

Handleiding *ipsogen*[®] JAK2 Muta *Search*[®] Kit



Versie 1

IVD

Kwalitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met instrumenten van Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] en LightCycler[®]



REF 673823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DUITSLAND

R4 **MAT** 1072502NL



QIAGEN Monster - en assaytechnologieën

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster- en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN is toonaangevend op het gebied van :

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek naar microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Het is onze missie om ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken behaalt. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoud

Beoogd gebruik	4
Samenvatting en uitleg	4
Uitgangspunt van de procedure	6
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit	9
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	10
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	11
Algemene voorzorgsmaatregelen	11
Opslag en verwerking reagentia	12
Procedure	13
Bereiding monster-DNA	13
Opslag van nucleïnezuren	13
Protocols	
■ Protocol: qPCR in Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes	14
■ Protocol: qPCR op Applied Biosystems 7500-, ABI PRISM 7900HT- of LightCycler 480-instrumenten	18
■ Protocol: qPCR in het LightCycler 1.2-instrument	22
Interpretatie van de resultaten	26
Berekening en genotypering $\Delta\Delta C_T$ (of $\Delta\Delta C_p$)	26
Controles	29
Problemen oplossen	29
Kwaliteitscontrole	31
Beperkingen	32
Prestatiekenmerken	32
Niet-klinische onderzoeken	32
Klinische onderzoeken	35
Referenties	36
Symbolen	37
Contactgegevens	37
Bestelgegevens	38

Beoogd gebruik

De *ipsogen*JAK2 Muta *Search*Kit is bedoeld voor de detectie van de JAK2 V617F/G1849T-mutatie in genomisch DNA van proefpersonen met verdenking van myeloproliferatieve neoplasma. De afwezigheid van JAK2 V617F/G1849T sluit de aanwezigheid van andere JAK2-mutaties niet uit. Als er extra mutaties voorkomen in de nucleotiden 88,504 tot 88,622 kunnen de testresultaten vals negatief zijn (NCBI-referentie NT_008413).

Opmerking: De kit moet worden gebruikt conform de instructies in deze handleiding en in combinatie met gevalideerde reagentia en instrumenten. Bij afwijkend gebruik van dit product en/of aanpassing van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Samenvatting en uitleg

In 2005 (1–4) werd een terugkerende somatische mutatie ontdekt, V617F, die invloed heeft op het Janus-tyrosinekinase 2-gen (JAK2). Dit leidde tot een belangrijke doorbraak in het begrijpen, classificeren en diagnosticeren van myeloproliferatieve neoplasma (MPN). JAK2 is een cruciaal intracellulair signaalmolecuul voor een aantal cytokinen, waaronder erythropoëtië.

De JAK2 V617F-mutatie is gedetecteerd bij > 95% van de patiënten met polycythaemia vera (PV), 50–60% van de patiënten met essentiële trombocytomie (ET) en 50% van de patiënten met primaire myelofibrose (PMF). JAK2 V617F is ook gedetecteerd bij enkele zeldzame gevallen van chronische myelomonocytaire leukemie, myelodysplastisch syndroom, systemische mastocytose en chronische neutrofiele leukemie, maar bij 0% van de patiënten met CML (5).

De mutatie komt overeen met een enkele nucleotideverandering van JAK2-nucleotide 1849 in exon 14, wat resulteert in een unieke substitutie van valine (V) naar fenylalanine (F) op positie 617 van de proteïne (JH2-domein). Dit leidt tot constitutieve activatie van JAK2, hematopoëtische transformatie in vitro en erythropoëtiëonafhankelijke erythroïde koloniegroei (erythropoëtiëin-independent erythroid colony, EEC) bij alle patiënten met PV en een groot deel van de patiënten met ET en PMF (6). JAK2 V617F vertegenwoordigt een belangrijke factor van de transformatie van hematopoëtische cellen in MPN, maar de exacte pathologische mechanismen met dezelfde unieke mutatie die leiden tot dergelijke verschillende klinische en biologische entiteiten, zijn nog niet volledig verklaard.

Traditioneel werd de diagnose MPN gebaseerd op klinische beenmerghistologie en cytogenetische criteria. De ontdekking van een ziektespecifieke moleculaire merker heeft geleid tot een vereenvoudiging van het proces en toegenomen diagnostische nauwkeurigheid. Detectie van de JAK2 V617F-mutatie maakt nu deel uit van de referentiecriteriën die de WHO in 2008 heeft gesteld voor de diagnose van BCR-ABL-negatieve MPN (tabel 1). De aanwezigheid van deze mutatie is een belangrijk criterium voor bevestiging van de diagnose.

Tabel 1. WHO-criteria voor de diagnose van MPN (aangepast van referentie 7)

Criteria voor een diagnose polycythaemia vera (PV)	
Primair	<p>1. Hemoglobine (Hb) > 18,5 g/dl¹ (mannen) of > 16,5 g/dl¹ (vrouwen) of Hb of hematocriet (Hct) > 99e percentiel van het referentiebereik voor leeftijd, geslacht of hoogte van leefomgeving; of Hb > 17 g/dl¹ (mannen) of > 15 g/dl¹ (vrouwen) indien verband houdend met een aanhoudende toename van ≥ 2 g/dl¹ ten opzichte van het basisniveau die niet kan worden toegeschreven aan het wegnemen van een ijzertekort; of Rodebloedcellenmassa van > 25% boven de gemiddelde normale voorspelde waarde</p> <p>2. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of soortgelijke mutatie</p>
Secundair	<p>1. Myeloproliferatie van drie cellijnen van beenmerg 2. Subnormaal erythropoëtinegehalte in serum 3. Groei endogene erythroïde kolonie (EEC)</p>
Criteria voor een diagnose van essentiële trombocytemie (ET)	
Primair	<p>1. Aantal bloedplaatjes ≥ 450 x 10⁹ l⁻¹ 2. Proliferatie van megakaryocyten met grote en ontwikkelde morfologie. geen of weinig proliferatie van granulocyten of erythroïde proliferatie 3. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor chronische myelomonocyttaire leukemie (CML), PV, primaire myelofibrose (PMF), myelodysplastisch syndroom (MDS) of ander myeloproliferatief neoplasma.</p> <p>4. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of andere klonale merker; of Geen tekenen van reactieve trombocytose</p>
Secundair	-
Criteria voor een diagnose van primaire myelofibrose (PMF)	
Primair	<p>1. Proliferatie van megakaryocyten en atypie in combinatie met ofwel reticuline- en/of collageenfibrose; of Indien er geen sprake is van reticulinefibrose, dient de verandering in megakaryocyten gepaard te gaan met een toegenomen cellulariteit van het beenmerg, proliferatie van granulocyten en dikwijls verminderde erythropoëse (d.w.z. prefibrotische PMF) 2. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor (CML), PV, MDS of ander myeloproliferatief neoplasma</p> <p>3. Aanwezigheid van <i>JAK2V617F</i> of andere klonale merker; of Geen tekenen van reactieve beenmergfibrose</p>
Secundair	<p>1. Leuko-erythroblastose 2. Toename van lactaatdehydrogenase (LDH) in serum 3. Anemie 4. Palpabele splenomegalie</p>

Daarbij wordt de limietwaarde van 1% voor klinische positiviteit met op PCR gebaseerde assays nu in toenemende mate ondersteund door Europese en Amerikaanse experts (8-10).

