

Manual *ipsogen*[®] JAK2 MutaScreen Kit



10 (nr. de catalog 673022)



24 (nr. de catalog 673023)

Versiunea 1



Cantitativ în diagnosticare in vitro

Pentru utilizare cu instrumentele Rotor-Gene[®] Q,
Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] și LightCycler[®]



673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3

MAT

1072500RO



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN este furnizor de top de tehnologii inovatoare pentru probe și teste, permițând izolarea și detecția conținutului oricărei probe biologice. Produsele și serviciile noastre avansate, de înaltă calitate, asigură succesul, de la prelevarea probei până la rezultat.

QIAGEN stabilește standarde în următoarele domenii:

- Purificarea ADN, ARN și a proteinelor
- Teste efectuate pe acizi nucleici și proteine
- Cercetare microARN și ARN de interferență
- Automatizarea tehnologiilor pentru probe și teste

Misiunea noastră este aceea de a vă permite să obțineți un succes excepțional și realizări ieșite din comun. Pentru mai multe informații, vizitați [**www.qiagen.com**](http://www.qiagen.com).

Cuprins

Domeniul de utilizare	4
Rezumatul și explicarea produsului	4
Principiul procedurii	6
Materiale furnizate	7
Conținutul kitului	7
Materiale necesare, dar nefurnizate	8
Avertismente și precauții	9
Precauții generale	9
Depozitarea și manipularea reactivilor	10
Procedură	11
Prepararea ADN-ului pentru probă	11
Păstrarea acizilor nucleici	11
Protocol	
■ qPCR pe instrumente Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi	11
■ qPCR pe instrumente Applied Biosystems și ABI PRISM	20
■ qPCR pe instrumentul LightCycler 480	29
■ qPCR pe instrumentul LightCycler 2.0	37
Interpretarea rezultatelor	42
Reprezentare grafică și criteriile de control al calității	42
Calculul raportului FAM/VIC normalizat și genotiparea	43
Ghid de depanare	46
Controlul calității	48
Limitări	48
Caracteristici de performanță	49
Studii nonclinice	49
Studii clinice	50
Referințe	55
Simboluri	56
Date de contact	56
Informații pentru comandă	57

Domeniul de utilizare

Kiturile *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit sunt destinate detectării mutației JAK2 V617F/G1849T în ADN-ul genomic de la subiecții cu suspiciune de neoplasm mieloproliferativ. Absența JAK2 V617F/G1849T nu exclude prezența altor mutații JAK2. Testul poate raporta rezultate fals negative în cazul unor mutații suplimentare localizate în codonii 615 până la 619 (1).

Notă: Kitul trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, în combinație cu reactivi și instrumente validate. Orice utilizare care nu este conformă cu eticheta acestui produs și/sau modificarea componentelor vor anula răspunderea QIAGEN.

Rezumatul și explicarea produsului

O mutație somatică recurentă, V617F, care afectează gena tirozin kinază 2 din familia Janus (JAK2), a fost identificată în 2005 (2-5), ceea ce a condus la o descoperire majoră în înțelegerea, clasificarea și diagnosticul neoplasmelor mieloproliferative (Myeloproliferative Neoplasm, MPN). JAK2 este o moleculă de semnalizare intracelulară critică pentru un număr de citokine, inclusiv eritropoietina.

Mutația JAK2 V617F este detectată la > 95 % dintre pacienții cu policitemie vera (Polycythemia Vera, PV), 50-60 % dintre pacienții cu trombocitemie esențială (Essential Thrombocythemia, ET) și la 50 % dintre pacienții cu mielofibroză primară (Primary Myelofibrosis, PMF). JAK2 V617F a fost de asemenea detectată în unele cazuri rare de leucemie mielomonocitară cronică, sindrom mielodisplazic, mastocitoză sistemică și leucemie neutrofilă cronică, dar la 0 % din LMC (6).

Mutația corespunde unei schimbări cu un singur nucleotid a nucleotidului JAK2 la poziția 1849 în exonul 14, rezultând o substituție unică de valină (V) cu fenilalanină (F) la poziția 617 a proteinei (domeniul JH2). Aceasta conduce la activarea constitutivă a JAK2, transformarea hematopoietică *in vitro* și creșterea coloniilor eritroide independente de eritropoietină (Erythropoietin-Independent Erythroid Colony, EEC) la toți pacienții cu PV și o mare parte a pacienților cu ET și PMF (7). JAK2 V617F reprezintă un promotor cheie în transformarea celulelor hematopoietice în MPN, dar mecanismele patologice exacte care conduc, prin aceeași mutație unică, la astfel de entități clinice și biologice diferite rămân trebuie să fie elucidate complet.

În mod tradițional, diagnosticul de MPN se baza pe criterii clinice, histologice ale măduvei osoase și citogenetice. Descoperirea unui marker molecular specific bolii a dus atât la simplificarea procesului, cât și la creșterea preciziei în diagnosticare. Detectarea mutației JAK2 V617F face acum parte din criteriile de referință OMS 2008 pentru diagnosticarea MPN negativ la BCR-ABL (Tabelul 1), iar prezența acestei mutații este un criteriu major pentru confirmarea diagnosticului.

Tabelul 1. Criteriile OMS pentru diagnosticarea MPN (adaptat din referința 8)

Criterii pentru diagnosticarea policitemiei vera (Polycythemia Vera, PV)	
Major	1. Hemoglobină (Hgb) >18,5 g.dl ⁻¹ (bărbați) sau >16,5 g.dl ⁻¹ (femei) sau Hgb sau hematocrit (Hct) > percentila 99 din intervalul de referință pentru vârstă, sex sau altitudine de reședință sau Hgb >17 g.dl ⁻¹ (bărbați) sau >15 g.dl ⁻¹ (femei) dacă este asociată cu o creștere susținută de ≥2 g.dl ⁻¹ față de linia de bază, care nu poate fi atribuită corectării deficitului de fier sau Masă crescută a globulelor roșii >25 % peste valoarea medie estimată normală 2. Prezența JAK2V617F sau a unei mutații similare
Minor	1. Mieloproliferarea trilineară a măduvei osoase 2. Nivelul eritropoietinei serice sub normal 3. Creșterea coloniilor eritroide endogene (Endogenous Erythroid Colony, EEC)
Criterii pentru diagnosticarea trombocitemiei esențiale (Essential Thrombocythemia, ET)	
Major	1. Număr de trombocite ≥450 x 10 ⁹ l ⁻¹ 2. Proliferarea megacariocitelor cu morfologie mare și matură. Nivel redus sau zero proliferare a granulocitelor sau a eritroidelor 3. Neîndeplinirea criteriilor OMS pentru leucemie mieloidă cronică (LMC), PV, mielofibroză primară (Primary Myelofibrosis, PMF), sindrom mielodisplazic (Myelodysplastic Syndrome, MDS) sau alt neoplasm mieloid 4. Demonstrarea JAK2V617F sau a altui marker clonal sau Fără dovezi de trombocitoză reactivă
Minor	-
Criterii pentru diagnosticarea mielofibrozei primare (Primary Myelofibrosis, PMF)	
Major	1. Proliferarea megacariocitelor și atipie însoțite de fibroză reticulică și/sau colagenă sau În absența fibrozei reticulice, modificările megacariocitelor trebuie să fie însoțite de creșterea celularității medulare, proliferarea granulocitară și adesea scăderea eritropoiezei (adică PMF prefibrotică) 2. Neîndeplinirea criteriilor OMS pentru (LMC), PV, MDS sau alt neoplasm mieloid 3. Demonstrarea JAK2V617F sau a altui marker clonal sau Fără dovezi de fibroză medulară reactivă
Minor	1. Leucoeritroblastoză 2. Creșterea lactat dehidrogenazei (Lactate Dehydrogenase, LDH) serice 3. Anemie 4. Splenomegalie palpabilă

Recent, experții internaționali au propus criterii pentru studiile terapeutice privind PV și ET. Pe baza datelor despre alogrefă, alfa-interferon sau hidroxiuree, cuantificarea JAK2V617F a fost încorporată ca un instrument potențial util pentru monitorizarea răspunsului la tratament (9). O scădere a riscului la JAK2 V617F a fost observată ca răspuns la unele dintre noile medicamente țintite anti-JAK2 aflate în etapa de dezvoltare clinică (10).

Principiul procedurii

Într-un test de discriminare alelică, două sonde TaqMan® sunt utilizate într-un test multiplexat. Una este o potrivire perfectă cu secvența alelică 2 (de exemplu, alela de tip sălbatic), iar cealaltă este o potrivire perfectă cu secvența alelică 1 (de exemplu, alela cu o mutație). Fiecare sondă este marcată cu un colorant fluorescent distinctiv la capătul său 5', raportorul, cum ar fi FAM™ sau VIC® și conține o substanță extincătoare de fluorescență non-fluorescentă la capătul 3'. Sondele conțin, de asemenea, un liant pentru canale minore (MGB™), care permite utilizarea de sonde mai scurte, cu o stabilitate mai mare și, prin urmare, o discriminare alelică mai precisă.

În timpul fazei de extensie a PCR, sonda cu potrivire perfectă este scindată de activitatea exonucleazei 5'→3' a Taq ADN-polimerazei, separând colorantul raportor de substanța extincătoare de fluorescență și, astfel, generând fluorescența detectabilă. Sonda fără potrivire perfectă va fi dislocuită mai degrabă decât scindată de Taq ADN-polimerază și nu se degajă colorant raportor. Semnalul de fluorescență (VIC sau FAM) generat este achiziționat la sfârșitul PCR (punct final) și indică imediat prezența secvenței (secvențelor) vizate în probă (alelă de tip sălbatic, alelă mutantă sau ambele) fără necesitatea unor etape post-PCR lungi și laborioase, care măresc, de asemenea, riscul de contaminare. Cantitatea reală a secvenței țintă nu este determinată.

ipsogen JAK2 MutaScreen Kit utilizează această tehnologie conform ilustrației (consultați Figura 1).

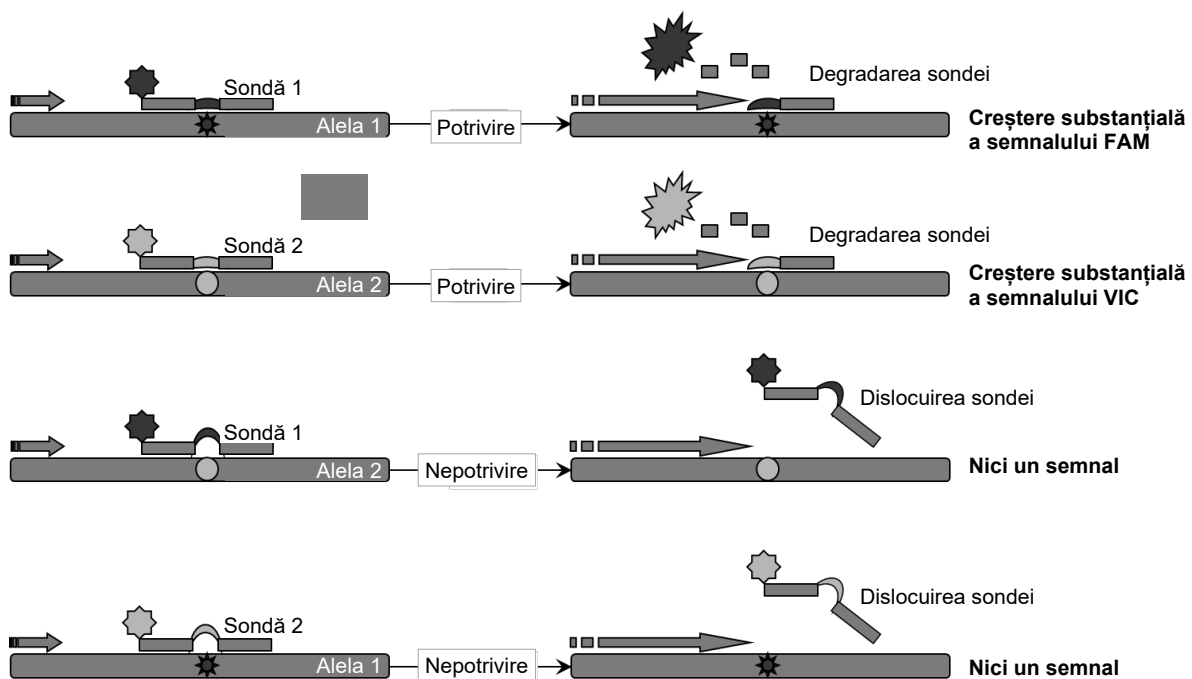


Figura 1. Test multiplex cu sonda TaqMan. *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit utilizează această tehnologie pentru discriminarea alelică.

Materiale furnizate

Conținutul kitului

<i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i>		(10)	(24)
Nr. de catalog		673022	673023
Număr de reacții		24	10
V617F Positive Control (Substanță de control pozitivă V617F)*	PC-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control (Substanță de control negativă V617F)†	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample (Probă cu prag de excludere)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix JAK2 V617F (Amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 V617F)‡	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
Manual <i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i> (limba engleză)		1	1

* Substanță de control pozitivă: 100 % ADN V617F.

† Substanță de control negativă: 100 % ADN tip sălbatic; 0 % V617F.

‡ Amestec de soluții de amorsare specifice inverse și directe pentru gena *JAK2*, sondă FAM V617F specifică și sondă VIC tip sălbatic.

Notă: Centrifugați pentru un timp scurt tuburile înainte de utilizare.

Notă: Analiza probelor necunoscute cu *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* necesită extracția ADN-ului genomic. Reactivii necesari pentru extracția ADN-ului (de exemplu, QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, nr. cat. 51304) nu sunt furnizați și trebuie validați în combinație cu kitul.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de siguranță (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Reactivi

- Apă de calitate PCR fără nuclează
- Nuclease-free 1x TE buffer, pH 8.0 (de exemplu, Thermo Fisher Scientific Inc., nr. cat. 12090015)
- Soluție tampon și *Taq* ADN-polimerază: Reactivii validați sunt TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., nr. cat. 4304437) și LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, nr. cat. 04535286001)
- Reactivi pentru gel de agaroză 0,8-1 % în soluție tampon de electroforeză 0,5x TBE

Consumabile

- Vârfuri de pipetă PCR sterile, fără nuclează, rezistente la aerosoli, cu filtre hidrofobe
- Tuburi PCR fără RNază și DNază de 0,5 sau 0,2 ml
- Gheață

Echipamente

- Pipete* dedicate pentru PCR (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l)
- Centrifugă de banc* cu rotor pentru eprubete de reacție de 0,2 ml/0,5 ml (capabile să atingă 10.000 rot/min)
- Spectrofotometru* pentru cuantificarea ADN-ului
- Instrument pentru real-time PCR:* Rotor-Gene Q 5plex HRM sau alt instrument Rotor-Gene; LightCycler 2.0, or 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS sau ABI PRISM 7900HT SDS și materiale specifice asociate
- Echipament* pentru electroforeză în gel cu câmp pulsant

* Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

Avertismente și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) a fiecărui kit și componente a kitului QIAGEN.

Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu reglementările locale de siguranță.

Precauții generale

Testările qPCR necesită bune practici de laborator, inclusiv întreținerea echipamentelor, care sunt dedicate biologiei moleculare și conforme cu reglementările aplicabile și standardele relevante.

Acest kit este destinat diagnosticării in vitro. Reactivii și instrucțiunile furnizate în acest kit au fost validate pentru performanțe optime. Diluarea ulterioară a reactivilor sau modificarea timpilor și temperaturilor de incubare poate genera date eronate sau discordante. Reactivul PPM-VF poate fi modificat dacă este expus la lumină. Toți reactivii sunt formulați în mod special pentru utilizare cu această testare. Pentru o performanță optimă a testării, nu trebuie făcute înlocuiri.

