

ipsogen[®] JAK2 MutaQuant[®] Kit — Instrukcja obsługi



12 (nr katalogowy 673522)



24 (nr katalogowy 673523)

Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS,
Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System i LightCycler[®]



REF

673522, 673523



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R3

MAT

1072501PL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń, które umożliwiają izolację i detekcję zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie — od pobrania próbki do otrzymania wyniku.

Firma QIAGEN wyznacza standardy w:

- procedurach oczyszczania DNA, RNA i białek;
- oznaczeniach kwasów nukleinowych i białek;
- badaniach microRNA oraz RNAi;
- automatyzacji technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń.

Naszą misją jest umożliwienie klientom osiągnięcia wybitnych sukcesów i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie **www.qiagen.com**.

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podsumowanie i objaśnienie	4
Zasada procedury	7
Dostarczone materiały	11
Zawartość zestawu	11
Materiały wymagane, ale niedostarczone	12
Ostrzeżenia i środki ostrożności	13
Ogólne środki ostrożności	13
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami	14
Procedura	15
Przygotowanie DNA próbki	15
Protokoły	
■ Protokół: qPCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 probówki	16
■ Protokół: qPCR w aparacie ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480	21
■ Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 1.2	27
Interpretacja wyników	32
Rozwiązywanie problemów	36
Kontrola jakości	40
Ograniczenia	40
Parametry skuteczności	41
Badania niekliniczne	41
Badania kliniczne	42
Literatura	44
Symbole	45
Informacje kontaktowe	45
Informacje dotyczące zamawiania	46

Przeznaczenie

Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit to ilościowy test *in vitro* przeznaczony do wykrywania i ilościowego oznaczania allelu JAK2 V617F/G1849T w genomowym DNA wyizolowanym z krwi obwodowej pacjentów z podejrzeniem nowotworu mieloproliferacyjnego (myeloproliferative neoplasm, MPN).

Brak mutacji JAK2 V617F/G1849T nie wyklucza obecności innych mutacji genu JAK2. W przypadku obecności dodatkowych mutacji zlokalizowanych w nukleotydach od 88504 do 88622 test może raportować fałszywie negatywne wyniki (1).

Uwaga: Zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanymi odczynnikami i aparatami. Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy QIAGEN.

Podsumowanie i objaśnienie

W 2005 roku zidentyfikowano powtarzającą się mutację somatyczną, V617F, występującą w obrębie genu Janusowej kinazy tyrozynowej 2 (JAK2) (2–5), co spowodowało znaczący przełom w zrozumieniu, klasyfikacji i rozpoznaniu nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN). Białko JAK2 to wewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnałowa kluczowa dla wielu cytokin, w tym erytropoetyny.

Mutacja JAK2 V617F jest wykrywana u >95% spośród pacjentów z czerwienicą prawdziwą (polycythemia vera, PV), 50–60% spośród pacjentów z nadpłytkowością samoistną (essential thrombocythemia, ET) oraz 50% spośród pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku (primary myelofibrosis, PMF). Mutację JAK2 V617F wykryto również w niektórych rzadkich przypadkach przewlekłej białaczki mielomonocytozowej, zespołu mielodysplastycznego, mastocytozy ogólnoustrojowej oraz przewlekłej białaczki neutrofilowej. Nie wykryto jej jednak w żadnym przypadku (0%) przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myeloid leukemia, CML) (6).

Mutacja dotyczy zmiany pojedynczego nukleotydu w genie JAK2 — nukleotydu 1849 w egzonie 14 — co powoduje unikalną substytucję waliny (V) przez fenyloalaninę (F) w pozycji 617 białka (domena JH2). Prowadzi to do konstytutywnej aktywacji białka JAK2, hematopoetycznej transformacji *in vitro* i wzrostu kolonii erytroidalnych niezależnych od erytropoetyny (erythropoietin-independent erythroid colony, EEC) u wszystkich pacjentów z PV oraz u dużej części pacjentów z ET i PMF (7). Mutacja JAK2 V617F jest głównym czynnikiem transformacji komórek hematopoetycznych w MPN, ale dokładne mechanizmy patologiczne prowadzące, przy tej samej unikalnej mutacji, do tak różnych klinicznych i biologicznych jednostek chorobowych nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione.

Zwyczajowo rozpoznanie MPN opierało się na kryteriach klinicznych, cytogenetycznych oraz histologii szpiku kostnego. Odkrycie markera molekularnego swoistego dla choroby doprowadziło do uproszczenia tego procesu oraz zwiększenia dokładności diagnostycznej. Wykrycie mutacji JAK2 V617F jest teraz częścią kryteriów referencyjnych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO) rozpoznania nowotworów mieloproliferacyjnych BCR-ABL-ujemnych (Tabela 1) z 2008 roku, a obecność tej mutacji jest większym kryterium potwierdzającym rozpoznanie.

Tabela 1. Kryteria rozpoznania MPN wg WHO (zaadaptowano z punktu 8 literatury)

Kryteria rozpoznania czerwienicy prawdziwej (PV)	
Większe	<p>1. Stężenie hemoglobiny (Hgb) $>18,5 \text{ g/dl}^{-1}$ (mężczyźni) lub $>16,5 \text{ g/dl}^{-1}$ (kobiety)</p> <p>lub</p> <p>Hgb lub hematokryt (Hct) $>99.$ percentyla zakresu referencyjnego dla wieku, płci lub wysokości miejsca zamieszkania nad poziomem morza</p> <p>lub</p> <p>Hgb $>17 \text{ g/dl}^{-1}$ (mężczyźni) lub $>15 \text{ g/dl}^{-1}$ (kobiety) w przypadku utrzymującego się przyrostu o $\geq 2 \text{ g/dl}^{-1}$ w porównaniu do wartości wyjściowej, którego nie można powiązać z leczeniem niedoboru żelaza</p> <p>lub</p> <p>wzrost masy krwinek czerwonych $>25\%$ powyżej średniej przewidzianej wartości prawidłowej</p> <p>2. Obecność mutacji <i>JAK2 V617F</i> lub podobnej mutacji</p>
Mniejsze	<p>1. Trójukładowa mieloproliferacja w szpiku kostnym</p> <p>2. Stężenie erytropoetyny w surowicy poniżej normy</p> <p>3. Endogenny wzrost kolonii erytroidalnych (endogenous erythroid colony, EEC)</p>
Kryteria rozpoznania nadpłytkowości samoistnej (ET)	
Większe	<p>1. Liczba płytek krwi $\geq 450 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$</p> <p>2. Proliferacja w linii megakariocytarnej, z dużymi megakariocytami o dojrzałej morfologii. Brak lub słaba proliferacja w linii granulocytarnej lub erytroidalnej</p> <p>3. Niespełnienie kryteriów WHO rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej (CML), PV, pierwotnego zwłóknienia szpiku (PMF), zespołu mielodysplastycznego (myelodysplastic syndrome, MDS) lub innego nowotworu szpiku kostnego</p> <p>4. Wykazanie obecności mutacji <i>JAK2 V617F</i> lub innego markera klonalności lub</p> <p>Brak dowodów na nadpłytkowość reaktywną</p>
Mniejsze	-
Kryteria rozpoznania pierwotnego zwłóknienia szpiku (PMF)	
Większe	<p>1. Proliferacja i atypia w linii megakariocytarnej z jednoczesnym występowaniem włóknienia retikulinowego i/lub kolagenowego lub (w przypadku nieobecności włóknienia retikulinowego) zmiany w linii megakariocytarnej, które muszą być powiązane ze zwiększoną komórkowością szpiku kostnego, proliferacją w linii granulocytarnej i często obniżoną erytropoezą (tj. prefibrotyczna faza PMF)</p> <p>2. Niespełnienie kryteriów WHO rozpoznania (CML), PV, MDS lub innego nowotworu szpiku kostnego</p> <p>3. Wykazanie obecności mutacji <i>JAK2 V617F</i> lub innego markera klonalności lub</p> <p>Brak dowodów na reaktywne zwłóknienie szpiku kostnego</p>
Mniejsze	<p>1. Leukoerytoblastoza</p> <p>2. Wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (lactate dehydrogenase, LDH) w surowicy</p> <p>3. Anemia</p> <p>4. Splenomegalia wyczuwalna w badaniu palpacyjnym</p>

W ostatnim czasie międzynarodowi eksperci zaproponowali kryteria dla badań klinicznych produktów leczniczych w chorobach PV i ET. W oparciu o dane dotyczące przeszczepu allogenicznego, alfa-interferonu lub hydroksymocznika, oznaczenie ilościowe mutacji JAK2 V617F zostało włączone jako narzędzie potencjalnie użyteczne do monitorowania odpowiedzi na leczenie (9). W odpowiedzi na niektóre nowe leki skierowane przeciwko białku JAK2 stosowane w trakcie badań klinicznych zaobserwowano zmniejszenie obciążenia mutacją JAK2 V617F (10).