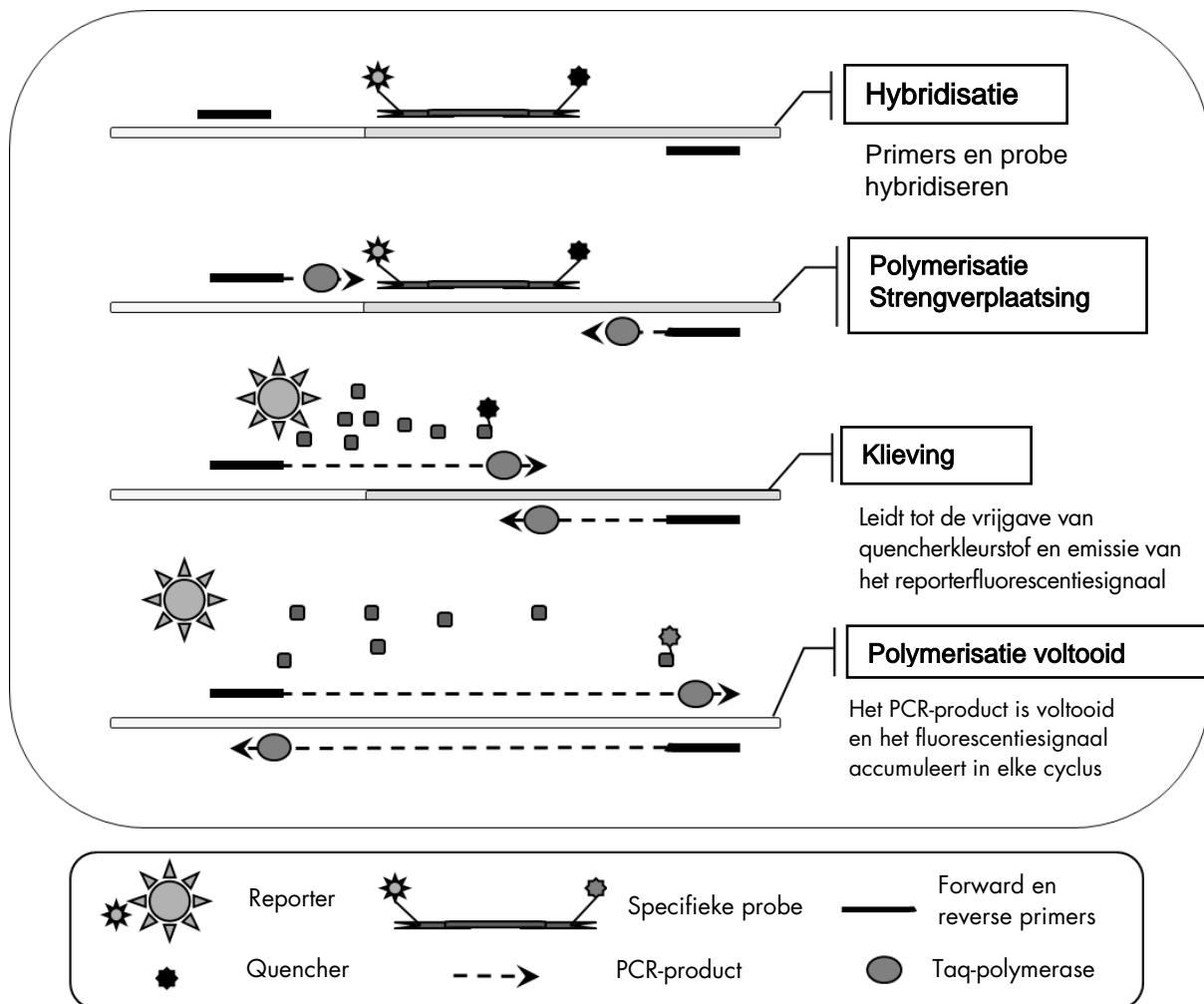
Uitgangspunt van de procedure

Dankzij qPCR is een nauwkeurige kwantificering van PCR-producten tijdens de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces mogelijk. Kwantitatieve PCR-gegevens kunnen snel worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij realtime detectie van fluorescente signalen tijdens en/of na de PCR-cyclus. Zo wordt het risico van contaminatie van het PCR-product drastisch verminderd. Er zijn momenteel 3 hoofdtypen qPCR-technieken beschikbaar: qPCR-analyse met SYBR[®] Green I-kleurstof, qPCR-analyse met hydrolyseprobes en qPCR-analyse met hybridisatieprobes.

Bij deze assay wordt het qPCR-principe van oligonucleotidehydrolyse met twee kleurstoffen benut. Gedurende de PCR worden forward en reverse primers gehybridiseerd volgens een specifieke sequentie. Hetzelfde mengsel bevat een oligonucleotide met twee kleurstoffen. Deze probe, die bestaat uit een oligonucleotide dat is gemerkt met een 5'-reporterkleurstof en een downstream 3'-quencher met kleurstof, hybridiseert tot een doelsequentie in het PCR-product. Bij de qPCR-analyse met hydrolyseprobes wordt gebruikgemaakt van de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase van *Thermus aquaticus* (*Taq*). Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterkleurstof ten opzichte van de quencherkleurstof in suppressie van de reporterfluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht.

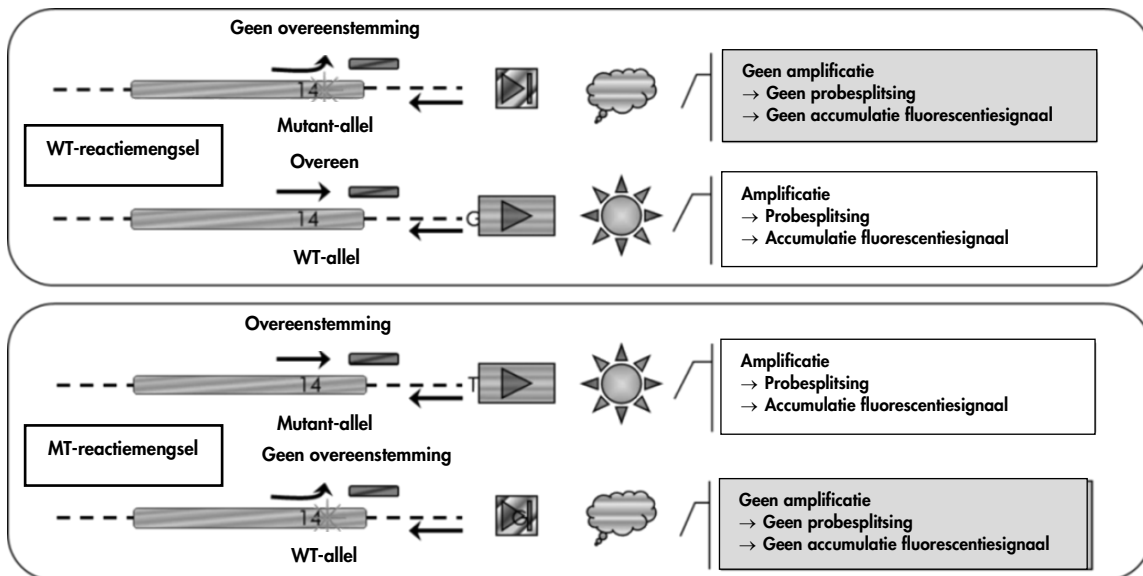
Als het gewenste doel tijdens de PCR aanwezig is, hybridiseert de probe zich vooral tussen de plekken met forward en reverse primer. Door de 5'→3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase wordt de probe alleen tussen de reporter en quencher gespleten als de probe aan het doel hybridiseert. De probefragmenten worden vervolgens verplaatst van het doel en polymerisatie van de streng gaat verder. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (afbeelding 1). Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet.

De toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie complementair is aan de probe en zodoende tijdens de PCR wordt geamplificeerd. Vanwege deze vereisten wordt niet-specifieke amplificatie niet gedetecteerd. De fluorescentietoename is daarom direct proportioneel aan de doelamplificatie gedurende de PCR.



Afbeelding 1. Reactieprincipe.

De allelspecifieke PCR-technologie die in deze assaykit wordt gebruikt, maakt gevoelige, accurate en in grote mate reproduceerbare detectie van SNP's mogelijk. Deze techniek is gebaseerd op het gebruik van specifieke forward primers voor het wildtype en V617F-allel. Alleen bij perfecte overeenstemming van de primer en het doel-DNA is extensie en amplificatie in de PCR mogelijk (afbeelding 2).



