

ipsogen[®] JAK2 Muta *Screen Kit* - sarjan käsikirja

 10 (luettelonro 673022)

 24 (luettelonro 673023)

Versio 1

IVD

Kvantitatiivinen in vitro -diagnostiikka

Käytetään Rotor-Gene[®] Q-, Applied Biosystems[®]-, ABI PRISM[®]-
ja LightCycler[®]-laitteiden kanssa



REF 673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3 **MAT** 1072500FI



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN on johtava innovatiivisten näyte- ja määritystekniikoiden toimittaja. QIAGENin tuotteet mahdollistavat kaikkien biologisten näytteiden sisällön eristämisen ja tunnistamisen. Pitkälle kehitetyt ja laadukkaat tuotteemme ja palvelumme takaavat luotettavan prosessin näytteestä tulokseen.

QIAGENin urauurtavan toiminnan ydinalueita ovat seuraavat :

- DNA:n, RNA:n ja proteiinien puhdistus
- nukleiinihappojen ja proteiinien määitykset
- microRNA-tutkimus ja RNAi
- näyte- ja määritystekniikoiden automatisointi.

Tavoitteenamme on toimittaa tuotteita, joiden avulla asiakkaamme saavuttavat menestystä ja läpimurtoja. Katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com.

Sisältö

Yhteenveto ja selitykset	4
Menetelmän toimintaperiaate	6
Toimitettut materiaalit	7
Sarjan sisältö	7
Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)	8
Varoitukset ja varotoimet	9
Yleiset varotoimet	9
Reagenssien säilytys ja käsittely	10
Menetelmä	11
Näytteen DNA:n valmistelu	11
Nukleiinihappojen säilytys	11
Protokolla: qPCR-ajo Rotor Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori	11
Protokolla: qPCR-ajo Applied Biosystems- ja ABI PRISM -laitteilla	21
Protokolla: qPCR-ajo LightCycler 480 -laitteella	30
Protokolla: qPCR-ajo LightCycler 2.0 -laitteella	39
Tulosten tulkitseminen	44
Graafinen esitys ja laadunvarmistuksen ehdot	44
Normalisoidun FAM/ VIC-suhteen laskenta ja genotyyppi	45
Ongelmien ratkaisu	48
Laadunvarmistus	50
Rajoitukset	50
Suorituskykyominaisuudet	50
Ei-kliiniset tutkimukset	50
Kliiniset tutkimukset	52
Lähteviitteet	58
Merkinnät	59
Yhteystiedot	59
Tilustiedot	60

Käyttötarkeitus

*ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjat on tarkoitettu JAK2 V617F/G1849T -mutaation etsimiseen genomisesta DNA:sta henkilöiltä, joilla epäillään olevan myeloproliferaatiivinen kasvain. Vaikka henkilöillä ei ole JAK2 V617F/G1849T -mutaatiota, hänellä saattaa silti olla muita JAK2-mutaatioita. Testistä saattaa tulla väärää negatiivisia tuloksia, jos kodoneissa 615–619 (1) on lisää mutaatioita.

Huomautus: Tätä sarjaa on käytettävä tämän käsikirjan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoitujen reagenssien ja laitteiden kanssa. Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai osien muokkaaminen mitätöi QIAGENin vastuun.

Yhteenveto ja selitykset

Janus-tyrosiinikinaasi 2:n (JAK2) vaikuttava toistuva somaattinen mutaatio V617F löydettiin vuonna 2005 (2-5), mikä johti merkittävään läpimurtoon myeloproliferaatiivisten tautien ymmärtämisessä, luokittelussa ja diagnosoinnissa. JAK2 on useiden sytokiinien (erytropoietiini mukaan lukien) tärkeä solunsisäinen signaalimolekyyli.

JAK2 V617F -mutaatio löytyy yli 95 prosentilta polysytemia veraa (PV) sairastavilta, 50–60 prosentilta essentiaalista trombosytemiaa (ET) sairastavilta ja 50 prosentilta idiopaattista myelofibroosia sairastavilta potilailta (primary myelofibrosis, PMF). JAK2 V617F on löytynyt myös joissakin harvoissa tapauksissa potilailta, joilla on myelomonosyyttinen leukemia, myelodysplastinen oireyhtymä, systeeminen mastosytoosi tai krooninen neutrofiilileukemia, mutta ei yhdeltäkään kroonista myeloista leukemialta sairastavalta potilalta (6).

Kyseessä on JAK2-geenin pistemutaatio nukleotidissa 1849 eksonissa 14. Tuloksena on valiinin (V) korvautuminen fenyylialaniinilla (F) proteiinin paikassa 617 (JH2-domeeni). Mutaatiosta seuraa JAK2:n konstitutiivinen aktivaatio, hematopoieettinen transformaatio in vitro ja erytropoietinistä riippumattomien erytrooisten pesäkkeiden (EEC) kasvua kaikilla PV-potilailla ja suurella osalla ET- ja PMF-potilaista (7). JAK2 V617F on olennainen metapoeettisten solujen muutosten aiheuttaja MPN:ssä, mutta samasta mutaatiosta lähteviä näin erilaisiin kliinisiin ja biologisiin lopputuloksiin johtavia patologisia mekanismeja ei vielä tarkasti tunneta.

Myeloproliferaatiivisten tautien diagnosointi on perinteisesti perustunut kliinisiin, luuydinhistologisiin ja sytogeneettisiin kriteereihin. Sairaudelle spesifin molekyyli-merkkiaineen löytyminen yksinkertaisesti diagnoosiprosessia ja paransi sen tarkkuutta. JAK2 V617F -mutaation löytyminen kuuluu nyt Maailman terveysjärjestön laatiin BCR-ABL-negatiivisten myeloproliferaatiivisten tautien diagnoosikriteereihin 2008 (taulukko 1), ja tämä mutaatio on tärkeä kriteeri diagnoosin vahvistamiselle.

Taulukko 1. WHO:n kriteerit myeloproliferaatiivisten tautien diagnosoille (sovitettu viitteen 8 mukaisesti)

Polysytomia veran (PV) diagnostiset kriteerit	
Pääkriteerit	1. Hemoglobiini (Hb) > 18,5 g/dl ⁻¹ (miehillä) tai > 16,5 g/dl ⁻¹ (naisilla) tai Hb tai hematokriitti (Hkr) > 99. persentiili iän, sukupuolen tai asuinpaikan korkeuden mukaisesta viitealueesta tai Hb > 17 g/dl ⁻¹ (miehillä) tai > 15 g/dl ⁻¹ (naisilla), jos tason nousu on pysyvästi ≥ 2 g/dl ⁻¹ mutta ei liity raudanpuutteen korjaukseen tai punasolumassan kasvu > 25 % yli keskimääräisen normaalin ennustearvon 2. JAK2V617F tai samanlainen mutaatio
Sivukriteerit	1. Luuytimen kolmen solulinjan myeloproliferaatio 2. Pienentynyt seerumin erytropoietiiniipitoisuus 3. Erytrooisten pesäkkeiden spontaani kasvu soluviljelmässä
Essentiaalisen trombosytomian (ET) diagnostiset kriteerit	
Pääkriteerit	1. Verihiutaleiden määrä ≥ 450 x 10 ⁹ l ⁻¹ 2. Laajentuneiden ja kypsien megakaryosyyttien proliferaatiota. Ei lainkaan tai vähän granulosityttistä tai erytroidista proliferaatiota 3. Kroonisen myeloosin leukemian, polysytomia veran, primaarisen myelofibroosin, myelodysplastisen oireyhtymän tai muiden myeloproliferaatiivisten kasvainten kriteerit eivät täyty 4. JAK2V617F tai muu klonaalinen löydös Ei näyttöä reaktiivisesta trombosytoosista
Sivukriteerit	–
Primaarisen myelofibroosin diagnostiset kriteerit	
Pääkriteerit	1. Megakaryosyyttien proliferaatio ja atypia sekä retikuliini- ja/taikollageenifibroosi tai Megakaryosyyttilöydökset ja proliferaatiivinen luuydin ilman retikuliinifibroosia, granulosityttistä proliferaatiota ja usein vähentynyt erytropoiesi (prefibroottinen primaarinen myelofibroosi) 2. Kroonisen myeloosin leukemian, polysytomia veran, myelodysplastisen oireyhtymän tai muiden myeloproliferaatiivisten kasvainten kriteerit eivät täyty 3. JAK2V617F tai muu klonaalinen löydös Ei näyttöä reaktiivisesta luuytimen fibroosista
Sivukriteerit	1. Leukoerythroblastosis 2. Kohonnut seerumin laktaattidehydrogenaasi (LDH) 3. Anemia 4. Palpoitava suurentunut perna

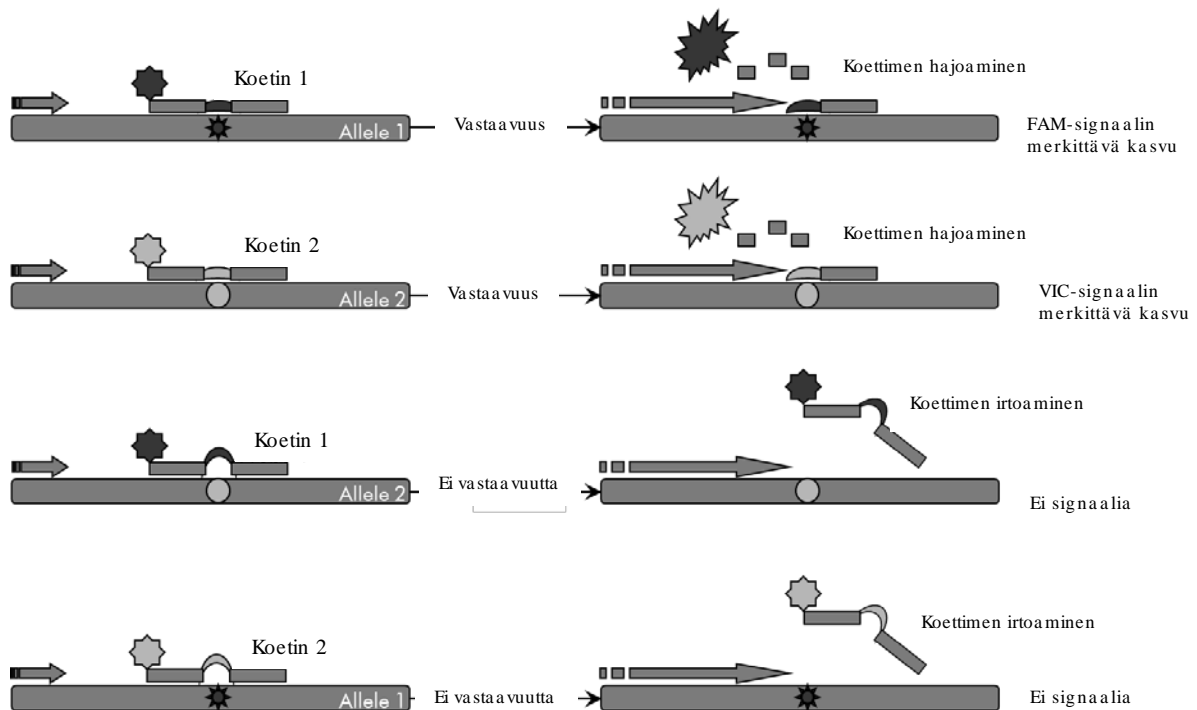
Asiantuntijat ovat viime aikoina laatineet ehdotuksia PV:n ja ET:n lääketutkimusten kriteereiksi. Allografeja, alfa interferonia ja hydroksyureaa koskevien tietojen perusteella JAK2 V617F:n kvantifikaatio on lisätty mahdollisesti hyödylliseksi välineeksi hoitovasteen seurantaan (9). JAK2 V617F:n vähenemistä on havaittu vasteena joillekin uusille kliinisessä kehitysvaiheessa oleville JAK2-lääkkeille (10).

Menetelmän toimintaperiaate

Alleelien erottelussa käytetään kahta TaqMan[®]-koetinta Multiplex-analyysissä. Toinen on alleeli 2:n sekvenssin täydellinen vastine (villityypin alleeli) ja toinen alleeli 1:n sekvenssin täydellinen vastine (mutaation sisältävä alleeli). Koettimet leimataan fluoresoivalla värillä 5'-päässä, reporterissa, kuten FAM[™] tai VIC[®], ja niiden 3'-päässä on fluoresoimaton vaimennin. Koettimissa on myös MGB[™] (Minor Groove Binder), joka mahdollistaa lyhyempien ja vakaampien koettimien käytön, jolloin alleelien erottelu tarkentuu.

PCR:n laajennusvaiheessa Taq-DNA-polymeraasi 5'→3' -eksonukleasiaktiivisuus pilkkoo täysin vastaavan koettimen, jolloin reporteriväriaine irtoaa ja fluoresoiva signaali vapautuu. Taq-DNA-polymeraasi korvaa epätäydellisesti vastaavan koettimen eikä pilko sitä, jolloin reporteriväriaine ei irtoa. Fluoresoiva signaali (VIC tai FAM) kerätään PCR:n lopussa ja osoittaa heti näytteessä olevat kohdesekvenssit (villityypin alleeli, mutatoitunut alleeli tai molemmat) ilman pitkiä ja työläitä PCR:n jälkivaiheita, jotka lisäävät myös kontaminaatoriskiä. Kohdesekvenssin kulloistakin määrää ei selvitetä.

*ipsogen*JAK2 Muta ScreenKit -sarja käyttää tätä tekniikkaa kuvan 1 mukaisesti.



Kuva 1. TaqMan-koetin ja multiplexsaus. *ipsogen*JAK2 Muta ScreenKit -sarja käyttää tätä tekniikkaa alleelien erotteluun.

Toimitettua materiaalia

Sarjan sisältö

<i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit</i>		(10)	(24)
Luettelonumero		673022	673023
Number of reactions (Reaktioiden määrä)		24	10
V617F Positive Control (V617F-positiivinen kontrolli)*	PG-VF	30 µl	30 µl
V617F Negative Control (V617F-negatiivinen kontrolli)†	NC-VF	30 µl	30 µl
Cut-Off Sample (Katkaistu näyte)	COS-VF	30 µl	30 µl
Primers and probes mix (Auke- ja koetinseos) JAK2 V617F‡	PPM-VF 10x	70 µl	145 µl
<i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit Handbook</i> (English)			
<i>ipsogen JAK2 Muta Screen Kit -käsikirja</i> (englanniksi)		1	1

* Positiivinen kontrolli: 100 % V617F DNA.

† Negatiivinen kontrolli: 100 % villityypin DNA; 0 % V617F.

‡ Spesifisten etu- ja taka-alkkeiden seos *JAK2* geenille, spesifinen V617F FAM -koetin ja villityypin VIC-koetin.

Huomautus: sentrifugoi putkia hetki ennen käyttöä.

Huomautus: Tuntemattomien näytteiden analysointi *ipsogen JAK2 Muta Screen Kit* -sarjalla edellyttää genomisen DNA:n uuttamista. DNA:n uuttamista varten tarvittavat reagenssit (esimerkiksi QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, luettelonumero 51304) eivät sisälly toimitukseen, ja ne on validoitava sarjan kanssa käytettäessä.

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Reagenssit

- Nukleasiton PCR-vesi
- Nukleasiton puskuri 1x TE, pH 8,0 (esimerkiksi Thermo Fisher Scientific Inc., luettelonumero 12090015)
- Puskuri ja *Taq*-DNA-polymeraasi: Validoidut reagenssit ovat TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., luettelonumero 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, luettelonumero 04535286001)
- 0,8–1-prosenttisen agarosigeelin reagenssit elektroforeesipuskurissa 0,5x TBE

Kulutustavarat

- Nukleasittomia aerosolisuojattuja steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- 0,5 tai 0,2 ml:n nukleasittomia PCR-putkia
- Jäätä

Laitteet

- Pipettejä*, jotka on tarkoitettu PCR:ään (1–10 µl; 10–100 µl; 100 – 1 000 µl)
- Pöytämallinen sentrifugi*, jossa on roottori 0,2:n tai 0,5 ml:n reaktioputkia varten (ja joka kykenee saavuttamaan nopeuden 10 000 rpm)
- Spektrofotometri* DNA:n kvantitointia varten
- Reaaliaikainen PCR-laitte:* Rotor-Gene Q 5plex HRM tai muu Rotor-Gene-laitte; LightCycler 2.0 tai 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS tai ABI PRISM 7900HT SDS; ja tarvittavat materiaalit
- Välineet* pulssikenttä-geelielektroforeesia varten

*Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkaa, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätieto saatuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjekomponenttien käyttöturvallisuustietoita.