Zasada procedury

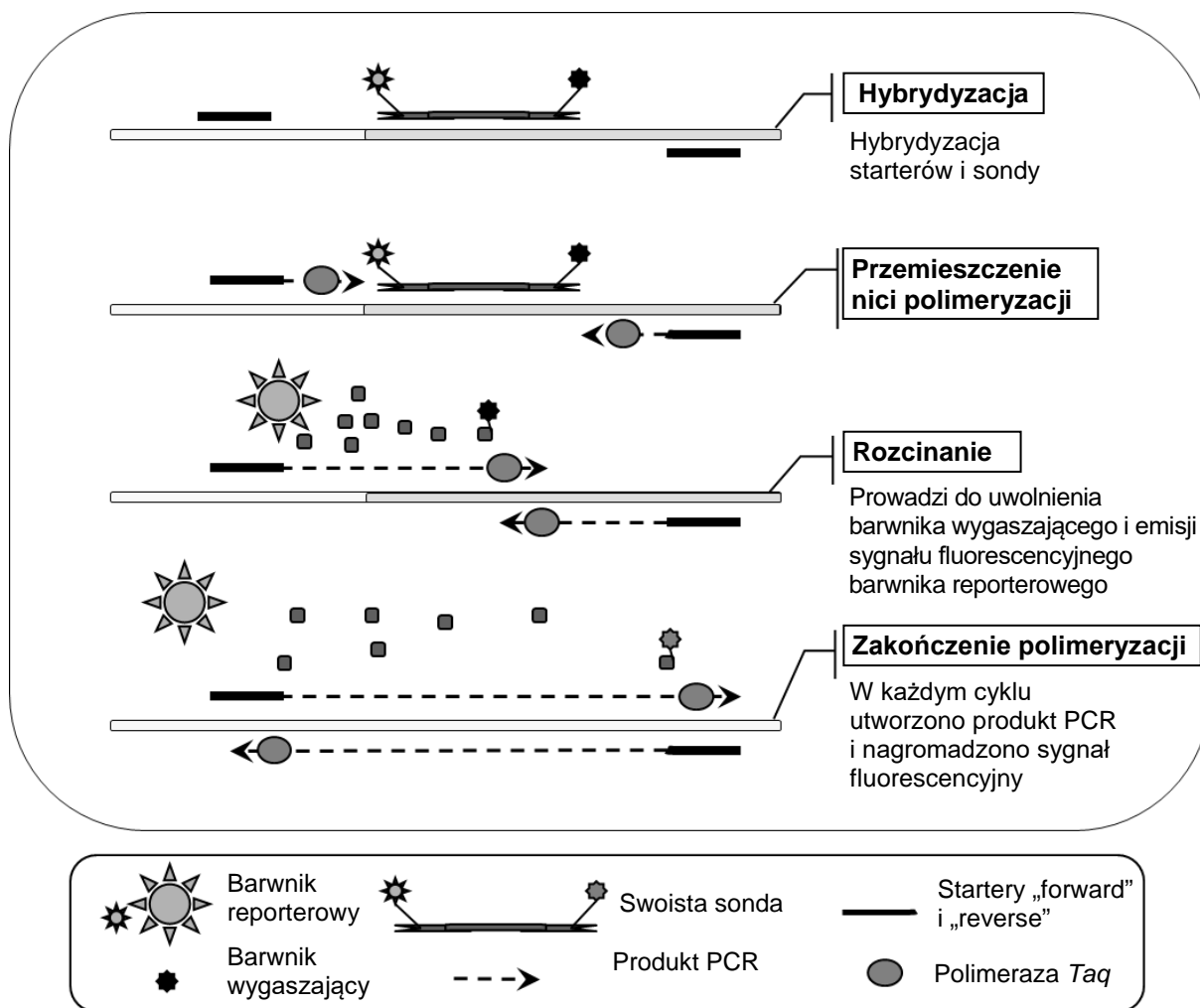
Zaproponowano wiele różnych technik ilościowego oznaczania proporcji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (single nucleotide polymorphism, SNP) w próbkach DNA. Spośród nich preferowane są metody oparte na ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) w czasie rzeczywistym ze względu na ich wyższą czułość umożliwiającą monitorowanie obciążenia allelem w ramach badań podłużnych. Wiele z tych technik charakteryzuje się średnią czułością na poziomie 1–10%, na przykład rozróżnianie alleli przy użyciu sond TaqMan[®], technika Pyrosequencing[®], oznaczenie krzywej topnienia i sekwencjonowanie bezpośrednio. Niektóre techniki, takie jak oznaczenie krzywej topnienia i sekwencjonowanie, są jedynie półilościowe, natomiast inne, takie jak technika Pyrosequencing, wymagają obróbki danych po reakcji PCR lub urządzeń, które są trudno dostępne lub w przypadku których koszt instalacji jest zbyt wysoki, aby mogły być używane do wykonywania rutynowych testów laboratoryjnych. Wysoce czuła metoda charakteryzująca się czułością na poziomie <0,1% wymaga użycia startera swoistego dla polimorfizmu SNP, który umożliwia selektywną amplifikację allelu zmutowanego lub allelu typu dzikiego, co jest łatwo wykrywalne na aparacie do reakcji qPCR w czasie rzeczywistym. Zestaw *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit opiera się na tej technice.

Zastosowanie reakcji qPCR umożliwia precyzyjne ilościowe oznaczenie produktów PCR podczas fazy wykładniczej procesu amplifikacji reakcji PCR. Dane ilościowe z reakcji PCR można uzyskać szybko, bez konieczności ich obróbki po reakcji PCR, poprzez detekcję sygnałów fluorescencyjnych w czasie rzeczywistym podczas i/lub po przeprowadzeniu cykli reakcji PCR, tym samym znacznie zmniejszając ryzyko zanieczyszczenia produktów PCR. Obecnie dostępne są 3 główne techniki qPCR: analiza qPCR z wykorzystaniem barwnika SYBR[®] Green I, analiza qPCR z wykorzystaniem sond hydrolitycznych oraz analiza qPCR z wykorzystaniem sond hybrydyzacyjnych.

W tym oznaczeniu wykorzystywana jest technologia qPCR oparta na hydrolizie oligonukleotydów wyznakowanych dwoma barwnikami. Podczas reakcji PCR startery „forward” i „reverse” hybrydują do swoistej sekwencji. W tej samej mieszaninie znajduje się oligonukleotyd wyznakowany dwoma barwnikami. Ta sonda, która składa się z oligonukleotydu wyznakowanego barwnikiem reporterowym (ang. reporter) na końcu 5' i barwnikiem wygaszającym (ang. quencher) na końcu 3', hybryduje do sekwencji docelowej w obrębie produktu PCR. W analizie qPCR z sondami hydrolitycznymi wykorzystywana jest aktywność 5'→3' egzonukleazy polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Jeśli sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika reporterowego i barwnika wygaszającego powoduje wytłumienie fluorescencji barwnika reporterowego głównie poprzez przeniesienie energii typu Förstera.

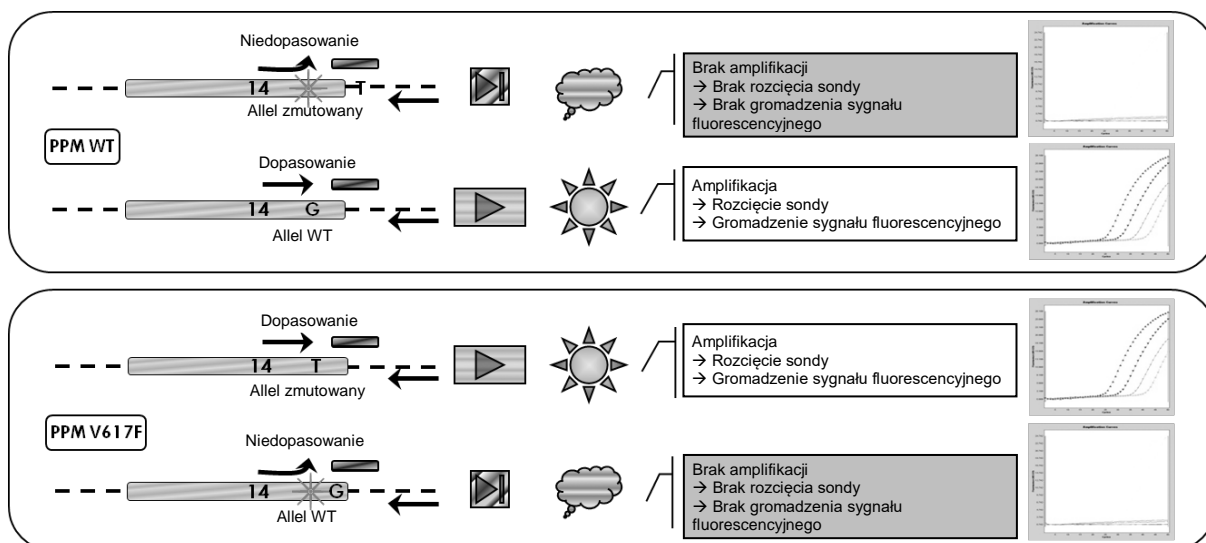
Podczas reakcji PCR, jeśli sekwencja docelowa jest obecna, sonda swoiście hybryduje między miejsca starterów „forward” i „reverse”. Polimeraza DNA, dzięki aktywności 5'→3' egzonukleazy, rozcina sondę między barwnikiem reporterowym i barwnikiem wygaszającym, tylko jeśli sonda zhybryduje do sekwencji docelowej. Fragmenty sondy są następnie wypierane z sekwencji docelowej, a polimeryzacja nici jest kontynuowana. Koniec 3' sondy jest blokowany, aby uniknąć wydłużania sondy podczas reakcji PCR (Ryc. 1). Ten proces zachodzi podczas każdego cyklu i nie zakłóca gromadzenia produktu w sposób wykładniczy.