Afbeelding 2. Allelspecifieke PCR. Door het mengsel van wildtype- of V617F-primers en een probe is specifieke detectie mogelijk van het wildtype-allel of mutant-allel in twee afzonderlijke reacties die met hetzelfde monster plaatsvinden.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>ipsogen JAK2 Muta Search Kit</i>		(24)
Catalogusnr.		673823
Aantal reacties		24
Positive control (positieve controle) V617F	PC-VF JAK2	40 µl
Negative control (negatieve controle) V617F	NC-VF JAK2	40 µl
Cut-off sample (drempelmonster) (1% V617F-allel)	COS-VF JAK2	40 µl
Primers and probe mix (Mengsel van primers en probe) JAK2 V617F*	PPMJAK2 V617F 25x	68 µl
Primers and probe mix (Mengsel van primers en probe) JAK2 WT†	PPM-JAK2 WT 25x	68 µl
<i>ipsogen JAK2 Muta Search Kit Handbook</i> (English) (Handleiding <i>ipsogen JAK2 Muta Search Kit</i> [Engels])		1

* Mengsel van bepaalde reverse en forward primers voor het *JAK2* gen, plus een specifieke V617F FAMTM-TAMRATM-probe.

† Mengsel van bepaalde reverse en forward primers voor het *JAK2* gen, plus een specifieke wildtype FAM-TAMRA-probe.

Opmerking: Centrifugeer de buisjes kort voor gebruik.

Opmerking: Voor het analyseren van onbekende monsters met de *ipsogen JAK2 Muta Search Kit* moet genomisch DNA worden geëxtraheerd. Reagentia die nodig zijn voor de extractie van DNA worden niet meegeleverd en moeten worden gevalideerd in combinatie met de kit.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (safety data sheets, SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Reagentia

- Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit
- Nucleasevrij 1 x TE-buffer, pH 8,0
- Buffer en *Taq*DNA-polymerase: De gevalideerde reagentia zijn TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., cat.nr. 4304437) en LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat.nr. 04535286001) of LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, cat.nr. 03515567001)
Opmerking: Dit mastermengsel kan alleen worden gebruikt voor LightCycler 1.2
- Reagentia voor 0,8–1% agarosegel in 0,5x TBE-elektroforesebuffer

Verbruiksartikelen

- Nuclease-free aerosol-resistant sterile PCR pipet tips with hydrophobic filters (nucleasevrije, aerosol-resistente, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters)
- PCR-buisjes van 0,5 ml of 1,5 ml zonder RNase en DNase
- Ijs

Apparaat

- Microliterpipetten* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Tafelcentrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 0,5 ml/1,5 ml (die een snelheid van 10.000 rpm kan halen)
- Spectrofotometer* voor DNA-kwantificering
- Realtime PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM of andere Rotor-Gene Q-instrumenten; LightCycler 1.2 of 480; Applied Biosystems 7500 realtime PCR-systeem of ABI PRISM 7900HT SDS; en bijbehorend specifiek materiaal

*Zorg ervoor dat de instrumenten volgens de aanbevelingen van de fabrikant zijn gecontroleerd en gekalibreerd.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen. Deze zijn als handige, compacte PDF-bestanden online beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook het VIB voor elke QIAGEN-kit en elke component van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

Gooi monster- en assayafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor de uitvoering van qPCRtesten zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die geschikt zijn voor moleculaire biologie en voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in-vitrodiagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn gevalideerd voor optimale prestaties. Verdere verdunning van de reagentia of het hanteren van andere incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve of tegenstrijdige gegevens. PPMJAK2-reagentia kunnen veranderen bij blootstelling aan licht. Alle reagentia zijn specifiek samengesteld voor gebruik met deze test. Voor een optimale werking van de test mogen er geen vervangende materialen worden gebruikt.

Wees zorgvuldig ter voorkoming van:

- contaminatie door DNase die kan leiden tot degradatie van het template-DNA
- contaminatie door achtergebleven DNA- of PCR-materiaal, wat resulteert in een vals positief signaal

Wij adviseren u daarom het volgende:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosol-resistente pipettips ter voorkoming van kruiscontaminatie van de monsters en reagentia.
- Bereid voorafgaand aan PCR een mastermengsel met behulp van speciaal daarvoor bestemde materialen (pipetten, tips, etc.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen DNA-matrijzen (DNA, PCR-product) worden verwerkt. Voeg de template toe in een afzonderlijke zone (bij voorkeur in een andere ruimte) met specifiek materiaal (pipetten, tips, etc.).

Opslag en verwerking reagentia

De kits worden op droog ijs verzonden en moeten na ontvangst bij -30 °C tot -15 °C worden bewaard.

- Stel de primer-probemengsels (PPM-JAK2-buisjes) zo min mogelijk bloot aan licht.
- Meng en centrifugeer de buisjes voorzichtig voordat u ze opent.
- Bewaar alle kitcomponenten in de originele verpakking.

Deze opslagomstandigheden gelden voor zowel geopende als ongeopende componenten. Componenten die onder andere omstandigheden dan de op de etiketten vermelde omstandigheden worden bewaard, werken mogelijk niet naar behoren en kunnen de assayresultaten negatief beïnvloeden.

De vervaldatum van de verschillende reagentia staan vermeld op de etiketten van de afzonderlijke componenten. Onder de juiste opslagcondities blijft de werking van het product optimaal tot aan de vervaldatum die op het etiket staat vermeld.

Er zijn geen duidelijke tekenen die duiden op instabiliteit van dit product. U moet echter wel gelijktijdig positieve en negatieve controles met onbekende monsters uitvoeren.

Procedure

Bereiding monster -DNA

Genomisch DNA moet worden verkregen uit volbloed, gezuiverde lymfocyten uit perifeer bloed, polynucleaire cellen of granulocyten. Voor vergelijkbare resultaten adviseren wij om dezelfde cellulaire fractie en DNAextractiemethode te gebruiken. DNA-extractie moet worden uitgevoerd volgens een eigen of in de handel verkrijgbare methode.

De DNA-kwantiteit wordt bepaald door de optische dichtheid te meten bij 260 nm. De DNA-kwaliteit moet worden beoordeeld door middel van spectrofotometrie of gelelektroforese.

De verhouding A_{260}/A_{280} moet 1,7–1,9 zijn. Kleinere ratio zijn doorgaans een indicatie voor contaminatie door proteïnen of organische chemicaliën. Met behulp van elektroforetische analyse van een agarosegel van 0,8–1,0% kan het geïsoleerde DNA worden gevisualiseerd als een duidelijke strook van ongeveer 20 kb. Een lichte afwijking is acceptabel.

Het resulterende DNA wordt verdund tot 5 ng/ μ l in TE-buffer. De qPCR-reactie is geoptimaliseerd voor 25 ng gezuiverd genomisch DNA.

Opslag van nucleïnezuren

Voor kortdurende opslag (maximaal 24 uur) adviseren we gezuiverde nucleïnezuren te bewaren bij 2–8 °C. Voor langdurige opslag (langer dan 24 uur) adviseren we opslag bij -20 °C.