Hävitä näyte- ja analyysijäte paikallisten turvallisuusmääräysten mukaisesti.

Yleiset varotoimet

qPCR-testit edellyttävät hyvien laboriokäytäntöjen noudattamista, kuten molekyylibiologian käytettävien laitteiden kunnossapitoa sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämä sarja on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on validoitu suorituskyvyltään optimaaliksi. Reagenssien lisäläimentäminen tai inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja. PPM-VF-reagenssissa saattaa tapahtua muutoksia, jos se altistuu valolle. Kaikki reagenssit on suunniteltu erityisesti tätä testiä varten. Testi toimii parhaiten, kun korvauksia ei tehdä.

Estä varotoimilla seuraavat:

- DNA:n kontaminaatio, joka voi aiheuttaa malli-DNA:n hajoamista
- DNA:n tai PCR-tuotteen kulkeutumiskontaminaatio, joka voi aiheuttaa väärän positiivisen signaalin

Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita.

- Käytä nukleasittomia laboriövälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja) ja käytä käsineitä testiä tehdessäsi.
- Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojattuja pipettikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.
- Valmista esi-PCR-pääseos vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (kuten pipetit ja kärjet) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja). Lisää malli erillisellä alueella (mieluiten erillisessä huoneessa), jolla on tarvittavat materiaalit (pipetit, kärjet ja muut).

Reagenssien säilytys ja käsittely

Sarjat toimitetaan kuivajäällä ja vastaanottamisen jälkeen niitä on säilytettävä $-30...-15\text{ °C}$:n lämpötilassa.

- Vältä aluke- ja koetinseosten altistumista valolle (PPM-VF-putki).
- Sekoita ja sentrifugoi putkia kevyesti ennen avaamista.
- Säilytä sarjan kaikkia osia alkuperäisissä astioissa.

Nämä säilytysolosuhteet koskevat sekä avattuja että avaamattomia osia. Jos osia ei säilytetä merkintöjen mukaisesti, ne eivät välttämättä toimi oikein ja ne voivat haitata testituloksia.

Reagenssien vanhenemispäivät on ilmoitettu kunkin osan merkinnöissä. Oikein säilytetyn tuotteen suorituskyky säilyy merkinnässä ilmoitettuun vanhenemispäivään asti.

Tämän tuotteen epävakauden osoittamiseksi ei ole selviä merkkejä. Positiiviset ja negatiiviset kontrollit tulisi ajaa samanaikaisesti tuntemattomien näytteiden kanssa.

Menetelmä

Näytteen DNA:n valmistelu

Genominen DNA tulisi ottaa kokoverestä, puhdistetuista ääreisveren lymfosyyteistä, polynukleaarista soluista tai granulosityteistä. Jotta tuloksia voidaan verrata, suosittelemme käyttämään samaa solujen erottelun ja DNA:n uuttamisen menetelmää. DNA:n uuttaminen voidaan tehdä omalla tai kaupallisella menetelmällä.

DNA:n määrä selvitetään mittaamalla optinen tiheys 260 nm:ssä. DNA:n laatua tulisi arvioida spektrofotometrillä tai geelielektroforeesilla.

A_{260}/A_{280} -suhteen on oltava 1,7–1,9. Pienemmät suhteet ovat yleensä merkki proteiinin tai orgaanisten kemikaalien aiheuttamasta kontaminaatiosta. 0,8–1-prosenttisen agarosigeelin elektroforeettisessa analyysissä pitäisi näkyä eristetyyn DNA:n noin 20 kb:n kokoinen näytekäista. Pieni tahra on sallittu.

Tuloksena saatu DNA laimennetaan pitoisuuteen 5 ng/μl TE-puskurissa. qPCR-reaktio on optimoitu 25 ng:lle puhdistettua genomista DNA:ta.

Nukleiinihappojen säilytys

Jos kyseessä on lyhytaikainen, enintään 24 tuntia kestävä säilytys, suosittelemme säilyttämään puhdistetut nukleiinihapot 2–8 °C:n lämpötilassa. Jos kyseessä on pitkäaikainen, yli 24 tuntia kestävä säilytys, suosittelemme säilytystä –20 °C:n lämpötilassa.

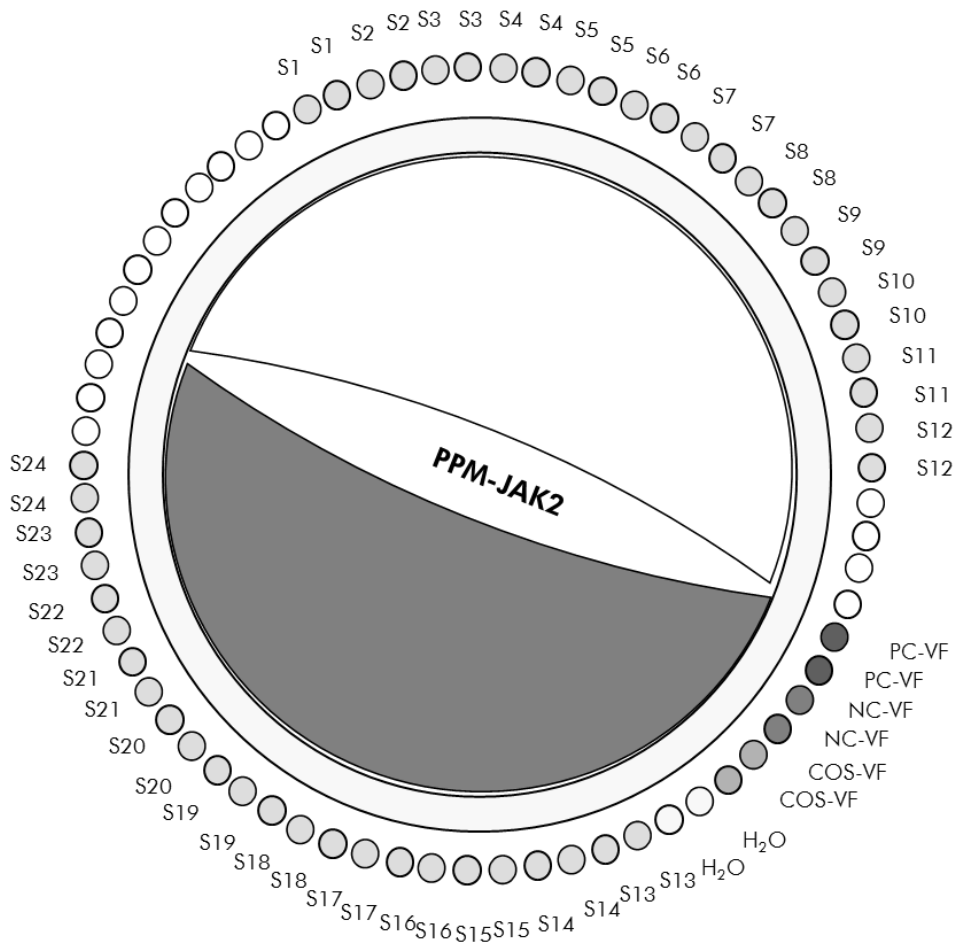
Protokolla: qPCR-ajo Rotor Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Tätä laitetta käytettäessä suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahtena, kuten taulukossa 2 esitetään.

Taulukko 2. Reaktioiden määrä: Rotor Gene Q MDx 5plex HRM- tai Rotor Gene Q 5plex HRM -laitteet, joissa on 72 putken roottori

Näytteet	Reaktiot
Aluke- ja koetinseos JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reaktiota)	
24 DNA-näytettä	24 × 2 reaktiota
3 DNA-kontrollia	3 x 2 reaktiota (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, jokaisella kaksi testiä)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Näytteiden käsittely Rotor Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori



Kuva 2. Ehdotetut roottorin asetukset, kun koe tehdään *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjalla. PC-VF: positive control (positiivinen kontrolli); NC-VF: negative control (negatiivinen kontrolli); COS-VF: cut-off sample (katkaistu näyte); S: DNA-näyte; H₂O: vesikontrolli.

Huomautus: Muista asettaa testattava näyte aina roottorin paikkaan 1. Muutoin laite ei tee kalibrointia kalibrointivaiheessa ja testistä saadaan virheellisiä fluoresenssitietoja.

Täytä kaikki muut paikat tyhjillä putkilla.

qPCR-ajo Rotor Gene Q -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Huomautus: tee kaikki vaiheet jäällä.

Menetelmä

1. Sulata kaikki tarvittavat osat ja aseta ne jäähauteeseen.
Osat tulisi ottaa pakastimesta noin 10 minuuttia ennen aloittamista.
2. Sekoita hyvin ja sentrifugoi hetki kaikkia putkia (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).

3. Valmista seuraava qPCR -seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 3 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Rotor-Gene-laitteissa *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit -sarjaa voidaan käyttää 24 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin yhdessä kokeessa (kuva), 20 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin kahdessa kokeessa tai 15 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin kolmessa kokeessa.

Taulukko 3. qPCR -seoksen valmistus

Osa	Reaktioiden määrä (µl)				Lopullinen määrä
	1	56+1*	28+ 1 [†]	18+ 1 [‡]	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1 x
Aluke- ja koetinseos, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1 x
Nukleasiton PCR-vesi	5	285	145	95	–
Näyte (lisätään vaiheessa 5)	5	5 kuta kin	5 kuta kin	5 kuta kin	–
Kokonaismäärä	25	25 kuta kin	25 kuta kin	25 kuta kin	–

* 24 näytettä; yksi koe/sarja.

[†] 10 näytettä; kaksi koetta/sarja.

[‡] 5 näytettä; kolme koetta/sarja.

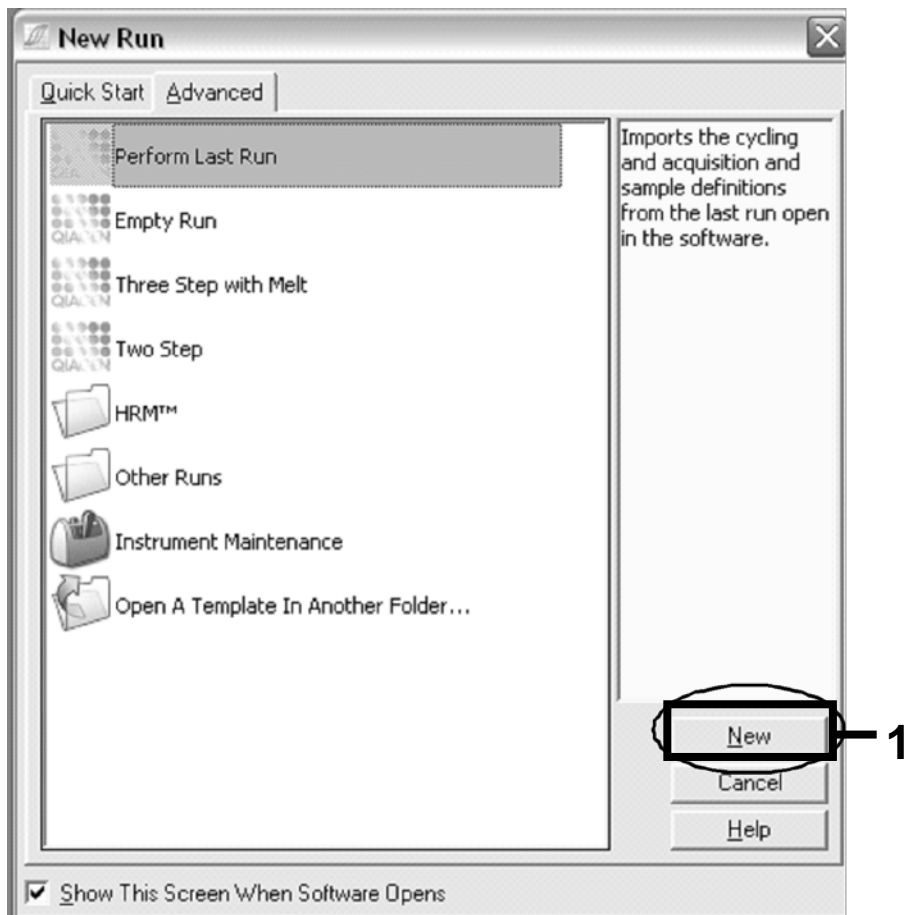
4. Sekoita qPCR-seos hyvin ja sentrifugoi sitä hetki (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
5. Annostele 20 µl qPCR-esiseosta putkea kohti.

6. Lisää 5 µl DNA-näytemateriaalia tai kontrolleja vastaavaan putkeen (kokonaismäärä on 25 µl).
7. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
8. Sulje PCR-putket. Aseta putket 72 putken roottoriin valmistajan suositusten mukaan. Täytä kaikki muut paikat tyhjillä putkilla.
9. Varmista, että lukitusrengas (Rotor-Gene-laitteen lisävaruste) on paikallaan roottorin päällä, jotta putket eivät vahingossa avaudu ajon aikana. Aseta roottori RotorGene Q -laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
10. Luo JAK2-DNA:n havaitsemista varten lämpötilaprofiili seuraavien ohjeiden mukaan.

Yleisten analyysiparametrien asetus	Kuvat 3, 4
DNA:n monistus	Kuva 5
Fluoresenssikanavan herkkyuden säätäminen	Kuva 6

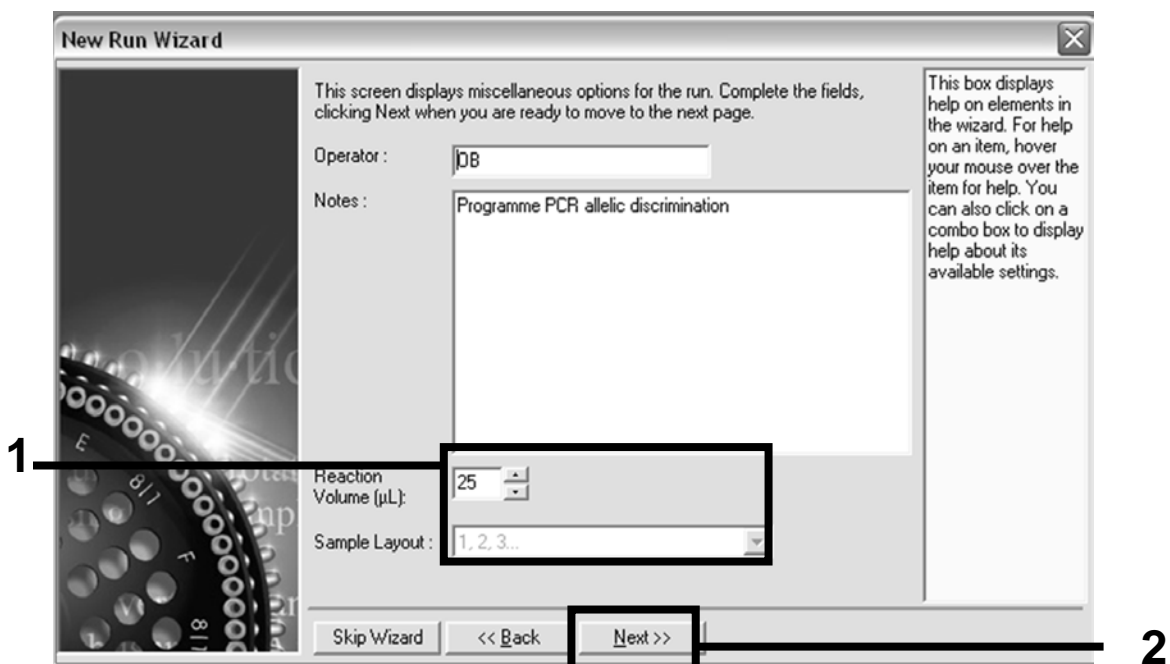
Lisätietoja Rotor-Gene-laitteiden ohjelmoinnista on laitteen käyttöoppaassa. Kuvissa ohjelman asetukset on merkitty mustilla kehyksillä. Kuvat on lisätty Rotor-Gene Q -laitteille.