Wzrost sygnału fluorescencyjnego jest wykrywany wyłącznie wtedy, gdy sekwencja docelowa jest komplementarna z sondą i, co za tym idzie, amplifikowana podczas reakcji PCR. Ze względu na powyższe wymogi amplifikacja nieswoista nie jest wykrywana. Wzrost fluorescencji jest więc wprost proporcjonalny do amplifikacji sekwencji docelowej podczas reakcji PCR.



Ryc. 1. Zasada reakcji.

Wykorzystywana w tym zestawie oznaczenia technologia ilościowej allelospecyficznej reakcji PCR umożliwia czułe, dokładne i wysoce odtwarzalne wykrywanie polimorfizmów SNP. Technika ta opiera się na wykorzystaniu swoistych starterów „forward” dla allelu typu dzikiego (WT) i allelu V617F (11). Etapy wydłużania i amplifikacji mogą zajść podczas reakcji PCR tylko w przypadku idealnego dopasowania startera i docelowego DNA (Ryc. 2).



Ryc. 2. Allelospecyficzna reakcja PCR. Zastosowanie mieszaniny starterów i sondy dla allelu typu dzikiego lub mieszaniny starterów i sondy dla allelu V617F umożliwia swoiste wykrycie allelu typu dzikiego lub allelu zmutowanego w dwóch odrębnych reakcjach przeprowadzanych przy użyciu jednej próbki. Wyniki mogą być wyrażone jako odsetek kopii allelu VF w stosunku do całkowitej liczby kopii genu JAK2.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit		(12)	(24)
Nr katalogowy		673522	673523
Liczba reakcji		12	24
V617F positive control (Kontrola pozytywna V617F) (allel V617F — 100%)	PC-VF-JAK2 PC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
V617F negative control (Kontrola negatywna V617F) (allel typu dzikiego — 100%)	NC-VF-JAK2 NC-VF-JAK2 Mini	40 µl	60 µl
M1-VF Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe M1-VF), 50 kopii (5 x 10 ¹ kopii allelu V617F/5 µl)	M1-VF M1-VF Mini	20 µl	30 µl
M2-VF Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe M2-VF), 500 kopii (5 x 10 ² kopii allelu V617F/5 µl)	M2-VF M2-VF Mini	20 µl	30 µl
M3-VF Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe M3-VF), 5000 kopii (5 x 10 ³ kopii allelu V617F/5 µl)	M3-VF M3-VF Mini	20 µl	30 µl
M4-VF Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe M4-VF), 50 000 kopii (5 x 10 ⁴ kopii allelu V617F/5 µl)	M4-VF M4-VF Mini	20 µl	30 µl
WT-1 Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe WT-1), 50 kopii (5 x 10 ¹ kopii allelu typu dzikiego/5 µl)	WT-1 WT-1 Mini	20 µl	30 µl
WT-2 Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe WT-2), 500 kopii (5 x 10 ² kopii allelu typu dzikiego/5 µl)	WT-2 WT-2 Mini	20 µl	30 µl
WT-3 Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe WT-3), 5000 kopii (5 x 10 ³ kopii allelu typu dzikiego/5 µl)	WT-3 WT-3 Mini	20 µl	30 µl
WT-4 Standard Dilution (Rozcieńczenie wzorcowe WT-4), 50 000 kopii (5 x 10 ⁴ kopii allelu typu dzikiego/5 µl)	WT-4 WT-4 Mini	20 µl	30 µl
Primers and Probe Mix JAK2 WT*	PPM-JAK2 WT 25x PPM-JAK2 WT Mini 25x	52 µl	95 µl
Primers and Probe Mix JAK2 V617F†	PPM-JAK2 V617F 25x PPM-JAK2 V617F Mini 25x	52 µl	95 µl
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit — Instrukcja obsługi (w języku angielskim)		1	1

* Mieszanina swoistych starterów „reverse” i „forward” dla genu kontrolnego JAK2 typu dzikiego i swoistej sondy FAM™–TAMRA™.

† Mieszanina swoistych starterów „reverse” i „forward” dla mutacji JAK2 V617F i swoistej sondy FAM–TAMRA.

Uwaga: Przed użyciem wytrząsać i krótko odwirować rozcieńczenia wzorcowe i mieszaniny starterów i sond.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Odczynniki

- Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR
- Bufor i polimeraza DNA *Taq*: zwalidowane odczynniki to mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4304437) i mieszanina LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, nr kat. 04535286001) lub mieszanina LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe[®] (Master Mix 5x) (Roche, nr kat. 03515567001)

Materiały eksploatacyjne

- Jałowe końcówki do pipet do przygotowywania reakcji PCR, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami hydrofobowymi
- Probówki do PCR o pojemności 0,5 ml lub 1,5 ml, wolne od nukleaz
- Lód

Wyposażenie

- Pipeta mikrolitrowa* przeznaczona do przygotowywania reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 0,5 ml/1,5 ml i mikro płytek (umożliwiająca wirowanie przy 13 000–14 000 rpm)
- Aparat do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym*: aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM lub inny aparat Rotor-Gene; aparat LightCycler 1.2 lub 480; aparat ABI PRISM 7900HT SDS; aparat Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; oraz powiązane odpowiednie materiały
- Biofotometr

* Upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

Pozostałości próbek i odczynników należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Ogólne środki ostrożności

Podczas przeprowadzania testów qPCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.

Ten zestaw jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Odczynniki i instrukcje dostarczone w tym zestawie zostały zwalidowane w celu zapewnienia optymalnej wydajności. Dalsze rozcieńczanie odczynników lub zmiana okresów i temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub sprzecznych danych. Właściwości odczynników PPM-WT i PPM-VF mogą ulec zmianie pod wpływem światła słonecznego. Wszystkie odczynniki opracowano specjalnie do użycia z tym testem. Aby zapewnić optymalną wydajność testu, nie należy zastępować żadnych odczynników.

Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec:

- zanieczyszczeniu DNazą, która może spowodować rozkład matrycy DNA;
- przenoszeniu zanieczyszczeń DNA lub reakcji PCR, które mogą spowodować otrzymanie fałszywie pozytywnego sygnału.

W związku z tym zalecane jest przestrzeganie poniższych środków ostrożności.

- Podczas wykonywania oznaczenia używać sprzętu laboratoryjnego (np. pipet, końcówek do pipet, fiolek reakcyjnych) wolnych od nukleaz i nosić rękawiczki.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego próbek i odczynników, w każdym kroku pipetowania używać świeżych, odpornych na aerozole końcówek do pipet.
- Przygotowywać wstępną mieszaninę Master Mix na potrzeby reakcji PCR, używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.) w odrębnym obszarze, do którego nie są wprowadzane żadne matryce DNA (DNA, plazmid lub produkty reakcji PCR). Dodać matrycę w oddzielnej strefie (najlepiej w innym pomieszczeniu), używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.).

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Zestawy są transportowane na suchym lodzie, a po ich dostarczeniu należy je przechowywać w temperaturze od -15°C do -30°C .

- Zminimalizować ekspozycję na światło mieszanin starterów i sond (próbówki PPM-WT i PPM-VF).
- Przed otwarciem delikatnie wymieszać i odwirować próbówki.
- Wszystkie składniki zestawu przechowywać w oryginalnych pojemnikach.

Te warunki przechowywania dotyczą zarówno otwartych, jak i nieotwartych składników. Składniki przechowywane w warunkach innych niż określone na etykietach mogą nie działać prawidłowo i negatywnie wpłynąć na wyniki oznaczenia.

Daty ważności dla każdego odczynnika są określone na etykietach poszczególnych składników. W prawidłowych warunkach przechowywania skuteczność produktu zostanie zachowana do upływu daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

Nie istnieją żadne możliwe do zaobserwowania wyraźne oznaki wskazujące na niestabilność produktu. Jednakże wraz z próbką o nieznanym charakterze należy analizować kontrole pozytywne i negatywne.