Acordați o atenție extremă, pentru a preveni următoarele situații:

- Contaminarea cu DNază care ar putea provoca degradarea ADN-ului șablon
- Contaminarea prin transfer de ADN sau PCR, care are ca rezultat un semnal fals pozitiv

Prin urmare, recomandăm următoarele:

- Folosiți aparatură de laborator fără nuclează (de exemplu, pipete, vârfuri de pipetă, flacoane de reacție) și purtați mănuși când efectuați testul.
- Utilizați vârfuri de pipetă noi, rezistente la aerosoli, pentru toate etapele de pipetare pentru a evita contaminarea încrucișată a probelor și a reactivilor.
- Pregătiți amestecul Master Mix pre-PCR cu material dedicat (pipete, vârfuri etc.) într-o zonă dedicată, în care nu sunt introduse matrice ADN (ADN, plasmidă). Adăugați șablonul într-o zonă separată (de preferință, într-o cameră separată) cu material specific (pipete, vârfuri etc.).

Depozitarea și manipularea reactivilor

Kiturile sunt expediate pe gheață carbonică și trebuie depozitate între -30 și -15 °C la primire.

- Reduceți la minimum expunerea la lumină a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde (tub PPM-VF).
- Amestecați ușor și centrifugați tuburile înainte de deschidere.
- Depozitați toate componentele kitului în recipientele originale.

Aceste condiții de depozitare se aplică atât componentelor desfăcute, cât și celor nedesfăcute. Componentele depozitate în alte condiții decât cele menționate pe etichete pot să nu funcționeze corespunzător și pot afecta negativ rezultatele testului.

Datele de expirare pentru fiecare reactiv sunt indicate pe etichetele componentelor individuale. În condiții de depozitare corecte, produsul își va menține performanța până la data de expirare imprimată pe etichetă.

Nu există semne evidente care să indice instabilitatea acestui produs. Cu toate acestea, substanțele de control pozitive și cele negative trebuie rulate simultan cu eșantioane necunoscute.

Procedură

Prepararea ADN-ului pentru probă

ADN-ul genomic trebuie obținut fie din sânge integral, din limfocite din sângele periferic purificat, din celule polinucleare sau din granulocite. Pentru a putea compara rezultatele, vă recomandăm să adoptați aceeași fracție celulară și aceeași metodă de extracție a ADN-ului. Extracția ADN-ului trebuie efectuată prin orice metodă proprie sau comercială.

Cantitatea de ADN este determinată prin măsurarea densității optice la 260 nm. Calitatea ADN-ului trebuie evaluată prin spectrofotometrie sau electroforeză în gel.

Raportul A_{260}/A_{280} trebuie să fie 1,7-1,9. Rapoartele mai mici indică, de obicei, contaminarea cu proteine sau substanțe chimice organice. Analiza electroforetică pe un gel de agaroză 0,8-1 % ar trebui să permită vizualizarea ADN-ului izolat ca o bandă distinctă de aproximativ 20 kb. Se acceptă un ușor frotiu.

ADN-ul rezultat este diluat la 5 ng/μl în TE buffer. Reacția qPCR este optimizată pentru 25 ng de ADN genomic purificat.

Păstrarea acizilor nucleici

Pentru depozitarea pe termen scurt, de până la 24 de ore, recomandăm depozitarea acizilor nucleici purificați la 2-8 °C. Pentru depozitarea pe termen lung, mai mare de 24 de ore, recomandăm depozitarea la -20 °C.

Protocol: qPCR pe instrumente Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi

Dacă utilizați acest instrument, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 2.

Tabelul 2. Numărul de reacții pentru instrumentele Rotor Gene Q MDx 5plex HRM sau Rotor-Gene Q 5plex HRM cu rotor cu 72 de tuburi

Probele	Reacții
Amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 V617F (PPM-VF) (56 de reacții)	
24 de probe de ADN	24 x 2 reacții
3 substanțe de control ADN	3 x 2 reacții (PC-VF, NC-VF și COS-VF, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumente Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi

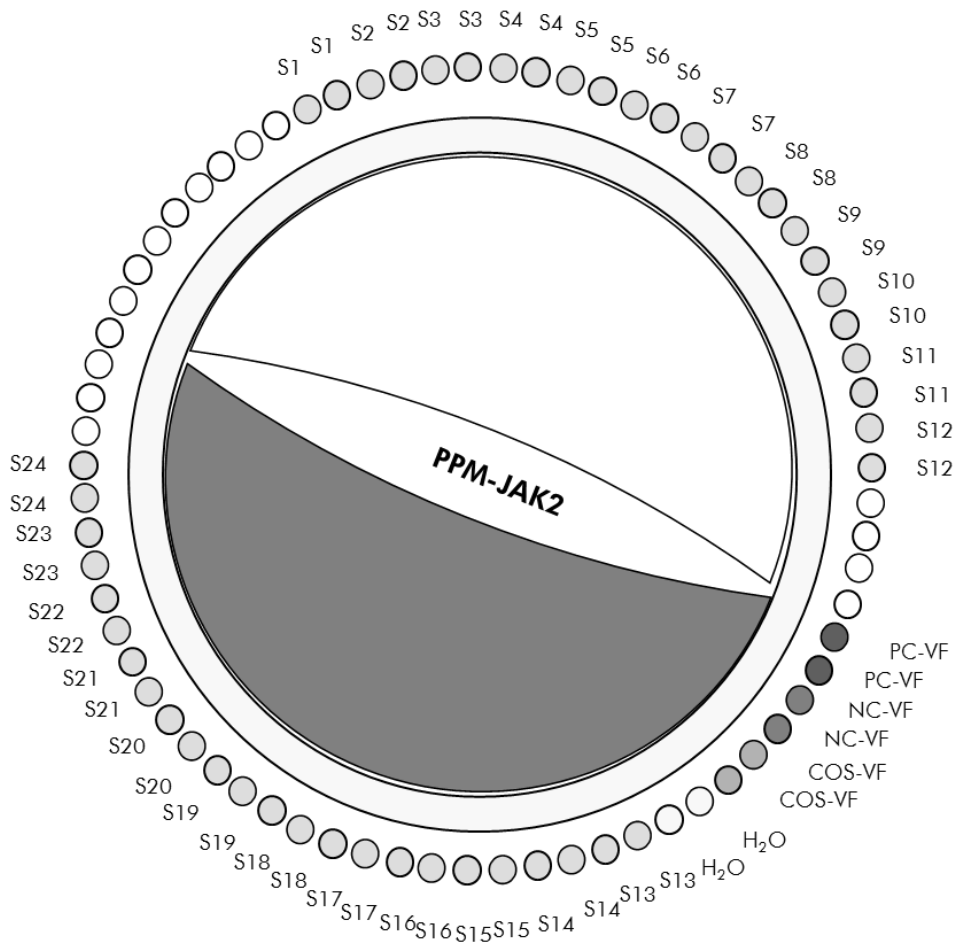


Figura 2. Configurația sugerată a rotorului pentru un experiment efectuat cu *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit*. PC-VF: substanță de control pozitivă; NC-VF: substanță de control negativă; COS-VF: probă cu prag de excludere; S: probă de ADN; H₂O: substanță de control apă.

Notă: Aveți grijă să plasați întotdeauna o probă de testat în poziția 1 a rotorului. În caz contrar, în timpul etapei de calibrare, instrumentul nu va efectua calibrarea și vor fi obținute date de fluorescență incorecte.

Umpleți toate celelalte poziții cu tuburi goale.

qPCR pe instrumente Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

- 1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.**
Componentele trebuie scoase din congelator cu aproximativ 10 minute înainte de începerea procedurii.
- 2. Vortexați și centrifugați pentru scurt timp toate tuburile (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**

3. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 3 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde. Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Pe instrumentele Rotor-Gene, *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit poate fi utilizat pentru analiza a 24 de probe în duplicat în cadrul unui singur experiment (Figura 2), 20 de probe în duplicat în două experimente sau 15 probe în duplicat în trei experimente.

Tabelul 3. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	Număr de reacții (μ l)				Concentrație finală
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	5	285	145	95	–
Probă (de adăugat la pasul 5)	5	Câte 5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	Câte 25	–

* 24 de probe; un experiment/kit.

† 10 probe; două experimente/kit.

‡ 5 probe; trei experimente/kit.

4. Vortexați și centrifugați pentru scurt timp amestecul qPCR (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).
5. Distribuți 20 µl de amestec qPCR preliminar per tub.
6. Adăugați 5 µl din materialul de probă ADN sau substanțele de control în tubul corespunzător (volum total 25 µl).
7. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
8. Închideți eprubetele PCR. Așezați tuburile în rotorul cu 72 de tuburi, conform recomandărilor producătorului. Umpleți toate celelalte poziții cu tuburi goale.
9. Asigurați-vă că inelul de blocare (accesoriu al instrumentului Rotor-Gene) este amplasat pe partea superioară a rotorului pentru a preveni deschiderea accidentală a eprubetelor în timpul testării. Așezați rotorul în instrumentul Rotor-Gene Q, conform recomandărilor producătorului.
10. Pentru detecția ADN JAK2, creați un profil de temperatură în conformitate cu etapele următoare.

Setarea parametrilor generali ai testului	Figurile 3, 4
Amplificarea ADN-ului	Figura 5
Ajustarea sensibilității canalului de fluorescență	Figura 6

Informații suplimentare despre programarea instrumentelor Rotor-Gene pot fi găsite în manualul de utilizare al instrumentului. În ilustrații, setările software sunt încercuite cu o linie neagră îngroșată. Ilustrațiile sunt incluse pentru instrumentele Rotor-Gene Q.

11. Porniți software-ul Rotor-Gene. În caseta de dialog „New Run” (Testare nouă), faceți clic pe „New” (Nou).

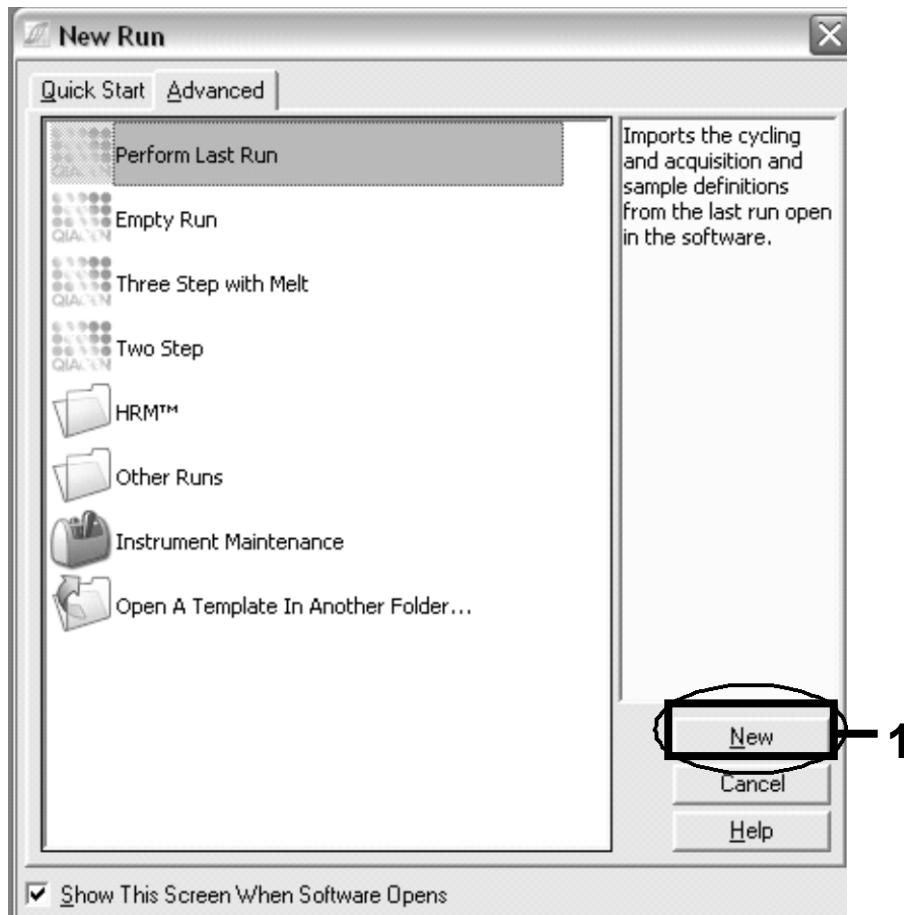


Figura 3. Caseta de dialog „New Run” (Testare nouă).

12. În „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă), setați volumul la 25 μ L și faceți clic pe „Next” („Următorul”).

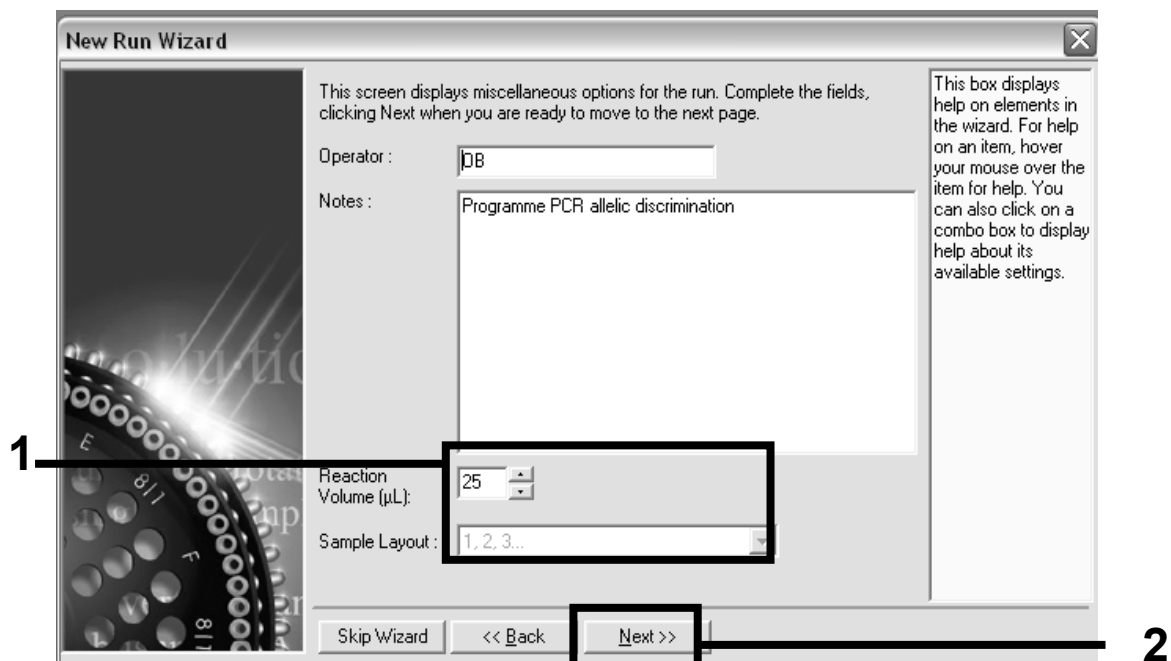


Figura 4. Setarea parametrilor generali ai testului.

13. Faceți clic pe butonul „Edit Profile” (Editare profil) din caseta de dialog următoare „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă) și programați profilul de temperatură conform celor prezentate în Tabelul 4 și Figura 5. Asigurați-vă că adăugați ultima etapă de achiziție la 60 °C, la fiecare ciclu, pentru ambele canale Green (FAM) și Yellow (VIC).