11. Käynnistä Rotor-Gene-ohjelma. Valitse New Run (Uusi ajo) -valintaikkunasta New (Uusi).



Kuva 3. New Run (Uusi ajo) -valintaikkuna.

12. Aseta New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -ikkunassa määräksi 25 μ l ja valitse Next (Seuraava).

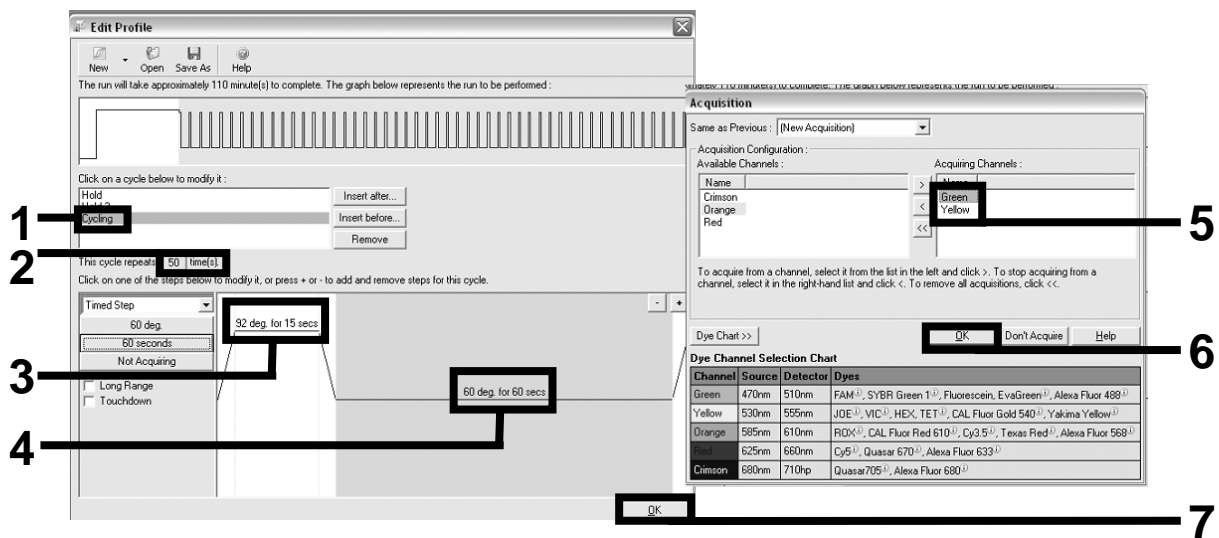


Kuva 4. Yleisten analyysiparametrien asetus.

13. Napsauta seuraavan New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -ikkunan Edit Profile (Muokkaa profiilia) -painiketta ja ohjelmoi lämpötilaprofiili taulukossa 4 ja kuvassa 5 esitetyllä tavalla. Muista lisätä viimeisen keruvaiheen lämpötilaksi 60°C kussakin syklissä molemmille kanaville: Green (FAM) ja Yellow (VIC).

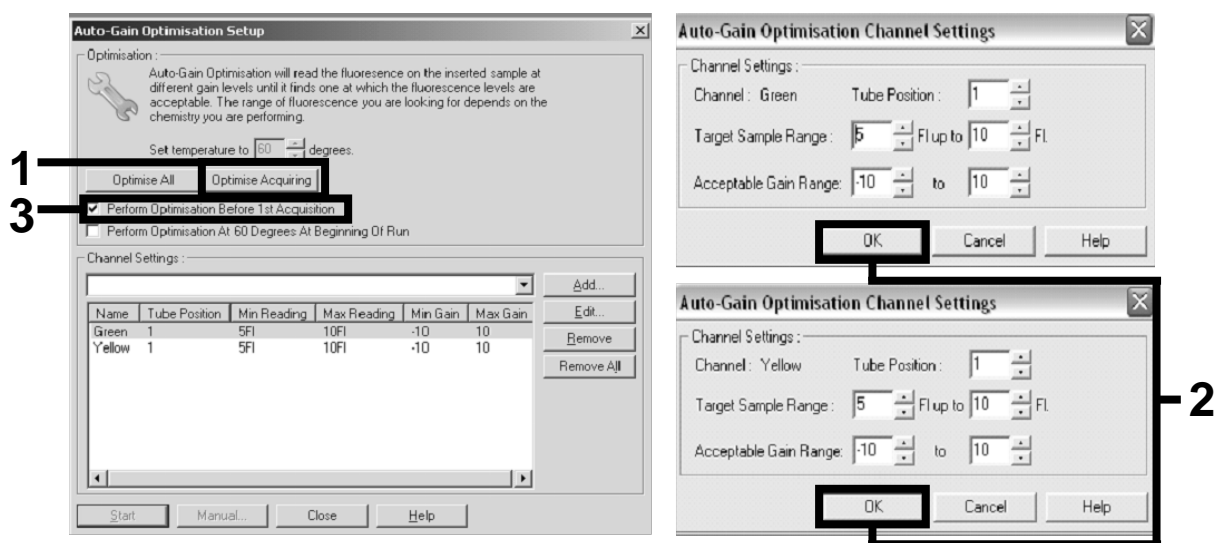
Taulukko 4. Lämpötilaprofiili

Hold (Pito)	Lämpötila: 50 °C Aika: 2 min
Hold (Pito) 2	Lämpötila: 95°C Aika: 10 min
Cycling (Syklit)	50 kertaa 92 °C, 15 sekuntia 60 °C 1 minuutti; yksi FAM-fluoresenssin keruu Cycling A Green (Vihreä jakso) -kanavalla VIC-fluoresenssin keruu Cycling A Yellow (Vihreä jakso) -kanavalla



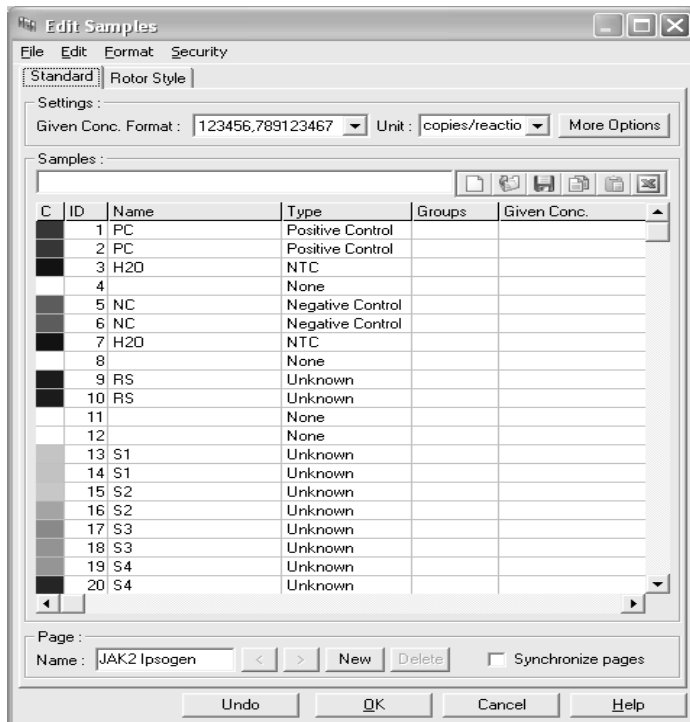
Kuva 5. DNA:n monistus.

14. Fluoresenssikanavien havainnointialue on määritettävä PCR-putkien fluoresenssin voimakkuuden mukaan. Valitse New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -valintaikkunasta Gain Optimisation (Vahvistuksen optimointi). Näyttöön tulee Auto-Gain Optimisation Setup (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset) -valintaikkuna. Valitse kunkin kanavan (Green ja Yellow, kuva 6) Auto-Gain Optimisation Channel Settings (Automaattisen vahvistuksen optimointikanavan asetukset) -valintaikkunoista Optimise Acquiring (Optimoi keruu) (kuva 6) ja napsauta OK-painiketta. Varmista, että Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu on valittu kullekin kanavalle (kuva 6).



Kuva 6. Fluoresenssikanavan herkkyuden säätäminen.

15. Kanavan kalibroinnilla määritetyt vahvistusarvot tallennetaan automaattisesti, ja ne luetellaan ohjelmoinnin viimeisessä valikkoikkunassa. Käynnistä ohjelma Start Run (Aloita ajo) -painikkeella.
16. Syötä roottoriaisetukset Rotor-Gene-ohjelmassa (kuva 7).



Kuva 7. Rotor -Gene-asetukset: Edit Samples (Muokkaa näytteitä).

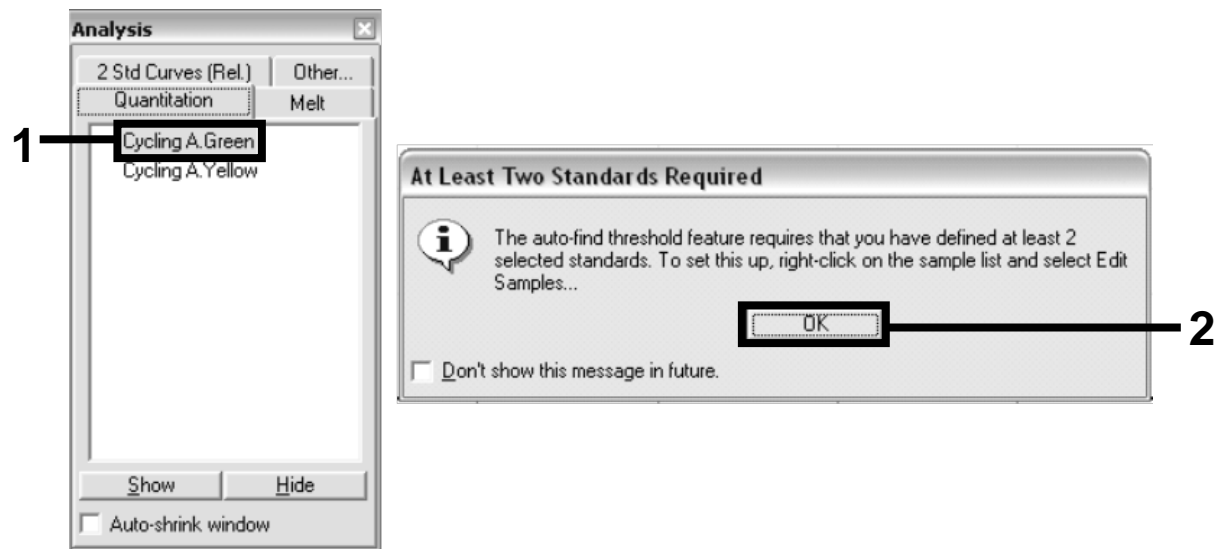
Päätepisteen analysointi Rotor -Gene Q 5plex HRM -laitteen asetusten mukaan

17. Valitse PCR-ohjelman päättymisen jälkeen työkaluriviltä Analysis (Analyysi) (kuva 8).



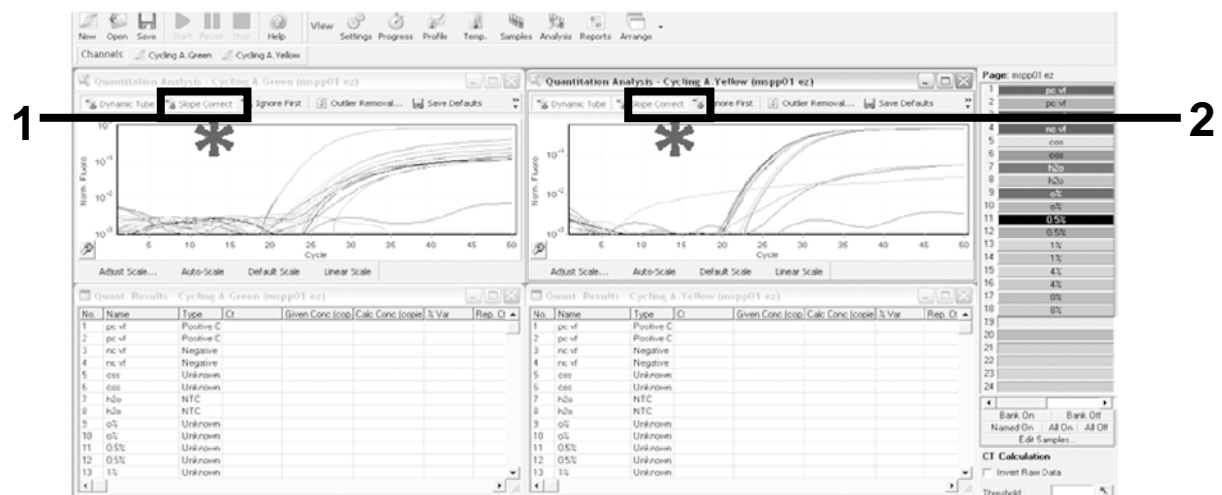
Kuva 8. Analyysi.

18. Kaksoisnapsauta Analysis (Analyysi) -valintaikkunan (kuva 9) Cycling A Green (Vihreä jakso) -vaihtoehtoa ja valitse sitten OK. Toista sama Cycling A Yellow (Keltainen jakso) -vaihtoehdolle.



Kuva 9. Kvantitointi: Cycling A. Green (Vihreä jakso).

19. Näyttöön tulee uusi ikkuna (kuva 10). Valitse molemmista ruuduista Slope Correct (Pudotus oikea), kuten kuvassa 10.



Kuva 10. Slope Correct (Pudotus oikea) -asetuksen määrittäminen.

20. Jos haluat viedä tiedot, tallenna ne Excel®-laskentataulukkona. Valitse OK, anna vientitiedostolle nimi ja tallenna tekstitiedosto (*.txt).

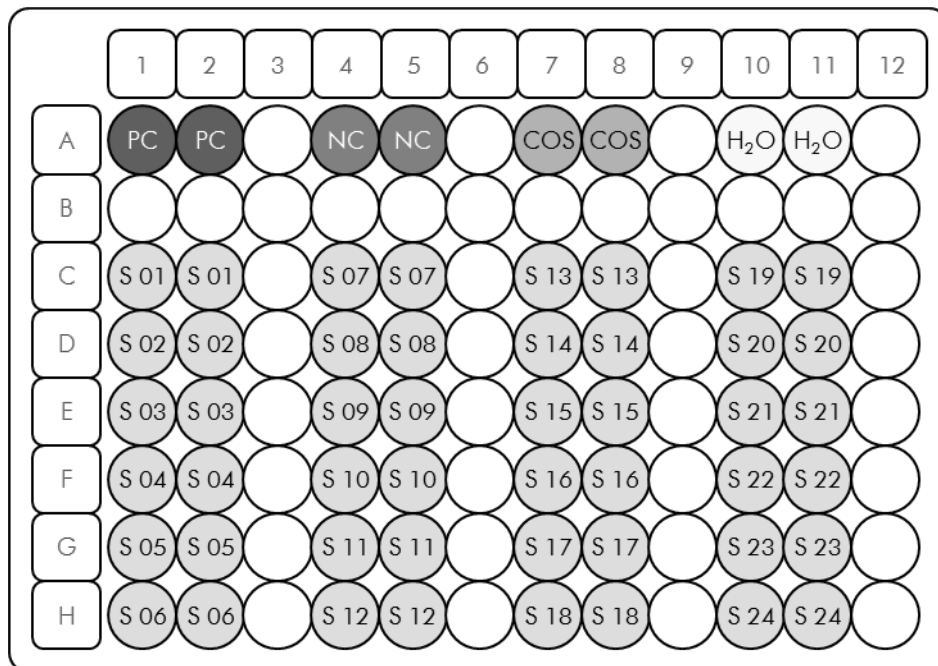
Protokolla: qPCR-ajo Applied Biosystems- ja ABI PRISM -laitteilla

96-kuoppaisella qPCR-laitteella suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahdesti, kuten taulukossa 5 esitetään.