Protocol: qPCR in Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

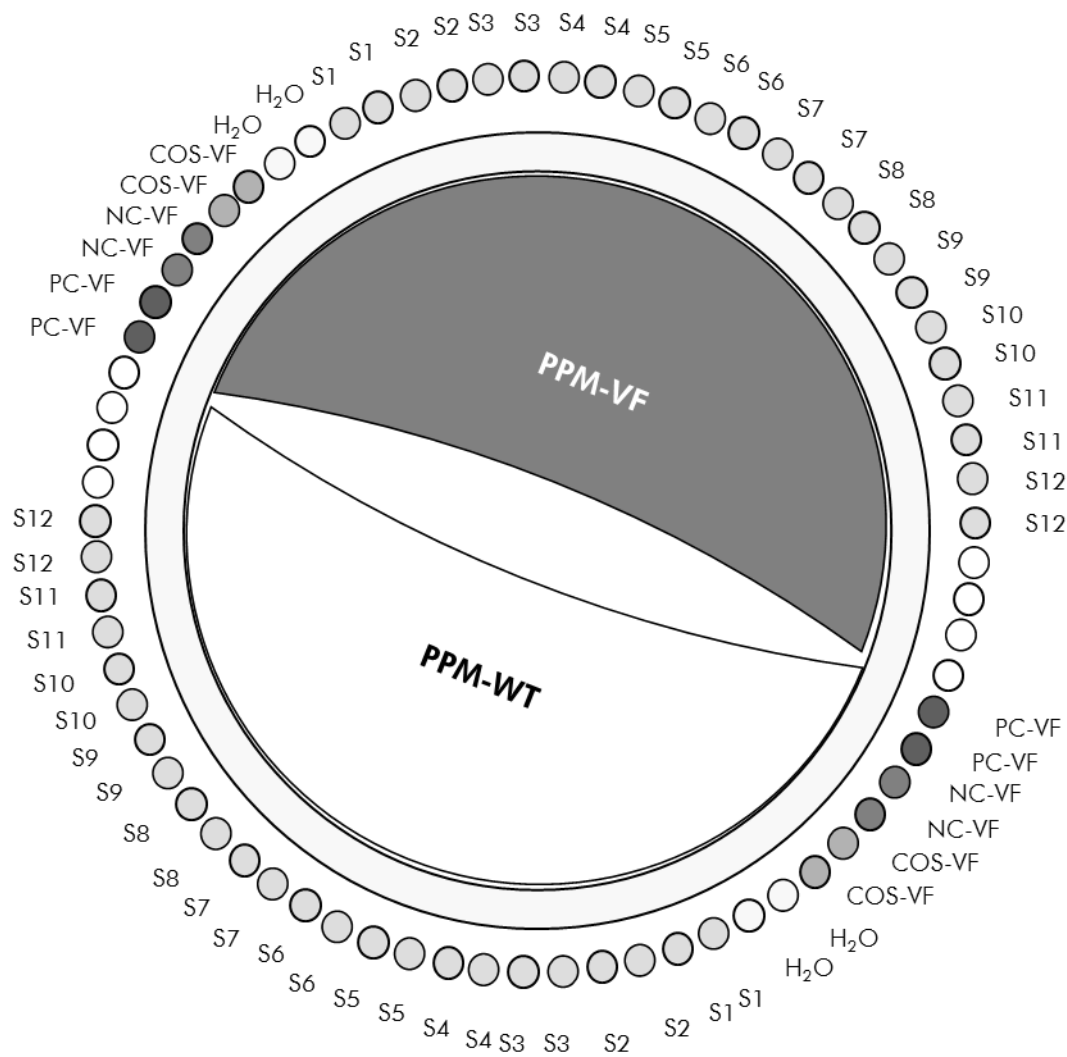
Wanneer u dit instrument gebruikt, adviseren we u alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 2.

Tabel 2. Aantal reacties in een Rotor-Gene Q-instrument met rotor voor 72 buisjes

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA-monsters	n x 2 reacties
3 DNA-controles	6 reacties, (PC-VF, NC-VF, en COS-VF, elke reactie tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties
Met het JAK2 WT-primer-probemengsel (PPM-JAK2 WT)	
n DNA-monsters	n x 2 reacties
3 DNA-controles	6 reacties, (PC-VF, NC-VF, en COS-VF, elke reactie tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties

Monsterverwerking met Rotor-Gene Q-instrumenten met rotor voor 72 buisjes

We adviseren u om ten minste 12 DNA-monsters in hetzelfde experiment te testen om zo optimaal gebruik te maken van de standaarden en de primer-probemengsels. In afbeelding 3 (volgende pagina) ziet u het rotorschema voor een dergelijk experiment.



Afbeelding 3. Aanbevolen rotorinstelling voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta *Search* Kit. PC-VF: positive control (positieve controle); NC-VF: negative control (negatieve controle); COS-VF: cut-off sample (drempelmonster); S: DNA-monster; H₂O: watercontrole.

Opmerking: Let erop dat u het monster dat u wilt testen altijd in buispositie 1 van de rotor plaatst. Als u dit niet doet, wordt er tijdens de kalibratiestap geen kalibratie uitgevoerd en worden er onjuiste fluorescentiegegevens verkregen.

Plaats lege buisjes in alle andere posities.

qPCR in Rotor-Gene Q-instrumenten met een rotor voor 72 buisjes

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.

Ongeveer 10 minuten voordat de procedure wordt gestart, moeten de onderdelen uit de vriezer worden gehaald.

2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kort (circa 10 seconden bij 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
3. Bereid de volgende qPCR-mengsels op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 3 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om eventuele pipetteerfouten te compenseren.

Tabel 3. Bereiding van qPCR-mengsels

Bestanddeel	1 reactie (µl)	VF: 32 + 1 reacties (µl)	WT: 32 + 1 reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
TaqMan Universal PCR- mastermengsel, 2x	12,5	412,5	412,5	1×
Primer- probemengsel, 25x (VF of WT, respectievelijk)	1	33	33	1×
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	6,5	214,5	214,5	–
Monster (toevoegen in stap 6)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	–

4. Vortex en centrifugeer ieder qPCR-mengsel (VF and WT) kort (circa 10 seconden bij 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
5. Vul ieder buisje met 20 µl van het betreffende qPCR-voormengsel (VF or WT).
6. Breng 5 µl van het DNA-monstermateriaal of de controles over naar het betreffende buisje (totaal volume 25 µl).

7. Meng de inhoud voorzichtig door op en neer te pipetteren.
8. Sluit de PCR-buisjes af. Plaats de buisjes in de rotor voor 72 buisjes volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Plaats lege buisjes in alle andere posities.
9. Programmeer het Rotor -Gene Q -instrument met het programma voor thermisch cycleren zoals vermeld in tabel 4.

Tabel 4. Temperatuurprofiel

Analysemodus	Kwantificatie
Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 min
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 s 62 °C gedurende 1 min. met acquisitie van FAM-fluorescentie in kanaal Groen: enkel

10. Start het in tabel 4 aangegeven thermocyclerprogramma.
11. Selecteer bij Rotor -Gene Q -instrumenten 'Slope correct' (Hellingcorrectie) voor de analyse. We adviseren u de drempelwaarde in te stellen op 0,03.

Protocol: qPCR op Applied Biosystems7500-, ABI PRISM 7900HT- of LightCycler 480-instrumenten

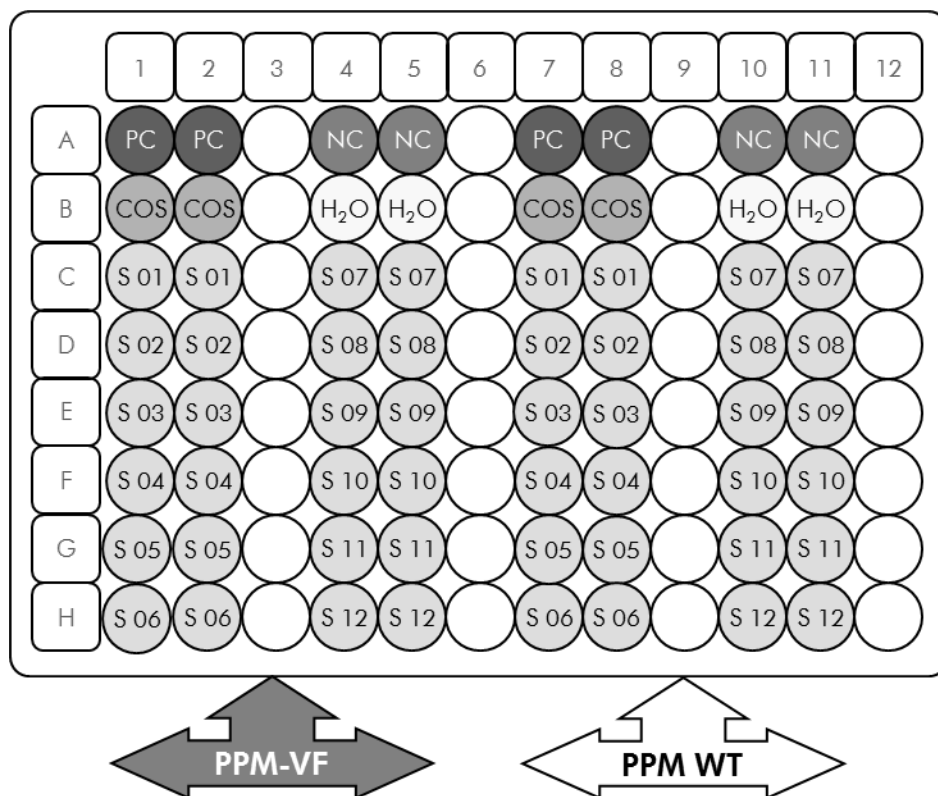
Wanneer u een qPCR-instrument met een plaat voor 96 wells gebruikt, raden we u aan alle metingen twee keer uit te voeren, zoals vermeld in tabel 5.