Tabelul 4. Profilul de temperatură

Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 2 min
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95°C Time (Timp): 10 min
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 92 °C timp de 15 s 60 °C timp de 1 min; unic Achiziția fluorescenței FAM în canalul Cycling A Green Achiziția fluorescenței VIC în canalul Cycling A Yellow

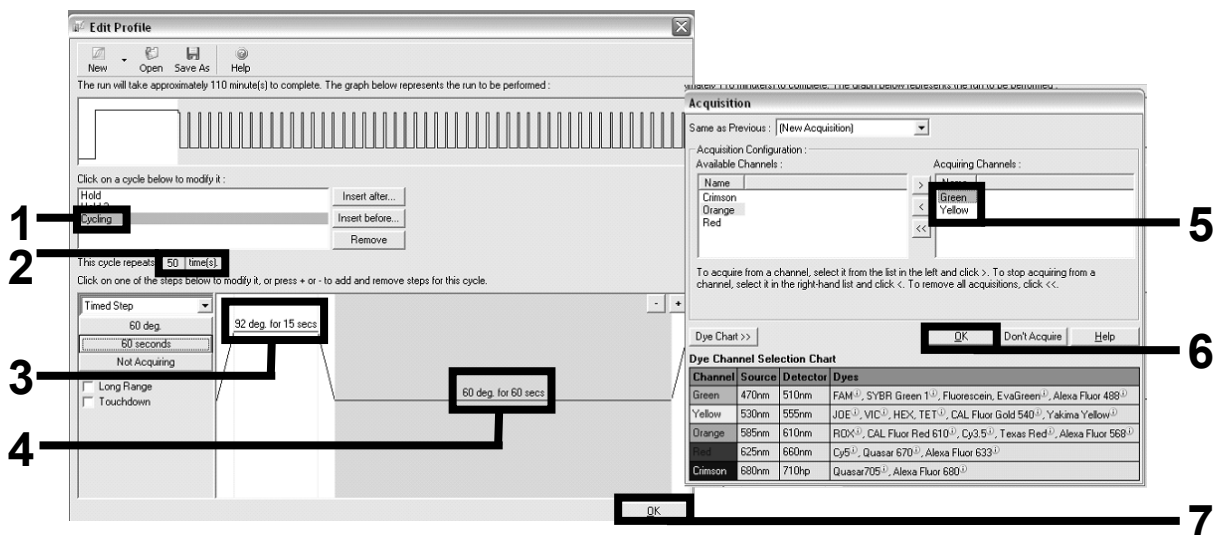


Figura 5. Amplificarea ADN-ului.

14. Intervalul de detectare a canalelor de fluorescență trebuie determinat în funcție de intensitățile fluorescenței din eprubetele PCR. Faceți clic pe „Gain Optimisation” (Optimizare amplificare) în caseta de dialog „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă) pentru a deschide caseta de dialog „Auto-Gain Optimisation Setup” (Configurarea optimizării amplificării automate). Faceți clic pe „Optimise Acquiring” (Optimizare achiziție) (Figura 6), apoi faceți clic pe „OK” în casetele

de dialog „Auto-Gain Optimisation Channel Settings” (Setări ale canalului de optimizare a amplificării automate) pentru fiecare canal (Green și Yellow, Figura 6). Verificați dacă ați bifat caseta „Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Efectuarea optimizării înainte de prima achiziție) pentru fiecare canal (Figura 6).

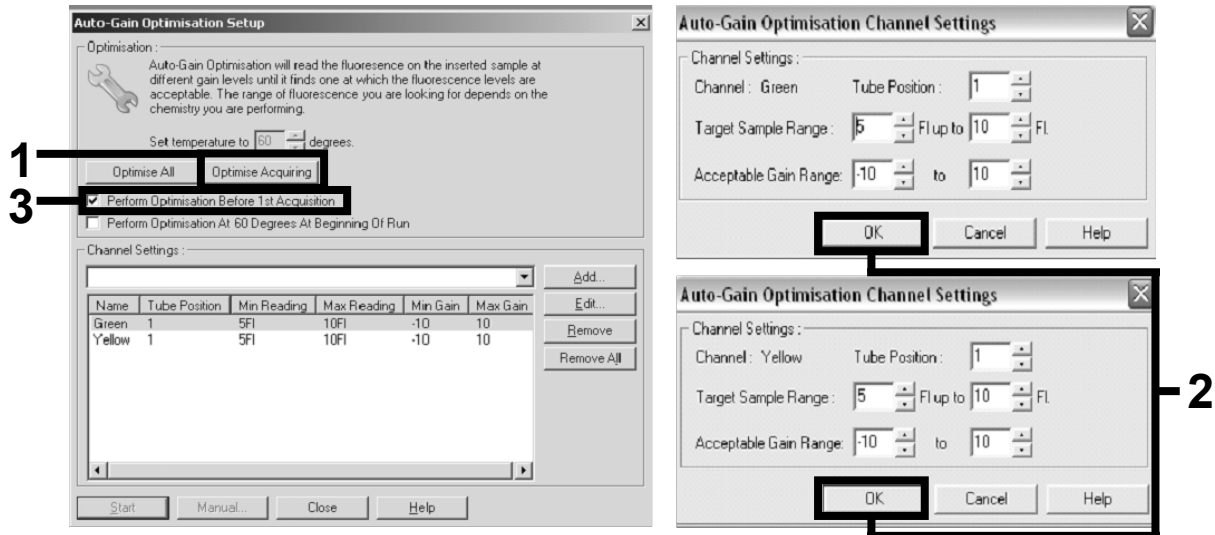


Figura 6. Ajustarea sensibilității canalului de fluorescență.

15. Valorile amplificării determinate prin calibrarea canalelor sunt salvate automat și sunt enumerate în ultima fereastră de meniu a procedurii de programare. Faceți clic pe „Start Run” (Pornire testare) pentru rularea programului.

16. Intrați în configurarea rotorului în software-ul Rotor-Gene (Figura 7).

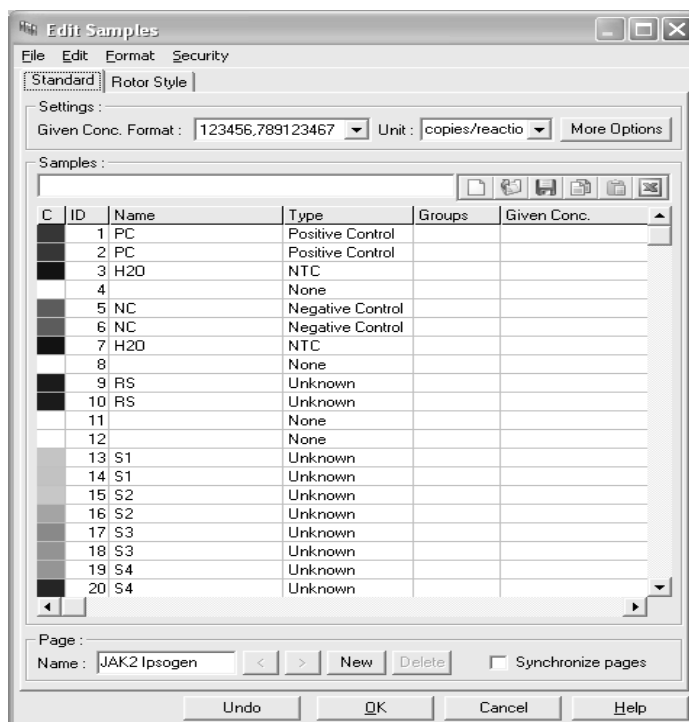


Figura 7. Configurarea Rotor-Gene: „Edit Samples” (Editare probe).

Procedura de analiză cu punct final pentru setarea instrumentului Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. După ce programul PCR s-a încheiat, faceți clic pe „Analysis” (Analiză) în bara de instrumente (Figura 8).



Figura 8. Analysis (Analiză).

18. În caseta de dialog „Analysis” (Analiză) (Figura 9), faceți dublu clic pe „Cycling A Green” și apoi pe „OK”. Repetați pentru Cycling A Yellow.

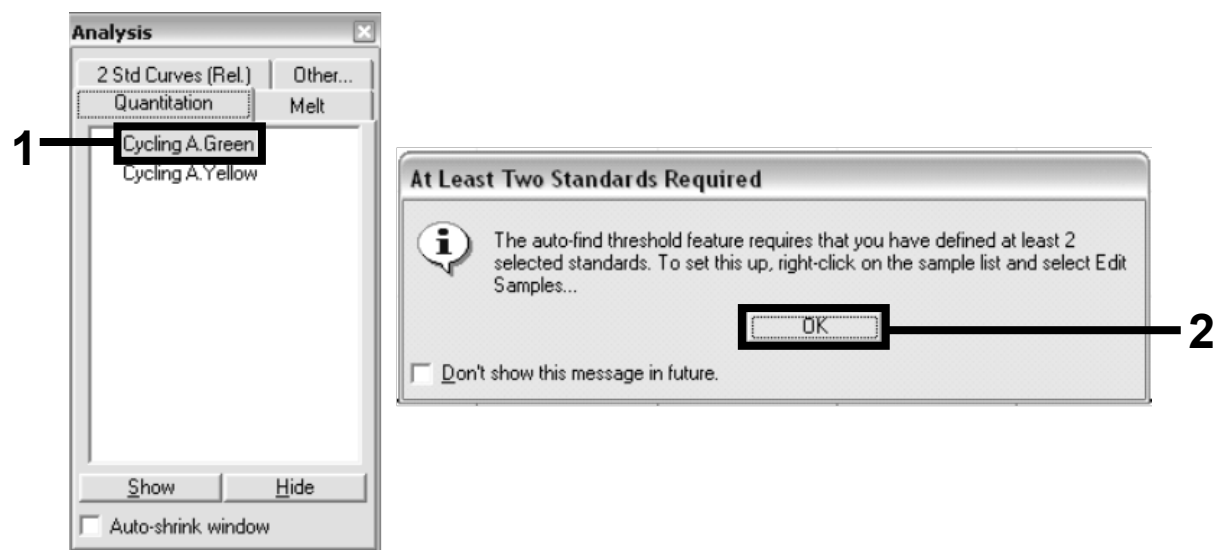


Figura 9. Cuantificarea: „Cycling A. Green”.

19. Apare o fereastră nouă (Figura 10). Faceți clic pe „Slope Correct” (Corecție pantă) în ambele panouri, așa cum se arată în Figura 10.

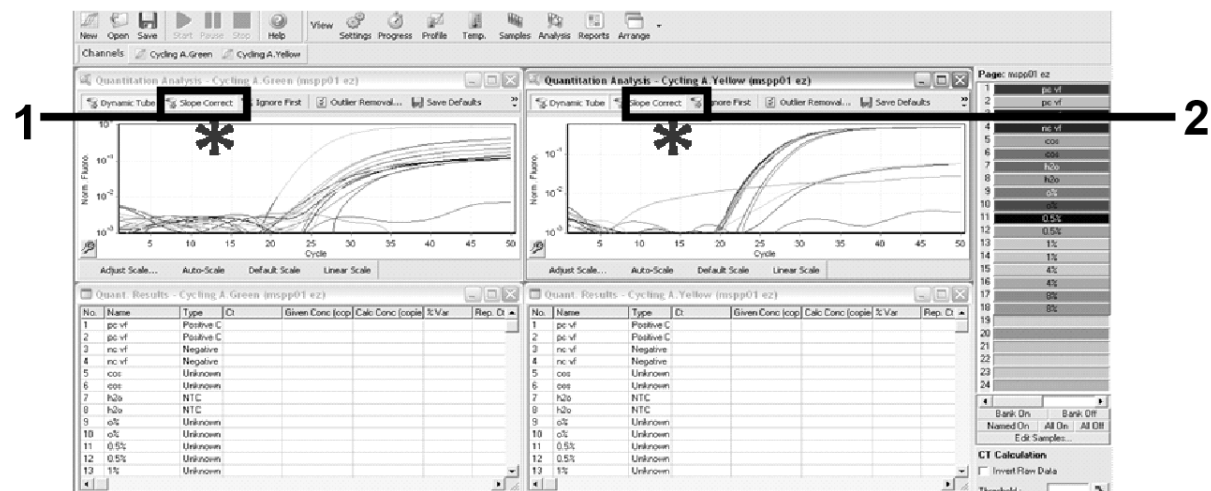


Figura 10. Setarea „Slope correct” (Corecție pantă).

20. Pentru exportul datelor, salvați ca foaie de date Excel®. Faceți clic pe „OK”, dați un nume fișierului de export și salvați fișierul text (*.txt).
21. Deschideți fișierul text în Excel și selectați coloana A. Faceți clic pe „Data” (Date), apoi pe „Convert” (Conversie) și „Next” (Următorul). Selectați „Comma” (Virgulă), apoi faceți clic pe „End” (Terminare). Rezultatele vor apărea așa cum se prezintă în Figura 11.

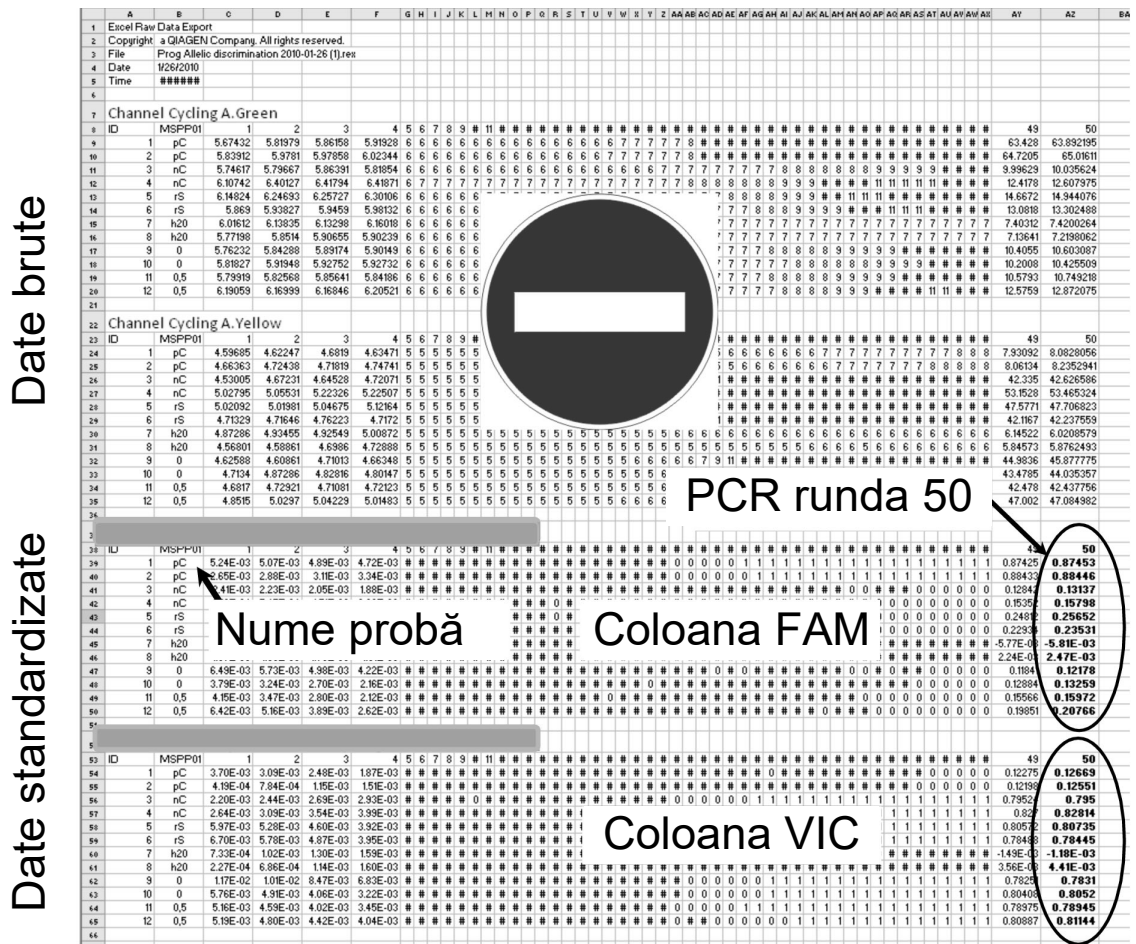


Figura 11. Exemplu de rezultate afișate în fișierul Excel.

Notă: Fișierul conține atât date brute, cât și date standardizate. Numai datele standardizate trebuie luate în considerare.

Aceste date sunt prezentate în secțiunile din tabel Analiza cantitativă a canalului Cycling A Green și Analiza cantitativă a canalului Cycling A Yellow. Datele pentru interpretare sunt cele achiziționate în timpul ciclului 50 PCR (în cercurile din dreapta).

Protocol: qPCR pe instrumente Applied Biosystems și ABI PRISM

Dacă utilizați echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 5.

