalooginr 03515567001)

Kulutarvikud

- Nukleaasidevabad aerosoolikindlad steriilsed PCR-pipetiotsikud ja hüdrofoobsed filtrid
- 0,5 ml või 1,5 ml nukleaasidevabad PCR-katsutid
- Jää

Seadmed

- Mikropipett* ainult PCR-i jaoks (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Lauatsentrifuug* rooriga 0,5 ml/1,5 ml reaktsioonikatsutitele ja mikroplaatidele (maksimumkiirusega 13 000–14 000 p/min)
- Real-time PCR-seade:* Rotor-Gene Q 5plex HRM või muu Rotor-Gene; LightCycler 1.2 või 480; ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ja seotud spetsiifiline materjal
- Biofotomeeter

* Veenduge, et seadmeid oleks kontrollitud ja kalibreeritud vastavalt tootja soovitudele.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas

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

Hävitage proovivõtu- ja analüüsijätmed vastavalt kohalikele ohutusnõuetele.

Üldised ettevaatusabinõud

qPCR-testide kasutamine nõuab häid laboratoorseid tavasid, sealhulgas selliste seadmete hooldust, mis on pühendatud molekulaarbioloogiale ja vastavad kohaldatavatele määrustele 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 andmed olla vigased või neis võib esineda lahknevusi. PPM-WT ja PPM-VF reaktiivid võivad valgusega kokkupuutel muutuda. Kõik reaktiivid on loodud spetsiaalselt selle analüüsiga kasutamiseks. Analüüsi optimaalseks toimimiseks ei tohiks midagi asendada.

Olge eriti ettevaatlik, et vältida järgmist:

- DNAasiga saastumine, mis võib põhjustada matriits-DNA lagunemist
- DNA või PCR-i jääkmõju saastumist, mis põhjustab väärpositiivse signaali.

Ülaltoodu vältimiseks soovitame järgmist.

- Kasutage analüüsi tegemisel nukleasidvabu laboritarbeid (nt pipette, pipetiotsikuid, reaktsioonivahendeid) ja kandke kindaid.
- Kasutage uusi aerosoolikindlaid pipetiotsikuid iga pipeteerimistoimingu jaoks, et vältida proovide ja reaktiivide ristsaastumist.
- Valmistage PCR-eelne põhisegu selleks ette nähtud materjaliga (pipetid, otsikud jne) selleks ette nähtud alal, kuhu ei ole viidud DNA maatriksit (DNA-d, plasmidi ega PCR-produkte). 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 temperatuuril $-15...-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Minimeerige praimerite ja sondi segude (PPM-WT ja PPM-VF katsutite) kokkupuudet valgusega.
- Enne avamist segage ja tsentrifuugige katsuteid õrnalt.
- Hoidke komplekti kõiki osi algpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui ka avamata osadele. Siltidel märgitutest 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 tuleks saada täisverest, täisvere puhastatud perifeerse vere lümfotsüütidest, polünukleaarsetest rakkudest või granulotsüütidest. Võrreldavate tulemuste saamiseks on soovitatav kasutada sama rakufraktsiooni ja DNA ekstraheerimise meetodit. DNA ekstraheerimiseks võib kasutada home-brew meetodit või müügil olevat komplekti.

DNA kogus tuleks kindlaks määrata proovi optilise tiheduse (Optical Density, OD) mõõtmisega lainepikkusel 260 nm ja DNA kvaliteeti saab määrata kas spektrofotomeetria või geel*elektroforeesi abil.

- OD_{260}/OD_{280} suhe peaks olema 1,7–1,9 ja sellest väiksemad suhted võivad viidata valguga saastumisele või orgaaniliste kemikaalide olemasolule.
- Elektroforeetiline analüüs 0,8–1,0% agarosgeelil* peaks võimaldama eraldatud DNA visualiseerimist eraldiseisva, umbes 20 kb vöödina (kerge määrdumine annab vastuvõetavad tulemused).

Saadud DNA tuleb lahjendada kontsentratsioonini 5 ng/ μ l 1x TE puhvrisk, mille pH on 8,0, ja seejärel säilitada seda temperatuuril +4...+ 8 °C 1 nädala jooksul või temperatuuril –20 °C, kui on vaja pikemat säilitamist.

qPCR reaktsioon on optimeeritud DNA proovide jaoks, mis sisaldavad 25 ng puhastatud genoomset DNA-d.

* Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks lugege toote tarnijalt saadaolevaid asjakohaseid ohutuskaarte (Safety Data Sheets, SDS-e).

Protokoll: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM seadmetel 72-katsutilise rootoriga

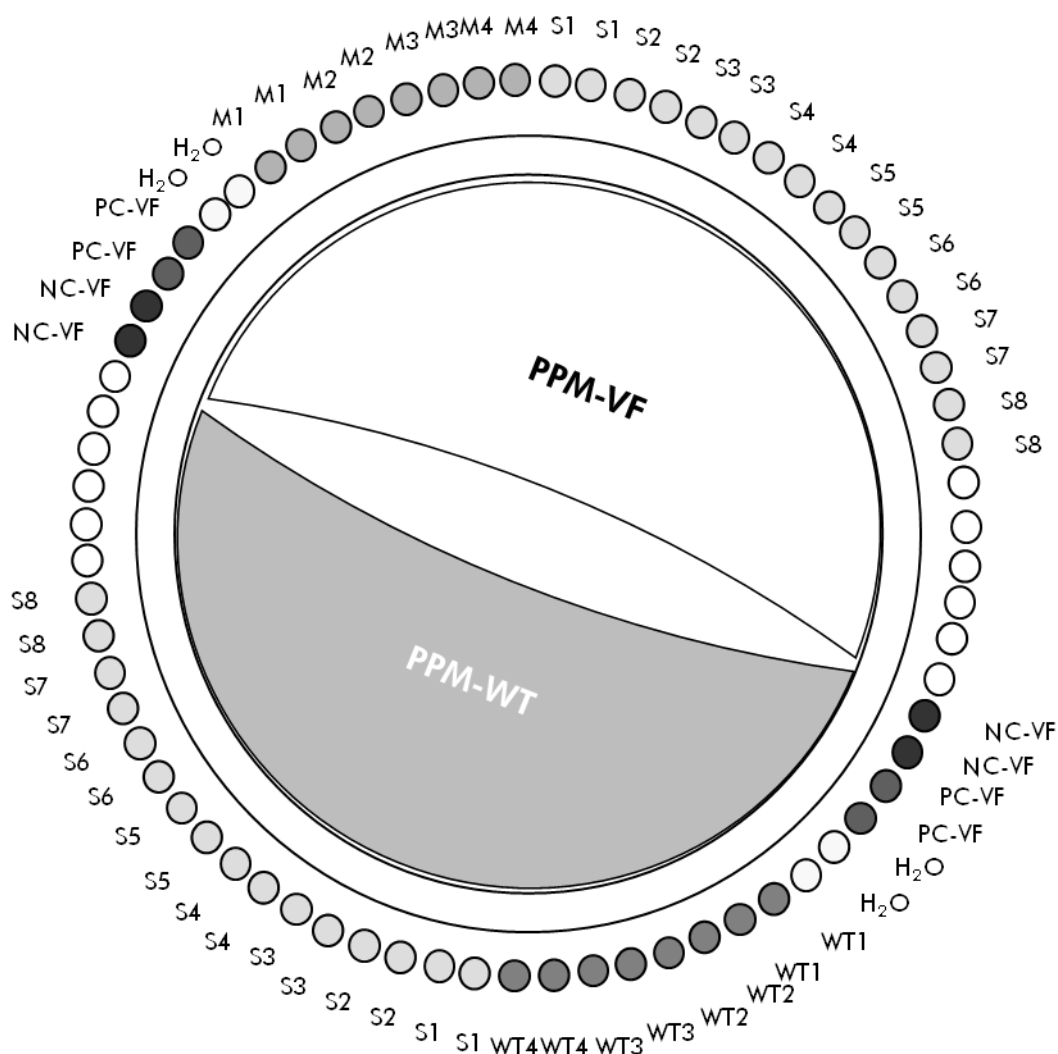
Seda seadet kasutades soovitame kõik mõõtmised teha kahes korduses, nagu on näidatud tabelis Tabel 2.