Tabel 5. Aantal reacties voor Applied Biosystems7500-, ABI PRISM 7900HT- of LightCycler 480-instrumenten

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA-monsters	n x 2 reacties
3 DNA-controles	6 reacties, (PC-VF, NC-VF, en COS-VF, elke reactie tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties
Met het JAK2 WT-primer-probemengsel (PPM-JAK2 WT)	
n DNA-monsters	n x 2 reacties
3 DNA-controles	6 reacties, (PC-VF, NC-VF, en COS-VF, elke reactie tweemaal getest)
Watercontrole	2 reacties

Monsterverwerking op Applied Biosystems 7500-, ABI PRISM 7900HT- of LightCycler 480-instrumenten

We adviseren u om ten minste 12 DNA-monsters in hetzelfde experiment te testen om zo optimaal gebruik te maken van de standaarden en de primer-probemengsels. Het plaatdiagram in afbeelding 4 toont een voorbeeld van een dergelijke proef.



Afbeelding 4. Aanbevolen plaatinstelling voor een experiment met de *ipsogen JAK2* Muta *Search Kit*. PC: positive control (positieve controle); NC: negative control (negatieve controle); COS: cut-off sample (drempelmonster); S: DNA-monster; H₂O: watercontrole.

qPCR op Applied Biosystems 7500-, ABI PRISM 7900HT- of LightCycler 480-instrumenten

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
Ongeveer 10 minuten voordat de procedure wordt gestart, moeten de onderdelen uit de vriezer worden gehaald.
2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kort (circa 10 seconden bij 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
3. Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 6 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 25 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om eventuele pipetteerfouten te compenseren.

Tabel 6. Bereiding van het qPCR-mengsel

Bestanddeel	1 reactie (μ l)	VF: 32 + 1 reacties (μ l)	WT: 32 + 1 reacties (μ l)	Uiteindelijke concentratie
TaqMan Universal PCR- mastermengsel, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primer- probemengsel, 25x (VF of WT, respectievelijk)	1	33	33	1x
Nucleasevrij water van PCR- kwaliteit	6,5	214,5	214,5	–
Monster (toevoegen in stap 6)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	25 elk	–

4. Vortex en centrifugeer ieder qPCR-mengsel (VF and WT) kort (circa 10 seconden bij 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
5. Vul iedere well met 20 μ l van het betreffende qPCR-voormengsel (VF of WT).
6. Breng 5 μ l van het DNA-monstermateriaal of de controles over naar de betreffende well (totaal volume 25 μ l).
7. Meng de inhoud voorzichtig door op en neer te pipetteren.
8. Sluit de plaat en centrifugeer kort (circa 10 s bij 300 *g*).
9. Plaats de plaat in de thermocycler volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
10. Programmeer de thermocycler met het programma voor thermisch cycleren zoals vermeld in tabel 7 voor de Applied Biosystems 7500 en ABI PRISM 7900HT SDS of zoals vermeld in tabel 8 voor het LightCycler 480 -instrument.

Tabel 7. Temperatuurprofiel voor de Applied Biosystems 7500 en ABI PRISM 7900HT SDS

Analysemodus	Standaardcurve— absolute kwantificering
Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 min
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 s 63 °C gedurende 1 min. en 30 seconden met acquisitie van FAM-fluorescentie: Enkelkanaals; quencher: TAMRA

Tabel 8. Temperatuurprofiel van het LightCycler 480 -instrument

Analysemodus	Absolute kwantificering ('Abs Quant')
Detection formats (Detectievormen)	Selecteer 'Simple Probe' (Enkele probe) in het venster 'Detection formats' (Detectievormen)
Hold (Constant)	Temperatuur: 50 °C Tijd: 2 min
Hold (Constant) 2	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cyclus	50 keer 95 °C gedurende 15 s 63 °C gedurende 1 min. en 30 seconden met acquisitie van FAM-fluorescentie overeenkomend met (483-533 nm) voor LC versie 01 en (465-510 nm) voor LC versie 02: enkel

11. Volg stap 11a voor de Applied Biosystems 7500 en ABI PRISM 7900HT SDS. Volg stap 11b voor het LightCycler 480 -instrument.
- 11a. Applied Biosystems 7500 en ABI PRISM 7900HT SDS: We adviseren u om in de analysestap de drempelwaarde in te stellen op 0,1. Start het in tabel 7 aangegeven cyclusprogramma.
- 11b. LightCycler 480 -instrument: we adviseren een analysemodus met passende meetpunten met een achtergrond op 2,0 en een drempel op 2,0. Start het in tabel 8 aangegeven thermocyclerprogramma.

Protocol: qPCR in het LightCycler 1.2-instrument

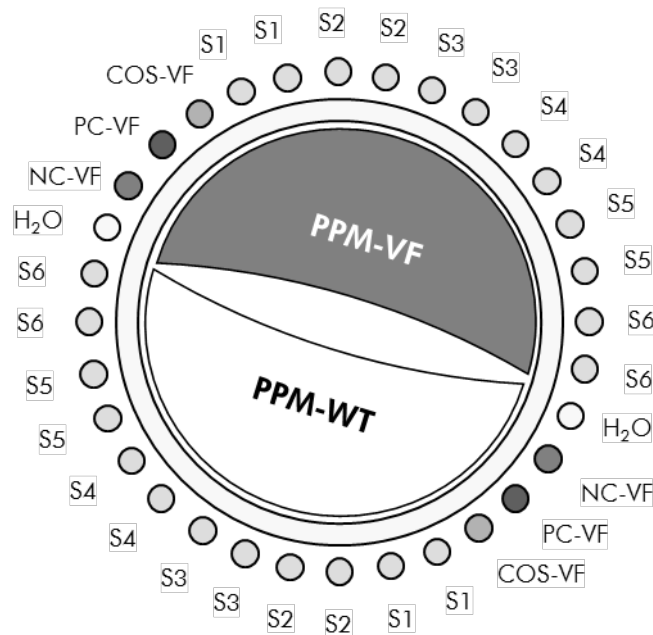
Wanneer u een instrument met capillaire buisjes gebruikt, raden we u aan de monsters tweemaal en de controles eenmaal te meten, zoals vermeld in tabel 9.

Tabel 9. Aantal reacties met het LightCycler 1.2-instrument

Monsters	Reacties
Met het JAK2 V617F-primer-probemengsel (PPM-JAK2 V617F)	
n DNA-monsters	n x 2 reacties
3 DNA-controles	3 reacties, (PC-VF, NC-VF en COS-VF, elke reactie eenmaal getest)
Watercontrole	1 reactie
Met het JAK2 WT-primer-probemengsel (PPM-JAK2 WT)	
n DNA-monsters	n x 2 reacties
3 DNA-controles	3 reacties, (PC-VF, NC-VF en COS-VF, elke reactie eenmaal getest)
Watercontrole	1 reactie

Monsterverwerking in het LightCycler 1.2-instrument

We adviseren om 6 DNA-monsters in hetzelfde experiment te testen om zo optimaal gebruik te maken van de controles en de primer-probemengsels. In afbeelding 5 ziet u het schema van capillaire buisjes voor een dergelijk experiment.