Procedura

Przygotowanie DNA próbki

Genomowe DNA należy uzyskać z krwi pełnej, oczyszczonych limfocytów krwi pełnej z krwi obwodowej, komórek wielojądrzastych lub granulocytów. W celu uzyskania porównywalnych wyników zalecane jest stosowanie tej samej frakcji komórkowej i metody izolacji DNA. Izolację DNA można wykonywać za pomocą własnej metody laboratorium lub zestawu dostępnego komercyjnie.

Ilość DNA należy określić poprzez pomiar gęstości optycznej (optical density, OD) próbki przy długości fali 260 nm, a jakość DNA można określić spektrofotometrycznie lub wykonując elektroforezę żelową*.

- Stosunek OD_{260}/OD_{280} powinien mieścić się w zakresie 1,7–1,9. Mniejszy stosunek może wskazywać na zanieczyszczenie białkami lub na obecność związków organicznych.
- Po wykonaniu analizy elektroforetycznej w żelu agarozowym* o stężeniu 0,8–1,0% wyizolowane DNA powinno być widoczne jako wyraźny prążek o wielkości około 20 kb (akceptowalna jest słabo widoczna smuga).

Otrzymane DNA należy rozcieńczyć do stężenia 5 ng/ μ l w 1x stężonym buforze TE* o pH 8,0, a następnie przechowywać w temperaturze od +4 do +8°C przez 1 tydzień lub, jeśli wymagane jest przechowywanie długoterminowe, w temperaturze –20°C.

Reakcja qPCR jest zoptymalizowana dla próbek DNA zawierających 25 ng oczyszczonego genomowego DNA.

* Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Protokół: qPCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub Rotor-Gene Q 5plex HRM z rotorem na 72 próbówki

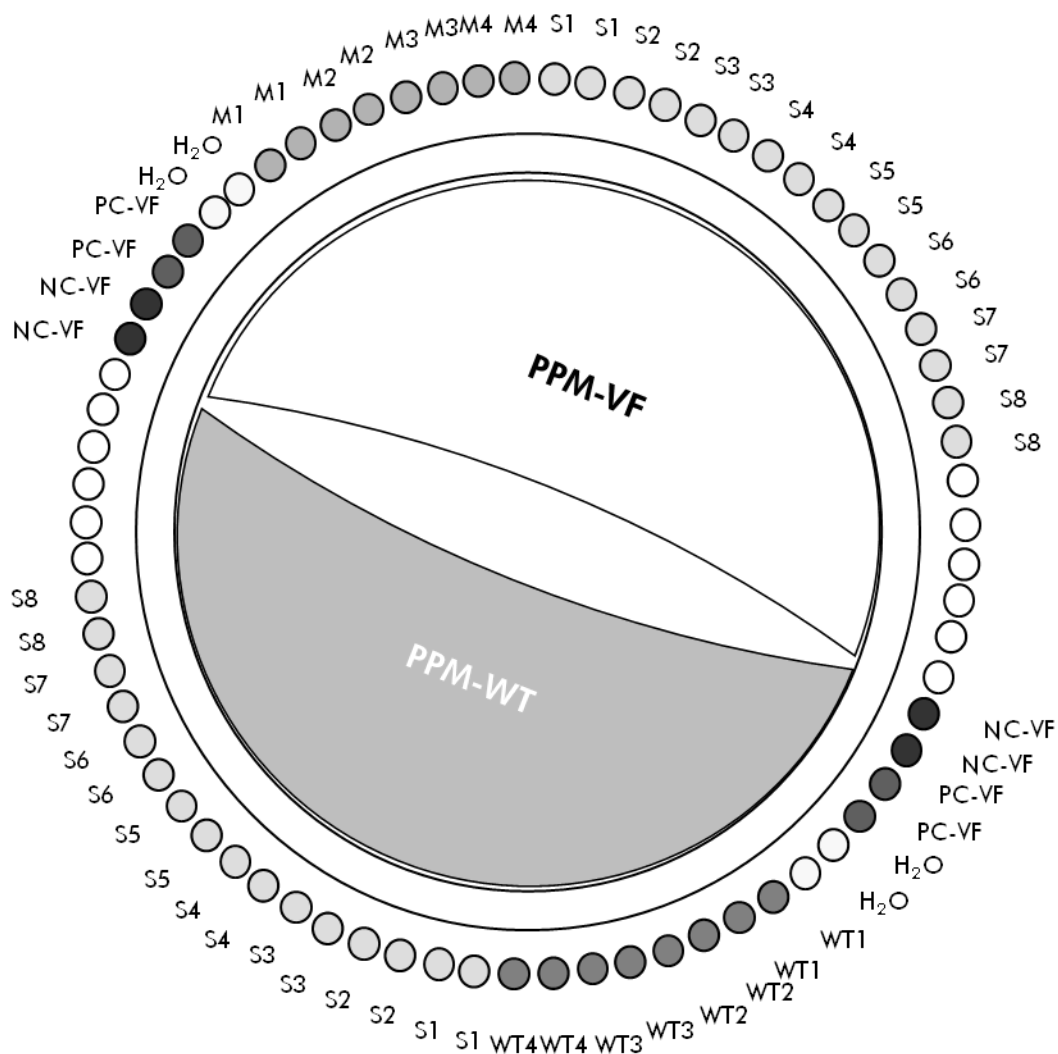
W przypadku używania tego aparatu zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w dwóch powtórzeniach, zgodnie z Tabelą 2.

Tabela 2. Liczba reakcji w przypadku aparatów Rotor-Gene Q z rotorem na 72-próbówki

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sondy dla allelu JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 wzorce M-VF	8 reakcji, każdy oznaczany w dwóch powtórzeniach
n próbek DNA	n x 2 reakcje
2 kontrole DNA	4 reakcje: kontrola pozytywna (PC-VF) i kontrola negatywna (NC-VF), każda oznaczana w dwóch powtórzeniach
Kontrola — woda	2 reakcje
Z mieszaniną starterów i sondy dla allelu JAK2 typu dzikiego (PPM-WT)	
4 wzorce typu dzikiego	8 reakcji, każdy oznaczany w dwóch powtórzeniach
n próbek DNA	n x 2 reakcje
2 kontrole DNA	4 reakcje: PC-VF i NC-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach
Kontrola — woda	2 reakcje

Przetwarzanie próbek w aparatach Rotor-Gene Q z rotorem na 72 próbówki

Aby zoptymalizować użycie wzorców oraz mieszanin starterów i sondy zalecamy testowanie co najmniej ośmiu próbek DNA za pomocą zestawu na 24 reakcje (nr kat. 673523) i co najmniej sześciu próbek DNA za pomocą zestawu na 12 reakcji (nr kat. 673522) w jednym eksperymencie.



Ryc. 3. Sugerowane ustawienie rotora dla eksperymentu z zestawem *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* na 24 próbki. PC-VF: kontrola pozytywna V617F; **NC-VF:** kontrola negatywna V617F; **M-VF:** wzorce allelu V617F; **M-WT:** wzorce allelu typu dzikiego; **S:** próbka DNA; **H₂O:** kontrola — woda.

Uwaga: Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać badaną próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie podczas kroku kalibracji aparat nie wykona kalibracji i zostaną zarejestrowane nieprawidłowe dane fluorescencji.

We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste probówki.

Reakcja qPCR w aparatach Rotor-Gene Q z rotorem na 72 probówki

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.
2. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

Tabele 3 i 4 przedstawiają schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszanki odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 25 μ l. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszanki starterów i sondy (PPM-VF lub PPM-WT). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 3. Przygotowanie mieszanki qPCR

Składnik	1 reakcja (μl)	Wstępna mieszanka V617F 30 + 1 reakcja (μl)	Stężenie końcowe
Mieszanka TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Mieszanka Primers and probe mix, PPM-VF 25x	1,0	31	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	6,5	201,5	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	–
Łączna objętość	25,0	25 na każdą	–

Tabela 4. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	1 reakcja (μl)	Wstępna mieszanina WT 30 + 1 reakcja (μl)	Stężenie końcowe
Mieszanina TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	387,5	1x
Mieszanina Primers and probe mix, PPM-WT 25x	1,0	31	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	6,5	201,5	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	–
Łączna objętość	25,0	25 na każdą	–

3. Dodaj po 20 μ l wstępnej mieszaniny qPCR (VF lub WT) na próbkę.
4. Dodaj 5 μ l materiału, który ma zostać oznaczony ilościowo (25 ng genomowego DNA próbki lub kontroli), do odpowiedniej próbki (całkowita objętość 25 μ l).
5. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
6. Umieść próbki w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
7. Zaprogramuj aparat Rotor-Gene Q na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 5.

Tabela 5. Profil temperaturowy

Mode of analysis (Tryb analizy)	Quantitation (Oznaczenie ilościowe)
Hold (Wstrzymanie)	Temperature (Temperatura): 50 stopni Time (Czas): 2 min
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperature (Temperatura): 95°C Time (Czas): 10 min
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 95°C przez 15 sekund 62°C przez 1 min z rejestracją fluorescencji FAM w kanale zielonym: pojedynczy

8. W przypadku aparatów Rotor-Gene Q wybierz opcję „Slope Correct” (Korekcja nachylenia) dla analizy. Zalecamy ustawienie wartości progowej na 0,03. Rozpocznij program cykli termicznych, zgodnie z Tabelą 5.