Tabel 2. Reaktsioonide arv 72-katsutilise rootoriga Rotor-Gene Q seadmete korral

Proovid	Reaktsioonid
JAK2 V617F praimerite ja sondi seguga (PPM-VF)	
4 M-VF standardit	8 reaktsiooni, igaüht neist testiti kahes korduses
n DNA proovi	n x 2 reaktsiooni
2 DNA kontrolli	4 reaktsiooni: positiivne kontroll (PC-VF) ja negatiivne kontroll (NC-VF), igaüht testiti kahes korduses
Veekontroll	2 reaktsiooni
JAK2 metsiktüüpi praimerite ja sondi seguga (PPM-WT)	
4 metsiktüüpi standardit	8 reaktsiooni, igaüht neist testiti kahes korduses
n DNA proovi	n x 2 reaktsiooni
2 DNA kontrolli	4 reaktsiooni: PC-VF ja NC-VF, kumbagi testiti kahes korduses
Veekontroll	2 reaktsiooni

Proovide töötlemine 72-katsutilise rootoriga Rotor-Gene Q seadmetega

Soovitame standardite ning praimerite ja sondi segude optimaalsemaks kasutamiseks testida samas katses vähemalt kaheksat DNA proovi 24 reaktsiooni komplektiga (katalooginr 673523) ja vähemalt kuut DNA proovi 12 reaktsiooni komplektiga (katalooginr 673522).



Joonis 3. Soovitatav rootori seadistus iga katse jaoks komplektiga *ipsogen* 24 proovi JAK2 MutaQuant Kit. PC-VF: V617F positiivne kontroll; NC-VF: V617F negatiivne kontroll; M-VF: V617F standardid; M-WT: metsiktüüpi standardid; S: DNA proov; H₂O: veekontroll.

Märkus. Hoolitsege selle eest, et testitav proov asetatakse alati rootori 1. asukohta. Vastasel juhul ei teosta seade kalibreerimist ning saadakse valed fluorestsentsandmed.

Täitke kõik muud asukohad tühjade katsutitega.

qPCR 72-katsutilise rootoriga Rotor-Gene Q seadmetel

Märkus. Tehke kõik toimingud jääl.

Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.
Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabelid Tabel 3 ja 4 kirjeldavad pipeteerimisskeemi ühe reaktiivisegu valmistamiseks, mis on arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht oleks 25 µl. Eelsegu võib valmistada vastavalt reaktsioonide arvule, kasutades sama praimerite ja sondi segu (kas PPM-VF või PPM-WT). Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Tabel 3. qPCR-segu ettevalmistamine

Komponent	1 reaktsioon (µl)	V617F eelsegu 30 + 1 reaktsioon (µl)	Lõppkontsentratsioon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Praimerite ja sondi segu, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Nukleaasidevaba PCR-klassi vesi	6,5	201,5	–
Proov (lisatakse 4. etapis)	5,0	igaüht 5	–
Lõppmaht	25,0	igaüht 25	–

Tabel 4. qPCR-segu ettevalmistamine

Komponent	1 reaktsioon (µl)	WT eelsegu 30 + 1 reaktsiooni (µl)	Lõppkontsentratsioon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Praimerite ja sondi segu, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Nukleaasidevaba PCR-klassi vesi	6,5	201,5	–
Proov (lisatakse 4. etapis)	5,0	igaüht 5	–
Lõppmaht	25,0	igaüht 25	–

3. Lisage 20 µl qPCR-i eelsegu (VF või WT) katsuti kohta.
4. Lisage vastavasse katsutisse 5 µl kvantifitseeritavat materjali (25 ng proovi genoomset DNA-d või kontrolli) (kogumaht 25 µl).
5. Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.
6. Asetage katsutid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
7. Programmeerige Rotor-Gene Q seadme termotsükleerimise programm, nagu on näidatud tabelis Tabel 5.

Tabel 5. Temperatuuriprofiil

Analüüsirežiim	Määramine
Hold (Hoidmine)	Temperatuur: 50 kraadi Aeg: 2 minutit
Hold 2 (2. hoidmine)	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 minutit
Cycling (Tsüklistamine)	50 korda 95 °C 15 sekundit 62 °C 1 minuti jooksul FAM fluorestsentsi kogumisega kanalis Green: Single (Üksik)

8. Rotor-Gene Q seadmel valige analüüsiks „Slope Correct” (Kõvera parandamine). Soovitame lävendiks panna 0,03. Käivitage termotsüklistamise programm, nagu on näidatud tabelis Tabel 5.

Protokoll: qPCR ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 seadmel

Kasutades 96-süvendilise plaadi qPCR seadet, soovitame kõik mõõtmised läbi viia kahes korduses, nagu on näidatud tabelis Tabel 6.

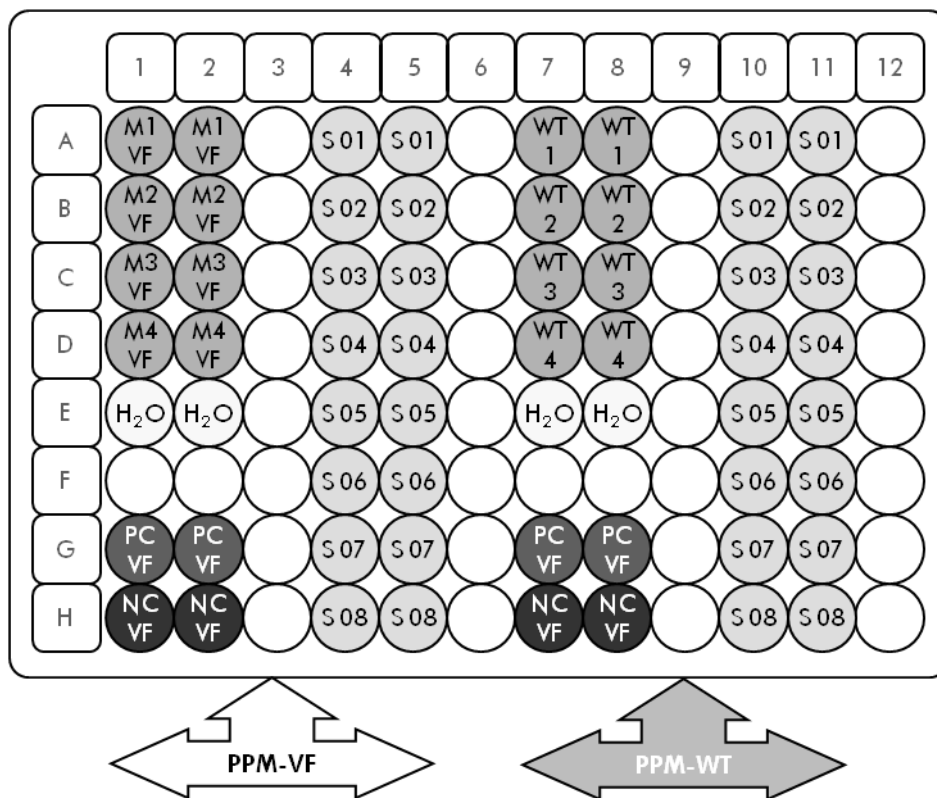
Tabel 6. Reaktsioonide arv, kasutades 96-süvendilise plaadi qPCR seadet