Afbeelding 5. Aanbevolen rotorinstelling voor een experiment met de *ipsogen* JAK2 Muta *Search* Kit. PC-VF: positive control (positieve controle); NC-VF: negative control (negatieve controle); COS: cut-off sample (drempelmonster); S: DNA-monster; H₂O: watercontrole.

qPCR in het LightCycler 1.2-instrument

Opmerking: Vanwege bepaalde technologische vereisten moeten experimenten met de LightCycler 1.2 met specifieke reagentia worden uitgevoerd. We raden u aan de LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe te gebruiken en de instructies van de fabrikant op te volgen voor de bereiding van het mastermengsel 5x.

Opmerking: Voer alle stappen uit op ijs.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde componenten en leg ze op ijs.
Ongeveer 10 minuten voordat de procedure wordt gestart, moeten de onderdelen uit de vriezer worden gehaald.
2. Vortex en centrifugeer alle buisjes kort (circa 10 seconden bij 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
3. Bereid het volgende qPCR-mengsel op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In tabel 10 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één reagensmengsel, berekend voor een uiteindelijk reactievolume van 20 µl. U kunt een voormengsel op basis van het aantal reacties bereiden met behulp van hetzelfde primer-probemengsel. Het extra volume is opgenomen om eventuele pipetteerfouten te compenseren.

Tabel 10. Bereiding van het qPCR-mengsel

Bestanddeel	1 reactie (μ l)	VF: 16+ 1 reacties (μ l)	WT: 16+ 1 reacties (μ l)	Uitein- delijke concentra- tie
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 5x	4	68	68	1x
Primer- probemengsel, 25x (VF of WT, respectievelijk)	0,8	13,6	13,6	1x
Nucleasevrij water van PCR-kwaliteit	10,2	173,4	173,4	–
Monster (toevoegen in stap 6)	5	5 elk	5 elk	–
Totaal volume	20	20 elk	20 elk	–

4. Vortex en centrifugeer ieder qPCR-mengsel (VF and WT) kort (circa 10 seconden bij 10.000 tpm, zodat de vloeistof zich onder in het buisje bevindt).
5. Vul ieder capillairbuisje met 15 μ l van het betreffende qPCR-voormengsel (VF of WT).
6. Breng 5 μ l van het DNA-monstermateriaal of de controles over naar het betreffende capillairbuisje (totaal volume 20 μ l).
7. Meng de inhoud voorzichtig door op en neer te pipetteren.
8. Sluit de capillairbuisjes en centrifugeer kort (circa 5 s bij 500 g).
9. Laad de capillaire buisjes volgens de instructies van de fabrikant in de thermocycler.
10. Stel het LightCycler 1.2 -instrument in op het thermocyclerprogramma zoals aangegeven in tabel 11.

Tabel 11. Temperatuurprofiel

Analysemodus	Kwantificatie
Hold (Constant)	Temperatuur: 95 °C Tijd: 10 min
Cycling (Cyclus)	50 keer 95 °C gedurende 15 s 66 °C gedurende 1 min. met acquisitie van FAM-fluorescentie: enkel

11. Bij gebruik van de LightCycler 1.2 wordt de modus F1/F2 en '2nd derivative analysis' (2e afgeleide analyse) aanbevolen. Start het in tabel 11 aangegeven thermocyclerprogramma.

Interpretatie van de resultaten

Berekening en genotypering $\Delta\Delta C_T$ (of $\Delta\Delta C_p$)

Extraheer geëxporteerde gegevens van het door het systeem gemaakte exportbestand van de analyse en analyseer de resultaten zoals hieronder beschreven.

Opmerking: C_T -waarden zijn resultaten die zijn verkregen met Rotor-Gene-, Applied Biosystems- en ABI PRISM-systemen. C_p -waarden, verkregen met LightCycler-systemen, mogen in onderstaande beschrijving worden vervangen door C_T -waarden. De weergegeven berekeningen van C_T -waarden kunnen op dezelfde manier worden toegepast op C_p -waarden.

BELANGRIJK: Als bij zowel PPM-JAK2 WT als PPM-JAK2 VF geen amplificatie wordt waargenomen (d.w.z. 'niet gedetecteerd', $C_T > 45$ of $C_p > 45$, afhankelijk van het gebruikte instrument), kunnen de resultaten niet worden geanalyseerd. Deze resultaten geven aan dat de concentratie DNA in het monster niet binnen het acceptabele bereik was of dat de DNA-matrijs is vergeten. Ga anders verder met de analyse zoals hieronder beschreven.

Procedure

1. Bereken voor ieder monster (controls, cut-off sample en unknown samples; controles, het drempelmonster en onbekende monsters) de gemiddelde C_T -waarde die is verkregen met PPM-JAK2 V617F (Gemiddelde C_T VF) en PPM-JAK2 WT (Gemiddelde C_T WT).

Neem duplicaten van een monster die een 'onbekende' waarde hebben niet mee in de berekening: gebruik alleen de verkregen waarden van het andere duplicaat. In een dergelijk geval adviseren wij dringend om het monster opnieuw te testen.

Stel de monsterwaarde in op 45 als beide duplicaten onbekend zijn.

2. Bereken de invoerlimiet (IL) volgens onderstaand schema.

$$\text{Invoerlimiet (IL)} = \text{Gemiddelde } C_T \text{ WT voor COS} + 3,3$$

Opmerking: Dankzij de invoerlimiet kan worden gecontroleerd of er op de juiste manier is omgegaan met het DNA-monster van de patiënt dat is gebruikt voor de test, zodat de uiteindelijk verkregen JAK2 V617F-statusresultaten kunnen worden gegarandeerd.

- Controleer de kwaliteit van ieder onbekend monster conform tabel 12.

Tabel 12. Criteria voor monsterkwaliteit

Als:	Dan:
Gemiddelde C_T VF < 40	Ga verder met stap 4.
Gemiddelde C_T VF \geq 40 en Gemiddelde C_T WT < IL	Ga verder met stap 4.
Gemiddelde C_T VF \geq 40 en Gemiddelde C_T WT \geq IL	Monster kan niet worden geanalyseerd.*

*De concentratie DNA in het monster was niet binnen het acceptabele bereik of de DNA-matrijs is vergeten.

- Bereken de ΔC_T -waarde van alle geldige monsters ($\Delta C_{T\text{-monster}}$) en controles ($\Delta C_{T\text{PC-VF}}$, $\Delta C_{T\text{NC-VF}}$ en $\Delta C_{T\text{COS}}$) volgens onderstaand schema.

$$\Delta C_T = \text{Gemiddelde } C_T \text{ VF} - \text{Gemiddelde } C_T \text{ WT}$$

- Bereken de $\Delta\Delta C_T$ -waarde van ieder onbekend monster ($\Delta\Delta C_{T\text{-monster}}$) en iedere controle ($\Delta\Delta C_{T\text{PC-VF}}$ en ($\Delta\Delta C_{T\text{NC-VF}}$) volgens onderstaand schema's.

$$\Delta\Delta C_{T\text{-monster}} = \Delta C_{T\text{COS}} - \Delta C_{T\text{-monster}}$$

$$\Delta\Delta C_{T\text{PC-VF}} = \Delta C_{T\text{COS}} - \Delta C_{T\text{PC-VF}}$$

$$\Delta\Delta C_{T\text{NC-VF}} = \Delta C_{T\text{COS}} - \Delta C_{T\text{NC-VF}}$$

- Bereken de grijze zone, of het onzekere gebied, rond de OS-VF volgens onderstaand schema.

Opmerking: De grijze zone (GZ) van een test is een gebied met waarden waarin de discriminatoire prestatie niet nauwkeurig genoeg is. Een waarde in de grijze zone geeft aan dat de doelmerker niet kan worden gerekend als aanwezig of afwezig. Voor ieder experiment moet de grijze zone worden berekend. Op basis van variaties die zijn waargenomen tijdens precisieonderzoeken (zie pagina Prestatiekenmerken van '32') is de GZ vastgesteld op $\pm 7\%$ van het $\Delta C_{T\text{COS}}$.