Protokół: qPCR w aparacie ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

W przypadku używania urządzenia do qPCR przeznaczonego na płytkę 96-dołkową zalecamy wykonanie powtórzeń wszystkich pomiarów, zgodnie z Tabelą 6.

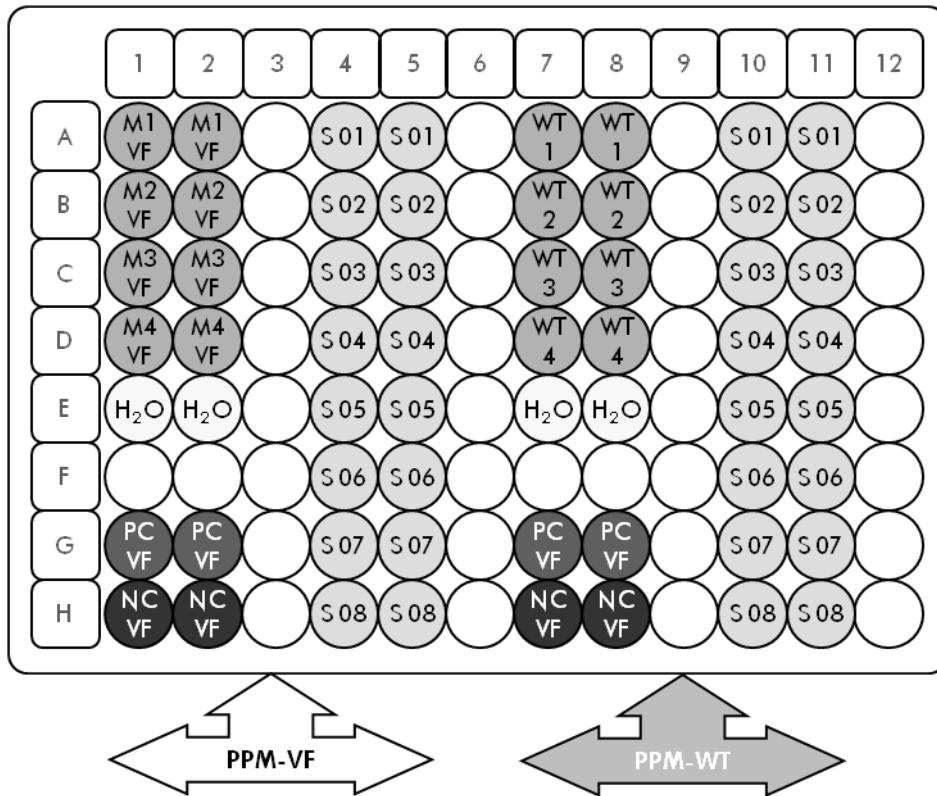
Tabela 6. Liczba reakcji w przypadku używania urządzenia do qPCR przeznaczonego na płytkę 96-dołkową

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sondy dla allelu JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 wzorce M-VF	8 reakcji, każdy oznaczany w dwóch powtórzeniach
n próbek DNA	n x 2 reakcje
2 kontrole DNA	4 reakcje: PC-VF i NC-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach
Kontrola — woda	2 reakcje
Z mieszaniną starterów i sondy dla allelu JAK2 typu dzikiego (PPM-WT)	
4 wzorce typu dzikiego	8 reakcji, każdy oznaczany w dwóch powtórzeniach
n próbek DNA	n x 2 reakcje
2 kontrole DNA	4 reakcje: PC-VF i NC-VF, każda oznaczana w dwóch powtórzeniach
Kontrola — woda	2 reakcje

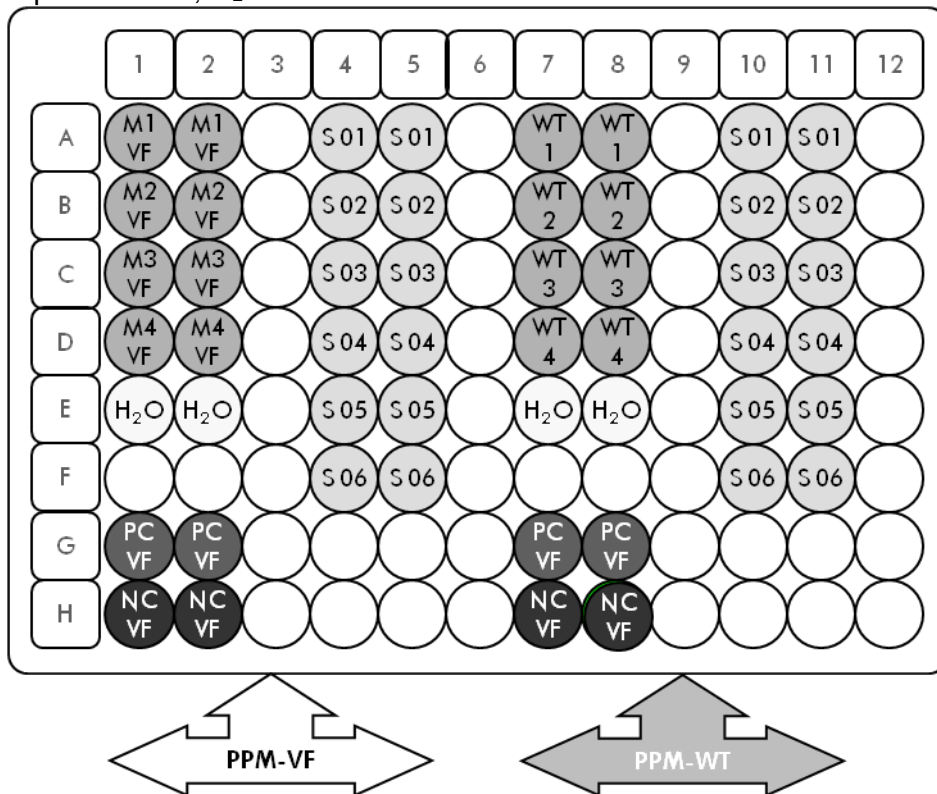
Przetwarzanie próbek w aparatach ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Aby zoptymalizować użycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie co najmniej ośmiu próbek DNA za pomocą zestawu na 24 reakcje (nr kat. 673523) i co najmniej sześciu próbek DNA za pomocą zestawu na 12 reakcji (nr kat. 673522) w jednym eksperymencie.

Schemat płytki na Ryc. 4 przedstawia przykład eksperymentu wykonywanego za pomocą zestawu na 24 reakcje (nr kat. 673523), a schemat płytki na Ryc. 5 przedstawia przykład eksperymentu wykonywanego za pomocą zestawu na 12 reakcji (nr kat. 673522).



Ryc. 4. Sugerowane ustawienie płytki dla jednego eksperymentu wykonywanego za pomocą zestawu na 24 reakcje (nr kat. 673523). PC-VF: kontrola pozytywna V617F; NC-VF: kontrola negatywna V617F; M-VF: wzorce allelu V617F; M-WT: wzorce allelu typu dzikiego; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda



Ryc. 5. Sugerowane ustawienie płytki dla jednego eksperymentu wykonywanego za pomocą zestawu na 12 reakcji (nr kat. 673522). PC-VF: kontrola pozytywna V617F; NC-VF: kontrola negatywna V617F; M-VF: wzorce allelu V617F; M-WT: wzorce allelu typu dzikiego; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda

Reakcja qPCR w aparatach ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i LightCycler 480

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.
2. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

Tabele 7 i 8 przedstawiają schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 25 μ l. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sondy (PPM-VF lub PPM-WT). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 7. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	Wstępna mieszanina V617F			Stężenie końcowe
	1 reakcja (μ l)	26 + 1 reakcja (μ l)	30 + 1 reakcja (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primers and probe mix, PPM-VF 25x	1,0	27	31	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	6,5	175,5	201,5	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25,0	25 na każdą	25 na każdą	–

Tabela 8. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	Wstępna mieszanina WT			Stężenie końcowe
	1 reakcja (µl)	26 + 1 reakcja (µl)	30 + 1 reakcja (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	337,5	387,5	1x
Primers and probe mix, PPM-WT 25x	1,0	27	31	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	6,5	175,5	201,5	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	5 na każdą	–
Łączna objętość	25,0	25 na każdą	25 na każdą	–

3. Dodaj po 20 µl wstępnej mieszaniny qPCR (VF lub WT) na studzienkę.
4. Dodaj 5 µl materiału, który ma zostać oznaczony ilościowo (25 ng genomowego DNA próbki lub kontroli), do odpowiedniej studzienki (całkowita objętość 25 µl).
5. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
6. Zamknij płytkę i krótko odwiruj (300 x g, około 10 sekund).
7. Umieść płytkę w termocyklerze zgodnie z zaleceniami producenta.
8. Zaprogramuj termocykler na program cykli termicznych i skonfiguruj aparat pod kątem rejestracji podwójnie znakowanej sondy fluorescencyjnej FAM w sposób przedstawiony w Tabeli 9 dla aparatów ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System lub w sposób przedstawiony w Tabeli 10 dla aparatu LightCycler 480.