Tabelul 5. Numărul de reacții pentru instrumentele Applied Biosystems 7300 și 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 sau ABI PRISM 7900HT

Probele	Reacții
Amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 V617F (PPM-VF) (56 de reacții)	
24 de probe de ADN	24 x 2 reacții
3 substanțe de control ADN	3 x 2 reacții (PC-VF, NC-VF și COS-VF, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumentele Applied Biosystems 7300 și 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 sau ABI PRISM 7900HT

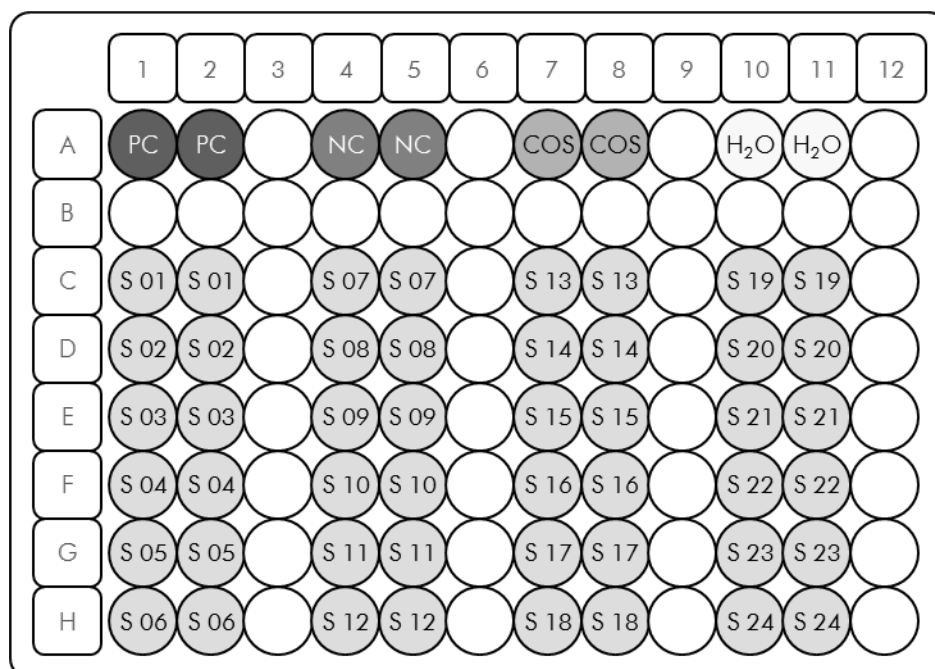


Figura 12. Configurarea sugerată a plăcii pentru un experiment efectuat cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC: substanță de control pozitivă; NC: substanță de control negativă; COS: probă cu prag de excludere; S: probă de ADN; H₂O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentele Applied Biosystems 7300 și 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 sau ABI PRISM 7900HT

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

- 1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.**
Componentele trebuie scoase din congelator cu aproximativ 10 minute înainte de începerea procedurii.
- 2. Vortexați și centrifugați pentru scurt timp toate tuburile (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**
- 3. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.**

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 6 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde. Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Pe instrumentele Applied Biosystems 7300 și 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 sau ABI PRISM 7900HT, *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit poate fi utilizat pentru analiza a 24 de probe în duplicat în cadrul unui singur experiment (Figura 12), 20 de probe în duplicat în două experimente sau 15 probe în duplicat în trei experimente.

Tabelul 6. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	Număr de reacții (μl)				Concentrație finală
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	5	285	145	95	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5	Câte 5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	Câte 25	–

* 24 de probe; un experiment/kit.

† 10 probe; două experimente/kit.

‡ 5 probe; trei experimente/kit.

4. **Vortexați și centrifugați pentru scurt timp amestecul qPCR (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**
5. **Distribuiți 20 μl de amestec qPCR preliminar per godeu.**
6. **Adăugați 5 μl din materialul de probă ADN sau substanțele de control în godeul corespunzător (volum total 25 μl).**
7. **Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.**
8. **Închideți placa și centrifugați pentru scurt timp (300 x g, aproximativ 10 s).**
9. **Așezați placa în termociclor, conform recomandărilor producătorului.**
10. **Programați termociclorul cu programul de termociclare indicat în Tabelul 7, apoi porniți testarea.**

Tabelul 7. Profilul temperaturii pentru instrumentele Applied Biosystems și ABI PRISM

Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 2 min
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 min
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 92 °C timp de 15 s 60 °C timp de 1 min

Procedura de analiză a testării ulterioară citirii pentru instrumentele Applied Biosystems și ABI PRISM

Pentru detalii de programare ale instrumentelor Applied Biosystems 7300 și 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 sau ABI PRISM 7900HT, consultați ghidul de utilizare al instrumentului. Pentru o prezentare de ansamblu mai clară, setările software sunt încercuite cu o linie neagră îngroșată.

- 11. După finalizarea testării, selectați „Start/Program”, apoi „File/New” (Fișier/Nou).**
- 12. În caseta de dialog „New Document Wizard” (Expertul pentru documente noi), faceți clic pe lista verticală „Assay” (Test) și selectați „Allelic Discrimination” (Discriminare alelică) (Figura 13).**
- 13. Acceptați setările implicite pentru câmpurile „Container” (Recipient) și „Template” (Șablon) („96-Well Clear” (96 de godeuri transparente) și „Blank Document” (Document necompletat), Figura 13). În câmpul „Plate Name” (Denumire placă), tasta *AD Post-read* (Procedură de analiză ulterioară citirii) (Figura 13), apoi faceți clic pe „Next>” (Următorul>) pentru a accesa caseta de dialog „Select Markers” (Selectare marcatori).**

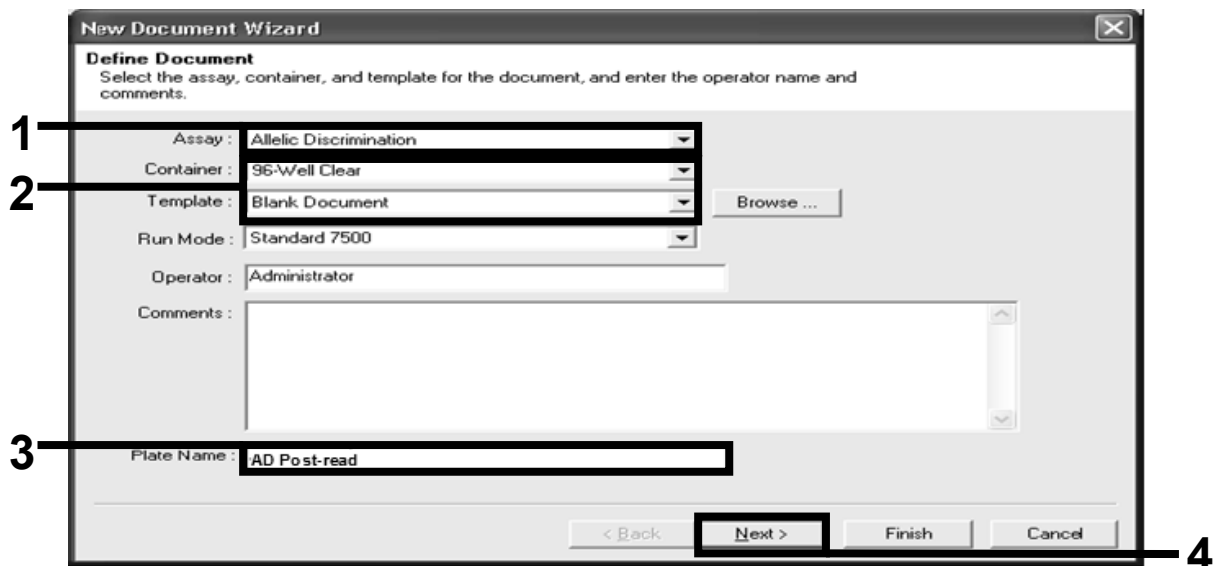


Figura 13. Pre-setări pentru crearea unei noi testări ulterioare citirii (New Document Wizard (Expertul pentru documente noi)).

14. Dacă panoul „Markers in Document” (Marcatori în document) din caseta de dialog „Select Markers” (Selectare marcatori) conține un marcator potrivit pentru aplicația dvs., treceți la pasul 18. În caz contrar, treceți la pasul 15.
15. Creați detectoare și marcatori după cum urmează. Faceți clic pe „New Detector” (Detector nou) (Figura 14).

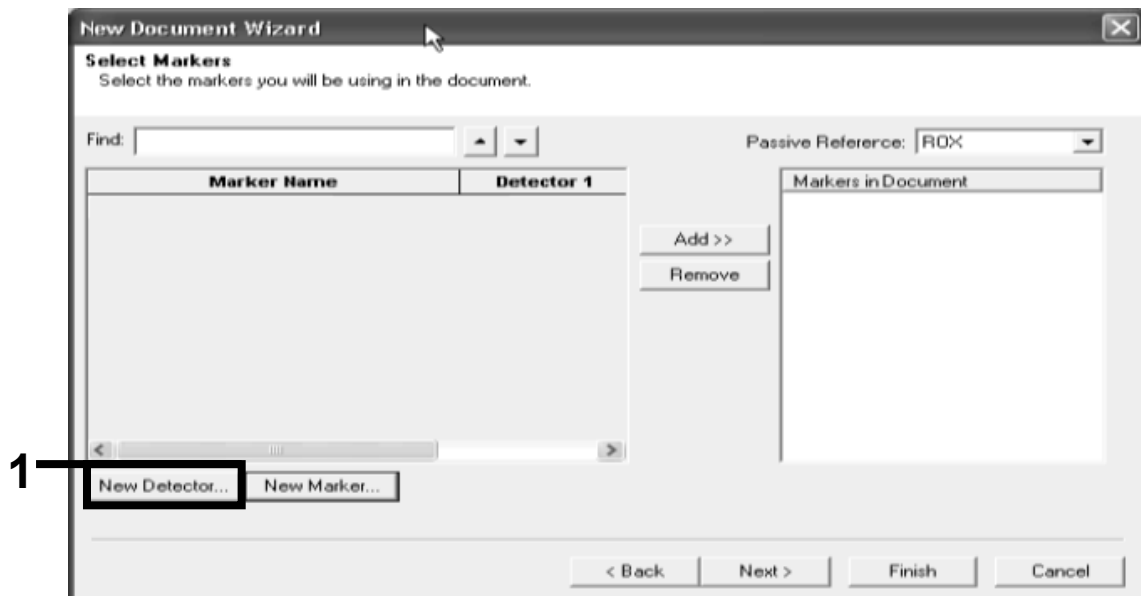


Figura 14. Panoul „Markers in Document” (Marcatori în document) nu conține un marcator potrivit pentru aplicația dvs.

16. În caseta de dialog „New Detector” (Detector nou), tastați *Allele A* (Alelă A) în câmpul „Name” (Denumire) (Figura 15). Lăsați opțiunea „Reporter Dye” (Colorant raportor) setată la „FAM”. Faceți clic pe butonul „Color” (Culoare), selectați o culoare, apoi faceți clic pe „OK” (Figura 15). Faceți clic pe „Create Another” (Creați altul) (Figura 15).

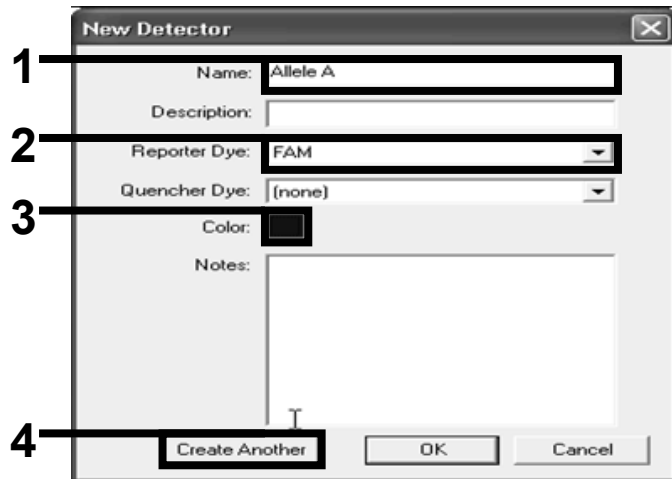


Figura 15. Modul de creare a detectoarelor.

17. În următoarea casetă de dialog „New Detector” (Detector nou), tastați *Allele B* (Alelă B) în câmpul „Name” (Denumire). În câmpul „Reporter Dye” (Colorant raportor), selectați „VIC”. Faceți clic pe butonul „Color” (Culoare), selectați o culoare, apoi faceți clic pe „OK”.
18. Faceți clic pe „New Marker” (Marcator nou) în caseta de dialog „Select Markers” (Selectare marcatori) (consultați Figura 14).
19. În caseta de dialog „New Marker” (Marcator nou), tastați *JAK2* în câmpul „New Marker Name” (Denumire marcator nou) (Figura 16). Selectați detectoarele „Allele A” (Alelă A) și „Allele B” (Alelă B), create în etapele 16 și 17 (sau definite deja), apoi faceți clic pe „OK” (Figura 16).

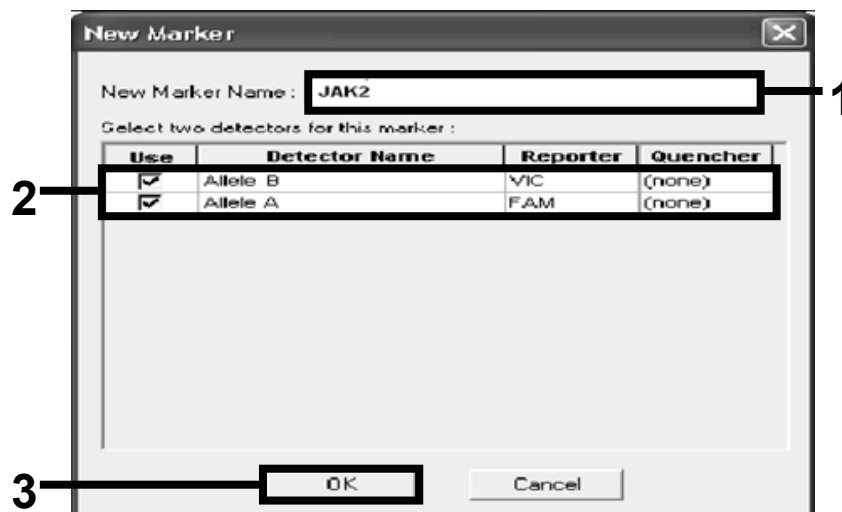


Figura 16. Modul de creare a marcatorelor.

20. În caseta de dialog „Select Markers” (Selectare marcatori), selectați „JAK2”, creat în modul prezentat mai sus sau un marcator predefinit adecvat, apoi faceți clic pe „Add>>” (Adăugare>>) (Figura 17).

Notă: Pentru eliminarea unui marcator, selectați-l și apoi faceți clic pe „Remove” (Eliminare).

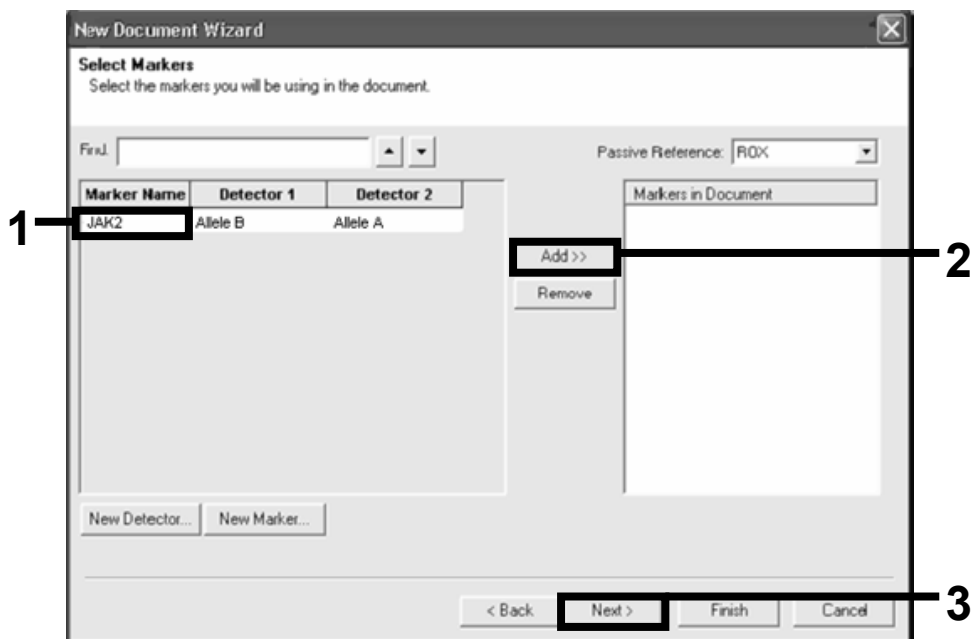


Figura 17. Selectarea marcarilor.