Deze berekening is geldig voor alle experimenten en bij alle aanbevolen experimenten.

$$\text{GZ: } [(-\Delta C_{T\text{COS}} \times 0,07); (+ \Delta C_{T\text{COS}} \times 0,07)]$$

7. Bepaal het genotype van onbekende monsters conform tabel 13. In tabel 14 wordt een voorbeeld weergegeven van berekeningen en de interpretatie van resultaten voor een representatief experiment.

Tabel 13. Interpretatie van resultaten op het gebied van genotypering

Resultaten	Interpretatie
$\Delta\Delta C_{T\text{-monster}} > + \Delta C_{TCOS} \times 0,07$	JAK2 V617F-mutatie gedetecteerd.
$\Delta\Delta C_{T\text{-monster}} < -\Delta C_{TCOS} \times 0,07$	Geen JAK2 V617F-mutatie gedetecteerd.
$\Delta\Delta C_{T\text{-monster}}$ binnen de GZ $(-\Delta C_{TCOS} \times 0,07 \leq \Delta\Delta C_{T\text{-monster}} \leq + \Delta C_{TCOS} \times 0,07)$	Onduidelijk resultaat.

Tabel 14. Voorbeeld van berekeningen en de interpretatie van resultaten voor een representatief experiment.

Monster	C_T VF	Gemiddelde C_T VF	C_T WT	Gemiddelde C_T WT	ΔC_T	ΔC_T	Evaluatie
PC	27,82	27,74	40,27	40,24	-	12,50	20,12
PC	27,66		40,20				
NC	41,23	41,10	26,66	26,76	14,34	-6,72	Negatief
NC	40,96		26,85				
COS	35,04	34,85	27,28	27,23	7,62	0	IL= 30,53 GZ: -0,53 tot + 0,53
COS	34,66		27,17				
Monster 1	42,15	41,63	28,86	28,80	12,83	-5,21	Negatief
Monster 1	41,10		28,73				
Monster 2	30,54	30,73	28,99	29,10	1,63	5,99	Positief
Monster 2	30,92		29,20				
Monster 3	37,31	37,71	30,11	30,22	7,49	0,13	Onduidelijk (binnen de GZ)
Monster 3	38,11		30,33				
Monster 4	45	45	39,25	38,85	Kan niet worden geanalyseerd (Gemiddelde C_T VF > 40 en Gemiddelde C_T WT > IL)		
Monster 4	45		38,45				

Controles

De watercontrole zou bij zowel JAK2 V617F als JAK2 WT geen C_T- of C_p-waarde moeten geven. Een C_T- of C_p-waarde van een watercontrole kan duiden op kruisbesmetting. Zie 'Problemen oplossen' hieronder.

De PC-VF moet worden geïnterpreteerd als een monster waarbij de JAK2 V617F-mutatie is gedetecteerd.

NC-VF moet worden geïnterpreteerd als een monster waarbij de JAK2 V617F-mutatie niet is gedetecteerd.

Zie 'Problemen oplossen' hieronder voor meer informatie over de interpretatie van onjuiste resultaten.

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de pagina met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers van de afdeling Technische services van QIAGEN geven graag antwoord op uw vragen over de informatie of protocollen in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (zie 'Contactgegevens' op pagina 37 voor contactgegevens).

Opmerkingen en suggesties

Positive control (positieve controle) met een negatief signaal

- | | |
|---------------------------------------|---|
| a) Pipetteerfout | Controleer het pipetteschema en de instellingen van de reactie.
Herhaal de PCR-run. |
| b) Onjuiste opslag van kitcomponenten | Bewaar de <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>SearchKit</i> bij -30 tot -15 °C en stel het primer-probemengsel (PPM) niet bloot aan licht. Zie 'Opslag en verwerking reagentia' op pagina 12.
Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.
Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag. |

Opmerkingen en suggesties

Negatieve controles zijn positief of positieve controles zijn positief bij het verkeerde PPM

- | | |
|-------------------|--|
| Kruiscontaminatie | Vervang alle kritieke reagentia.
Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.
Hanteer de monsters, kitcomponenten en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden om contaminatie door achtergebleven materiaal te voorkomen. |
|-------------------|--|

Geen signaal, zelfs niet bij positieve controles

- | | |
|--|--|
| a) Pipetteerfout of reagentia vergeten | Controleer het pipetteschema en de instellingen van de reactie.
Herhaal de PCR-run. |
| b) Remmende effecten van het monstermateriaal veroorzaakt door onvoldoende zuivering | Herhaal de DNA-bereiding. |
| c) LightCycler: Onjuist detectiekanaal geselecteerd | Stel het kanaal in op F1/F2 of 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: geen gegevensacquisitie geprogrammeerd | Controleer de cyclusprogramma's.
Selecteer aan het einde van elk hybridisatiesegment van het PCR-programma de acquisitiemodus 'single' (enkelvoudig). |

Geen of zwak signaal in monsters, maar de positieve controles zijn goed

- | | |
|---|--|
| DNA van slechte kwaliteit of in lage concentratie | Controleer altijd de kwaliteit en concentratie van het DNA voordat u begint. |
|---|--|

Opmerkingen en suggesties

LightCycler: Intensiteit van fluorescentie te laag

- a) Onjuiste opslag van kitcomponenten Bewaar de *ipsogen* JAK2 MutaSearchKit bij -30 tot -15 °C en stel het primer-probemengsel (PPM) niet bloot aan licht. Zie 'Opslag en verwerking reagentia' op pagina 12.
- Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.
Verdeel de reagentia in gelijke delen voor opslag.
- b) Zeer lage initiële hoeveelheid doel-DNA Verhoog de hoeveelheid monster-DNA.
- Opmerking : Er kunnen remmende effecten optreden, afhankelijk van de gekozen DNA-bereidingsmethode.

LightCycler: Intensiteit van fluorescentie varieert

- a) Pipetteerfout De variabiliteit als gevolg van een zogenoemde 'pipetteerfout' kan worden beperkt door gegevens in de F1/F2- of 530 nm/640 nm -modus te analyseren.
- b) Capillairbuisjes zijn onvoldoende gecentrifugeerd Het bereide PCR-mengsel kan zich nog bovenin het capillairbuisje bevinden of er zit een luchtbel in de punt.
- Centrifugeer capillaire buisjes waar het reactiemengsel in zit altijd op de wijze die in de gebruikshandleiding van het apparaat is beschreven.
- c) Punt van het capillaire buisje is vies Draag altijd handschoenen wanneer u met capillaire buisjes werkt.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij *ipsogen* JAK2 MutaSearchKits getest aan de hand van vooraf vastgestelde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen. Analysecertificaten zijn op aanvraag verkrijgbaar via www.qiagen.com/support.

Beperkingen

Alle reagentia mogen uitsluitend worden gebruikt voor in-vitrodiagnostiek.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de procedures voor in-vitrodiagnostiek.

Om optimale PCR-resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk dat men zich strikt houdt aan de gebruikershandleiding.

Let goed op de uiterste houdbaarheidsdatums op het etiket van de doos en op de etiketten van alle onderdelen. Gebruik geen onderdelen waarvan de uiterste houdbaarheidsdatum is verstreken.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

Prestatiekenmerken

Niet-klinische onderzoeken

Er zijn niet-klinische onderzoeken uitgevoerd om de analytische prestaties van de *ipsogenJAK2* Muta *SearchKit* vast te stellen.

Precisie rond de drempelwaarde

Drie onafhankelijke monsters die overeenkwamen met lage mutatieniveaus zijn 38 keer gemeten met behulp van 3 partijen van de *ipsogenJAK2* Muta *Search Kit* in het Applied Biosystems 7500-instrument. De resultaten zijn samengevat in tabel 15 en 16.