Taulukko 5. Reaktioiden määrä Applied Biosystems 7300- ja 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- ja ABI PRISM 7900HT -laitteilla

Näytteet	Reaktiot
Aluke- ja koetinseos JAK2 V617F (PPM-VF) (56 reaktiota)	
24 DNA-näytettä	24 × 2 reaktiota
3 DNA-kontrollia	3 x 2 reaktiota (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, jokaisella kaksi testiä)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Näytteiden käsittely Applied Biosystems 7300- ja 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- ja ABI PRISM 7900HT -laitteilla



Kuva 12. Ehdotettu levyjärjestys yhtä koetta varten, kun koe tehdään *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjalla. PC: positive control (positiivinen kontrolli); NC: negative control (negatiivinen kontrolli); COS: cut-off sample (katkaistu näyte); S: DNA-näyte; H₂O: vesikontrolli.

qPCR-ajo Applied Biosystems 7300- ja 7500-, ABI PRISM 7000-,
ABI PRISM 7700- ja ABI PRISM 7900HT -laitteilla

Huomautus: tee kaikki vaiheet jäällä.

Menetelmä

1. Sulata kaikki tarvittavat osat ja aseta ne jäähauteeseen.
Osat tulisi ottaa pakastimesta noin 10 minuuttia ennen aloittamista.
2. Sekoita hyvin ja sentrifugoi hetki kaikkia putkia (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
3. Valmista seuraava qPCR-seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 6 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Applied Biosystems 7300- ja 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- ja ABI PRISM 7900HT -laitteissa *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjaa voidaan käyttää 24 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin yhdessä kokeessa (kuva 12), 20 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin kahdessa kokeessa tai 15 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin kolmessa kokeessa.

Taulukko 6. qPCR-seoksen valmistus

Osa	Reaktioiden määrä (µl)				Lopullinen määrä
	1	56+ 1*	28+ 1†	18+ 1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Aluke- ja koetinseos, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Nukleaa siton PCR-vesi	5	285	145	95	–
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5 kuta kin	5 kuta kin	5 kuta kin	–
Kokonaismäärä	25	25 kuta kin	25 kuta kin	25 kuta kin	–

* 24 näytettä; yksi koe/sarja.

† 10 näytettä; kaksi koetta/sarja.

‡ 5 näytettä; kolme koetta/sarja.

- Sekoita qPCR-seos hyvin ja sentrifugoi sitä hetki (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
- Annostele 20 µl qPCR-esiseosta kuoppaa kohti.
- Lisää 5 µl DNA-näytemateriaalia tai kontrolleja vastaavaan kuoppaan (kokonaismäärä on 25 µl).
- Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
- Sulje levy ja sentrifugoi hetken aikaa (300 x *g*, noin 10 sekuntia).
- Aseta levy PCR-laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
- Ohjelmoi PCR -laitteeseen taulukon 7 mukainen PCR -ohjelma ja käynnistä ajo.

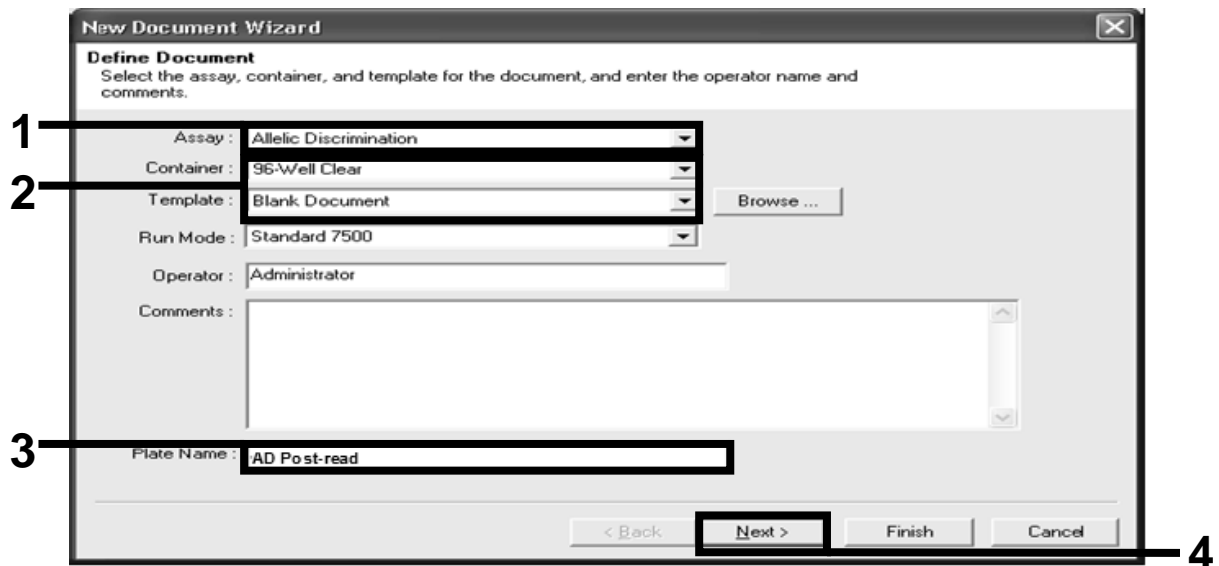
Taulukko 7. Lämpötilaprofiili: Applied Biosystems- ja ABI PRISM -laitteilla

Hold (Pito)	Lämpötila: 50 °C Aika: 2 min
Hold (Pito) 2	Lämpötila: 95 °C Aika: 10 min
Cycling (Syklit)	50 kertaa 92 °C, 15 sekuntia 60 °C, 1 minuutti

Applied Biosystems- ja ABI PRISM -laitteiden lukemisen jälkeisen ajon analysointi

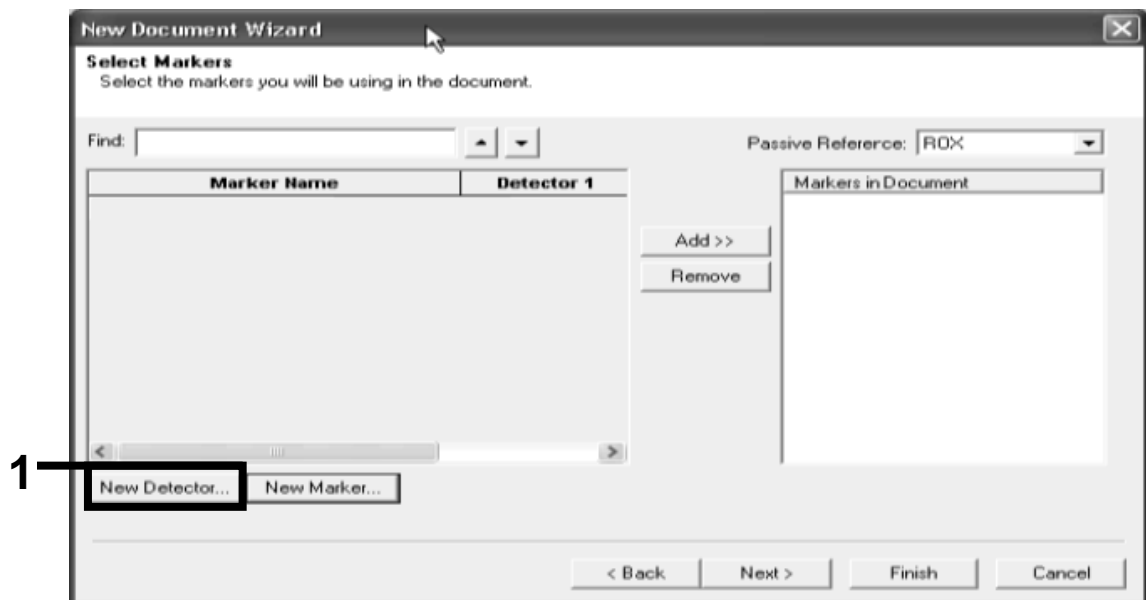
Tietoja Applied Biosystems 7300- ja 7500-, ABI PRISM 7000-, ABI PRISM 7700- ja ABI PRISM 7900HT -laitteiden ohjelmoinnista on laitteen käyttöoppaassa. Ohjelman asetukset on selkeyden vuoksi merkitty mustilla kehyksillä.

11. Kun ajo on päättynyt, valitse Start/Program (Käynnistä/Ohjelma) ja sitten File/New (Tiedosto/Uusi).
12. Valitse New Document Wizard (Ohjattu uusi asiakirja) -valintaikkunan Assay (Määritys) -pudotusvalikosta Allelic Discrimination (Alleelien erotus) (kuva 13).
13. Hyväksy Container (Säiliö)- ja Template (Malli) -kenttien oletusasetukset (96-Well Clear [96-kuoppainen tyhjä] ja Blank Document [Tyhjä asiakirja], kuva 13). Lisää Plate Name (Levyn nimi) -kenttään *AD Post-read* (kuva 13) ja valitse Next> (Seuraava). Näyttöön tulee Select Markers (Valitse markkerit) -valintaikkuna.



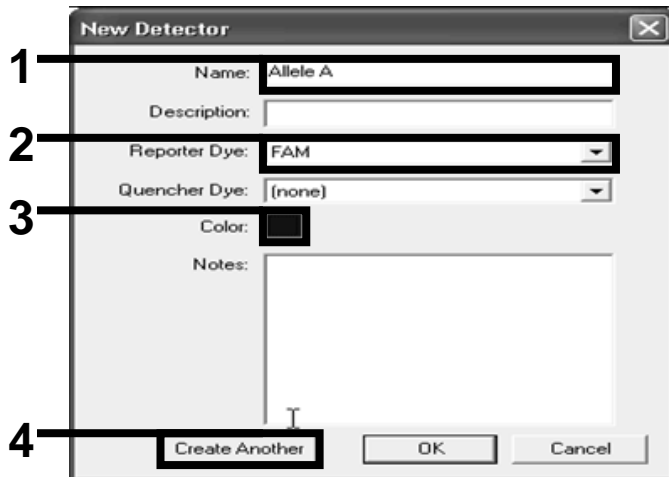
Kuva 13. Esiasetukset uuden lukemisen jälkeisen ajon luontia varten (New Document Wizard [Ohjattu uusi asiakirja] -ikkunassa).

14. Jos Select Markers (Valitse markkerit) -valintaikkunan Markers in Document (Asiakirjan markkerit) -ruudussa on käyttökohteeseen sopiva markkeri, siirry vaiheeseen 18. Jos ei ole, siirry vaiheeseen 15.
15. Luo tunnistimet ja markkerit seuraavien ohjeiden mukaan. Valitse New Detector (Uusi tunnistin) (kuva 14).



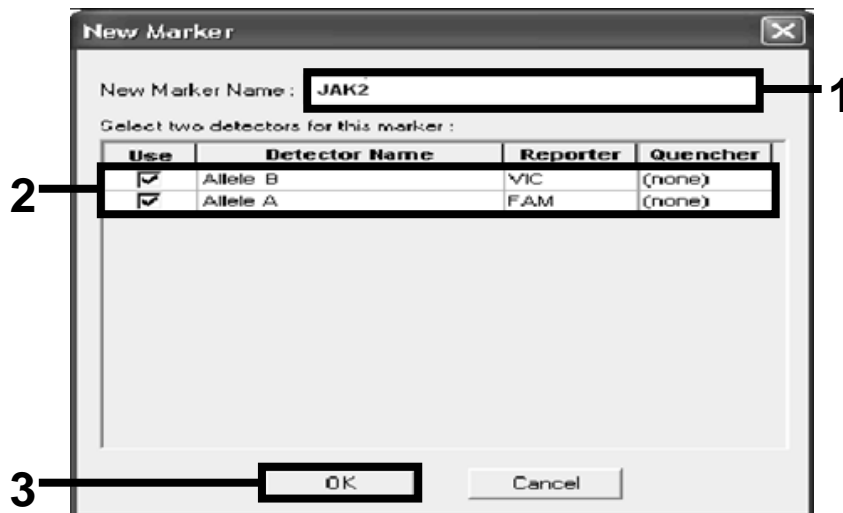
Kuva 14. Markers in Document (Asiakirjan markkerit) -ruudussa ei ole käyttökohteeseen sopivaa markkeria.

16. Kirjoita New Detector (Uusi tunnistin) -valintaikkunan Name (Nimi) -kenttään *Allele A* (kuva 15). Jätä Reporter Dye (Reportterin väri) -kenttään FAM -asetus. Napsauta Color (Väri) -painiketta, valitse väri ja napsauta OK -painiketta (kuva 15). Valitse Create Another (Luo toinen) (kuva 15).



Kuva 15. Tunnistimien luonti.

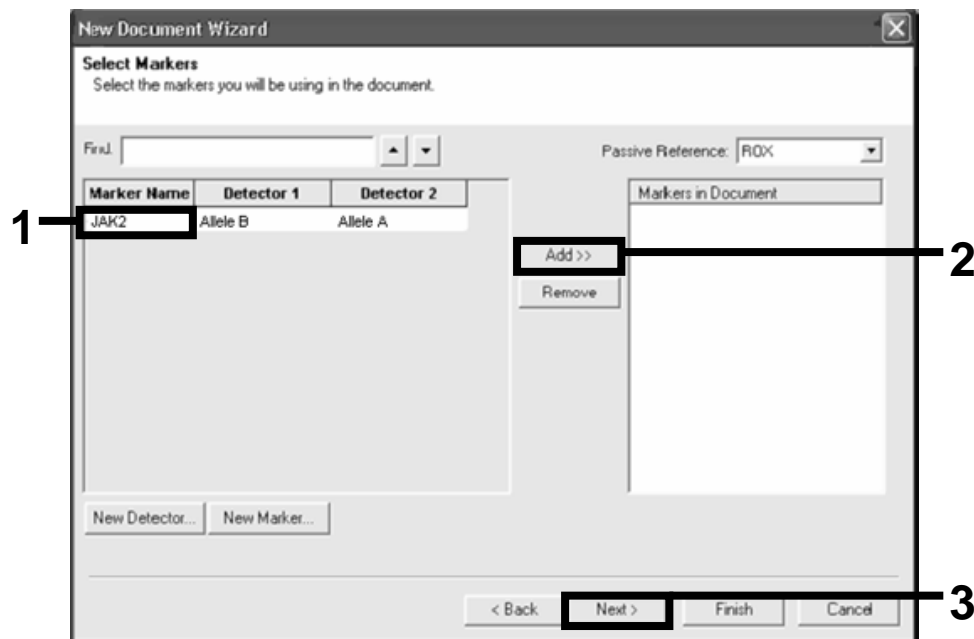
17. Kirjoita New Detector (Uusi tunnistin) -valintaikkunan Name (Nimi) -kenttään *Allele B*. Valitse Reporter Dye (Reportterin väri) -kentästä VIC. Napsauta Color (Väri) -painiketta, valitse väri ja napsauta OK -painiketta.
18. Valitse Select Markers (Valitse markkerit) -valintaikkunasta New Marker (Uusi markkeri) (kuva 14).
19. Kirjoita New Marker (Uusi markkeri) -valintaikkunan New Marker Name (Uuden markkerin nimi) -kenttään *JAK2* (kuva 16). Valitse tunnistimet Allele A (Alleeli A) ja Allele B (Alleeli B), jotka luotiin vaiheissa 16 ja 17 (tai jotka on jo määritetty), ja napsauta OK -painiketta (kuva 16).



Kuva 16. Markkereiden luonti.