Proovid	Reaktsioonid
JAK2 V617F praimerite ja sondi seguga (PPM-VF)	
4 M-VF standardit	8 reaktsiooni, igaüht neist testiti kahes korduses
n DNA proovi	n x 2 reaktsiooni
2 DNA kontrolli	4 reaktsiooni: PC-VF ja NC-VF, kumbagi testiti kahes korduses
Veekontroll	2 reaktsiooni
JAK2 metsiktüüpi praimerite ja sondi seguga (PPM-WT)	
4 metsiktüüpi standardit	8 reaktsiooni, igaüht neist testiti kahes korduses
n DNA proovi	n x 2 reaktsiooni
2 DNA kontrolli	4 reaktsiooni: PC-VF ja NC-VF, kumbagi testiti kahes korduses
Veekontroll	2 reaktsiooni

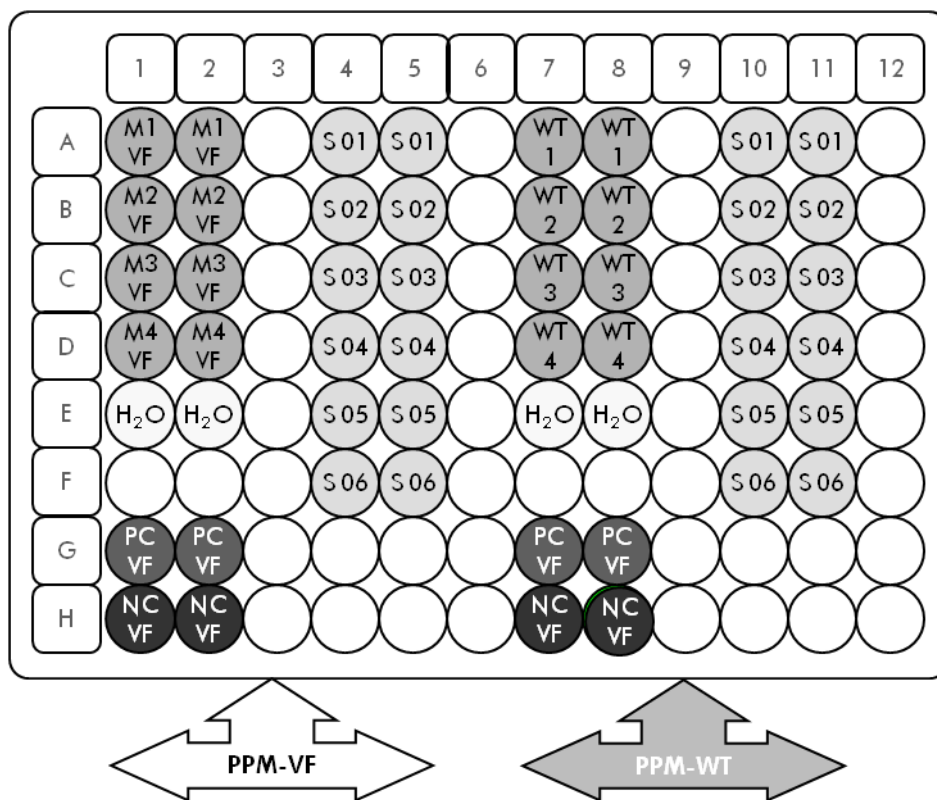
Proovi töötlemine ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 seadmel

Soovitame standardite ning praimerite ja sondi segude optimaalsemaks kasutamiseks testida samas katses kaheksat DNA proovi 24 reaktsiooni komplektiga (katalooginr 673523) ja vähemalt kuut DNA proovi 12 reaktsiooni komplektiga (katalooginr 673522).

Plaatskeem joonis 4 näitab sellise katse näidet, kasutades 24 reaktsiooni komplekti (katalooginr 673523) ja joonis 5 näitab sellise katse näidet, kasutades 12 reaktsiooni komplekti (katalooginr 673522).



Joonis 4. Soovituslik plaatide paigutus ühe katse jaoks , kasutades 24 reaktsiooni komplekti (katalooginr 673523). PC-VF: V617F positiivne kontroll; NC-VF: V617F negatiivne kontroll; M-VF: V617F standardid; M-WT: metsiktüüpi standardid; S: DNA proov; H₂O: veekontroll



Joonis 5. Soovituslik plaatide paigutus ühe katse jaoks , kasutades 12 reaktsiooni komplekti (katalooginr 673522). PC-VF: V617F positiivne kontroll; NC-VF: V617F negatiivne kontroll; M-VF: V617F standardid; M-WT: metsiktüüpi standardid; S: DNA proov; H₂O: veekontroll

qPCR ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 seadmel

Märkus. Tehke kõik toimingud jääl.

Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.
Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabelid 7 ja 8 kirjeldavad pipeteerimisskeemi ühe reaktiivisegu valmistamiseks, mis on arvutatud nii, et reaktsiooni lõppmaht oleks 25 µl. Eelsegu võib valmistada vastavalt reaktsioonide arvule, kasutades sama praimerite ja sondi segu (kas PPM-VF või PPM-WT). Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Tabel 7. qPCR-segu ettevalmistamine

Komponent	V617F eelsegu			Lõppkontsentratsioon
	1 reaktsioon (µl)	26 + 1 reaktsiooni (µl)	30 + 1 reaktsiooni (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Praimerite ja sondi segu, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Nukleaasidevaba PCR-klassi vesi	6,5	175,5	201,5	–
Proov (lisatakse 4. etapis)	5,0	igaüht 5	igaüht 5	–
Lõppmaht	25,0	igaüht 25	igaüht 25	–

Tabel 8. qPCR-segu ettevalmistamine

Komponent	WT eelsegu			Lõppkontsentratsioon
	1 reaktsioon (μ l)	26 + 1 reaktsiooni (μ l)	30 + 1 reaktsiooni (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Praimerite ja sondi segu, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Nukleaasidevaba PCR-klassi vesi	6,5	175,5	201,5	–
Proov (lisatakse 4. etapis)	5,0	igaüht 5	igaüht 5	–
Lõppmaht	25,0	igaüht 25	igaüht 25	–

3. Lisage 20 μ l qPCR-i eelsegu (VF või WT) süvendi kohta.
4. Lisage vastavasse süvendisse 5 μ l kvantifitseeritavat materjali (25 ng proovi genoomset DNA-d või kontrolli) (kogumaht 25 μ l).
5. Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.
6. Sulgege plaat ja tsentrifugeerige (300 x g, ligikaudu 10 sekundit).
7. Asetage plaat termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
8. Programmeerige termotsükleri termotsüklistamise programm ja seadke seade kahekordse märgistusega FAM-fluorestsentssondi kogumiseks, nagu on näidatud tabelis Tabel 9 ABI PRISM 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, või Tabel 10 LightCycler 480 seadme kohta.