Tabel 15. ΔC_T -waarden en precisiegegevens voor niet-klinische onderzoeken

Monster (% V617F-allele)	ΔC_T [minimum ; maximum]	Variatiecoëfficiënt (%)
0,5%	[7,8 ; 10,9]	7,2%
1%	[6,7 ; 8,8]	5,6%
2%	[5,9 ; 7,7]	5,5%
COS-VF	[6,9 ; 8,8]	6,2%

Tabel 16. Resultaten voor genotypering volgens $\Delta\Delta C_T$ -berekening voor niet-klinische onderzoeken

Monster (% V617F- allel)	Replica's	Mutatie gedetec- teerd	Onduidelijk resultaat	Mutatie niet gedetec- teerd
0,5%	38	0	3	35
1%	38	3	27	4
2%	38	33	5	0

Bij 92% van de JAK2 V617F-monsters van 0,5% is de mutatie niet gedetecteerd.

Bij 87% van de JAK2 V617F-monsters van 2% is de mutatie gedetecteerd.

Invoerlimieten

De aanbevolen invoer van genomisch DNA is 25 ng. Tijdens testen zijn er verschillende hoeveelheden DNA ingevoerd om te bepalen of de hoeveelheid genomisch DNA invloed kan hebben op de interpretatie van de monstergegevens. De resultaten zijn samengevat in tabel 17.

Tabel 17. Invloed van de hoeveelheid ingevoerd genomisch DNA

Monster (% V617F- allel)	Invoer (ng)	Replica's	Mutatie gedetec- teerd	Onduide- lijk resultaat	Mutatie niet gedetec- teerd
< 1%	2,5	6	Monsters niet geanalyseerd (waarden > IL)		
	10	6	0	1	5
	25	6	0	0	6
	100	6	0	0	6
	250	6	0	0	6
Totaal < 1%		30	0	1	23
1%	2,5	3	Monsters niet geanalyseerd (waarden > IL)		
	10	3	0	1	2
	25	3	0	2	1
	100	3	0	3	0
	250	3	0	2	1
Totaal 1%		15	0	8	4
2%, 4%, 50%, 78% of 100%	2,5	15	15	0	0
	10	15	15	0	0
	25	15	15	0	0
	100	15	15	0	0
	250	15	15	0	0
Totaal		75	75	0	0

Uit analyse van verdunde of sterk geconcentreerde monsters (d.w.z., < 5 ng/μl DNA of > 5 ng/μl DNA, respectievelijk) is gebleken dat dergelijke concentraties invloed kunnen hebben op $\Delta\Delta C_T$ - of $\Delta\Delta C_p$ -waarden. Dit leidt niet tot vals negatieve of vals positieve resultaten, maar tot onduidelijke resultaten met zeer lage percentages JAK2 V617F.

Klinische onderzoeken

DNA-monsters van 81 proefpersonen met verdenking van myeloproliferatieve neoplasmata (geëxtraheerd uit bloed of beenmerg) die eerder zijn gekenmerkt met de *ipsogen* JAK2 MutaScreenEZ Kit (QIAGEN, cat.nr. 673223) zijn samen met 9 DNA-monsters van gezonde donoren geanalyseerd met de *ipsogen* JAK2 MutaSearchKit in het Applied Biosystems 7500instrument. De resultaten zijn samengevat in tabel 18.

Tabel 18. Resultaten voor monsters met de *ipsogen* JAK2 Muta Search Kit en de *ipsogen* JAK2 Muta Screen EZ Kit

		<i>ipsogen</i> JAK2 Muta Screen EZ Kit		
		Mutatie gedetecteerd	Onduidelijk	Mutatie niet gedetecteerd
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta Search	Monsters			
	Mutatie gedetecteerd	37	1	1
	Onduidelijk	0	0	1
	Mutatie niet gedetecteerd	0	0	50

De totale overeenstemming was 98,9% (95% betrouwbaarheidsinterval: 93,8–99,8%).

De positieve overeenstemming was 100,0% (95% betrouwbaarheidsinterval: 90,6–100,0%).

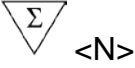









De negatieve overeenstemming was 98,0% (95% betrouwbaarheidsinterval: 89,7–99,7%).

References

1. James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144.
2. Levine, R.L, Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387.
3. Kralovics, R, Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779.
4. Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 36, 1054.
5. Tefferi, A., Skoda, R., Vardiman, J.W. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 627.
6. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 290, 1382.
7. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14.
8. Martinaud, C., Brisou, P., Mozziconacci, M.J. (2010) Is the JAK2 V617F mutation detectable in healthy volunteers? *Am. J. Hematol.* 85, 287.
9. Tefferri, A., et al. (2011) Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms. *J. Mol. Diagn.* 13, 461.
10. Lippert, E., Mansier, O., Migeon, M., Denys, B., Nilsson, A., Rosmond, C., et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1–2%) JAK2 V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica.* 99, e98.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en etiketten staan:

	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
	Lotnummer
	Materiaalnummer
	Global Trade Item Number
	Temperatuurbepering
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/Support . Ook kunt u bellen naar 00800 -22-44-6000 of contact opnemen met de afdeling Technical service van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Search</i> Kit (24)	Voor 24 reacties: V617F positive control (positieve controle), V617F negative control (negatieve controle), V617F cut-off sample (drempelmonster), primer-probemengsel JAK2 en JAK2 V617F	673823
Rotor-Gene Q MDx — voor IVD-gevalideerde real-time PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9002033
QIAamp® DNA Blood Maxi Kit — voor het zuiveren van genomisch DNA uit bloed		
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (10)	Voor 10 DNA-maxibereidingen: 10 QIAamp Maxi-spinkolommen, QIAGEN-protease, buffers, afnamebuisjes (50 ml)	51192
QIAamp DNA Blood Maxi Kit (50)	Voor 50 DNA-maxibereidingen: 50 QIAamp Maxi-spinkolommen, QIAGEN-protease, buffers, afnamebuisjes (50 ml)	51194

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

Dit product is bestemd voor in-vitro diagnostisch gebruik. Zonder schriftelijke toestemming van QIAGEN mogen *ipsogen*-producten niet worden doorverkocht, gemodificeerd voor doorverkoop of gebruikt voor de productie van commerciële producten.

De in dit document gegeven informatie kan zonder kennisgeving worden gewijzigd. QIAGEN aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten in dit document. Dit document is voor zover bekend volledig en accuraat op het moment van publicatie. In geen geval is QIAGEN aansprakelijk voor incidentele schade, speciale schade, meervoudige schade of gevolgschade in verband met, of voortvloeiend uit, het gebruik van dit document.

Voor *ipsogen*-producten geldt een garantie voor de vermelde specificaties. De enige verplichting van QIAGEN en het enige recht van herstel van de klant zijn beperkt tot gratis vervanging van de producten in het geval dat de producten niet functioneren zoals is gegarandeerd.

JAK2 V617F-mutatie en het gebruik daarvan zijn beschermd door patentrechten, waaronder het Europees patent EPI 692281, de Amerikaanse patenten 7,429,456 en 7,781,199, de Amerikaanse patentaanvragen US20090162849 en US20120066776 en buitenlandse tegenhangers.

Met de aankoop van dit product verwerft u niet het recht om het te gebruiken voor klinische trials voor geneesmiddelen tegen JAK2 V617F. QIAGEN ontwikkelt specifieke licentieprogramma's voor dergelijk gebruik. Neem contact op met onze juridische afdeling via jak2licenses@qiagen.com.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *ipsogen*®, Muta *Search*®, Rotor-Gene® (QIAGEN-groep); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); HybProbe®, LightCycler®, TaqMan® (Roche-groep).

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *ipsogen* JAK2 Muta *Search* Kit dat hij/zij akkoord gaat met de volgende voorwaarden:

1. De *ipsogen* JAK2 Muta *Search* Kit mag uitsluitend in overeenstemming met de handleiding van de *ipsogen* JAK2 Muta *Search* Kit en in combinatie met de componenten uit de kit worden gebruikt. QIAGEN verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de handleiding bij de *ipsogen* JAK2 Muta *Search* Kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor bijgewerkte licentievoorwaarden www.qiagen.com.

HB-1354-004 © 2013–2016 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

www.qiagen.com