20. Valitse Select Markers (Valitse markkerit) -valintaikkunasta aiemmin luotu JAK2 tai sopiva valmiiksi määritetty markkeri ja napsauta Add>> (Lisää) -painiketta (kuva 17).

Huomautus: Jos haluat poistaa markkerin, valitse se ja napsauta Remove (Poista) -painiketta.



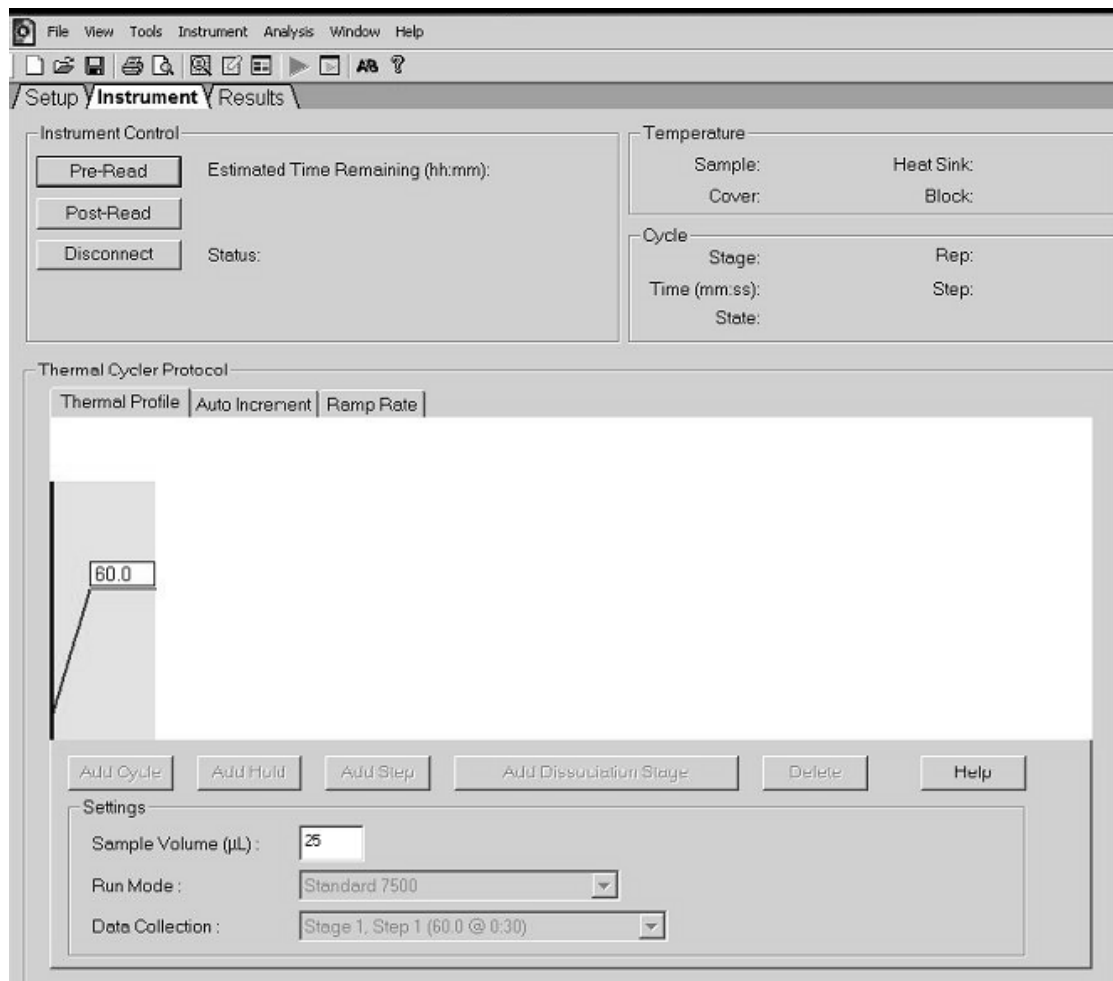
Kuva 17. Markkereiden valitseminen.

21. Valitse Next> (Seuraava).

22. Valitse Setup Sample Plate (Näytelevyn asennus) -valintaikkunassa näytteitä sisältävien kuoppien markkeri napsauttamalla ja vetämällä sitä. Valitse Finish (Lopeta).

23. Valitse Instrument (Instrumentti) -välilehti ja vaihda Sample Volume (Näytteen tilavuus) -kentän arvoksi 25 µl.
24. Valitse File/Save (Tiedosto/Tallenna) ja napsauta Save (Tallenna) -painiketta, jotta levyn luonnin yhteydessä määritetty nimi säilyy.
25. Aseta reaktiolevy laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
26. Käynnistä lukemisen jälkeinen ajo. Napsauta Post-Read (Jälkiluku) -painiketta.

Laite suorittaa 1 syklin ajon, joka kestää 60 sekuntia 60 °C:n lämpötilassa. Tämän ajon aikana laite kerää kuoppien FAM- ja VIC-fluoresenssin (kuva 18).



Kuva 18. Lukemisen jälkeinen ajo.

27. Valitse File/Export (Tiedosto/Vie) ja vie tulokset Excel-tiedostoon Results (Tulokset) -painikkeella. Tulokset tulevat näyttöön, kuten kuvassa 19.

Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method
A1	sample 1	VIC	Unknown	247.897	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.184	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call
A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call
A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call
A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call
A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call
A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.806	5.278	Undetermined	100.00	Manual Call
A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.948	Undetermined	100.00	Manual Call
A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call
A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call
A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call
A11	C-	VIC	Unknown	269.500	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call
A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call
B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call
B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call
B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call
B4	ER	VIC	Unknown	404.145	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call
B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call
B6	H2O	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.346	Undetermined	100.00	Manual Call
B7	H2O	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call
B8	H2O	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call

Kuva 19. Tulosten esimerkki Excel-tiedostossa.

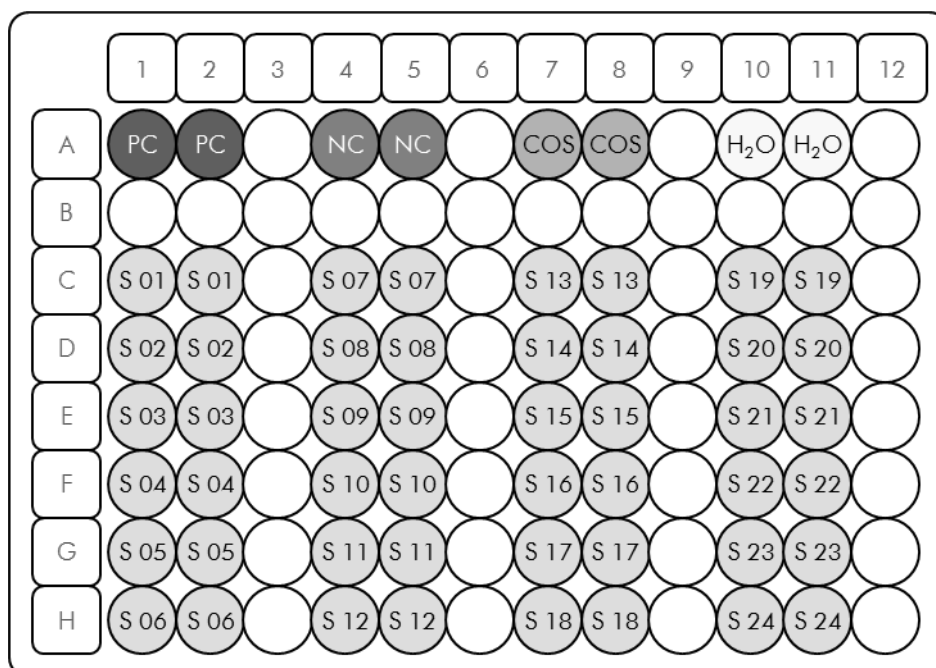
Protokolla: qPCR-ajo LightCycler 480 -laitteella

96-kuoppaisella qPCR-laitteella suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahdesti, kuten taulukossa 8 esitetään.

Taulukko 8. Reaktioiden määrä: LightCycler 480 -laite

Näytteet	Reaktiot
JAK2 V617F -aluke- ja koetinseoksella (PPM-JAK2)	
24 DNA-näytettä	24 × 2 reaktiota
3 DNA-kontrollia	3 x 2 reaktiota (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, jokaisella kaksi testiä)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Näytteiden käsittely LightCycler 480 -laitteella



Kuva 20. Ehdotettu levyjärjestys yhtä koetta varten, kun koe tehdään *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjalla. PC: positive control (positiivinen kontrolli); NC: negative control (negatiivinen kontrolli); COS: cut-off sample (katkaistu näyte); S: DNA-näyte; H₂O: vesikontrolli.

qPCR-ajo LightCycler 480 -laitteella

Huomautus : tee kaikki vaiheet jäällä.

Menetelmä

1. Sulata kaikki tarvittavat osat ja aseta ne jäähauteeseen.
Osat tulisi ottaa pakastimesta noin 10 minuuttia ennen aloittamista.
2. Sekoita hyvin ja sentrif ugoi hetki kaikkia putkia (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
3. Valmista seuraava qPCR -seos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 9 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

LightCycler 480 -laitteessa *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit -sarjaa voidaan käyttää 24 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin yhdessä kokeessa (kuva 20), 20 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin kahdessa kokeessa tai 15 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin kolmessa kokeessa.

Taulukko 9. qPCR-seoksen valmistus

Osa	Reaktioiden määrä (µl)				Lopullinen määrä
	1	56+ 1*	28+ 1 [†]	18+ 1 [‡]	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Aluke- ja koetinseos, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Nukleaa siton PCR-vesi	5	285	145	95	–
Näyte (lisätään vaiheessa 6)	5	5 kuta kin	5 kuta kin	5 kuta kin	–
Kokonaismäärä	25	25 kuta kin	25 kuta kin	25 kuta kin	–

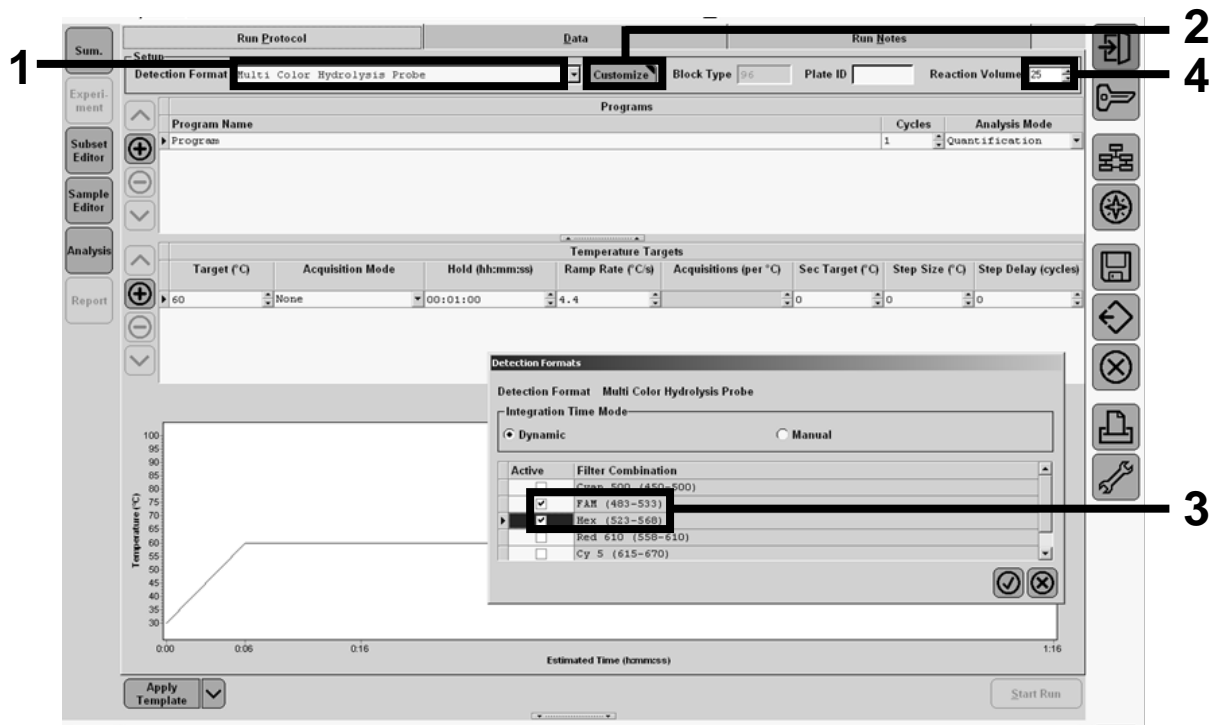
*24 näytettä; yksi koe/sarja.

[†] 10 näytettä; kaksi koetta/sarja.

[‡] 5 näytettä; kolme koetta/sarja.

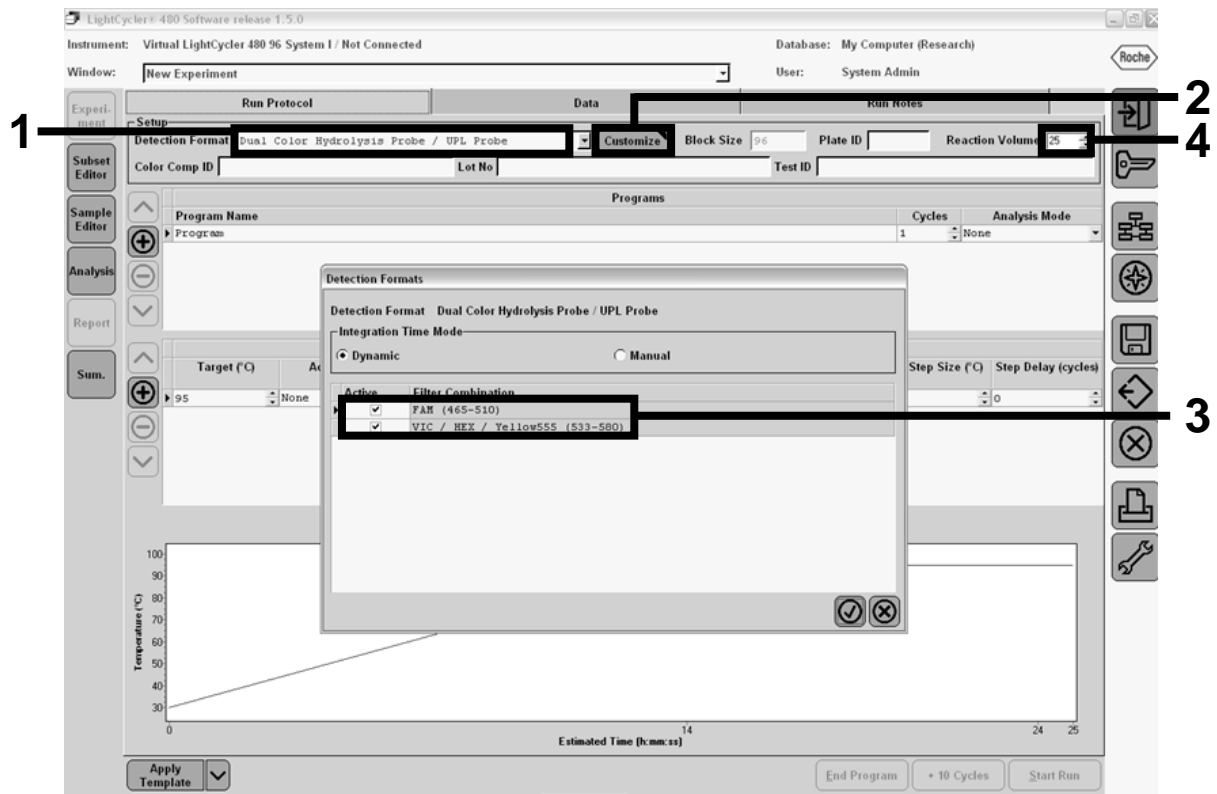
- Sekoita qPCR-seos hyvin ja sentrifugoi sitä hetki (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
- Annostele 20 µl qPCR-esiseosta kuoppaa kohti.
- Lisää 5 µl DNA-näytemateriaalia tai kontrolleja vastaavaan kuoppaan (kokonaismäärä on 25 µl).
- Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
- Sulje levy ja sentrifugoi hetken aikaa (300 x g, noin 10 sekuntia).
- Aseta levy PCR-laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
- Valitse aloitussivulta New Experiment (Uusi koe).
- Jos käytät LightCycler 480 I -laitetta, noudata 11a -vaiheen ohjeita. Jos käytät LightCycler 480 II -laitetta, noudata 11b -vaiheen ohjeita. Tietoja LightCycler 480-laitteen ohjelmoinnista on laitteen käyttöoppaassa. Ohjelman asetukset on selkeyden vuoksi merkitty mustilla kehyksillä.