Tabela 9. Profil temperaturowy dla aparatów ABI PRISM 7900HT SDS i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Mode of analysis (Tryb analizy)	Standard Curve – Absolute Quantitation (Krzywa wzorcowa — bezwzględne oznaczenie ilościowe)
Hold (Wstrzymanie)	Temperature (Temperatura): 50°C Time (Czas): 2 minuty
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperature (Temperatura): 95°C Time (Czas): 10 minut
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 95°C przez 15 sekund 63°C przez 1 minutę 30 sekund z rejestracją fluorescencji FAM; barwnik wygaszający: TAMRA

Tabela 10. Profil temperaturowy dla aparatu LightCycler 480

Mode of analysis (Tryb analizy)	Absolute Quantification (Bezwzględne oznaczenie ilościowe) („Abs Quant”)
Detection formats (Formaty detekcji)	Wybrać opcję „Simple Probe” (Pojedyncza próbka) w oknie formatów detekcji
Hold (Wstrzymanie)	Temperature (Temperatura): 50°C Time (Czas): 2 minuty
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperature (Temperatura): 95°C Time (Czas): 10 minut
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 95°C przez 15 sekund 63°C przez 1 minutę 30 sekund z rejestracją fluorescencji FAM odpowiednio (483–533 nm) dla wersji LC 01 i (465–510 nm) dla wersji LC 02

9. W przypadku aparatów ABI PRISM 7900HT i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System przejdź do kroku 8a. W przypadku aparatu LightCycler 480 przejdź do kroku 8b.

- 9a. Aparaty ABI PRISM 7900HT i Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Zalecamy ustawienie wartości progowej na 0,1. Rozpocznij program cykli, zgodnie z Tabelą 9.
- 9b. LightCycler 480: Zalecamy korzystanie z trybu analizy punktu dopasowania z wartością tła 2,0 i wartością progową 2,0. Rozpocznij program cykli termicznych, zgodnie z Tabelą 10.

Protokół: reakcja qPCR w aparacie LightCycler 1.2

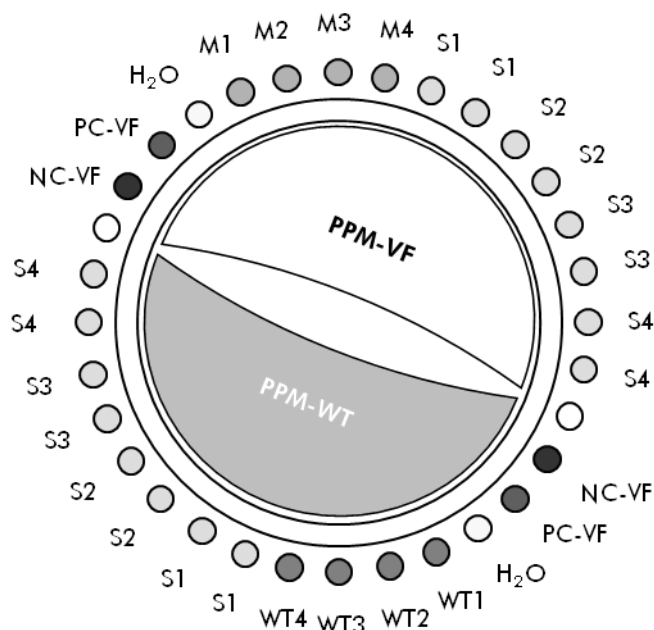
W przypadku korzystania z aparatów kapilarnych zalecamy mierzenie próbek w dwóch powtórzeniach, natomiast kontroli w jednym powtórzeniu, zgodnie z Tabelą 11.

Tabela 11. Liczba reakcji w przypadku aparatu LightCycler 1.2

Próbki	Reakcje
Z mieszaniną starterów i sondy dla allelu JAK2 V617F (PPM-VF)	
4 wzorce M-VF	4 reakcje, każdy oznaczany jeden raz
n próbek DNA	n x 2 reakcje
2 kontrole DNA	2 reakcje: PC-VF i NC-VF, każda oznaczana jeden raz
Kontrola — woda	1 reakcja
Z mieszaniną starterów i sondy dla allelu JAK2 typu dzikiego (PPM-WT)	
4 wzorce typu dzikiego	4 reakcje, każdy oznaczany jeden raz
n próbek DNA	n x 2 reakcje
2 kontrole DNA	2 reakcje: PC-VF i NC-VF, każda oznaczana jeden raz
Kontrola — woda	1 reakcja

Przetwarzanie próbek w aparacie LightCycler 1.2

Aby zoptymalizować zużycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie czterech próbek DNA w jednym eksperymencie. Schemat probówek kapilarnych na Ryc. 6 przedstawia przykład takiego eksperymentu.



Ryc. 6. Sugerowane ustawienie rotora dla każdego eksperymentu z zestawem *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. PC-VF: kontrola pozytywna V617F; NC-VF: kontrola negatywna V617F; M-VF: wzorce allelu V617F; M-WT: wzorce allelu typu dzikiego; S: próbka DNA; H₂O: kontrola — woda.

Reakcja qPCR w aparacie LightCycler 1.2

Uwaga: Ze względu na szczególne wymagania technologiczne podczas wykonywania eksperymentów w aparacie LightCycler należy używać określonych odczynników. Zalecamy używanie mieszaniny LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe i przygotowanie mieszaniny Master Mix 5x zgodnie z wytycznymi producenta.

Uwaga: Wszystkie kroki należy wykonywać na lodzie.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki i umieść je na lodzie.
2. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę qPCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Wszystkie stężenia odnoszą się do końcowej objętości reakcji.

Tabele 12 i 13 przedstawiają schemat pipetowania przy przygotowywaniu jednej mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość reakcyjna wynosiła 20 µl. Można przygotować wstępną mieszaninę odpowiednio do liczby reakcji, używając tej samej mieszaniny starterów i sondy (PPM-VF lub PPM-WT). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Tabela 12. Przygotowanie mieszanki qPCR

Składnik	Wstępna mieszanka V617F		Stężenie końcowe
	1 reakcja (μl)	15 + 1 reakcja (μl)	
Świeżo przygotowana mieszanka LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primers and probe mix, PPM-VF 25x	0,8	12,8	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	10,2	163,2	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	–
Łączna objętość	20,0	20 na każdą	–

Tabela 13. Przygotowanie mieszaniny qPCR

Składnik	Wstępna mieszanina WT		Stężenie końcowe
	1 reakcja (μl)	15 + 1 reakcja (μl)	
Świeżo przygotowana mieszanina LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Mix, 5x	4,0	64,0	1x
Primers and probe mix, PPM-WT 25x	0,8	12,8	1x
Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR	10,2	163,2	–
Próbka (dodawana w kroku 4)	5,0	5 na każdą	–
Łączna objętość	20,0	20 na każdą	–

3. Dodaj po 15 μl wstępnej mieszaniny qPCR (VF lub WT) na próbkę kapilarną.
4. Dodaj 5 μl materiału, który ma zostać oznaczony ilościowo (25 ng genomowego DNA próbki lub kontroli), do odpowiedniej próbki (całkowita objętość 20 μl).
5. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.
6. Umieść próbki kapilarne w adapterze dostarczonym z aparatem i krótko odwiruj (700 x g, około 10 sekund).
7. Załaduj próbki kapilarne do termocyklera zgodnie z zaleceniami producenta.
8. Zaprogramuj aparat LightCycler 1.2 na program cykli termicznych w sposób przedstawiony w Tabeli 14.

Tabela 14. Profil temperaturowy

Mode of analysis (Tryb analizy)	Quantification (Oznaczenie ilościowe)
Hold 1 (Wstrzymanie 1)	Temperature (Temperatura): 55°C Time (Czas): 2 minuty Ramp (Spadek): 20
Hold 2 (Wstrzymanie 2)	Temperature (Temperatura): 95°C Time (Czas): 10 minut Ramp (Spadek): 20
Cycling (Powtarzanie cykli)	50 razy 95°C przez 15 sekund; spadek: 20 66°C przez 1 minutę; spadek: 20; z rejestracją fluorescencji FAM: pojedynczy

9. W przypadku aparatu LightCycler 1.2 zalecany jest tryb F1/F2 i „2nd derivative analysis” (Analiza drugiej pochodnej). Rozpocznij program cykli termicznych, zgodnie z Tabelą 14.