Tabel 9. Temperatuuriprofiil seadmete ABI PRISM 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System jaoks

Analüüsirežiim	Standardkõver – absoluutne määramine
Hold (Hoidmine)	Temperatuur: 50 °C Aeg: 2 minutit
Hold 2 (2. hoidmine)	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 minutit
Cycling (Tsüklistamine)	50 korda 95 °C 15 sekundit 63 °C 1 minuti 30 sekundi jooksul FAM-fluorestsentsi kogumisega, summutaja: TAMRA

Tabel 10. Temperatuuriprofiil LightCycler 480 seadme jaoks

Analüüsirežiim	Absoluutne kvantifitseerimine („Abs Quant“)
Detection formats (Tuvastamisvormingud)	Valige aknas Detection formats (Tuvastamisvormingud) „Simple Probe“ (Lihtne sond)
Hold (Hoidmine)	Temperatuur: 50 °C Aeg: 2 minutit
Hold 2 (2. hoidmine)	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 minutit
Cycling (Tsüklistamine)	50 korda 95 °C 15 sekundit 63 °C 1 minut 30 sekundit FAM-fluorestsentsi kogumisega, mis vastab (483–533 nm) LC-versioonile 01 ja (465–510 nm) LC-versioonile 02

9. Seadmete ABI PRISM 7900HT ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System korral järgige etappi 8a. Seadme LightCycler 480 korral järgige etappi 8b.
- 9a. ABI PRISM 7900HT ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Soovitame lävendiks seada 0,1. Käivitage tsüklistamisprogramm, nagu on näidatud tabelis Tabel 9.

9b. LightCycler 480: Soovitame Fit point analüüsirežiimi taustaga 2,0 ja lävendiga 2,0. Käivitage termotsüklistamise programm, nagu on näidatud tabelis Tabel 10.

Protokoll: qPCR seadmel LightCycler 1.2

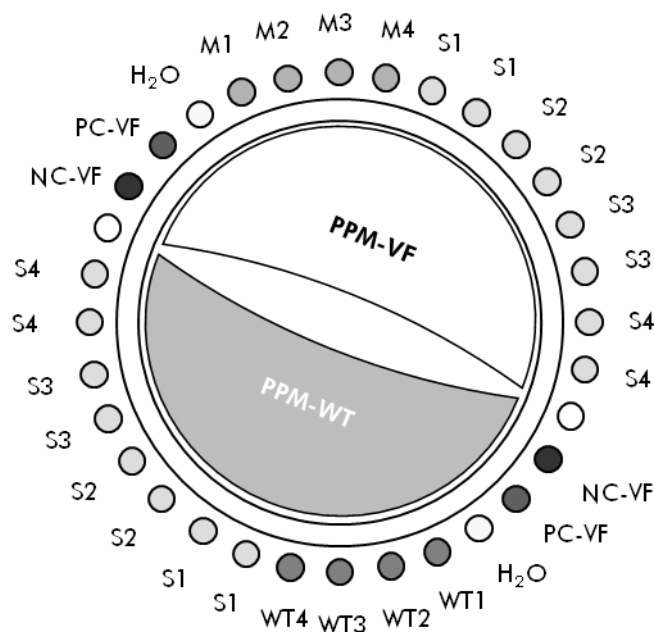
Kapillaarseadmete kasutamisel soovitame proove mõõta kahes korduses ja kontrolle ainult üks kord, nagu on näidatud tabelis Tabel 11.

Tabel 11. Seadme LightCycler 1.2 reaktsioonide arv

Proovid	Reaktsioonid
JAK2 V617F praimerite ja sondi seguga (PPM-VF)	
4 M-VF standardit	4 reaktsiooni, igaüht testitakse üks kord
n DNA proovi	n x 2 reaktsiooni
2 DNA kontrolli	2 reaktsiooni: PC-VF ja NC-VF, igaüht testitakse üks kord
Veekontroll	1 reaktsioon
JAK2 metsiktüüpi praimerite ja sondi seguga (PPM-WT)	
4 metsiktüüpi standardit	4 reaktsiooni, igaüht testitakse üks kord
n DNA proovi	n x 2 reaktsiooni
2 DNA kontrolli	2 reaktsiooni: PC-VF ja NC-VF, igaüht testitakse üks kord
Veekontroll	1 reaktsioon

Proovi töötlemine seadmel LightCycler 1.2

Standardite, praimerite ja sondi segude kasutamise optimeerimiseks soovitame testida nelja DNA proovi samas katses. Kapillaarskeem joonisel Joonis 6 näitab katse näidet.



Joonis 6. Soovitatav rootori seadistamine iga katse korral komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. PC-VF: V617F positiivne kontroll; NC-VF: V617F negatiivne kontroll; M-VF: V617F standardid; M-WT: metsiktüüpi standardid; S: DNA proov; H₂O: veekontroll.

qPCR seadmel LightCycler 1.2

Märkus. Spetsiifiliste tehnoloogiliste nõuete tõttu tuleb seadme LightCycler katsed läbi viia spetsiifiliste reaktiivide abil. Master Mix 5x valmistamiseks soovitame kasutada LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe ja järgida tootja juhiseid.

Märkus. Tehke kõik toimingud jääl.

Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on ette nähtud reaktsiooni lõppkoguse jaoks.

Tabelid Tabel 12 ja 13 kirjeldavad pipeteerimisskeemi ühe reaktiivisegu valmistamiseks, mis on arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht oleks 20 µl. Eelsegu võib valmistada vastavalt reaktsioonide arvule, kasutades sama praimerite ja sondi segu (kas PPM-VF või PPM-WT). Komplekt sisaldab ka lisakoguseid, mida saab kasutada pipeteerimistõrke korral.

Tabel 12. qPCR-segu ettevalmistamine

Komponent	1 reaktsioon (μ l)	V617F eelsegu 15 + 1 reaktsiooni (μ l)	Lõppkontsentratsioon
Värskelt valmistatud LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Praimerite ja sondi segu, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasiddevaba PCR-klassi vesi	10,2	163,2	–
Proov (lisatakse 4. etapis)	5,0	igaüht 5	–
Lõppmaht	20,0	igaüks 20	–

Tabel 13. qPCR-segu ettevalmistamine

Komponent	1 reaktsioon (μ l)	WT eelsegu 15 +1 reaktsiooni (μ l)	Lõppkontsentratsioon
Värskelt valmistatud LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Praimerite ja sondi segu, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Nukleasiddevaba PCR-klassi vesi	10,2	163,2	–
Proov (lisatakse 4. etapis)	5,0	igaüht 5	–
Lõppmaht	20,0	igaüks 20	–

3. Lisage 15 µl qPCR-i eelsegu (VF või WT) kapillaari kohta.
4. Lisage vastavasse katsutisse 5 µl kvantifitseeritavat materjali (25 ng proovi genoomset DNA-d või kontrolli) (kogumaht 20 µl).
5. Segage ettevaatlikult üles-alla pipeteerides.
6. Asetage kapillaarid aparaadiga kaasasolevatesse adapteritesse ja tsentrifugeerige lühikest aega (700 x g, ligikaudu 10 sekundit).
7. Asetage kapillaarid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
8. Programmeerige seade LightCycler 1.2 termotsüklistamise programmiga, nagu on näidatud tabelis Tabel 14.