21. Faceți clic pe „Next>” (Următorul>).
22. În caseta de dialog „Setup Sample Plate” (Configurare placă pentru probe), faceți clic și trageți pentru a selecta marcatorul pentru godeurile care conțin probe. Faceți clic pe „Finish” (Finalizare).
23. Selectați fila „Instrument” și modificați volumul probei la 25 µl.
24. Selectați „File/Save” (Fișier/Salvare), apoi faceți clic pe „Save” (Salvare) pentru a păstra denumirea atribuită la crearea plăcii.
25. Încărcați placa de reacție în instrument, conform recomandărilor producătorului

- 26. Porniți testarea ulterioară citirii. Faceți clic pe „Post-Read” (După citire).**
Instrumentul va efectua o testare de 1 ciclu timp de 60 s la 60 °C. În timpul acestei testări, instrumentul colectează fluorescența FAM și VIC în fiecare godeu (Figura 18).

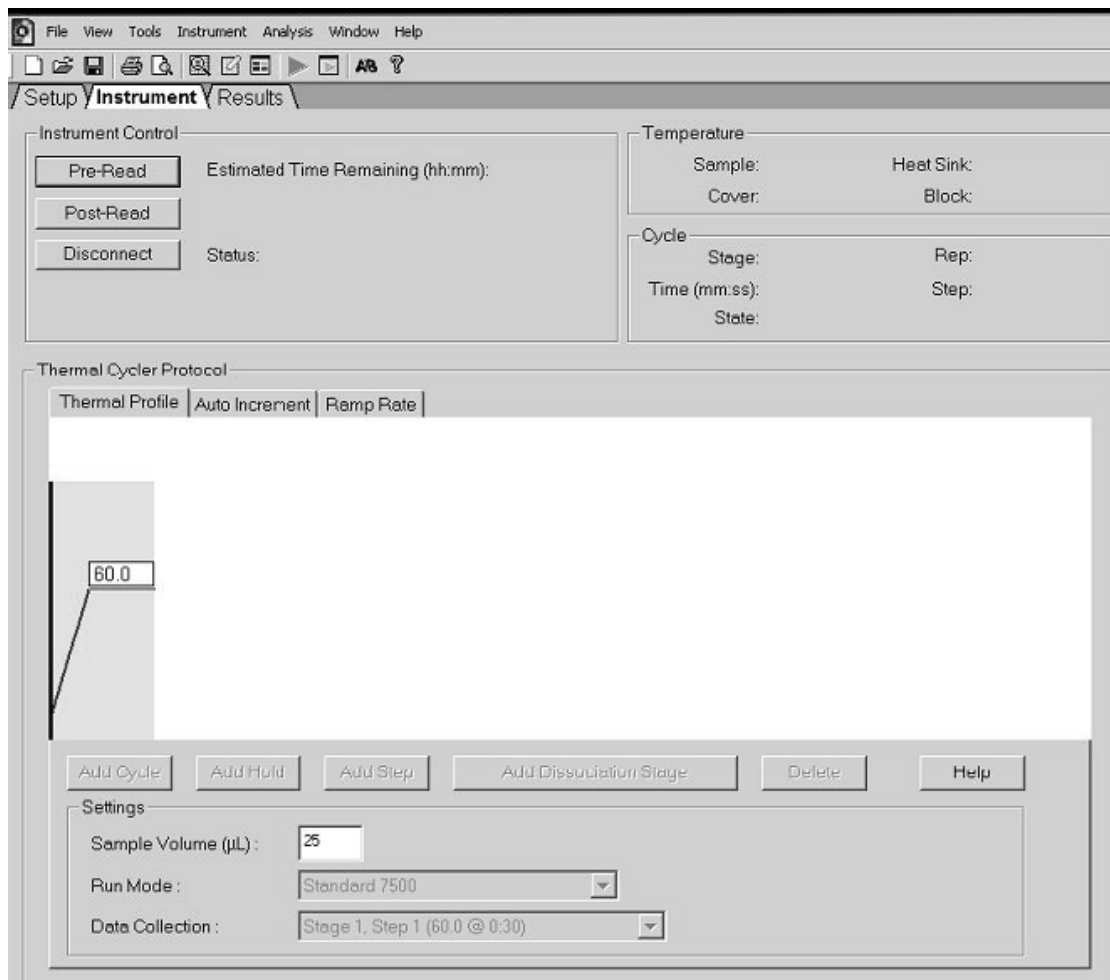


Figura 18. Testarea ulterioară citirii.

27. Selectați „File/Export” (Fișier/Export), apoi faceți clic pe „Results” (Rezultate) pentru a exporta rezultatele într-un fișier Excel. Rezultatele vor apărea așa cum se prezintă în Figura 19.

				VIC proba 1				FAM proba 1				
Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method	
12	Comments:											
13	SDS v1.2											
14												
15	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

Figura 19. Exemplu de rezultate afișate într-un fișier Excel.

Protocol: qPCR pe instrumentul LightCycler 480

Dacă utilizați echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 8.

Tabelul 8. Număr de reacții pentru instrumentul LightCycler 480

Probele	Reacții
Cu amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 V617F (PPM-JAK2)	
24 de probe de ADN	24 x 2 reacții
3 substanțe de control ADN	3 x 2 reacții (PC-VF, NC-VF și COS-VF, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumentul LightCycler 480

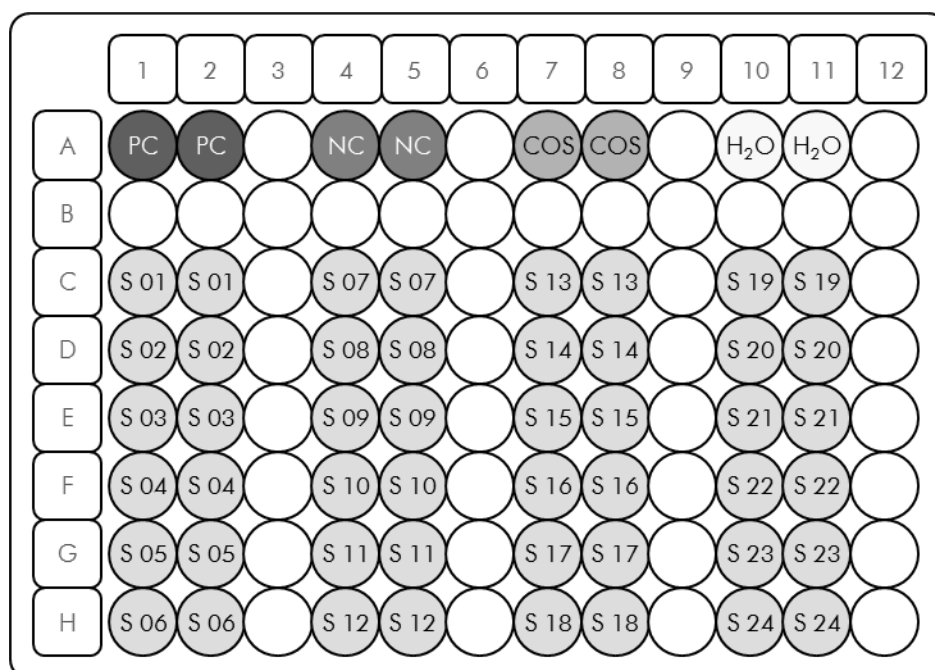


Figura 20. Configurarea sugerată a plăcii pentru un experiment efectuat cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC: substanță de control pozitivă; NC: substanță de control negativă; COS: probă cu prag de excludere; S: probă de ADN; H₂O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentul LightCycler 480

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

- 1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.**
Componentele trebuie scoase din congelator cu aproximativ 10 minute înainte de începerea procedurii.
- 2. Vortexați și centrifugați pentru scurt timp toate tuburile (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**
- 3. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.**

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 9 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde. Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Pe instrumentul LightCycler 480, *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit poate fi utilizat pentru analiza a 24 de probe în duplicat în cadrul unui singur experiment (Figura 20), 20 de probe în duplicat în două experimente sau 15 probe în duplicat în trei experimente.

Tabelul 9. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	Număr de reacții (μl)				Concentrație finală
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	5	285	145	95	–
Probă (de adăugat la pasul 6)	5	Câte 5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	Câte 25	–

* 24 de probe; un experiment/kit.

† 10 probe; două experimente/kit.

‡ 5 probe; trei experimente/kit.

4. **Vortexați și centrifugați pentru scurt timp amestecul qPCR (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**
5. **Distribuiți 20 μl de amestec qPCR preliminar per godeu.**
6. **Adăugați 5 μl din materialul de probă ADN sau substanțele de control în godeul corespunzător (volum total 25 μl).**
7. **Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.**
8. **Închideți placa și centrifugați pentru scurt timp (300 x g, aproximativ 10 s).**
9. **Așezați placa în termociclor, conform recomandărilor producătorului.**
10. **Pe pagina de pornire, selectați „New Experiment” (Experiment nou).**

11. Pentru LightCycler 480 I, parcurgeți etapa 11a. Pentru LightCycler 480 II, parcurgeți etapa 11b.

Pentru detalii de programare ale instrumentului LightCycler 480, consultați ghidul de utilizare al instrumentului. Pentru o prezentare de ansamblu mai clară, setările software sunt încercuite cu o linie neagră îngroșată.

11a. LightCycler 480 I: Selectați „Multi Color Hydrolysis Probe” (Sondă de hidroliză multicoloră), faceți clic pe „Customize” (Personalizare), apoi verificați dacă sunt selectate canalele „FAM (483-533)” și „Hex (533-568)” (adică VIC) (Figura 21). Setări volumul de reacție la „25” μl (Figura 21) și treceți la etapa 12.

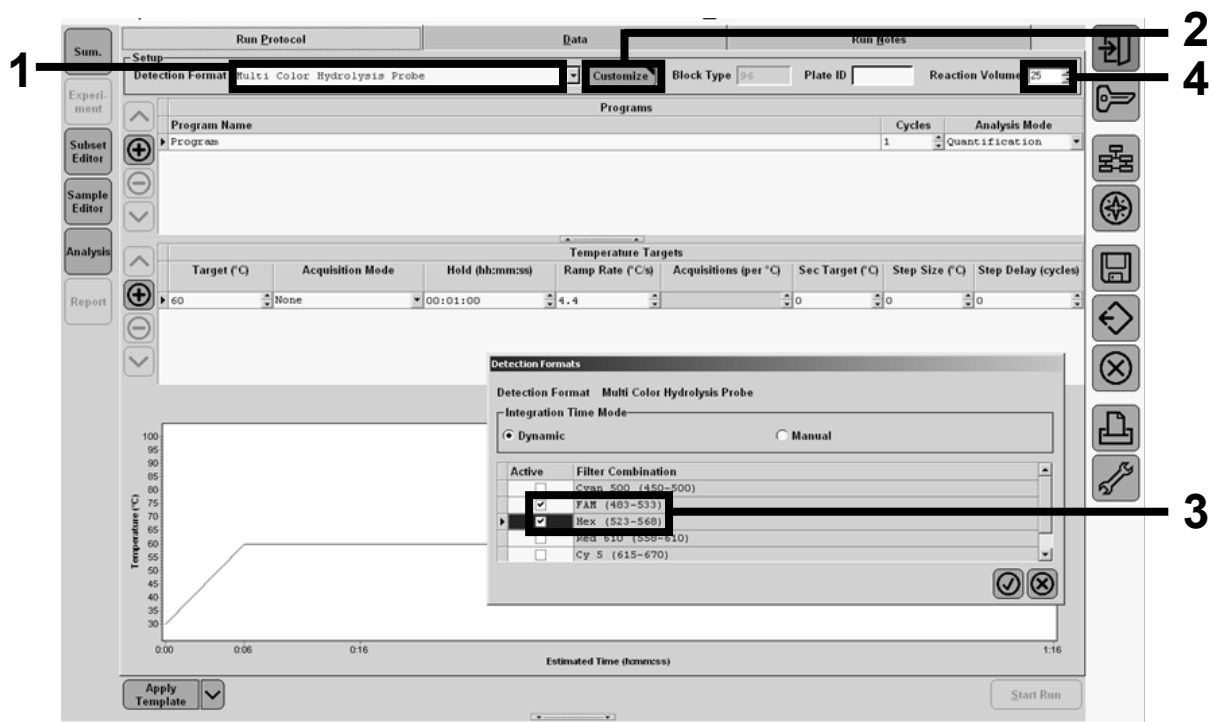


Figura 21. LightCycler 480 I: Setarea formatului de detecție.

11b. LightCycler 480 II: Selectați „Dual Color Hydrolysis Probe” (Sondă de hidroliză în două culori), faceți clic pe „Customize” (Personalizare), apoi verificați dacă sunt selectate canalele „FAM (465-510)” și „VIC / HEX / (533-580)” (Figura 22). Setări volumul de reacție la „25” μl (Figura 22) și treceți la etapa 12.

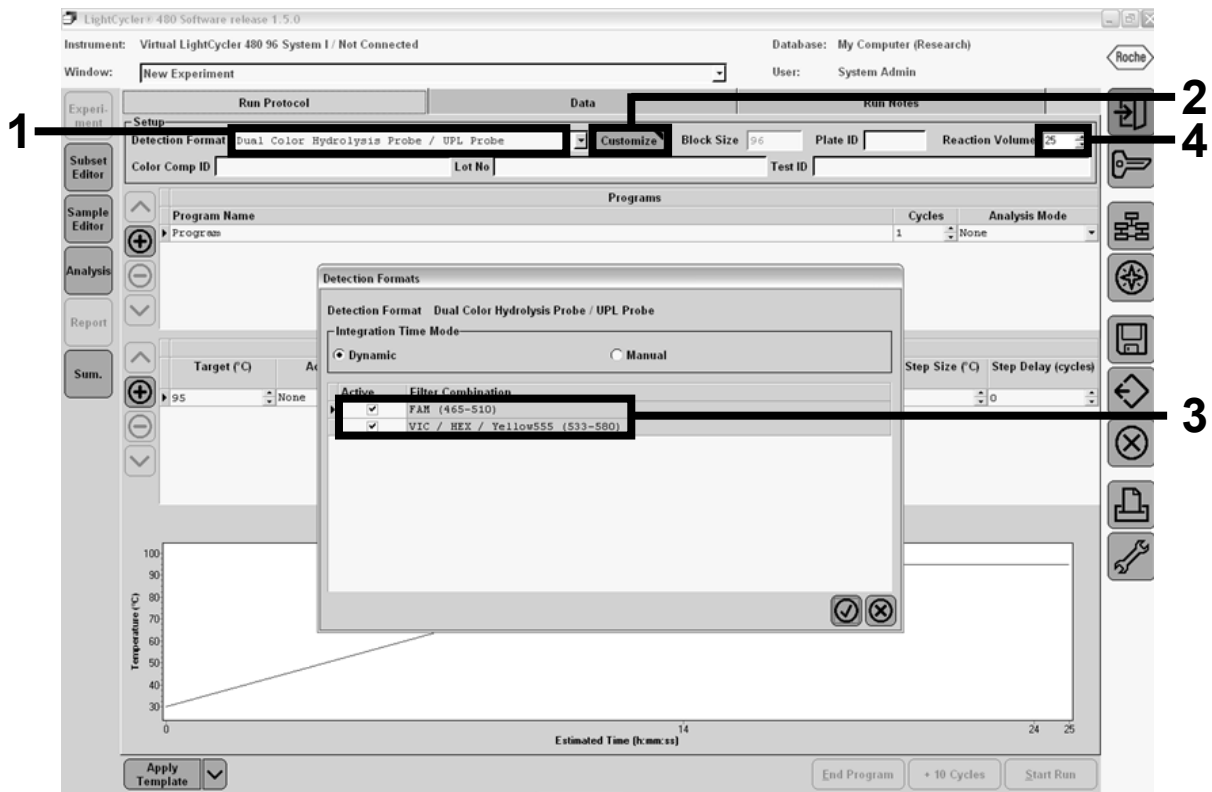


Figura 22. LightCycler 480 II: Setarea formatului de detecție.