- 11a. LightCycler 480 I: Valitse Multi Color Hydrolysis Probe (Monivärinen hydrolyysinanturi), napsauta Customize (Mukauta) -painiketta ja tarkista, että kanavat FAM (483 –533) ja Hex (533 –568) (eli VIC) on valittu (kuva 21). Aseta Reaction Volume (Reaktion tilavuus) -kentän arvoksi 25 µl (kuva 21) ja siirry vaiheeseen 12.



Kuva 21. LightCycler 480 I: Tunnistusmuodon määrittäminen.

11b. LightCycler 480 II: Valitse Dual Color Hydrolysis Probe (Kaksivärinen hydrolyysianturi), napsauta Customize (Mukauta) -painiketta ja tarkista, että kanavat FAM (465–510) ja VIC / HEX / (533–580) on valittu (kuva 22). Aseta Reaction Volume (Reaktion tilavuus) -kentän arvoksi 25 µl (kuva 22) ja siirry vaiheeseen 12.



Kuva 22. LightCycler 480 II: Tunnistusmuodon määrittäminen.

12. Ohjelmoi PCR-laitteeseen taulukon 10 mukainen PCR-ohjelma ja käynnistä ajo.

Huomautus: kun kuvailet laitteen levyjärjestystä, valitse Step 1 : select workflow Vaihe 1: valitse työnkulku) -kohdasta Endpt Geno (Päätetapahtuman genotyypitys).

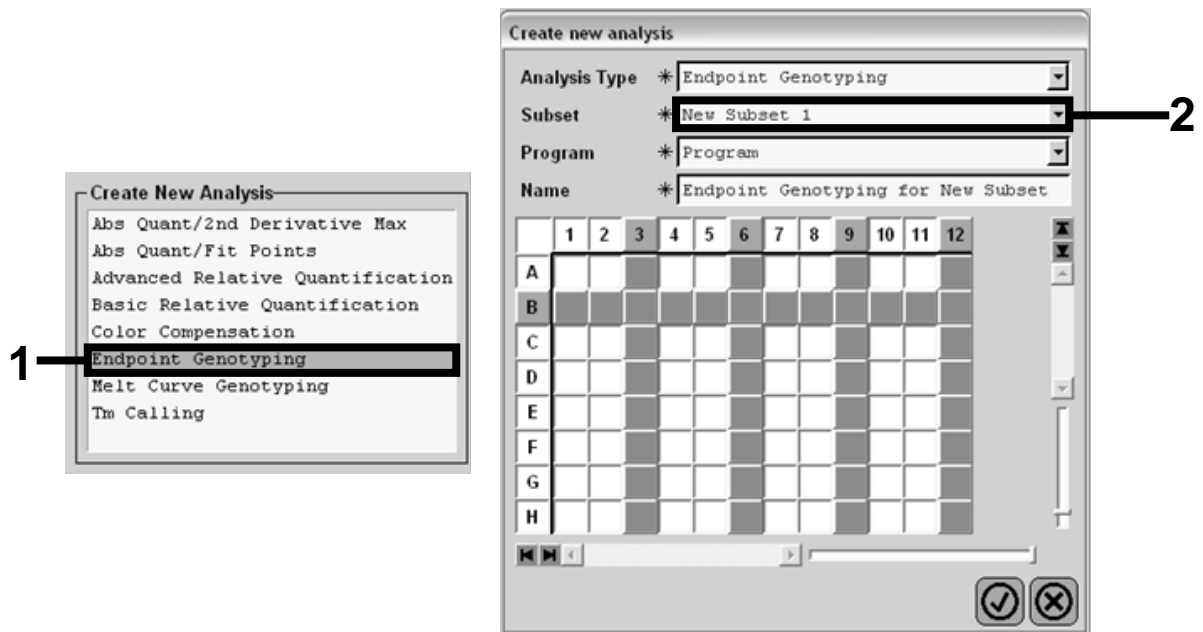
Taulukko 10. LightCycler 480 -laitteen lämpötilaprofiili

Hold (Pito)	Lämpötila: 50 °C Aika: 2 min
Hold (Pito) 2	Lämpötila: 95°C Aika: 10 min
Cycling (Syklit)	50 kertaa 92 °C,15 sekuntia; yksi 60 °C 1 minuutti; yksi
Hold (Pito) 3	60 °C 1 minuutti; yksi

Päätepisteen analysointi LightCycler 480 -laitteella

13. Kun ajo on valmis, napsauta Analysis (Analyysi) -painiketta.

14. Valitse Create New Analysis (Luo uusi analyysi) -valintaikkunasta Endpoint Genotyping (Päätetapahtuman genotyypitys). Valitse analysoitava ryhmä Subset (Alasarja) -valikosta (kuva 23).



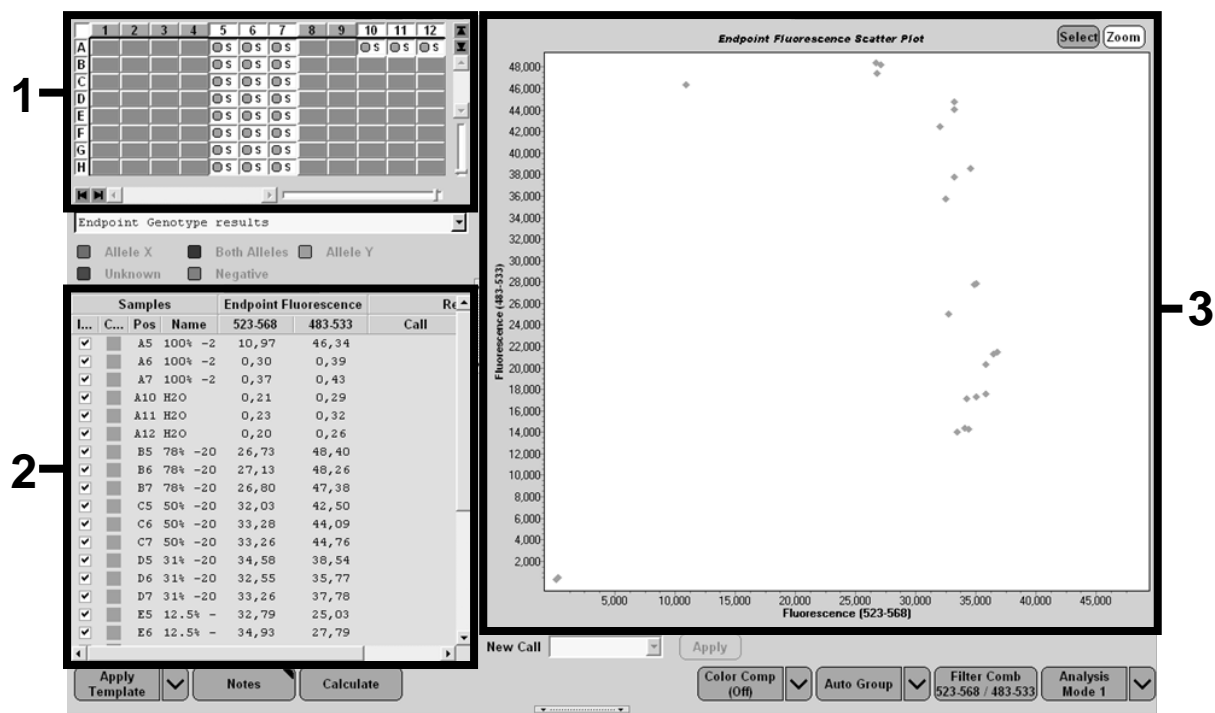
Kuva 23. Analyysityypin ja analysoitavan ryhmän valitseminen.

15. Valitse seuraavan ikkunan Allele X (Alleeli X) -kohdasta Hex-fluoresenssi (eli VIC) ja Allele Y (Alleeli Y) -kohdasta FAM-fluoresenssi (kuva 24).



Kuva 24. Fluoresenssin valitseminen Allele X (Alleeli X)- ja Allele Y (Alleeli Y) -kohdista.

16. Seuraavassa ikkunassa (kuva 25) esitetään levyjärjestys (1, ylhäällä vasemmalla), näytteiden fluoresenssien tulokset (2, alhaalla vasemmalla) ja pistekaavio, josta nähdään alleelien erottelu (3, oikealla; 50. PCR-syklissä mitattu FAM- ja VIC-fluoresenssi).



Kuva 25. Tietojen yhteenveto.

17. Jos haluat viedä tiedot, napsauta näytetulosten mallia hiiren kakkospainikkeella ja valitse Export Table (Vie taulukko). Tiedosto tallennetaan tekstimuodossa (.txt).

18. Avaa tiedosto Excelissä, jotta voit katsella ja analysoida tuloksia. Tulokset tulevat näyttöön, kuten kuvassa 26.

	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
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**

Kuva 26. Tulosten esimerkki Excel-tiedostossa.

Protokolla: qPCR-ajo LightCycler 2.0 -laitteella

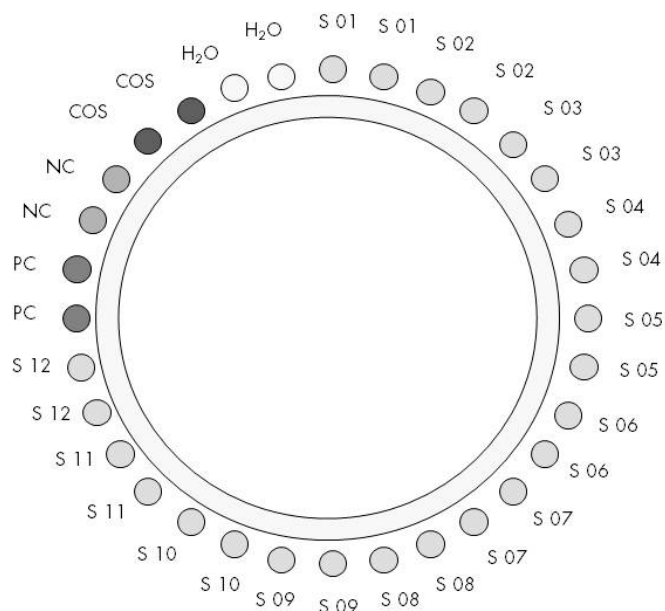
Huomautus: Teknisten vaatimusten takia LightCycler 2.0 -kokeet on tehtävä tietyillä reagensseilla. Suosittelemme käyttämään LightCycler TaqMan Master -reagenssia. Valmista Master Mix 5x valmistajan ohjeiden mukaan.

32 kapillaarin roottoria käytettäessä suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahtena, kuten taulukossa 11 esitetään.

Taulukko 11. Reaktioiden määrä: LightCycler 2.0 -laite

Näytteet	Reaktiot
Aluke- ja koetinseos JAK2 V617F (PPM-VF) (32 reaktiota)	
12 DNA-näytettä	12 × 2 reaktiota
3 DNA-kontrollia	3 x 2 reaktiota (PC-VF, NC-VF ja COS-VF, jokaisella kaksi testiä)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Näytteiden käsittely LightCycler 2.0 -laitteella



Kuva 27. Ehdotetut roottorin asetukset, kun koe tehdään *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjalla. PC: positive control (positiivinen kontrolli); NC: negative control (negatiivinen kontrolli); COS: cut-off sample (katkaistu näyte); S: DNA-näyte; H₂O: vesikontrolli.

qPCR-ajo LightCycler 2.0 -laitteella

Huomautus: tee kaikki vaiheet jäällä.

Menetelmä

1. Sulata kaikki tarvittavat osat ja aseta ne jäähäuteeseen.
Osat tulisi ottaa pakastimesta noin 10 minuuttia ennen aloittamista.
2. Sekoita hyvin ja sentrifugoi hetki kaikkia putkia (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
3. Valmista seuraava qPCR-seos käsiteltävien näytteen määrän mukaan.

Kaikki pitoisuudet koskevat reaktion lopullista määrää.

Taulukossa 12 esitetään pipetointijärjestys yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 20 µl. Esiseos voidaan valmistaa reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

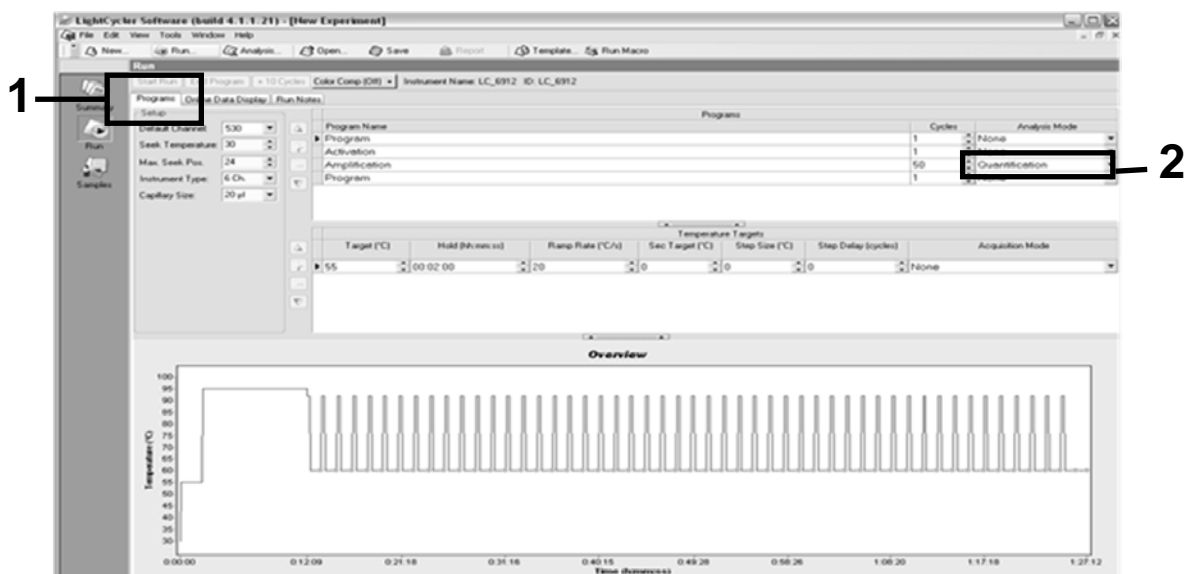
LightCycler 2.0 -laitteessa *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjaa voidaan käyttää 12 näytteen kaksinkertaiseen analysointiin yhdessä kokeessa (kuva 27).

Taulukko 12. qPCR-seoksen valmistus LightCycler 2.0 -laitetta varten

Osa	Reaktioiden määrä (µl)		Lopullinen määrä
	1	32+ 1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Aluke- ja koetinseos, 10x	2	66	1x
Nukleaaasiton PCR-vesi	9	297	–
Näyte (lisätään vaiheessa 4)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	20	20 kutakin	–

4. Sekoita qPCR-seos hyvin ja sentrifugoi sitä hetki (noin 10 sekuntia 10 000 rpm:n nopeudella, jotta neste kertyy putken pohjalle).
5. Annostele 15 µl qPCR-esiseosta kapillaaria kohti.
6. Lisää 5 µl DNA-näytemateriaalia tai kontrolleja vastaavaan kapillaariin (kokonaismäärä on 20 µl).
7. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.
8. Aseta kapillaarit laitteen mukana tulleisiin sovittimiin ja sentrifugoi kevyesti (700 x *g*, noin 10 sekuntia).
9. Aseta näytteet PCR -laitteeseen valmistajan suositusten mukaan.
10. Ohjelmoi PCR -laitteeseen taulukon 13 mukainen ohjelma (kuva 28).
Tietoja LightCycler 2,0-laitteen ohjelmoinnista on laitteen käyttöoppaassa. Ohjelman asetukset on selkeyden vuoksi merkittymustilla kehysillä.