Tabel 14. Temperatuuriprofiil

Analüüsirežiim	Kvantifitseerimine
Hold 1 (1. hoidmine)	Temperatuur: 55 °C Aeg: 2 minutit Kalle: 20
Hold 2 (2. hoidmine)	Temperatuur: 95 °C Aeg: 10 minutit Kalle: 20
Cycling (Tsüklistamine)	50 korda 95 °C 15 sekundit; kalle: 20 66 °C 1 minut; kalle: 20; FAM-fluorestsentsi kogumisega: Single (Üksik)

9. Seadme LightCycler 1.2 korral soovitatakse režiime F1/F2 ja „2nd derivative analysis” (Teine tuletusanalüüs). Käivitage termotsüklistamise programm, nagu on näidatud tabelis Tabel 14.

Tulemuste tõlgendamine

Andmeanalüüsi põhimõte

Läbitsükli (C_T) ja ristumispunkti (C_P) väärtuste andmeid saab qPCR-i seadmest eksportida ja kleepida analüüsimiseks Excel®-i faili. Neid väärtusi saab seejärel kasutada C_P ja C_T keskmiste väärtuste arvutamiseks ning standardised keskmised C_T väärtused saab kanda graafikule, et saada standardkõver nii metsiktüüpi kui V617F standarditele, kasutades järgmist võrrandit ja tabelit Tabel 15.

$y =$ keskmine C_P ; $x = \log_{10} CN$, milles $CN =$ geeni koopiaarv 5 μ l proovis

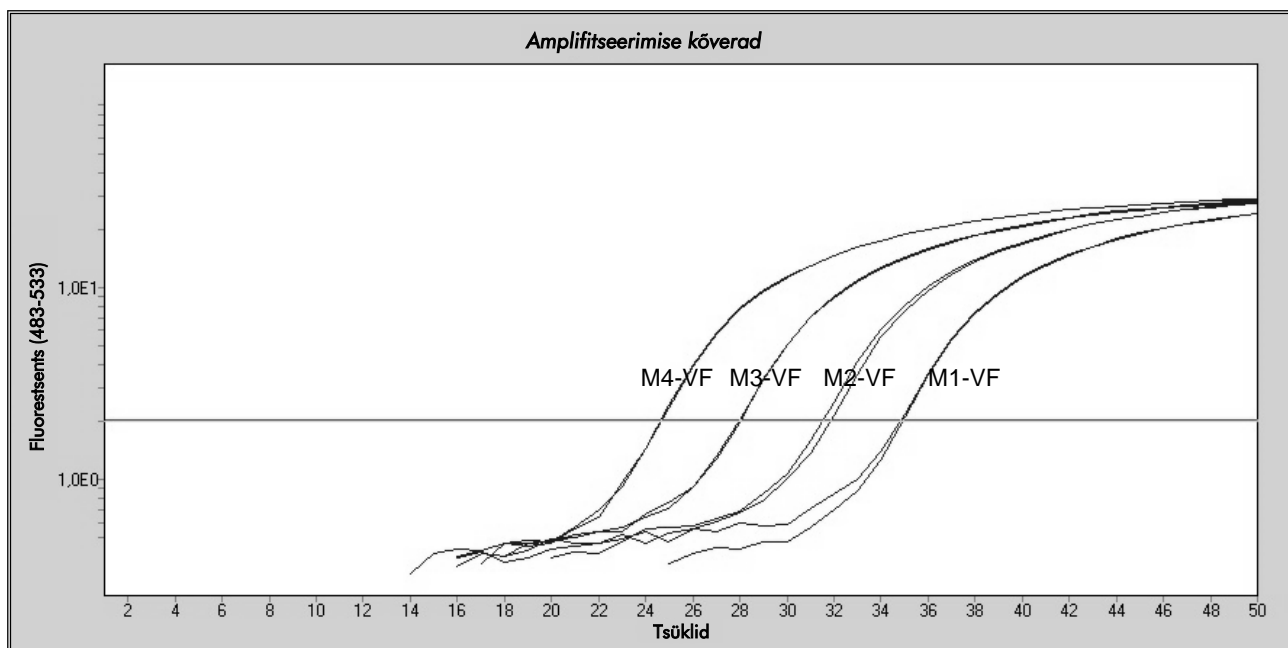
Tabel 15. Kvantitatiivsed andmed metsiktüüpi ja V617F standardite kohta

Standard	Koopiaarv (Copy number, CN)	$\log_{10} CN$
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

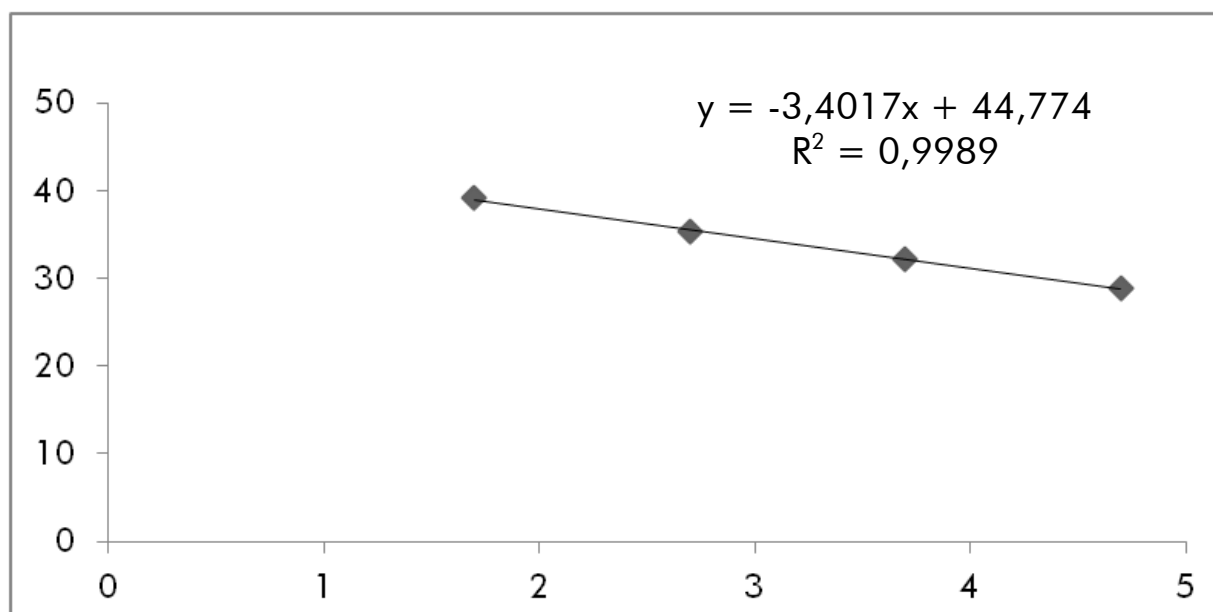
Märkus. Iga kasutaja peaks oma laboris mõõtma oma reprodutseeritavust.