Interpretacja wyników

Zasada analizy danych

Dane dla wartości cyklu progowego (C_T) i punktu przecięcia (C_P) można wyeksportować z aparatu do reakcji qPCR i wkleić do pliku programu Excel® w celu ich przeanalizowania. Wartości tych można następnie użyć do obliczenia średniej wartości C_P i C_T , a średnie wzorcowe wartości C_T można wykreślić w celu uzyskania krzywej wzorcowej dla wzorców allelu typu dzikiego i allelu V617F, korzystając z poniższego wzoru i Tabeli 15.

y = średnia wartość C_P ; x = \log_{10} CN, gdzie CN= liczba kopii genu w 5 μ l próbki

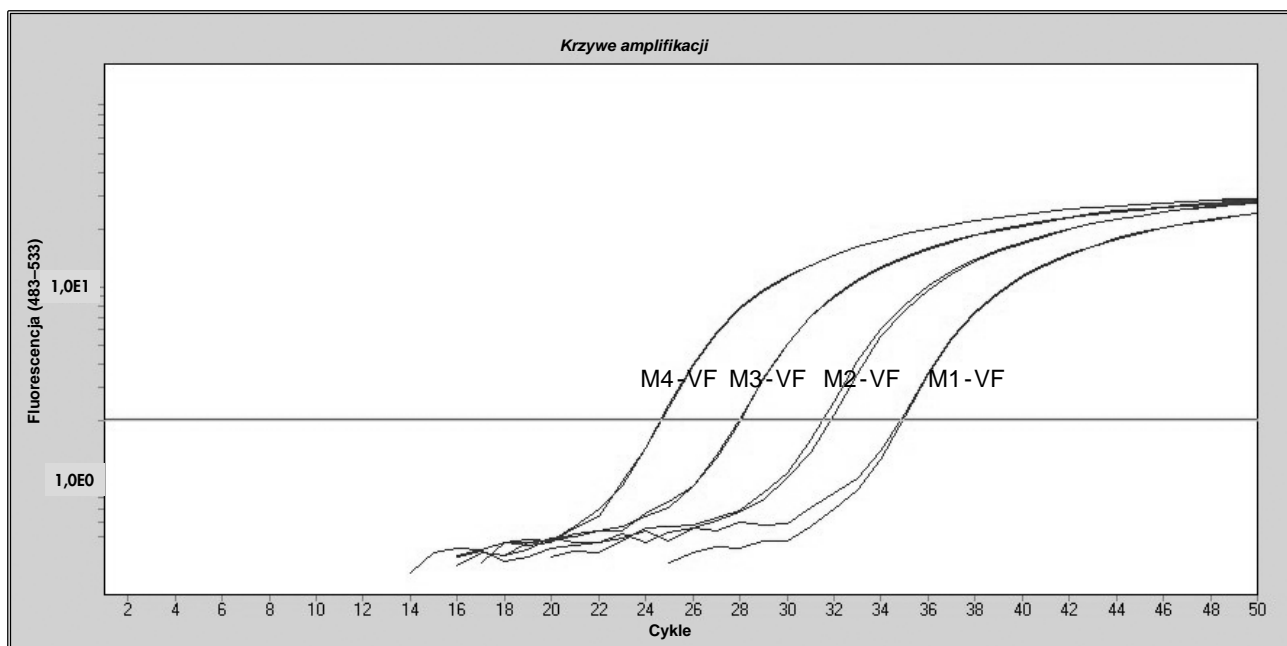
Tabela 15. Dane ilościowe dla wzorców allelu typu dzikiego i allelu V617F

Wzorzec	Liczba kopii (CN)	\log_{10} CN
M1-VF	5×10^1 VF	1,7
M2-VF	5×10^2 VF	2,7
M3-VF	5×10^3 VF	3,7
M4-VF	5×10^4 VF	4,7
WT-1	5×10^1 WT	1,7
WT-2	5×10^2 WT	2,7
WT-3	5×10^3 WT	3,7
WT-4	5×10^4 WT	4,7

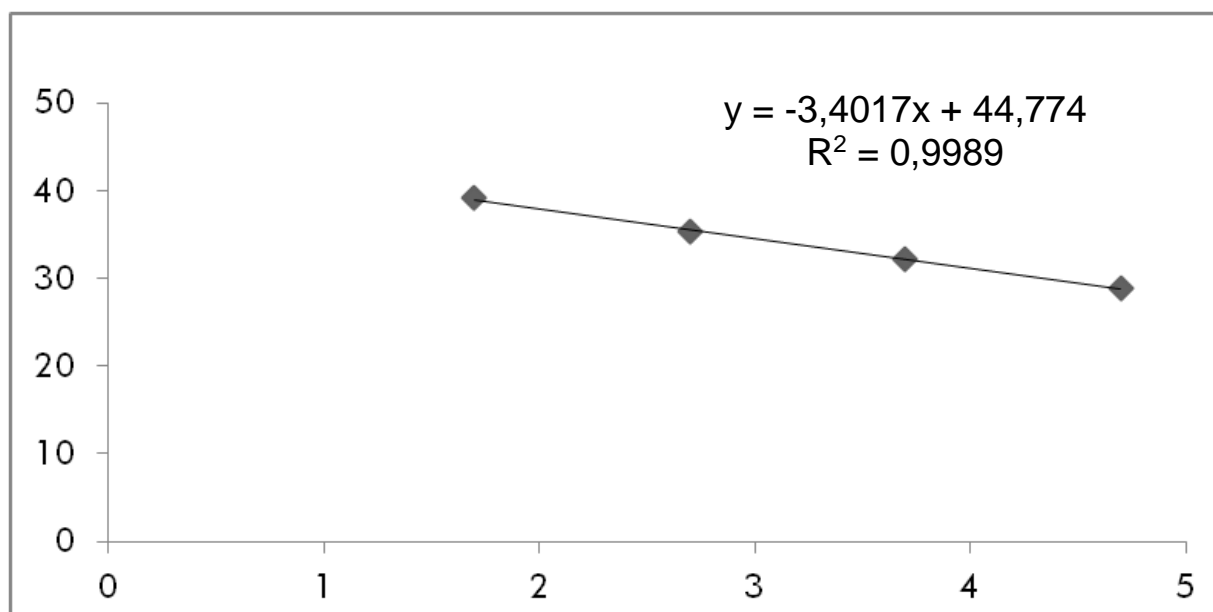
Uwaga: Każdy użytkownik powinien zmierzyć własny poziom powtarzalności w laboratorium.

Krzywa wzorcowa i kryteria jakości

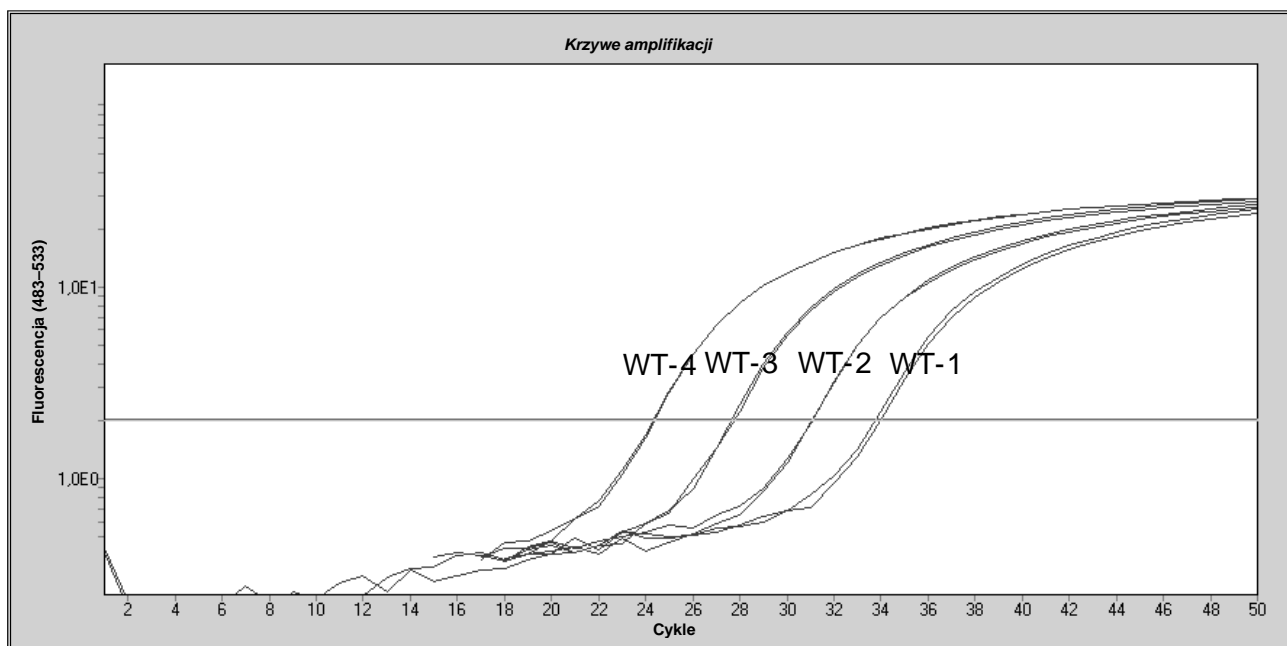
Ryc. 7 i 9 przedstawiają przykłady wyników uzyskanych za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit, a Ryc. 8 i 10 przedstawiają przykłady krzywej teoretycznej obliczonej na podstawie czterech rozcieńczeń wzorcowych.