12. Programați termociclorul cu programul de termociclare indicat în Tabelul 10, apoi porniți testarea.

Notă: La descrierea configurării plăcii pe instrument, selectați „Endpt Geno” (Genotipare cu punct final) în secțiunea „Step 1: select workflow” (Etapa 1: selectați fluxul de lucru).

Tabelul 10. Profilul temperaturii pentru instrumentul LightCycler 480

Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 2 min
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 min
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 92 °C timp de 15 s; unic 60 °C timp de 1 min; unic
Hold 3 (Reținere 3)	60 °C timp de 1 min; unic

Procedura de analiză cu punct final pentru instrumentul LightCycler 480

13. La finalizarea testării, faceți clic pe „Analysis” (Analiză).

14. În caseta de dialog „Create New Analysis” (Creare analiză nouă), selectați „Endpoint Genotyping” (Genotipare cu punct final), apoi selectați subsetul de analizat din meniul „Subset” (Figura 23).

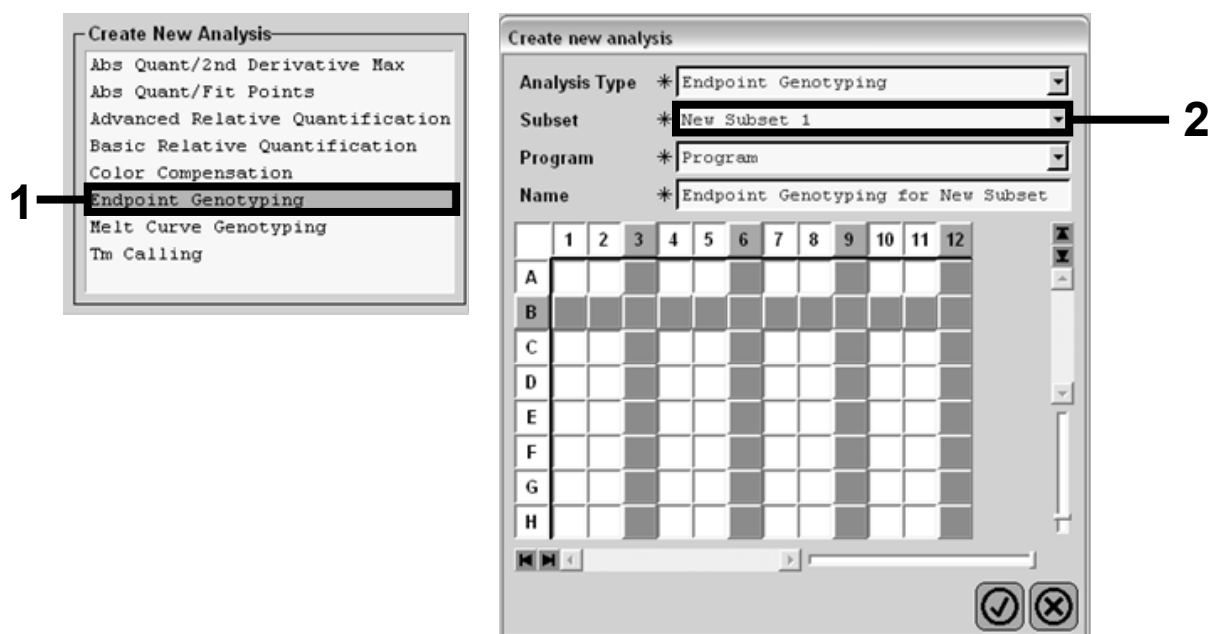


Figura 23. Selectarea tipului de analiză și a subsetului de analizat.

15. În fereastra următoare, selectați fluorescența „Hex” (adică VIC) pentru „Allele X” (Alelă X) și fluorescența „FAM” pentru „Allele Y” (Alelă Y) (Figura 24).



Figura 24. Selectarea fluorescenței pentru „Allele X” (Alelă X) și „Allele Y” (Alelă Y).

16. Următoarea fereastră (Figura 25) arată configurarea plăcii (1, stânga sus), rezultatele fluorescenței pentru fiecare probă (2, stânga jos) și diagrama de dispersie cu discriminarea alelică (3, dreapta; fluorescența FAM și VIC măsurate la ciclul 50 PCR).

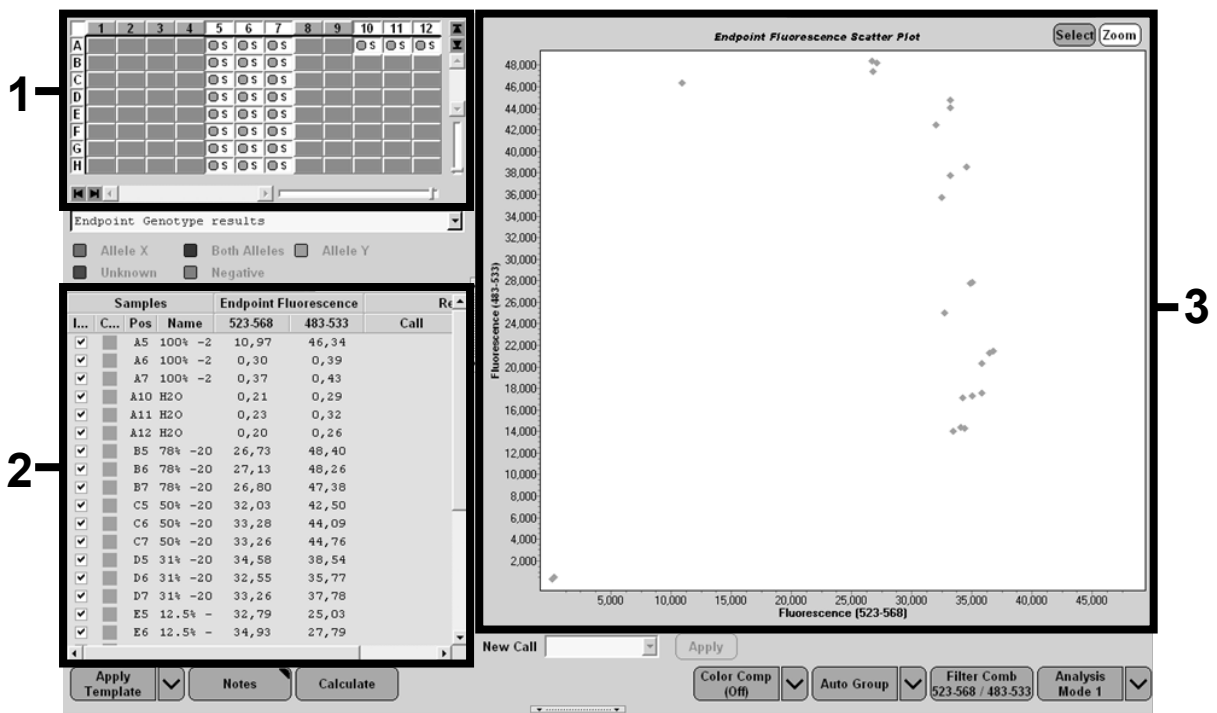


Figura 25. Rezumatul datelor.

17. Pentru exportul datelor, faceți clic dreapta pe șablonul cu rezultatele probelor, apoi selectați „Export Table” (Export tabel). Fișierul va fi salvat într-un format de fișier text (.txt).

18. Pentru a vizualiza și a analiza rezultatele, deschideți fișierul folosind Excel. Rezultatele vor apărea așa cum se prezintă în Figura 26.

Microsoft Excel - test

Fichier Edition Affichage Insertion Format Outils Données Fenêtre ?

Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)

	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								

VIC
FAM

Figura 26. Exemplu de rezultate afișate într-un fișier Excel.

Protocol: qPCR pe instrumentul LightCycler 2.0

Notă: Din cauza cerințelor tehnologice speciale, experimentele cu LightCycler 2.0 trebuie efectuate folosind reactivi specifici. Vă recomandăm utilizarea LightCycler TaqMan Master. Urmăți instrucțiunile producătorului pentru prepararea amestecului Master Mix 5x.

Dacă utilizați un rotor cu 32 de capilare, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 11.

Tabelul 11. Număr de reacții pentru instrumentul LightCycler 2.0

Probele	Reacții
Amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 V617F (PPM-VF) (32 de reacții)	
12 de probe de ADN	12 x 2 reacții
3 substanțe de control ADN	3 x 2 reacții (PC-VF, NC-VF și COS-VF, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumentul LightCycler 2.0

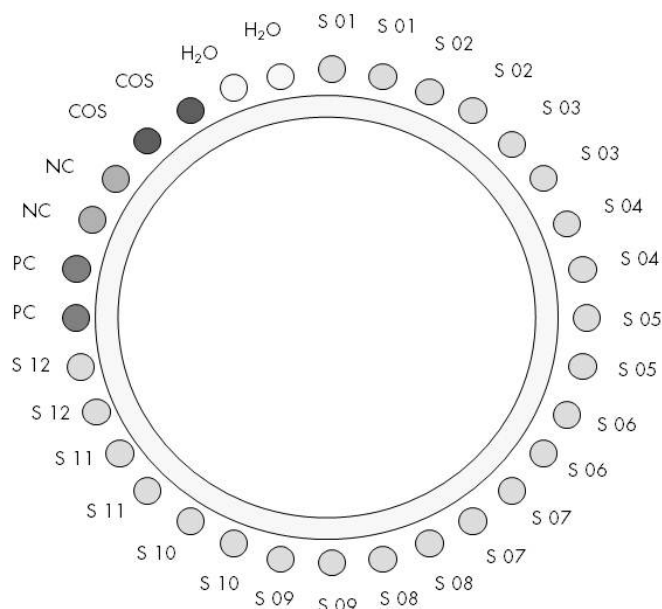


Figura 27. Configurarea sugerată a rotorului pentru un experiment efectuat cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. PC: substanță de control pozitivă; NC: substanță de control negativă; COS: probă cu prag de excludere; S: probă de ADN; H₂O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentul LightCycler 2.0

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.

Componentele trebuie scoase din congelator cu aproximativ 10 minute înainte de începerea procedurii.

2. Vortexați și centrifugați pentru scurt timp toate tuburile (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).

3. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 12 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 20 μ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde. Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Pe instrumentul LightCycler 2.0, *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit poate fi utilizat pentru analiza a 12 probe în duplicat în cadrul unui singur experiment (Figura 27).

Tabelul 12. Prepararea amestecului qPCR pentru instrumentul LightCycler 2.0

Componentă	Număr de reacții (μ l)		Concentrație finală
	1	32+1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 10x	2	66	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	9	297	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5	Câte 5	–
Volum total	20	Câte 20	–

4. Vortexați și centrifugați pentru scurt timp amestecul qPCR (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).
 5. Distribuți 15 μ l de amestec qPCR preliminar per capilar.
 6. Adăugați 5 μ l din materialul de probă ADN sau substanțele de control în capilarul corespunzător (volum total 20 μ l).
 7. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
 8. Așezați capilarele în adaptorul furnizat împreună cu instrumentul și centrifugați pentru scurt timp (700 x g, aproximativ 10 s).
 9. Încărcați probele în termociclor, conform recomandărilor producătorului.
 10. Programați termociclorul (Figura 28) la programul indicat în Tabelul 13.
- Pentru detalii de programare ale instrumentului LightCycler 2.0, consultați ghidul de utilizare al instrumentului. Pentru o prezentare de ansamblu mai clară, setările software sunt încercuite cu o linie neagră îngroșată.

Notă: Asigurați-vă că setarea este pentru Quantification (Cuantificare), pentru achiziția unică a fluorescenței FAM și achiziția unică a fluorescenței VIC atât în etapa de amplificare/ciclare, cât și în etapa finală de reținere la 60 °C.

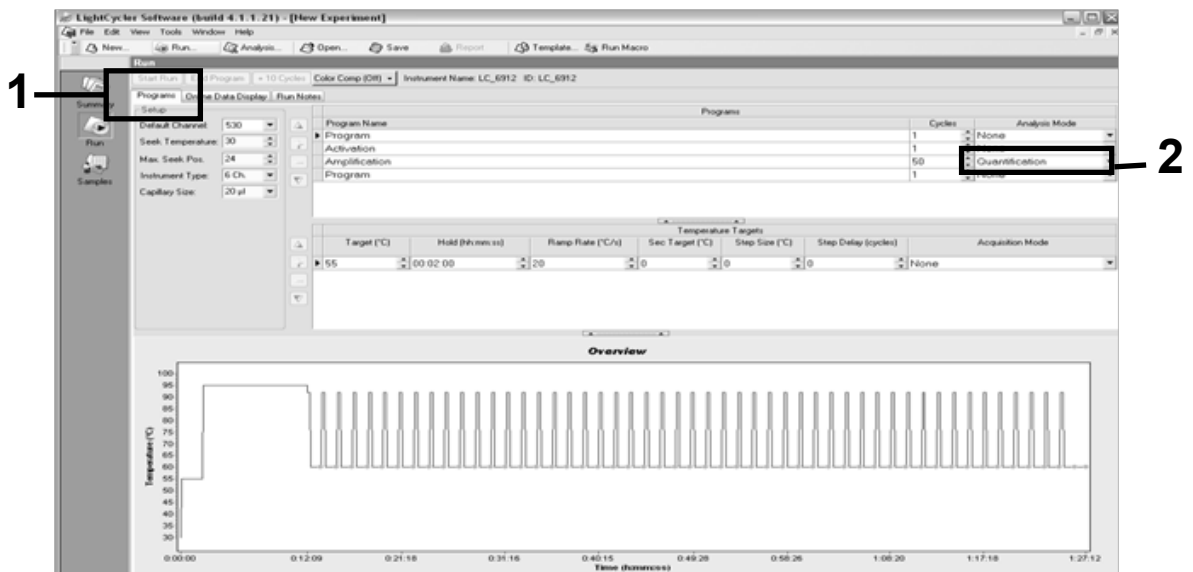


Figura 28. Ecran de programare pentru LightCycler 2.0.

Tabelul 13. Profilul temperaturii pentru instrumentul LightCycler 2.0

Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 55 °C Time (Timp): 2 min Rampă: 20
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 min Rampă: 20
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 92 °C timp de 15 s; rampă: 20 60 °C timp de 1 min; rampă 20
Hold 3 (Reținere 3)	60 °C timp de 1 min; rampă 20

Procedura de analiză cu punct final pentru instrumentul LightCycler 2.0

11. La sfârșitul rulării de amplificare, faceți clic pe fila „Online Data Display” (Afișare online date) (Figura 29). Deschideți meniul vizual din stânga sus a ferestrei „Current Fluorescence” (Fluorescență curentă), apoi tastați 51 în „Acquisition no.” (Nr. achiziție).