Standardkõver ja kvaliteedikriteeriumid

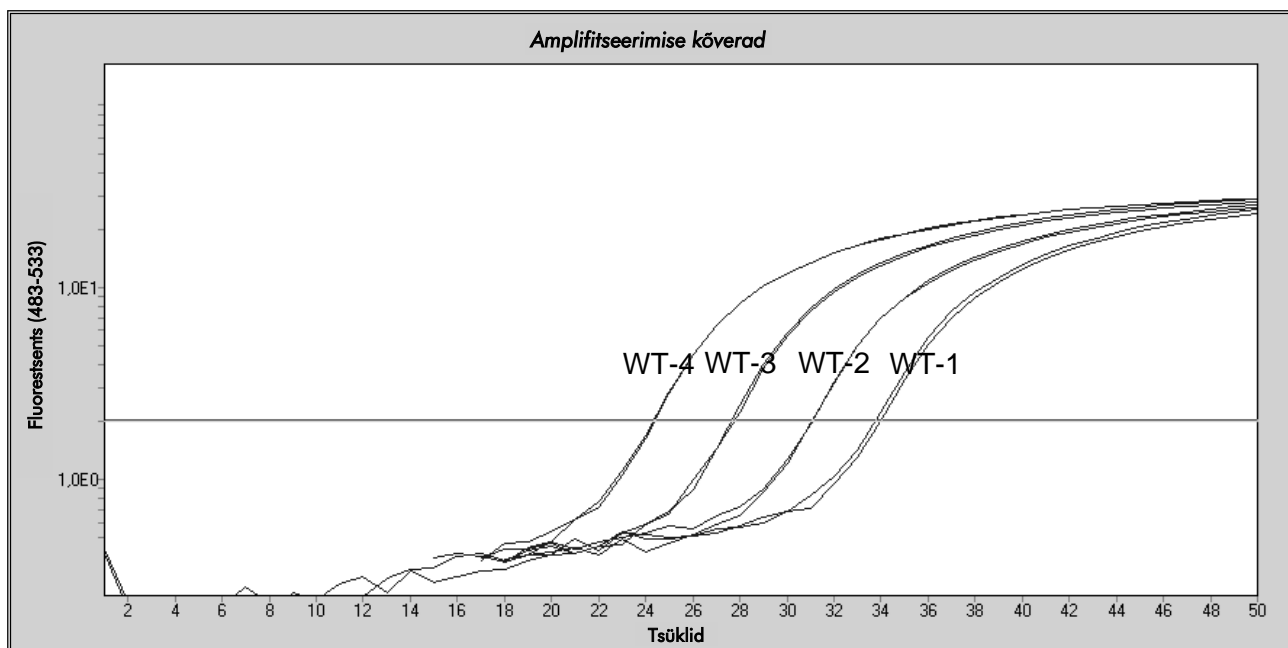
Joonised Joonis 7 ja 9 show näitavad komplekti ipsogen JAK2 MutaQuant Kit abil saadud tulemuste näiteid ning joonised Joonis 8 ja 10 näitavad nelja standardlahjendusega arvatud teoreetilise kõvera näidet.



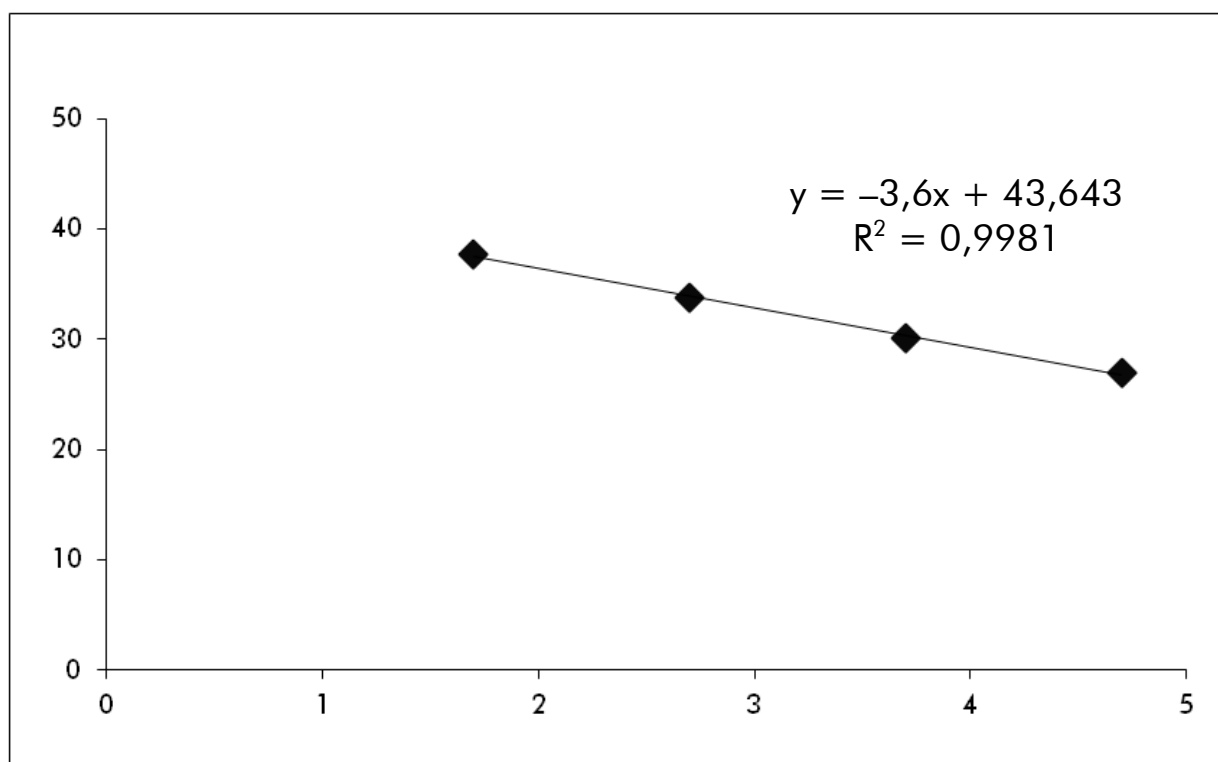
Joonis 7. JAK2 V617F plasmidi 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 , ja 5×10^4 koopia amplifikatsiooni graafik (kontrollid vastavalt M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF).



Joonis 8. Standardkõver JAK2 V617F-i jaoks.



Joonis 9. JAK2 metsiktüüpi plasmidi 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 ja 5×10^4 koopia amplifikatsiooni graafik (kontrollid vastavalt WT-1, WT-2, WT-3 ja WT-4).



Joonis 10. Standardkõver metsiktüüpi JAK2 jaoks.

Kuna standardid on 10-kordsed lahjendused, on kõvera teoreetiline tõu $-3,32$. Tõus vahemikus $-3,0 \dots -3,9$ on aktsepteeritav, kui R^2 on $> 0,95$ (12). Täpse tulemuse saamiseks on soovitatav, et $R^2 > 0,98$ (13).

Seejärel saab standardkõvera võrrandite abil arvutada V617F ja WT \log_{10} koopiaarvud tundmatutes proovides.