Huomautus : varmista, että asetukset on tehty kvantifointia varten sekä yhtä FAM- ja VIC-fluoresenssin keruuta varten monistus/syklitvaiheessa ja viimeisessä pidossa 60°C:n lämpötilassa.



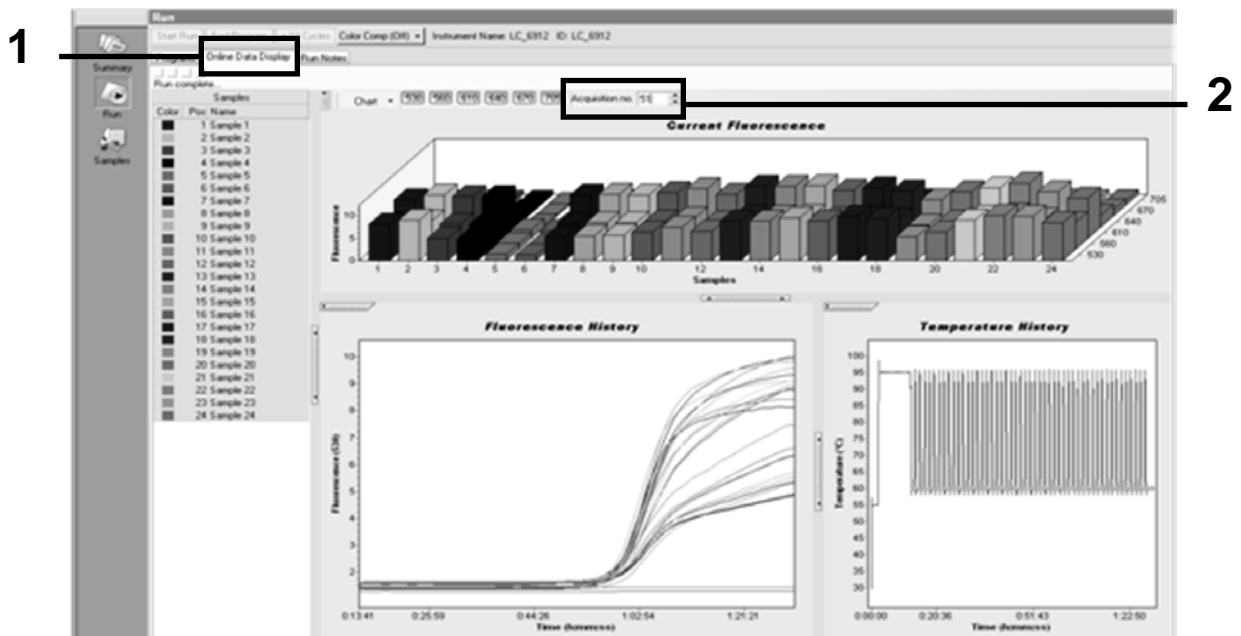
Kuva 28. LightCycler 2.0 -laitteen ohjelmointinäyttö.

Taulukko 13. LightCycler 2.0 -laitteen lämpötilaprofiili

Hold (Pito)	Lämpötila: 55 °C Aika: 2 min Ramppi: 20
Hold (Pito) 2	Lämpötila: 95 °C Aika: 10 min Ramppi: 20
Cycling (Syklit)	50 kertaa 92 °C, 15 sekuntia; ramppi: 20 60 °C, 1 minuutti; ramppi 20
Hold (Pito) 3	60 °C, 1 minuutti; ramppi 20

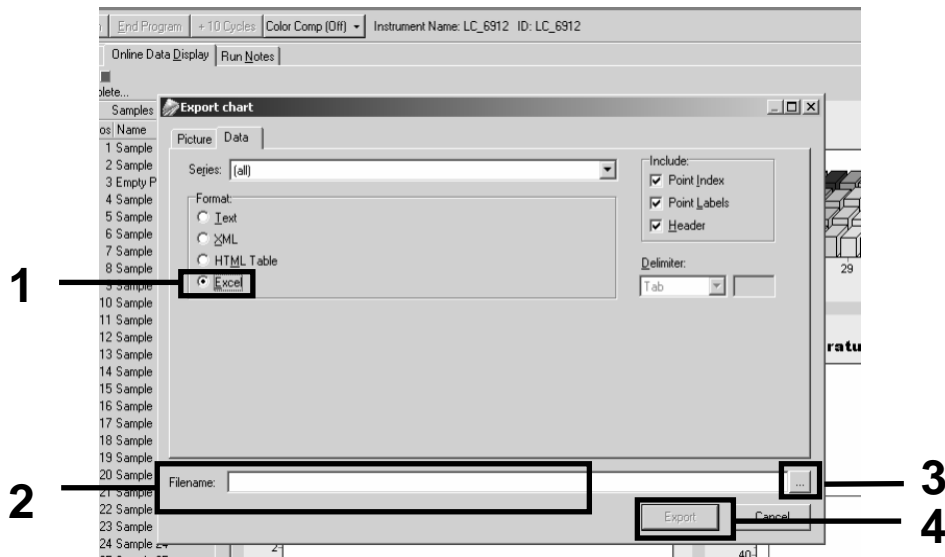
Päätepisteen analysointi LightCycler 2.0 -laitteella

1. Valitse monistuksen loputtua Online Data Display (Tietojen näyttö verkossa) -välilehti (kuva 29). Avaa Current Fluorescence (Nykyinen fluoresenssi) -ikkunan vasemmasta yläkulmasta näyttövalikko ja kirjoita Acquisition no. (Keruunumero) -kenttään 51.



Kuva 29. Tulokset ja historiatiedot Online Data Display (Tietojen näyttö verkossa) -välilehdessä.

12. Napsauta hiiren kakkospainikkeella näyttöä Current Fluorescence (Nykyinen fluoresenssi) -kaavion lähellä ja valitse Export (Vie).
13. Valitse Export chart (Vie kaavio) -valintaikkunasta Excel -vaihtoehto (kuva 30). Lisää Filename (Tiedostonimi) -kenttään nimi. Valitse painikkeella paikka, johon tulostiedosto viedään. Napsauta Export (Vie) -painiketta.



Kuva 30. Vientitiedoston muodon ja tallennuspaikan valitseminen.

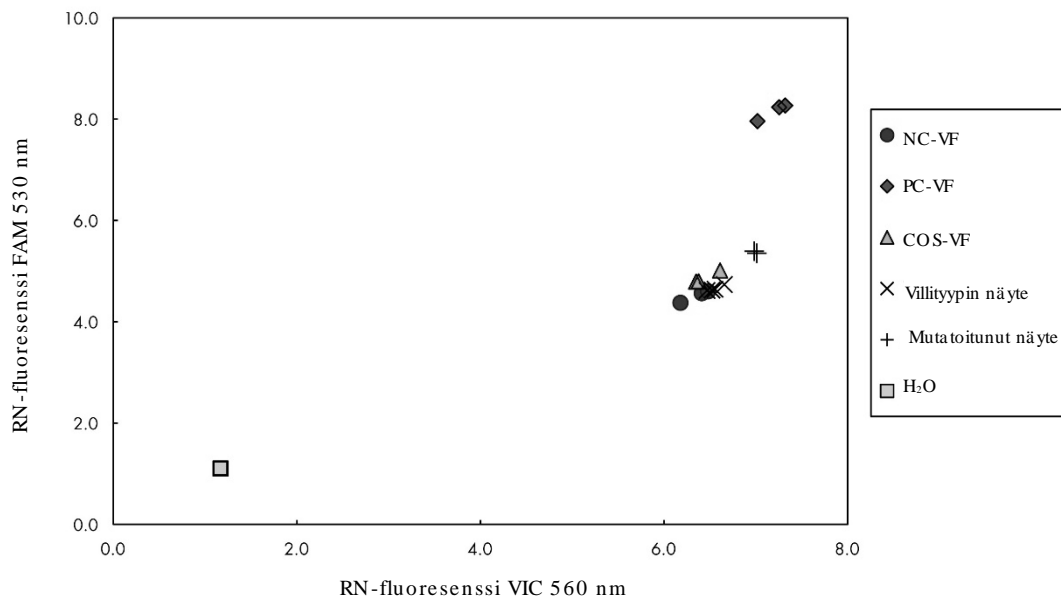
14. Avaa tiedosto Excelissä, niin voit katsella ja analysoida tuloksia. LightCycler 2.0 -laitteen tulokset tulevat näyttöön.

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

Kuva 31. LightCycler 2.0 -laitteen tulosten esimerkki Excel -tiedostossa.

- Vesikontrollien tulisi olla alhaalla vasemmalla.
- Vesikontrollin sopimaton sijainti (FAM-mittauksen negatiivisia kontrolleja ylempänä tai VIC-mittauksen positiivisia kontrolleja ylempänä) voi olla merkki kontaminaatiosta.

Huomautus: Kontrollien sijainti voi olla erilainen LightCycler 2.0 -laitteen tietojen analyysissä (kuva 33). Vesikontrollien tulisi silti olla alhaalla vasemmalla.



Kuva 33. Edustavan alleelien erotuskokeen pistekaavio. Laitte: LightCycler 2.0.

Normalisoidun FAM/ VIC-suhteen laskenta ja genotyyppi

Laske kaikkien näytteiden FAM/ VIC-suhteet. Laske positiivisen kontrollin (PC), katkaistun näytteen (COS) ja negatiivisen kontrollin (NC) FAM/ VIC-suhteet. Suhteiden on oltava yhdenmukaisia kaksoiskappaleiden välillä. Laske kaikkien kaksoiskappaleiden keskimääräinen suhde.

Laske katkaistun näytteen (COS) ja kaikkien näytteiden normalisoitu suhde (NSuhde):

$$\text{NSuhde}_{\text{Näyte}} = \frac{\text{Suhde}_{\text{Näyte}}}{\text{Suhde}_{\text{NC}}}$$

Huomautus: Testin harmaa alue (HA) on arvojen alue, jolla erottelun suorituskyky ei ole riittävä. Harmaalla alueella oleva arvo tarkoittaa, että kohdemarkkeria ei voi arvioida läsnäolevaksi eikä poissaolevaksi. Harmaa alue on laskettava jokaiselle kokeelle.

Laske katkaistun näytteen normalisoidun suhteen ($N_{Ratio_{COS}}$) ympärillä oleva harmaa alue eli epävarmuusalue:

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

Vertaa jokaisen näytteen normalisoitua suhdetta $NSuhde_{COS:n}$ harmaaseen alueeseen. Tulosten tulkinta esitetään taulukossa 14. Taulukossa 15 on esimerkki tietojen laskennasta ja tulkinnasta.

Taulukko 14. Genotyyppien tulosten tulkinta normalisoitujen suhteiden avulla

Tulokset	Tulkinta
$NSuhde_{Näyte} > NSuhde_{COS} \times 1,06$	JAK2 V617F -mutaatio löytyi
$NSuhde_{Näyte} < NSuhde_{COS} \times 0,94$	JAK2 V617F -mutaatiota ei löytynyt
$NSuhde_{Näyte}$ on $NSuhde_{COS:n}$ harmaalla alueella	Tulos on epäselvä

Taulukko 15. Esimerkki fluoresenssitietojen laskennasta ja tulkinnasta

Näyte	VIC	FAM	Suhde	Keskimmääinen suhde	NSuhde	Tulkinta
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutaatiota ei löytynyt
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Mutaatio löytyi
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Katkaisu näyte
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutaatiota ei löytynyt
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Mutaatio löytyi
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Epäselvä tulos
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Epäselvä tulos
S 4	2,322	2,191	0,944			
HA	1,205	1,359				

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisuopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustoltamme usein kysytyjen kysymysten osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja testeihin liittyviä tekniikoita (yhteystiedot: Yhteystiedot, sivu 59).

Huomautuksia ja ehdotuksia

Positiivisen kontrollin signaali on negatiivinen

- | | |
|--------------------------------|---|
| a) Pipetointivirhe | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| b) Sarjan osien väärä säilytys | Säilytä <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>ScreenKit</i> -sarjaa lämpötilassa $-30...-15$ °C ja pidä aluke- ja koetinseos (PPM) valolta suojattuna. Katso ”Reagenssien säilytys ja käsittely”, sivu 10.
Vältä toistuvaa jäädytystä ja sulatusta.
Jaa reagenssit alikvotteihin säilytystä varten. |

Negatiiviset kontrollit ovat positiivisia

- | | |
|--------------------|--|
| Ristikontaminaatio | Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit.
Toista koe käyttäen kaikista reagensseista uusia alikvotteja.
Käsittele näytteitä, sarjan osia ja tarvikkeita hyvien käytäntöjen mukaisesti, jotta näytteiden välistä kontaminaatiota ei tapahdu. |
|--------------------|--|

Ei signaalia edes positiivisissa kontroleissa

- | | |
|---|--|
| a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| b) Riittämättömästä puhdistuksesta johtuvat näyttemateriaalin inhibitoriset vaikutukset | Toista DNA:n valmistelut. |

Huomautuksia ja ehdotuksia

- c) LightCycler: Väärä tunnistuskanava valittu Määritä kanava-asetukseksi F1/F2 tai 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Tiedonkeruuta ei ole ohjelmoitu Tarkista sykliohjelmat. Valitse keruumenetelmäksi Single PCR-ohjelman kunkin pariutumissegmentin lopussa.

Näytteiden signaali on heikko tai poissa, mutta positiivisissa kontroleissa ei ongelmia

- DNA:n huono laatu tai riittämätön pitoisuus Tarkista aina DNA:n laatu ja pitoisuus ennen aloittamista.

LightCycler: Fluoresenssin voimakkuus ei riitä

- a) Sarjan osien väärä säilytys Säilytä *ipsogenJAK2* Muta *ScreenKit* -sarjaa lämpötilassa $-30...-15$ °C ja pidä aluke- ja koetinseos (PPM) valolta suojattuna. Katso ”Reagenssien säilytys ja käsittely”, sivu 10. Vältä toistuvaa jäädystä ja sulatusta. Jaa reagenssit alikvotteihin säilytystä varten.
- b) Kohde-DNA:n hyvin pieni aloitusmäärä Lisää näyte-DNA:n määrää. Huomautus: inhibitorisia vaikutuksia saattaa ilmetä valitun DNA-valmistelutavan mukaan.

LightCycler: Fluoresenssin voimakkuus vaihtelee.

- a) Pipetointivirhe Pipetointivirheen aiheuttamaa vaihtelua voidaan vähentää analysoimalla tiedot F1/F2- tai 530 nm/640 nm -tilassa.
- b) Kapillaarien sentrifugointi ei riitä Valmistettu PCR-seos voi yhä olla kapillaarin yläosassa, tai kapillaarin kärjessä voi olla ilmakupla. Sentrifugoi reaktioseoksella täytetyt kapillaarit aina laitteen käyttöohjeiden mukaan.
- c) Kapillaarin kärjen ulkopinta on likainen Käytä aina käsiineitä kapillaareja käsitellessäsi.

Laadunvarmistus

QIAGENin ISO -sertifioidun laadunhallintajärjestelmän mukaisesti jokainen *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi. Analyysin sertifikaatteja voidaan tilata osoitteesta www.qiagen.com/support/.

Rajoitukset

Käyttäjien on saatava koulutusta ja heidän on perehdyttävä tämän laitteen tekniikkaan ennen sen käyttöä. Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun, kohdassa ”Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)” sivulla 8 esitetyn laitteen kanssa.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa. Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratorioissa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Suorituskykyominaisuudet

Ei-kliiniset tutkimukset

Ei-kliinisissä tutkimuksissa selvitettiin *ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjan analyyttistä suorituskykyä.