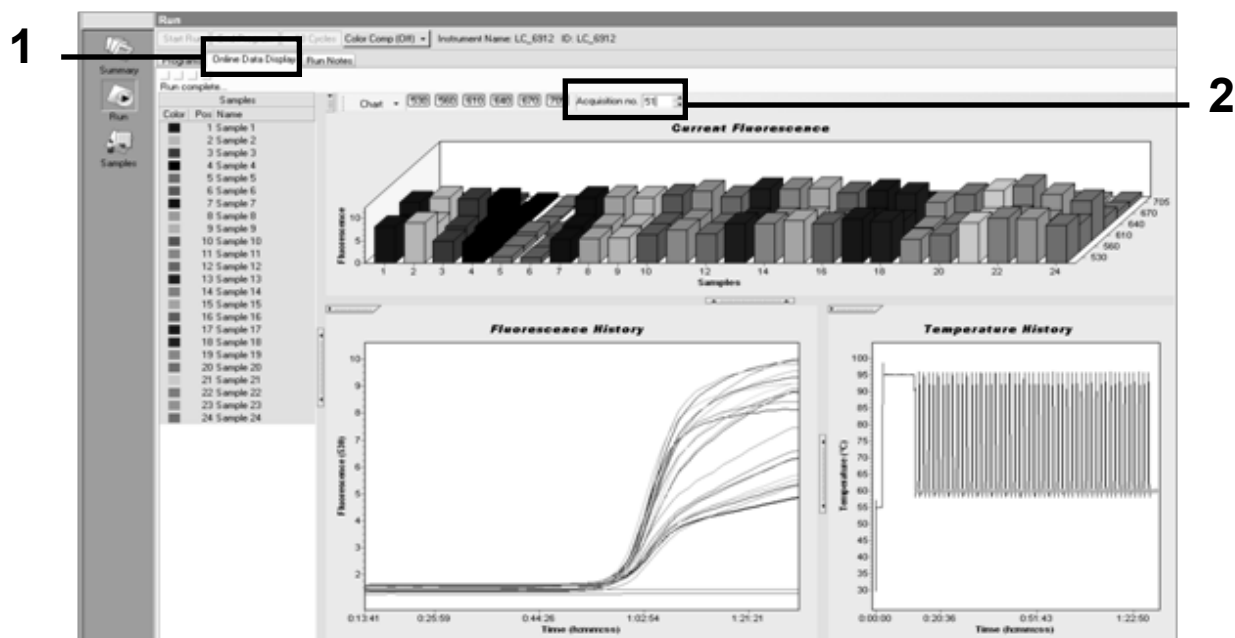



Figura 29. Rezultate și istoric în Online Data Display (Afișare online date).

12. Faceți clic dreapta lângă graficul „Current Fluorescence” (Fluorescență curentă) și selectați „Export”.

13. Faceți clic pe caseta „Excel” din caseta de dialog „Export chart” (Export grafic) (Figura 30). Introduceți o denumire în câmpul de dialog „Filename” (Denumire fișier). Selectați o destinație de export pentru fișierul cu rezultate, cu ajutorul butonului . Faceți clic pe „Export”.

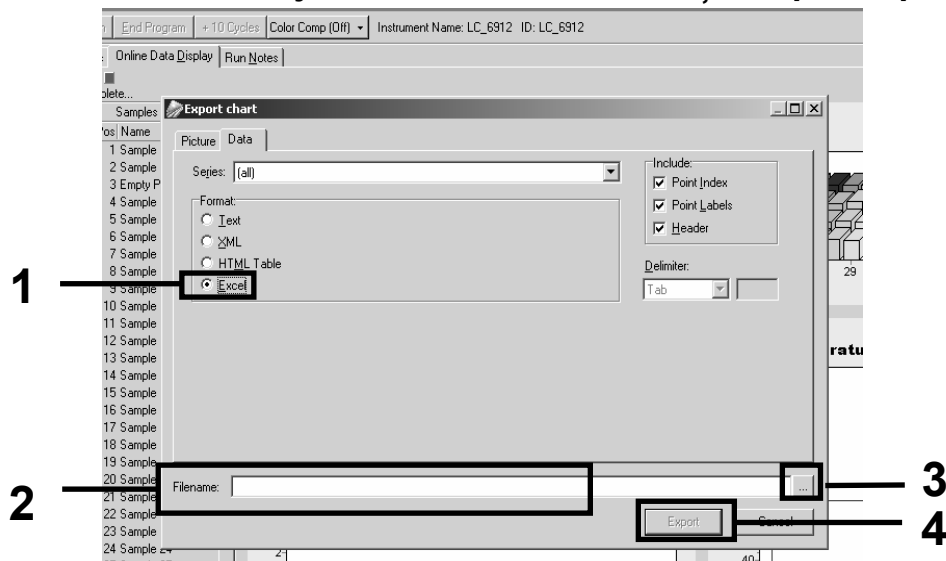


Figura 30. Selectarea formatului de export și a destinației fișierului de date.

14. Pentru a vizualiza și a analiza rezultatele, deschideți fișierul în Excel. Rezultatele pentru LightCycler 2.0 se vor afișa conform imaginii.

		Poziție																
I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U						
X	Bar	Text X	Bar	Text X	Bar	Text X	Bar	Text	Bar	Text	Bar	Text	Bar	Text	Bar	Text	Bar	Text
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								

Figura 31. Exemplu de rezultate LightCycler 2.0 afișate într-un fișier Excel.

Interpretarea rezultatelor

Creați un fișier adecvat pentru a extrage datele exportate pentru toate instrumentele: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau alt instrument Rotor-Gene, LightCycler 2.0 sau 480; Applied Biosystems 7300 sau 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS sau 7900HT SDS și verificați nivelurile de fluorescență (trebuie să existe concordanță la nivel de duplicate).

Pregătiți o reprezentare grafică (diagramă de dispersie) a datelor de fluorescență. Axa x este fluorescența VIC; axa y este fluorescența FAM.

Reprezentare grafică și criteriile de control al calității

Un exemplu de diagramă de dispersie este prezentat în Figura 32.

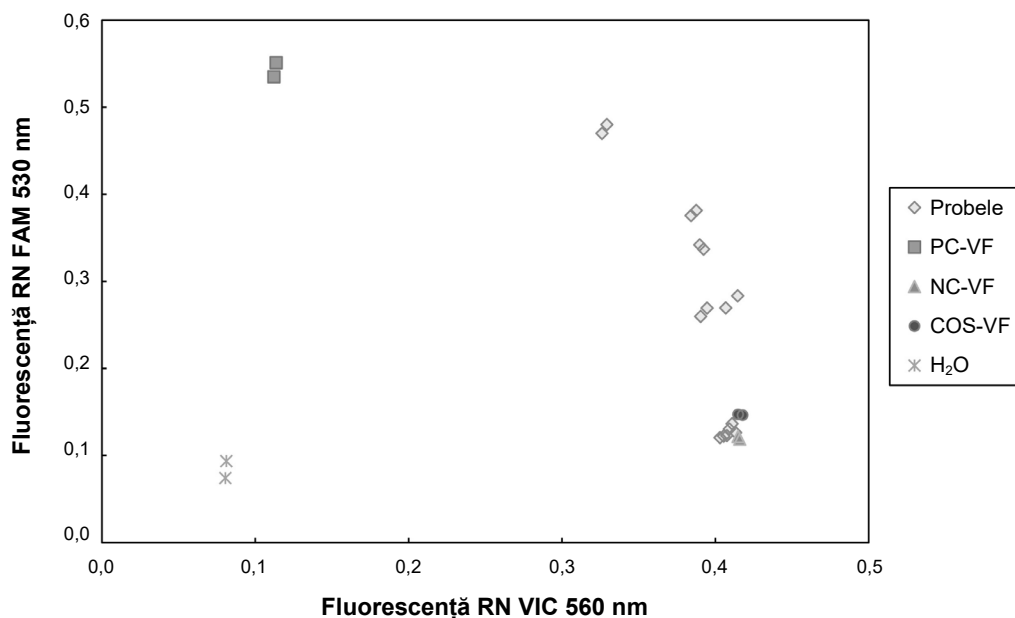


Figura 32. Diagrama de dispersie a unui experiment reprezentativ de discriminare alelică. Instrumente: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM și LightCycler 480.

Probele trebuie să se afle pe arcul care conectează substanțele de control negative (Negative Control, NC) de substanțele de control pozitive (Positive Control, PC).

Poziționarea necorespunzătoare a oricărei substanțe de control poate indica o eroare experimentală.

- Substanțele de control pozitive trebuie să se afle în stânga sus.
- Substanțele de control negative trebuie să se afle în dreapta jos.
 - Poziționarea greșită a unei substanțe de control negative poate indica posibila contaminare.
- Proba cu prag de excludere trebuie să apară deasupra substanțelor de control negative.

- Substanțele de control cu apă trebuie să se afle în stânga jos.
 - Poziționarea greșită a unei substanțe de control cu apă (deasupra NC pentru măsurătoarea FAM sau deasupra PC pentru VIC) poate indica posibila contaminare.

Notă: Poziționarea substanțelor de control poate fi diferită la analiza datelor provenite de la instrumentul LightCycler 2.0 (consultați Figura 33). Substanțele de control cu apă încă trebuie să se afle în stânga jos.

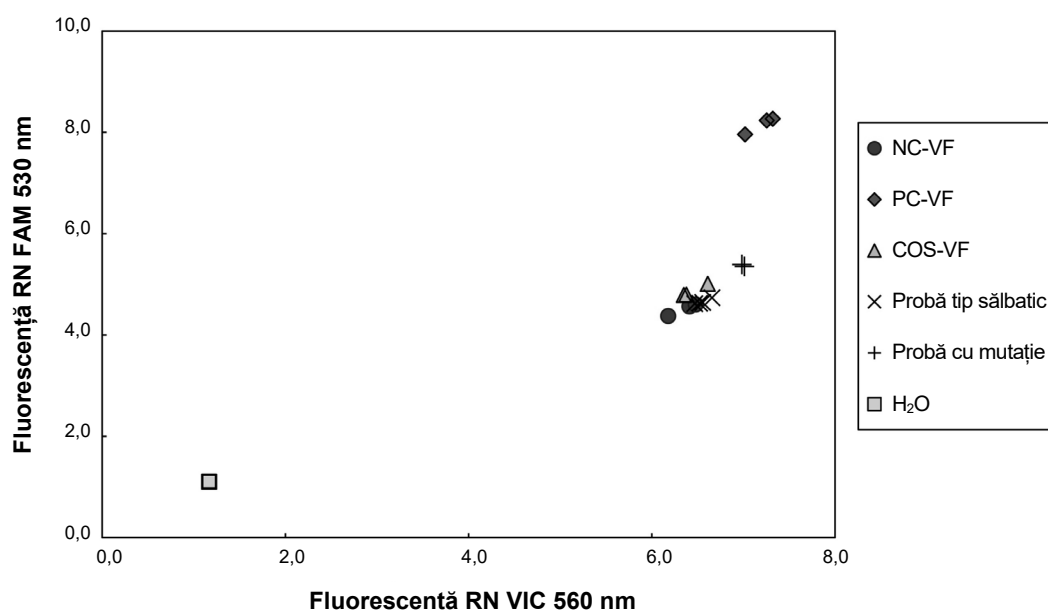


Figura 33. Diagrama de dispersie a unui experiment reprezentativ de discriminare alelică. Instrument: LightCycler 2.0.

Calculul raportului FAM/VIC normalizat și genotiparea

Calculați raporturile FAM/VIC pentru toate probele. Calculați raporturile FAM/VIC pentru substanța de control pozitivă (Positive Control, PC), proba cu prag de excludere (Cut-off Sample, COS) și substanța de control negativă (Negative Control, NC). Trebuie să existe concordanță între rapoarturi la nivel de duplicate. Calculați raportul mediu al tuturor duplicatelor.

Calculați raportul normalizat (normalized ratio, NRatio) pentru proba cu prag de excludere (Cut-off Sample, COS) și pentru toate probele:

$$\text{NRatio}_{\text{probă}} = \frac{\text{Raport}_{\text{probă}}}{\text{Raport}_{\text{NC}}}$$

Notă: Zona gri (Gray Zone, GZ) a unui test este definită ca o zonă de valori în care performanța discriminatorie este insuficient de precisă. O valoare în zona gri indică faptul că markerul vizat nu poate fi punctat ca prezent sau absent. Zona gri trebuie calculată pentru fiecare experiment în parte.

Calculați zona gri, sau zona de incertitudine, pe baza raportului normalizat al COS (NRatio_{COS}):

$$GZ: [(NRatio_{COS} \times 0,94); (NRatio_{COS} \times 1,06)]$$

Comparați raportul normalizat al fiecărei probe cu NRatio_{COS} GZ. Interpretarea rezultatelor este evidențiată în Tabelul 14 și un exemplu de calcul și interpretare a datelor este oferit în Tabelul 15.

Tabelul 14. Interpretarea rezultatelor genotipării folosind raporturi normalizate

Rezultate	Interpretare
NRatio _{probă} > NRatio _{COS} x 1,06	JAK2 V617F este detectat
NRatio _{probă} < NRatio _{COS} x 0,94	JAK2 V617F nu este detectat
NRatio _{probă} se încadrează în NRatio _{COS} GZ	Rezultat neconcludent

Tabelul 15. Un exemplu de calcul și interpretare a datelor de fluorescență

Probă	VIC	FAM	Raport	Raport mediu	NRatio	Interpretare
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutație nedetectată
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Mutație detectată
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Probă cu prag de excludere
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutație nedetectată
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Mutație detectată
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Rezultat neconcludent
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Rezultat neconcludent
S 4	2,322	2,191	0,944			
GZ	1,205	1,359				

Ghid de depanare

Acest ghid de depanare poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, a se vedea și pagina „Întrebări frecvente” din cadrul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Cercetătorii din cadrul Serviciilor tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și protocoalele din acest manual, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, consultați „Date de contact”, pagina 56).

Comentarii și sugestii

Semnal negativ pentru substanță de control pozitivă

- a) Eroare la pipetare Verificați schema de pipetare și configurarea reacției.
Repetăți testarea PCR.
- b) Depozitarea Depozitați *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit la
necorespunzătoare a temperaturi cuprinse între –30 și –15 °C și feriți
componentelor kitului de lumină amestecul de soluții de amorsare
și sonde (Primers and Probes Mix, PPM).
Consultați „Depozitarea și manipularea
reactivilor”, pagina 10.
Evitați ciclurile repetate de congelare
și decongelare.
Divizați reactivii în părți alicote pentru
depozitare.

Substanțele de control negative sunt pozitive

- Contaminare Înlocuiți toți reactivii critici.
încrucișată Repetați experimentul cu noi părți alicote din toți
reactivii.
Manipulați întotdeauna probele, componentele
kitului și consumabilele în conformitate cu
practicile acceptate în mod obișnuit pentru
a preveni contaminarea prin transfer.

Lipsa semnalului, chiar și în substanțele de control pozitive

- a) Eroare la pipetare sau Verificați schema de pipetare și configurarea
reactivi omiși reacției.
Repetăți testarea PCR.

Comentarii și sugestii

- | | |
|---|--|
| b) Efecte inhibitoare ale materialului de probă, cauzate de o purificare insuficientă | Repețați prepararea ADN-ului. |
| c) LightCycler: Canal de detecție ales greșit | Setați Channel Setting (Setare canal) la F1/F2 sau la 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Achiziția de date nu a fost programată | Verificați programele de ciclare.
Selectați modul de achiziție „single” (unic) la sfârșitul fiecărui segment de temperare al programului PCR. |

Semnal absent sau slab în probe, dar substanțele de control pozitive sunt în regulă

- | | |
|--|--|
| Calitate slabă sau concentrație scăzută a ADN-ului | Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ADN-ului înainte de a începe. |
|--|--|

LightCycler: Intensitatea fluorescenței este prea mică

- | | |
|--|---|
| a) Depozitarea necorespunzătoare a componentelor kitului | Depozitați <i>ipsogen JAK2 MutaScreen Kit</i> la temperaturi cuprinse între -30 și -15 °C și feriți de lumină amestecul de soluții de amorsare și sonde (Primers and Probes Mix, PPM). Consultați „Depozitarea și manipularea reactivilor”, pagina 10.

Evitați ciclurile repetate de congelare și decongelare.