V617F standardkõvera võrrandit tuleks kasutada tundmatute ja kontrollproovide C_P/C_T toorväärtuste keskmiste (saadud PPM-VF-ga) teisendamiseks JAK2 V617F koopiaarvudeks (CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{Keskmine } C_{pV617F} - \text{standardkõvera löikepunkt}_{V617F})}{\text{Standardkõvera tõus}_{V617F}}$$

Metsiktüüpi standardkõvera võrrandit tuleks kasutada tundmatute ja kontrollproovide C_P/C_T toorväärtuste (saadud PPM-WT-ga) teisendamiseks JAK2 metsiktüüpi koopiaarvudeks (CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{Keskmine } C_{pWT} - \text{standardkõvera löikepunkt}_{WT})}{\text{Standardkõvera tõus}_{WT}}$$

Tulemuste väljendamine

Tulemused on 25 ng kogu genoomse DNA suhtes ja neid tuleks väljendada JAK2 V617F protsendina järgmiselt.

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

Reproduktseeritavus replikaatide vahel

Saadud andmed peaksid duplikaatide vahel olema ühesugused.

Positiivsed ja negatiivsed kontrollid

Positiivne kontroll või PC-VF peaks andma JAK2 V617F protsendi, mis on suurem kui 99,9%.

Negatiivne kontroll või NC-VF peaks andma JAK2 V617F protsendi, mis on väiksem kui 0,1%.

Kui need kontrollid ei toimi õigesti, lugege lahenduse leidmiseks jaotist „Tõrkeotsingjuhend“ lk 32.

Veekontrollid

Negatiivsed kontrollid peaksid andma null CN-i nii JAK2 V617F kui metsiktüüpi JAK2 tuvastamisel.

Positiivne veekontroll tuleneb ristsaastumisest. Vaadake lahenduse leidmiseks allpool jaotist „Tõrkeotsingujuhend“.

Tõrkeotsingujuhend

See tõrkeotsingujuhend võib olla abiks tekkinud probleemide lahendamisel. Lisateabe saamiseks vaadake meie tehnilise toe veebilehel olevat korduma kippuvate küsimuste lehte: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN-i tehniliste teenistuste teadlased vastavad alati hea meelega küsimustele, mis võivad teil tekkida kas käesolevas käsiraamatus sisalduva teabe ja protokollide või proovide ja analüüsitehnoloogiate kohta (kontaktteabe leiate „Kontaktteave“, lk 41).

Kommentaariid ja ettepanekud

Standardkõver metsiktüüpi või V617F jaoks pole lineaarne

Viaali inversioon, inversioon jaotamise ajal, ristsaastumine, standardi, RQPCR reaktiivi osaline lagunemine, mittespetsiifiline amplifikatsioon või PCR-i programmiviga

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Säilitage komplekti *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit temperatuuril $-15...-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja hoidke praimerite ja sondi segusid valguse eest kaitstult. Vt jaotist „Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine“, lk 11.

Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.

Ühel standardil pole signaali või see on madal

Standardit ei jaotata või kasutatakse sama PPM-segu

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Korrake PCR-i tööseeriat.

Negatiivne (H₂O) kontroll on positiivne

Ristsaastumine, reaktiivi saastumine, seadme viga, süvendi või kapillaari inversioon või sondi lagunemine

Asendage kõik kriitilised reaktiivid. Ülekanduva saastuse vältimiseks kasutage proove, komplekti osi ja materjale vastavalt üldtunnustatud tavale.

Hoidke praimerite ja sondi segusid valguse eest kaitstult.

Kontrollige fluorestsentskõverate valepositiivsete tulemuste olemasolu.

Signaali pole, isegi standardkontrolliga

a) Valitud on vale tuvastamiskanal

Seadke kanal seadistusele F1/F2 või 530 nm / 640 nm.

b) Pipeteerimistõrge või vahele jäänud reaktiivid

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Korrake PCR-i tööseeriat.

c) Andmete kogumise programm puudub

Kontrollige tsükli programmi.

Valige PCR-programmi iga anniilimissegmendi lõpus kogumismisrežiim „Single“.

Proovides signaal puudub või on madal, kuid standardkontrollid on korras

Proovimaterjali inhibeeriv mõju, mis on põhjustatud ebapiisavast puhastamisest

Enne alustamist kontrollige alati DNA kvaliteeti (OD₂₆₀/OD₂₈₀) ja kontsentratsiooni.

Korrake DNA ettevalmistamist.

Liiga nõrk fluorestsentsi intensiivsus

a) Komplekti komponentide vale säilitamine

Jagage reaktiivide kogused säilitamiseks.

Säilitage komplekti *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit temperatuuril –15...–30 °C ja hoidke praimerite ja sondi segusid valguse eest kaitstult. Vt jaotist „Reaktiivide hoiustamine ja tarnimine“, lk 11.

Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.

Kommentaarisid ja ettepanekud

b) Väga väike siht-DNA
algkogus

Kontrollige proovi DNA kogust.
Märkus. Sõltuvalt valitud DNA
ettevalmistusmeetodist võib esineda
inhibeeriv toime.

Negatiivsed kontrollid on positiivsed

Ülekanduv saastumine

Asendage kõik kriitilised reaktiivid.
Korrake eksperimenti iga reaktiivi uue
kogusega.
Ülekanduva saastuse vältimiseks kasutage
proove, komplekti osi ja materjale
vastavalt üldtunnustatud tavale.

Varieeruv fluorestsentsi intensiivsus

a) Pipeteerimisviga

Pärast sulatamist segage keerissegajaga ja
tsentrifuugige kõiki reaktiive.

„Pipeteerimisveast“ põhjustatud seadme
LightCycler varieeruvust saab vähendada,
analüüsides andmeid režiimis F1/F2 või
530 nm / 640 nm.

b) Plaadi, katsutite või
kapillaaride ebapiisav
tsentrifuugimine või
ettevalmistatud PCR-i segu
võib endiselt olla kapillaari
ülemises anumas või
kapillaari otsa võib jääda
õhumull.

Tsentrifuugige alati reaktsiooniseadme
laaditud kapillaare seadme
kasutusjuhendis kirjeldatud viisil.

c) Kapillaari otsa välispind on
must

Kandke alati kapillaaride käsitsemisel
kindaid.

Metsiktüüpi või V617F positiivsed kontrollid annavad signaali vastastikuse PPM-i abil

Ristsaastumine, reaktiivi saastumine või süvendi või kapillaari inversioon

Asendage kõik kriitilised reaktiivid.

Korrake eksperimenti iga reaktiivi uue kogusega.

Ülekanduva saastuse vältimiseks kasutage proove, komplekti osi ja materjale vastavalt üldtunnustatud tavale.

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Positiivse kontrolli pöördtuvastamine

PPM-i jaotatud inversioon süvendis või kapillaaris või eelsegus

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Ühe või mõlema positiivse kontrolli signaal puudub

PPM või kontroll-DNA jäeti välja

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Tausta tugev värvumus

Fluorofoori pleekimine

Hoidke ja käsitsege sondi valguse eest kaitstult.

Duplikaatproovide halb reprodutseeritavus

Pipeteerimisviga või ristsaastumine

Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.

Kvaliteedikontroll

Vastavalt QIAGEN-i ISO-sertifitseeritud kvaliteedijuhtimissüsteemiga testitakse komplekti *ipsogen JAK2 MutaQuant* Kit iga partiid etteantud spetsifikatsioonide alusel, et tagada toote püsiv kvaliteet. Analüüsisertifikaadid on soovi avaldamise korral kättesaadavad aadressil www.qiagen.com/support/.