Tarkkuus

*ipsogen*JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjalla testattiin JAK2 V617F -mutaation solulinjan genomisen DNA:n (villityyppi) kolmea laimennustasoa. Laimennukset vastasivat mutaatiokuormia 1 %, 2 % ja 3 %. Jokaiselta tasolta saatiin erillisiä laimennuseriä, ja näiden laimennusten replikaatteja testattiin kolmessa erillisessä kokeessa. DNA-näytteiden suhteita (Suhde_{Näyte}) verrattiin negatiivisen kontrollin suhteeseen (JAK2 100 % villityypin DNA, Suhde_{NC}). Tulosten yhteenveto on Taulukossa 16.

Taulukko 16. Ei-kliinisten tutkimusten tarkkuustiedot

Mutaatio taso	Suhde _{Näyte} > Suhde _{NC}	CV (%) (suhde)
1 % V617F DNA	100 % (n = 183)	6,8
2% V617F DNA	100 % (n = 72)	4,5
3% V617F DNA	100 % (n = 135)	5,1

Laboratorioiden väliset analyysitiedot

Monikeskustutkimukseen osallistui 13 laboratoriota. Siinä kerättiin JAK2 V617F -mutaation sisältävän villityypin genomisen DNA:n laimennuksia koskevia analyysitietoja. Jokaisessa laboratoriossa tehtiin kolme koetta. Niissä testattiin solulinjojen seuraavia DNA-näytteitä:

- 1 negatiivinen kontrolli (NC) 0 % V617F
- 1 positiivinen kontrolli (NC) 100 % V617F
- 1 katkaistu näyte (COS) 2 % V617F
- 3 näytettä, joissa on keskimääräinen mutaatiokuorma (20 %, 50 % ja 80 %)

Kokeet tehtiin seitsemällä eri laitemallilla:

- 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®

Tulosten yhteenveto on Taulukossa 17.

Taulukko 17. Laboratorioiden väliset analyysitiedot JAK2 V617F -mutaation sisältävien solulinjojen villityypin genomisen DNA:n laimennuksista

Näytteen tunnistus	Positiiviset näytteet	Negatiiviset näytteet
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 villityyppi	0	36

*Positiivisiin näytteisiin kuului 36 positiivista kontrollia (PC-VF), 36 katkaistua näytettä (COS-VF; 2 % V617F), 34 näytettä, joissa on 20 % JAK2 V617F, 35 näytettä, joissa on 50 % JAK2 V617F ja 36 näytettä, joissa on 80 % JAK2 V617F.

Kliiniset tutkimukset

ipsogen JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjan ja ARMS[®]-menetelmän vertailu

DNA-näyte otettiin 141 potilaalta, joiden epäiltiin sairastavan myeloproliferatiivista tautia. Näytteet testattiin rinnakkain *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjalla ja qPCR-analyysillä ARMS (Amplification Refractory Mutation System)-periaatteen mukaan (11). Vertailun tulokset esitetään taulukossa 18 (2 x 3 ehdon taulukko) ja taulukossa 19 (prosentuaalinen yhtäpitävyys).

Taulukko 18. Menetelmien vertailu: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarja ja ARMS

		ARMS-testimenetelmän tulokset		
		JAK2 V617F > 2 %	JAK2 villityyppi (JAK2 V617F < 2 %)	Yhteensä
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> -testimenetelmä	JAK2 V617F -mutaatio löytyi	91	0	91
	Epäselvä tulos	1	2	3
	JAK2 villityyppi Mutaatiota ei löytynyt	1	46	47
Yhteensä		93	48	n = 141

Taulukko 19. Menetelmien vertailu: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarja ja ARMS

	Yhtäpitävyys (%)	95 %:n luottamusväli* (%)
Positiiviset tiedot		
Yhtäpitävyys <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit -sarjan ja ARMS menetelmän välillä	98,9	94,1 -99,8
Negatiiviset tiedot		
Yhtäpitävyys <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit -sarjan ja ARMS menetelmän välillä	100	92,3 -100
Yhtäpitävyys yhteensä	99,3	96,0 -99,9

* Luottamusvälien laskenta perustui ohjeeseen CLSI EP12 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline.

ipsogen JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjan ja sekvensoinnin välinen vertailu

DNA-näyte otettiin 51 potilaalta, joiden epäiltiin sairastavan myeloproliferatiivista tautia. Näytteet testattiin rinnakkain *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarjalla ja vertailutekniikalla (perusmallilla), johon kuuluu suora sekvensointi. Yhtä näytettä ei voinut tulkita sekvensointivirheen takia. Yhteenveto 50 tulkittavissa olleen näytteen tuloksista esitetään taulukossa 20 (2 x 3 ehdon taulukko) ja taulukossa 21 (prosentuaalinen yhtäpitävyys).

Taulukko 20. Menetelmien vertailu: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarja ja sekvensointi

		Suoran sekvensoinnin tulokset		
		JAK2 V617F > 2 %	JAK2 villityyppi (JAK2 V617F < 2 %)	Yhteensä
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> -testimenetelmä	JAK2 V617F -mutaatio löytyi	26	1	27
	Epäselvä tulos	0	1	1
	JAK2 villityyppi Mutaatiota ei löytynyt	2	20	22
Yhteensä		28	22	n = 50

Taulukko 21. Menetelmien vertailu: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarja ja sekvensointi

	Yhtäpitävyys (%)	95 %:n luottamusväli* (%)
Positiiviset tiedot Yhtäpitävyys <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit -sarjan ja sekvensoinnin välillä	92,9	77,4-98,0
Negatiiviset tiedot Yhtäpitävyys <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit -sarjan ja sekvensoinnin välillä	95,2	77,3-99,2
Yhtäpitävyys yhteensä	93,9	83,5-97,9

* Luottamusvälien laskentaperustui ohjeeseen CLSI EP12-A User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline.

228 potilaan näytteiden monikeskustutkimus

Potilaiden DNA-näytteitä analysoitiin paikallisilla tekniikoilla laboratorioden väliseen tutkimukseen osallistuneissa 13 laboratoriossa. Jokaisessa laboratoriossa tehtiin 3 koetta ei-kliinisten tarkkuustietojen kohdalla esitettyjen solulinjojen DNA:lla (yllä) ja laboratorion kymmeneltä käytettävissä olevalta potilaalta saadulla DNA:lla.

228 näytettä, joissa oli tunnettu JAK2genotyyppi, testattiin rinnakkain *ipsogen* JAK2 MutaScreenKit -sarjalla ja paikallisilla menetelmillä, joihin kuuluivat kvalitatiivinen PCR, alleelikohtainen PCR, FRET (Fluorescence Energy Resonance Transfer), sekvensointi, alleelikohtainen oligonukleotidien PCR, RFLP ja alleelien erotus. Vertailujen tulokset esitetään taulukossa 22 (2 x 3 ehdon taulukko) ja taulukossa 23 (prosentuaalinen yhtäpitävyys).

Taulukko 22. Menetelmien vertailu: *ipsogen* JAK2 Muta Screen Kit -sarja ja paikalliset menetelmät

		Paikallisen testauksen tulokset		
		Mutaatio löytyi JAK2 V617F	Villityypin JAK2-mutaatiota ei löytynyt	Yhteensä
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta Screen -testimenetelmä	JAK2 V617F -mutaatio löytyi	139	3	142
	Epäselvä tulos	5	17	22
	JAK2 villityyppi Mutaatiota ei löytynyt	3	61	64
Yhteensä		147	81	n = 228

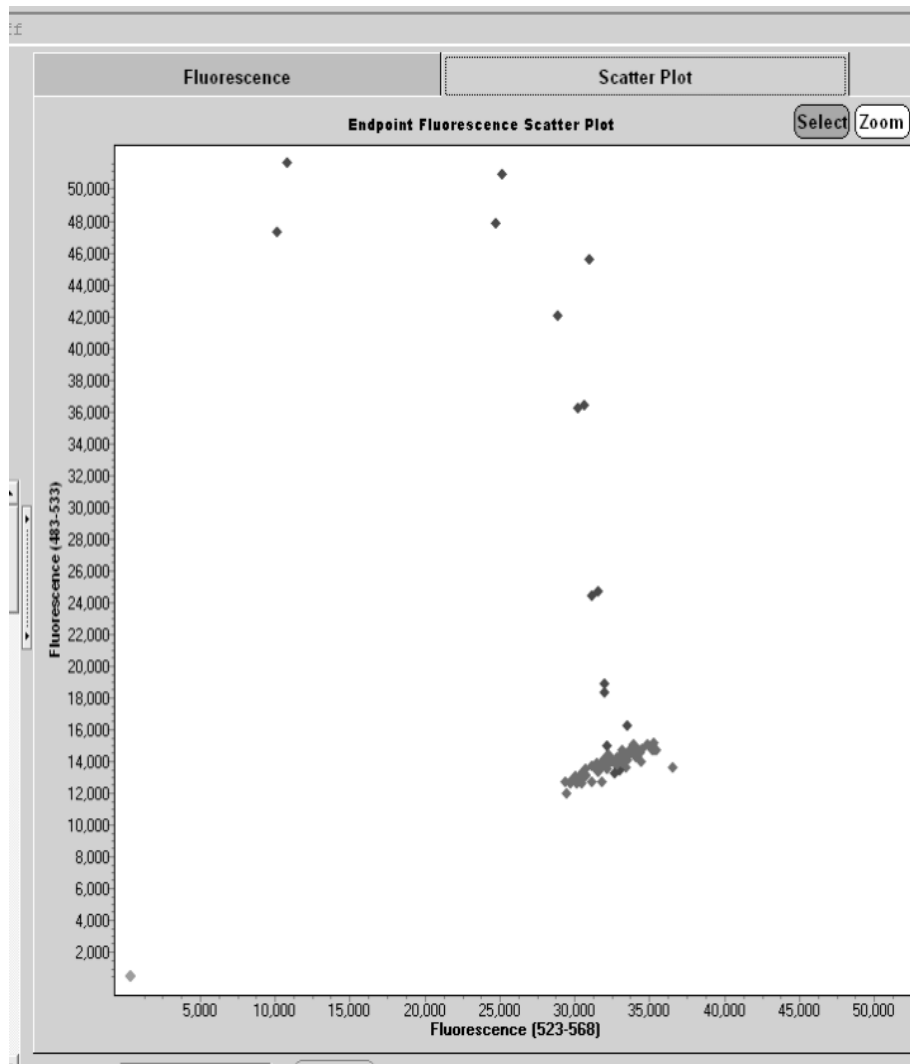
Taulukko 23. Menetelmien vertailu: *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit -sarja ja paikalliset menetelmät

	Yhtäpitävyys (%)	95 %:n luottamusväli* (%)
Positiiviset tiedot		
Yhtäpitävyys <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit -sarjan ja paikallisten menetelmien välillä	97,9	94,0-99,3
Negatiiviset tiedot		
Yhtäpitävyys <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit -sarjan ja paikallisten menetelmien välillä	95,3	87,1-98,4
Yhtäpitävyys yhteensä	97,1	93,8-98,7

* Luottamusvälien laskenta perustui ohjeeseen CLSI EP12 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline.

Varmuus: terveiltä luovuttajilta saatujen näytteiden testaus

103 terveeltä verenluovuttajalta saatuja DNA-näytteitä analysoitiin *ipsogen* JAK2 Muta *Screen* Kit-sarjalla. Kaikki näytteet tunnistettiin villityypin JAK2 näytteiksi. Kuvassa 34 esitetään LightCycler 480 -laitteella tehty 38 näytteen analyysi.



Kuva 34. Terveiden luovuttajien analyysi. 38 terveen luovuttajan analysointi LightCycler 480 -laitteella (◆) ja *ipsogen*JAK2 Muta *Screen*RS Kit -sarjalla (luettelonumero 673123). Kaksi kertaa saadut positiiviset tulokset (◆) vastaavat sarjan mukana toimitettua vertailusteikkaa. VIC-fluoresenssiarvot ovat x-akselilla ja FAM-arvot y-akselilla.

Lähde viitteet

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.

Merkinnät

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:



<N>

Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon



Viimeinen käyttöpäivämäärä



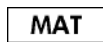
Diagnostinen in vitro -lääkintälaite



Luettelonumero



Eränumero



Materiaalinumero



GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support , soita ilmaisnumeroomme 00800 -22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Luettelonumero
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>ScreenKit</i> (10)	10 reaktiota varten: V617F positiivinen kontrolli, V617F negatiivinen kontrolli, V617F katkaistu näyte, aluke- ja koetinseos JAK2 villityyppi ja JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>ScreenKit</i> (24)	24 reaktiota varten: V617F positiivinen kontrolli, V617F negatiivinen kontrolli, V617F katkaistu näyte, aluke- ja koetinseos JAK2 villityyppi ja JAK2 V617F	673023
Rotor-Gene Q MDx — IVD-validoituun reaaliaikaiseen PCR-analyysiin kliinisessä käytössä		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM- analysointilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM- kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sis. asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM- analysointilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM- kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Tämä tuote on tarkoitettu käytettäväksi in vitro-diagnostiikassa. *ipsogen*-tuotteiden jälleenmyynti, muokkaus jälleenmyyntiä varten tai käyttö kaupallisten tuotteiden valmistukseen on kielletty ilman QIAGENin kirjallista lupaa.

Tässä asiakirjassa olevia tietoja saatetaan muuttaa ilman erillistä ilmoitusta. QIAGEN ei ole vastuussa mistään tässä asiakirjassa mahdollisesti olevista virheistä. Tämän asiakirjan uskotaan olevan julkaisuhetkenään kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, monenkertaisista tai seuraannaisvahingoista, jotka liittyvät tämän asiakirjan käyttöön tai ovat seurausta sen käytöstä.

ipsogen-tuotteille on myönnetty takuu siitä, että ne ovat ilmoitettujen ominaisuuksiensa mukaisia. QIAGENin ainoa velvollisuus ja asiakkaan samaa ainoa korvaus rajoittuvat tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuussa kerrotulla tavalla.

Tätä tuotetta myydään Epoch Biosciencesin lisenssisopimuksen mukaan ainoastaan in vitro -diagnostiikkaa varten, eikä sitä saa käyttää missään muissa tutkimuksissa, kaupallisessa ja kliinisessä tutkimuksessa eikä muissa in vitro -diagnostiikkaan kuulumattomissa käyttökohteissa.

JAK2 V617F -mutaatio ja sen käyttö on suojattu patenttioikeuksilla, mukaan lukien eurooppalainen patentti EP1 692 281, yhdysvaltalaiset patentit 7,429,456 ja 7,781,199, yhdysvaltalaiset patenttihakemukset US20090162849 ja US20120066776 ja niiden ulkomaiset vastineet.

Tämän tuotteen ostaminen ei anna oikeutta sen käyttöön JAK2 V617F -mutaatiota varten tarkoitettujen lääkkeiden kliinisissä lääketutkimuksissa. QIAGEN kehittää nimenomaisia lisenssiohjelmia tällaisia tarkoituksia varten. Lakiosastomme palvelee osoitteessa jak2licenses@qiagen.com.

Tavaramerkit: 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).

Rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjan ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaen seuraavia ehtoja:

1. *ipsogen* JAK2 Muta *ScreenKit* -sarjaa voidaan käyttää ainoastaan *ipsogen* JAK2 Muta *Screen Kit* -sarjan käsikirjan ohjeiden mukaisesti ja ainoastaan yhdessä sarjan sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia osia saa käyttää tai liittää muihin osiin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten *ipsogen* JAK2 Muta *Screen Kit* -sarjan käsikirjassaja lisäprotokollissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com.
2. QIAGEN ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi käännyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asiana jopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetetyt käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

HB-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

www.qiagen.com



1072500 FI 154011606

Sample & Assay Technologies