Divizați reactivii în părți alicote pentru depozitare. |
| b) Cantitate inițială foarte mică de ADN țintă | Măriți cantitatea de ADN din probă.
Notă: În funcție de metoda aleasă de preparare a ADN-ului, pot apărea efecte inhibitorii. |

LightCycler: Intensitatea fluorescenței variază

- | | |
|-----------------------|--|
| a) Eroare la pipetare | Variabilitatea cauzată de așa-numita „eroare la pipetare” poate fi redusă prin analiza datelor în modul F1/F2 sau 530 nm/640 nm. |
|-----------------------|--|

Comentarii și sugestii

- | | |
|---|---|
| b) Centrifugare insuficientă a capilarelor | Amestecul PCR preparat se poate afla încă în vasul superior al capilarului sau o bulă de aer ar putea fi prinsă în vârful capilarului.
Întotdeauna centrifugați capilarele încărcate cu amestecul de reacție așa cum este descris în manualul de utilizare specific al aparatului. |
| c) Suprafața exterioară a vârfului capilarului este murdară | Purtați întotdeauna mănuși la manipularea capilarelor. |

Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al companiei QIAGEN, fiecare lot de *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit este testat conform specificațiilor prestabilite pentru a asigura calitatea constantă a produsului. Buletinele de analiză sunt disponibile la cerere la adresa www.qiagen.com/support/.

Limitări

Utilizatorii trebuie să fie instruiți și familiarizați cu această tehnologie înainte de a utiliza acest dispozitiv. Acest kit trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, împreună cu un instrument validat, menționat în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 8.

Orice rezultate de diagnostic care sunt generate trebuie interpretate în coroborare cu alte rezultate clinice sau de laborator. Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de performanță efectuate de QIAGEN constituie răspunderea utilizatorului.

Trebuie acordată atenție datelor de expirare tipărite pe cutia și pe etichetele tuturor componentelor. Nu utilizați componente expirate.

Caracteristici de performanță

Studii nonclinice

Au fost efectuate studii nonclinice pentru a stabili performanța analitică a *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit.

Precizie

Trei niveluri de diluție ale ADN-ului genomic din liniile celulare care includ mutația JAK2 V617F în ADN-ul de tip sălbatic au fost testate cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit. Diluțiile au corespuns unor încărcături ale mutației de 1 %, 2 % și 3 %. S-au obținut loturi de diluție independente pentru fiecare nivel și au fost testate replicate ale acestor diluții în 3 experimente independente. Raporturile obținute pentru fiecare probă de ADN ($\text{Raport}_{\text{probă}}$) au fost comparate cu raportul pentru substanță de control negativă (JAK2 100 % ADN de tip sălbatic, $\text{Raport}_{\text{NC}}$). Rezultatele sunt sintetizate în Tabelul 16.

Tabelul 16. Date privind precizia în studiile nonclinice

Nivel de mutație	$\text{Raport}_{\text{probă}} > \text{Raport}_{\text{NC}}$	CV% (raport)
1 % ADN V617F	100 % (n = 183)	6,8
2 % ADN V617F	100 % (n = 72)	4,5
3 % ADN V617F	100 % (n = 135)	5,1

Date analitice între laboratoare

A fost realizat un studiu multicentric care a implicat 13 laboratoare. Au fost colectate date analitice privind diluțiile ADN-ului genomic care include mutația JAK2 V617F în ADN-ul de tip sălbatic. În fiecare laborator au fost efectuate câte trei experimente. Pentru fiecare experiment, următoarele probe de ADN au fost testate din liniile celulare:

- 1 substanță de control negativă (Negative Control, NC) 0 % V617F
- 1 substanță de control pozitivă (Positive Control, PC) 100 % V617F
- 1 probă cu prag de excludere (Cut-off Sample, COS) 2 % V617F
- 3 probe care includ încărcături ale mutației intermediare (20 %, 50 % și 80 %)

Experimentele au fost efectuate pe șapte modele de instrumente diferite:

- 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®

Rezultatele sunt sintetizate în Tabelul 17.

Tabelul 17. Date analitice între laboratoare obținute din diluțiile ADN-ului genomic din liniile celulare care includ mutația JAK2 V617F în ADN-ul de tip sălbatic

Deteție probă	Probe pozitive	Probe negative
JAK2 V617F	177*	0
Tip sălbatic JAK2	0	36

* Probele pozitive au inclus 36 de substanțe de control pozitive (PC-VF), 36 de probe cu prag de excludere (COS-VF; 2 % V617F), 34 de probe care includ 20 % JAK2 V617F, 35 de probe care includ 50 % JAK2 V617F și 36 de probe care includ 80 % JAK2 V617F.

Studii clinice

Comparație între *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* și metoda ARMS®

Probele de ADN de la 141 de pacienți cu suspiciune de MPN au fost testate în paralel cu *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* și un test qPCR bazat pe principiul sistemului de mutație refractară de amplificare (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) (11). Rezultatele comparației sunt prezentate în Tabelul 18 (tabelul de contingență 2 x 3) și în Tabelul 19 (acord procentual).

Tabelul 18. Comparație între metode: *ipsogen JAK2 MutaScreen Kit* și ARMS

		Rezultatele metodei de testare ARMS		
		JAK2 V617F >2 %	Tip sălbatic JAK2 (JAK2 V617F <2 %)	Total
Rezultatele metodei de testare <i>ipsogen JAK2 MutaScreen</i>	Mutație JAK2 V617F detectată	91	0	91
	Rezultat neconcludent	1	2	3
	Mutație JAK2 tip sălbatic nedetectată	1	46	47
Total		93	48	n = 141

Tabelul 19. Comparație între metode: *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și ARMS

	Acord (%)	Î 95 % (%)
Date pozitive Acord între <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit și ARMS	98,9	94,1-99,8
Date negative Acord între <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit și ARMS	100	92,3-100
Acord total	99,3	96,0-99,9

* Intervalele de încredere au fost calculate în conformitate cu CLSI EP12-A „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline”.

Comparație între *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și secvențiere

Probele de ADN de la 51 de pacienți cu suspiciune de MPN au fost testate în paralel cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și tehnica de referință („standardul de aur”), secvențierea directă. O probă nu a putut fi interpretată din cauza erorii la secvențiere. Comparațiile rezultatelor obținute din cele 50 de probe interpretabile sunt sintetizate în Tabelul 20 (tabelul de contingență 2 x 3) și Tabelul 21 (acord procentual).

Tabelul 20. Comparație între metode: *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și secvențiere

		Rezultatele secvențierii directe		
		JAK2 V617F >2 %	Tip sălbatic JAK2 (JAK2 V617F <2 %)	Total
Rezultatele metodei de testare <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	Mutație JAK2 V617F detectată	26	1	27
	Rezultat neconcludent	0	1	1
	Mutație JAK2 tip sălbatic nedetectată	2	20	22
Total		28	22	n = 50

Tabelul 21. Comparație între metode: *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și secvențiere

	Acord (%)	IÎ 95 % (%)
Date pozitive Acord între <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit și secvențiere	92,9	77,4-98,0
Date negative Acord între <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit și secvențiere	95,2	77,3-99,2
Acord total	93,9	83,5-97,9

* Intervalele de încredere au fost calculate în conformitate cu CLSI EP12-A „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline”.

Studiu multicentric pe 228 de probe de la pacienți

Probele de ADN de la pacienți au fost analizate cu tehnici proprii în 13 laboratoare, care au contribuit la un studiu între laboratoare. În fiecare laborator s-au efectuat câte 3 experimente, folosind ADN din linii celulare așa cum este descris pentru datele de precizie nonclinice (consultați deasupra), precum și cu ADN de la 10 pacienți, disponibil în laborator.

Cele 228 de probe cu un genotip JAK2 cunoscut au fost testate în paralel cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și prin metode proprii, inclusiv PCR calitativ, PCR specific alelelor, transfer de energie de rezonanță fluorescentă (Fluorescence Energy Resonance Transfer, FRET), secvențiere, PCR pe oligonucleotide specifice alelelor, RFLP și discriminarea alelică. Rezultatele comparațiilor sunt prezentate în Tabelul 22 (tabelul de contingență 2 x 3) și în Tabelul 23 (acord procentual).

Tabelul 22. Comparație între metode: *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și metode proprii

		Rezultatele testării proprii		
		Mutație detectată JAK2 V617F	Mutație JAK2 tip sălbatic nedetectată	Total
Rezultatele metodei de testare <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	Mutație JAK2 V617F detectată	139	3	142
	Rezultat neconcludent	5	17	22
	Nicio mutație JAK2 tip sălbatic detectată	3	61	64
Total		147	81	n = 228

Tabelul 23. Comparație între metode: *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și metode proprii

	Acord (%)	Î 95 % (%)
Date pozitive Acord între <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit și metoda proprie	97,9	94,0-99,3
Date negative Acord între <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit și metoda proprie	95,3	87,1-98,4
Acord total	97,1	93,8-98,7

* Intervalele de încredere au fost calculate în conformitate cu CLSI EP12-A „User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline”.

Robustețe: testarea probelor de la donatori sănătoși

Probele de ADN de la 103 donatori de sânge sănătoși au fost analizate cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit. Toate probele au fost detectate ca JAK2 de tip sălbatic. Analiza a 38 de probe cu instrumentul LightCycler 480 este prezentată în Figura 34.

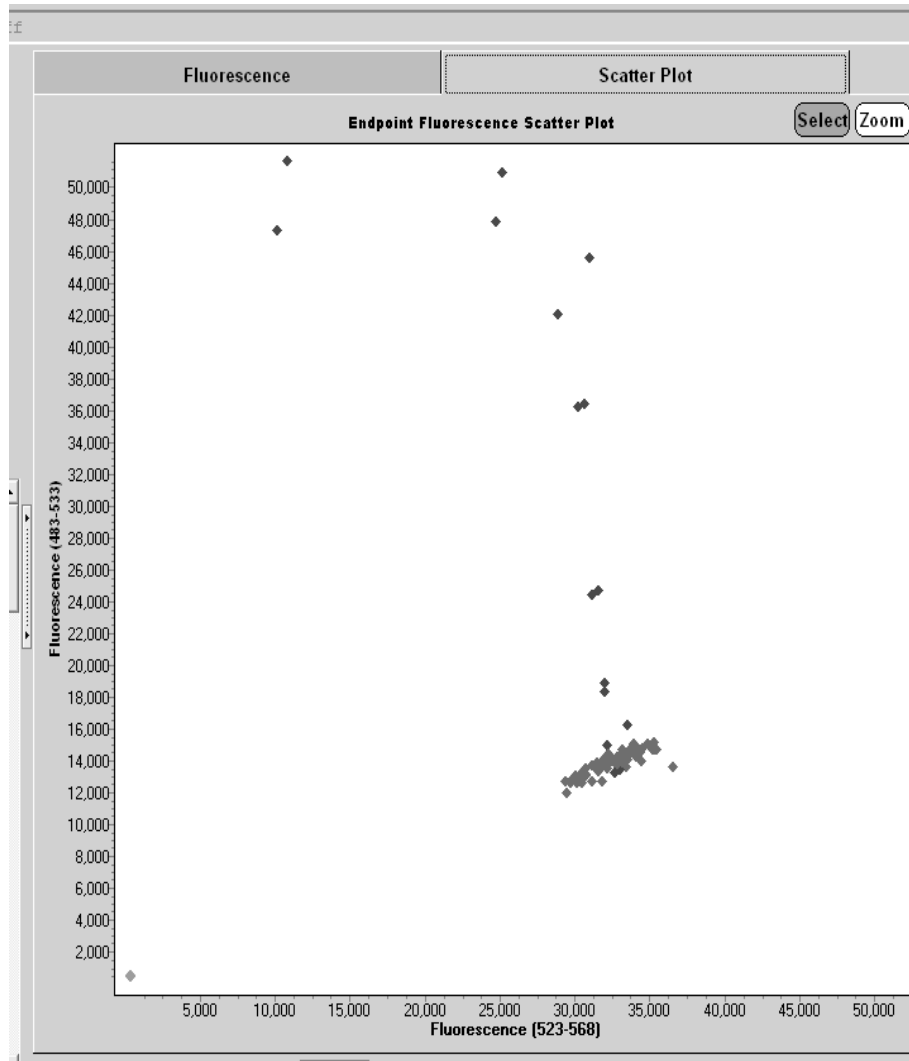












Figura 34. Analiza donatorilor sănătoși. Analiza cu LightCycler 480 a 38 de donatori sănătoși (◆) cu *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS Kit (nr. cat. 673123). Rezultate pozitive în duplicat (◆) corespund unei scări de referință incluse în kit. Valorile fluorescenței VIC sunt reprezentate grafic pe axa x, iar valorile FAM sunt reprezentate pe axa y.

Referințe

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.

Simboluri

Pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:

	Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții
	Data de expirare
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Număr catalog
	Număr de lot
	Număr material
	Număr de comercializare global articol
	Limitări de temperatură
	Producător
	Consultați instrucțiunile de utilizare

Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru Asistență Tehnică la adresa www.qiagen.com/Support, apelați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de Servicii Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (a se vedea coperta a patra sau vizitați www.qiagen.com).

Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (10)	Pentru 10 de reacții: Substanță de control pozitivă V617F, substanță de control negativă V617F, probă cu prag de excludere V617F, amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 tip sălbatic și JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (24)	Pentru 24 de reacții: Substanță de control pozitivă V617F, substanță de control negativă V617F, probă cu prag de excludere V617F, amestec de soluții de amorsare și sonde JAK2 tip sălbatic și JAK2 V617F	673023
Rotor-Gene Q MDx – pentru analiza real-time PCR validată de IVD în aplicații clinice		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002033

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kiturile QIAGEN sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Această pagină a fost lăsată necompletată în mod intenționat

Acest produs este destinat utilizării pentru diagnosticarea in vitro. Produsele *ipsogen* nu pot fi revândute, modificate pentru revânzare sau utilizate pentru fabricarea de produse comerciale fără aprobarea scrisă a companiei QIAGEN.

Informațiile din acest document fac obiectul modificării fără preaviz. QIAGEN nu își asumă nicio responsabilitate pentru eventualele erori care pot apărea în acest document. Se consideră că acest document este complet și exact în momentul publicării. În niciun caz, compania QIAGEN nu va fi răspunzătoare pentru niciun fel de daune incidente, speciale, multiple sau consecință în legătură cu sau care decurg din utilizarea acestui document.

Se garantează că produsele *ipsogen* întrunesc specificațiile declarate. Singura obligație a companiei QIAGEN și despăgubirea exclusivă a clientului se limitează la înlocuirea gratuită a produselor în cazul în care acestea nu funcționează conform garanției.

Acest produs este comercializat în baza unui acord de licență cu Epoch Biosciences pentru utilizare numai pentru diagnosticare in vitro și nu poate fi utilizat pentru alte studii, studii de piață, studii clinice sau pentru alte utilizări în afara domeniului de diagnosticare in vitro.

Mutația JAK2 V617F și utilizările acesteia sunt protejate de drepturi de brevet, inclusiv brevetul european EP1692281, brevetele SUA 7.429.456 și 7.781.199, cererile de brevet SUA US20090162849 și US20120066776 și orice omolog străin al acestora.

Achiziționarea acestui produs nu conferă niciun drept de utilizare pentru studiile clinice pentru medicamentele care vizează JAK2 V617F. Compania QIAGEN dezvoltă programe de licență specifice pentru astfel de utilizări. Vă rugăm să contactați departamentul nostru juridic la jak2licenses@qiagen.com.

Mărci comerciale: 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); iCycler® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); MGB™ (Epoch Biosciences).

Acord de licență limitată

Utilizarea acestui produs implică acceptarea următoarelor clauze de către oricare cumpărător sau utilizator al *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit:

1. *ipsogen*JAK2 MutaScreen Kit poate fi utilizat numai în conformitate cu manualul *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și numai împreună cu componentele conținute în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, cu excepția celor descrise în manualul *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest kit și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

HB-1371-003 © 2013-2016 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

www.qiagen.com