Piirangud

Kasutajad peavad enne selle seadme kasutamist olema saanud väljaõppe ja tehnoloogiaga tuttavad. Seda komplekti tuleb kasutada käesolevas juhendis olevaid juhiseid järgides, koos valideeritud seadmega, mis on mainitud jaotises „Vajalikud, kuid mitte kaasasolevad materjalid“, lk 10.

Kõiki saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete leidudega. Kasutaja vastutuseks on valideerida süsteemi toimimine sellisteks nende laboris läbiviidavateks protseduurideks, mis ei ole kaetud QIAGEN-i toimimise uuringutega.

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

Sooritusnäitajad

Mittekliinilised uuringud

Täpsus

Teostati täpsusuuring, kasutades 12 rakuliinist ekstraheeritud DNA proove, mis vastasid erinevatele JAK2 V617F alleelide koormustele. Iga prooviga tehti kokku 80 mõõtmist, kasutades komplekti *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit komplekti 3 erinevat partiid. Selles täpsusuuringus kasutati seadet Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Analüütilised andmed on kokku võetud tabelis Tabel 16.

Tabel 16. Täpsusandmete DNA proovid

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

* Hälbivad väärtused jäeti välja. Need määratleti väärtustena, mis on väiksemad kui alumine kvartiil miinus 3-kordne kvartiilidevaheline vahemik või suurem kui ülemine kvartiil pluss 3-kordne kvartiilidevaheline vahemik Boxi ja Whiskeri graafikul.

n = valideeritud proovide arv; CV = universaalne variatsioonikordaja.

Tühiproovi piir ja tuvastamiskiir

Negatiivsetel proovidel (8 proovi, 76 mõõtmist) määrati taustatase või tühiproovi tase (Level Of Blank, LOB). See leiti olevat 0,014%.

Tuvastamiskiir (Limit Of Detection, LOD) määrati proovide abil, mis olid teadaolevalt positiivsed, kuid madala ekspressiooniga (7 proovi, 68 mõõtmist). Leiti, et see on 0,061%, 90% usaldusvahemikuga ülempiiriga 0,091%.

Selle optimaalse tundlikkuse võib saada proovidelt, mis sisaldavad vähemalt 10 000 JAK2 geeni koopiat (metsiktüüpi või V617F mutatsioon).

Kvantifitseerimisandmed tuleks esitada järgmiselt.

- JAK2 V617F \leq 0,014% võib tõlgendada kui JAK2 V617F mutatsiooni mittetuvastamist.
- JAK2 V617F $>$ 0,014%, kuid $<$ 0,091% võib tõlgendada kui ebaselget tulemust.
- JAK2 V617F \geq 0,091% võib tõlgendada positiivse tulemusena ja JAK2 V617F mutatsioon on tuvastatud.

Lineaarsus

Lineaarsuse uuringud viidi läbi 12 prooviga, kusjuures iga proov saadi erinevast DNA segust, mis oli ekstraheeritud rakuliinidest, mis olid positiivsed ja negatiivsed JAK2 V617F mutatsiooni suhtes. Iga proovi testiti 5 korda. Selle uuringu andmed näitasid, et komplekt *ipsogen JAK2 MutaQuant* Kit andis dünaamilises vahemikus lineaarseid tulemusi.

Kliinilised uuringud

Vere või lümfotsüütide DNA eraldati 87 patsiendiproovist ja analüüsiti komplekti *ipsogen JAK2 MutaQuant* Kit abil. Lisaks kvantifitseeriti JAK2 V617F mutatsioonide protsent ja neid võrreldi skriinimisanalüüsi tulemustega, mis saadi komplektiga *ipsogen JAK2 MutaScreen EZ* Kit (katalooginr 673223). Saadud andmed on esitatud tabelis Tabel 17.

Tabel 17. Kontingentsustabel, mis näitab vastavust komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit ja komplektiga *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit saadud tulemuste vahel

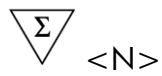




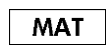




		Tulemused komplektist <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit			n
		Tuvastati mutatsioon	Tulemused ei ole ühesed	Mutatsiooni ei tuvastatud	
Tulemused komplektist <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit	Tuvastati mutatsioon	40	2	7	49
	Tulemused ei ole ühesed	0	0	21	21
	Mutatsiooni ei tuvastatud	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Positiivne vastavus	100% (95% usaldusvahemik: 91%, 100%)				
Negatiivne vastavus	71% (95% usaldusvahemik: 51%, 85%)				
Üldine vastavus	89% (95% usaldusvahemik: 79%, 95%)				

Viited

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

Tähised

Pakendil ja sildil võivad olla järgmised tähised:

	Sisaldab reaktiive, millest piisab <N> reaktsiooni jaoks
	Kõlblik kuni
	In vitro diagnostiline meditsiiniseade
	Katalooginumber
	Partii number
	Materjali number
	Globaalne kaubaartikli number
	Temperatuuripiirangud
	Tootja
	Tutvuge kasutusjuhendiga

Kontaktteave

Tehnilise toe ja lisateabe saamiseks külastage meie tehnilise toe keskust veebiaadressil 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).

Tellimisteave

Toode	Sisukord	Katalooginr
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	12 reaktsiooni jaoks: Metsiktüüpi JAK2 geenikontroll, JAK2 V617F kontrollgeen, praimerite ja sondi segu PPM-WT, praimerite ja sondi segu PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	24 reaktsiooni jaoks: Metsiktüüpi JAK2 geenikontroll, JAK2 V617F kontrollgeen, praimerite ja sondi segu PPM-WT, praimerite ja sondi segu PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx – IVD-valideeritud real-time PCR-analüüsi jaoks kliinilistes rakendustes		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time 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	Real-time 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

Ajakohastatud teavet litsentsimise ja tootespetsiifiliste kohustustest loobumise kohta saate vastavast QIAGEN-i komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN-i komplekti käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel www.qiagen.com või tellimisel QIAGEN-i tehniliselt toelt või kohalikult müügiesindajalt.

See toode on ette nähtud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. *ipsogen*'i tooteid ei tohi ilma QIAGEN-i kirjaliku nõusolekuta edasi müüa, edasimüügiks muuta ega kaubanduslike 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.

ipsogen tooted peavad vastama nende spetsifikatsioonidele. QIAGEN-i ainsaks kohustuseks ja kliendi ainsaks hüvitiseks on toote ettenähtud funktsiooni täitmise ebaõnnestumise korral toodete tasuta asendus.

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 ostmise ei anna selle kasutamise õigust JAK2V617F-i sihtivate ravimite kliinilisteks uuringuteks. QIAGEN töötab selleks välja spetsiaalseid litsentsiprogramme. Võtke ühendust meie juriidilise teabe osakonnaga aadressil jak2licenses@qiagen.com.

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

Piiratud litsentsileping

Selle toote kasutamine tähendab komplekti *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* iga ostja või kasutaja nõusolekut järgmiste tingimustega:

1. Komplekti *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* võib kasutada ainult vastavalt komplekti *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit käsiraamatule* ainult komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna ühegi oma intellektuaalse omandi alusel litsentsi selle komplekti lisatud komponentide kasutamiseks ega ühendamiseks selle komplekti kuuluvate komponentidega, välja arvatud juhul, mida on kirjeldatud komplekti *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit käsiraamatus* ja lisaprotokollides, mis on saadaval veebisaidil 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 otsestest 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 taotlema 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.

Aug-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, kõik õigused reserveeritud.

www.qiagen.com