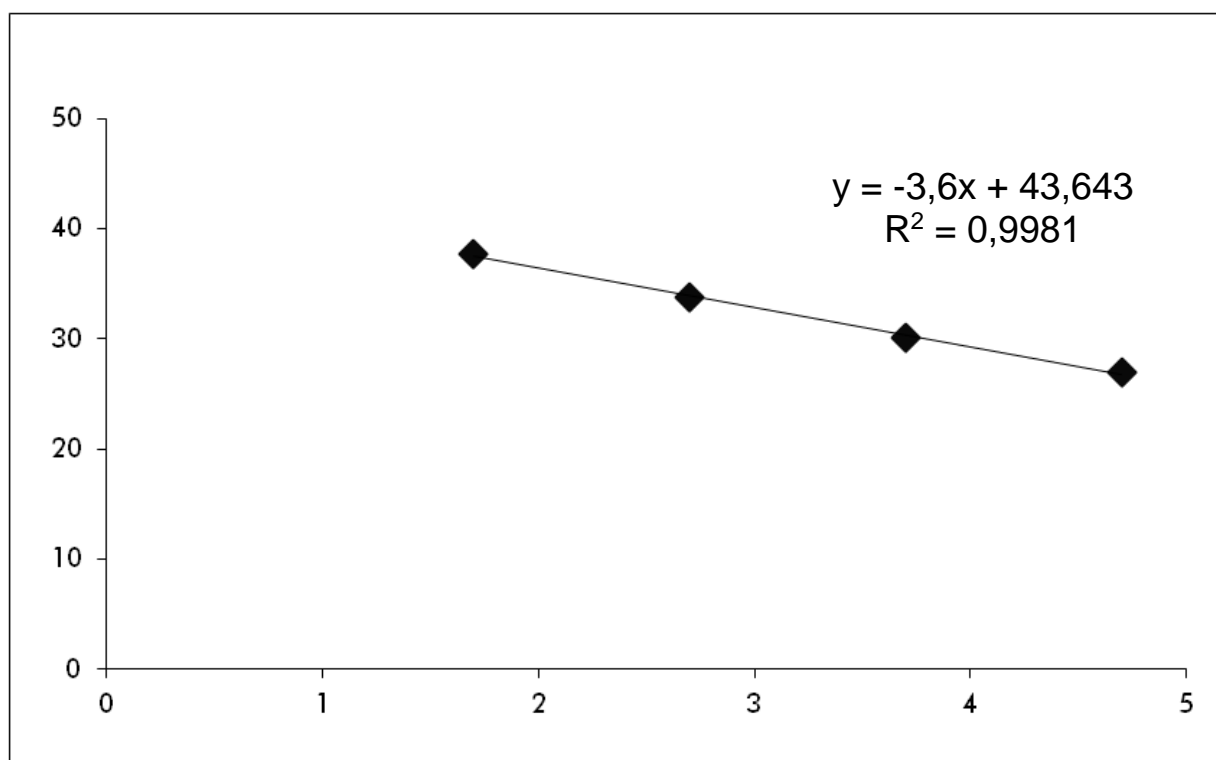
Ryc. 7. Wykres amplifikacji 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 i 5×10^4 kopii plazmidu JAK2 V617F (odpowiednio kontrole M1-VF, M2-VF, M3-VF, M4-VF).



Ryc. 8. Krzywa wzorcowa dla allelu JAK2 V617F.



Ryc. 9. Wykres amplifikacji 5×10^1 , 5×10^2 , 5×10^3 i 5×10^4 kopii plazmidu JAK2 typu dzikiego (odpowiednio kontrole WT-1, WT-2, WT-3 i WT-4).



Ryc. 10. Krzywa wzorcowa dla allelu JAK2 typu dzikiego.

Wzorce są rozcieńczeniami 10-krotnymi, więc teoretyczne nachylenie krzywej wynosi $-3,32$. Nachylenie między $-3,0$ a $-3,9$ jest akceptowalne, jeśli wartość R^2 jest $>0,95$ (12). Jednakże, w celu uzyskania precyzyjnych wyników, pożądana jest wartość $R^2 >0,98$ (13).

Równań krzywych wzorcowych można następnie użyć do obliczenia \log_{10} liczby kopii allelu V617F i allelu WT w nieznanach próbkach.

Równania krzywej wzorcowej allelu V617F należy użyć do przekształcenia surowej średniej wartości C_P/C_T (uzyskanej z PPM-VF) dla nieznanach próbek i próbek kontrolnych na liczbę kopii allelu JAK2 V617F (V617F copy numbers, CN_{V617F}).

$$\log_{10} CN_{V617F} = \frac{(\text{średnia wartość } C_{pV617F} - \text{punkt przecięcia krzywej wzorcowej}_{V617F})}{\text{Nachylenie krzywej wzorcowej}_{V617F}}$$

Równania krzywej wzorcowej allelu typu dzikiego należy użyć do przekształcenia surowej średniej wartości C_P/C_T (uzyskanej z PPM-WT) dla nieznanach próbek i próbek kontrolnych na liczbę kopii allelu JAK2 typu dzikiego (wild-type copy numbers, CN_{WT}).

$$\log_{10} CN_{WT} = \frac{(\text{średnia wartość } C_{pWT} - \text{punkt przecięcia krzywej wzorcowej}_{WT})}{\text{Nachylenie krzywej wzorcowej}_{WT}}$$

Sposób wyrażania wyników

Wyniki są podawane w odniesieniu do 25 ng całkowitego genomowego DNA i powinny być wyrażone jako odsetek allelu JAK2 V617F zgodnie z poniższym wzorem.

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

Odtwarzalność między powtórzeniami

Uzyskane dane powinny być spójne między dwoma powtórzeniami.

Kontrole pozytywne i negatywne

W przypadku kontroli pozytywnej lub PC-VF odsetek allelu JAK2 V617F powinien być wyższy niż 99,9%.

W przypadku kontroli negatywnej lub NC-VF odsetek allelu JAK2 V617F powinien być niższy niż 0,1%.

Jeśli kontrole te nie działają prawidłowo, należy zapoznać się z częścią „Rozwiązywanie problemów”, strona 36, aby rozwiązać ten problem.

Kontrole — woda

Kontrole negatywne powinny dawać wartość CN równą zero zarówno w przypadku wykrywania allelu JAK2 V617F jak i allelu JAK2 typu dzikiego.

Pozytywny wynik dla kontroli w postaci wody jest spowodowany zanieczyszczeniem krzyżowym. Aby rozwiązać ten problem, patrz „Rozwiązywanie problemów” poniżej.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na pytania dotyczące danych i/lub protokołu opisanego w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń (informacje kontaktowe — patrz „Informacje kontaktowe”, strona 45).

Komentarze i wskazówki

Krzywa wzorcowa dla allelu typu dzikiego lub allelu V617F nie jest liniowa

Zamiana kolejności fiolek,
zamiana kolejności podczas
dodawania wzorców,
zanieczyszczenie krzyżowe,
częściowy rozkład wzorca,
odczynnik RQPCR, nieswoista
amplifikacja lub błąd programu
reakcji PCR

Sprawdź schemat pipetowania i
konfigurację reakcji.

Przechowuj zestaw *ipsogen* JAK2
MutaQuant Kit w temperaturze od –
15 do –30°C i chroń mieszaniny
starterów i sond przed światłem.
Patrz „Przechowywanie i sposób
postępowania z odczynnikami”,
strona 14.

Unikaj wielokrotnego zamrażania
i rozmrażania.

Brak sygnału lub słaby sygnał dla jednego wzorca

Wzorzec nie został dodany lub użyto tej samej mieszaniny PPM

Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórz reakcję PCR.

Kontrola negatywna (H₂O) jest pozytywna

Zanieczyszczenie krzyżowe, zanieczyszczenie odczynnika, błąd aparatu, zmiana miejsca dołka lub probówki kapilarnej lub rozkład sondy

Wymień wszystkie kluczowe odczynniki.

Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze postępuj z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.

Chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem.

Sprawdź krzywe fluorescencji pod kątem fałszywie pozytywnych odczytów.

Brak sygnału, nawet w kontroli wzorcowej

a) Wybrano nieprawidłowy kanał detekcji

Ustaw kanał na F1/F2 lub 530 nm/640 nm.

b) Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników

Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Powtórz reakcję PCR.

c) Nie zaprogramowano programu rejestracji danych

Sprawdź program cykli.

Wybierz tryb rejestracji „Single” (Pojedynczy) przy końcu każdego segmentu hybrydyzacji w programie reakcji PCR.

Brak sygnału lub słaby sygnał w próbkach, ale prawidłowy sygnał w kontrolach wzorcowych

Efekt inhibicji materiału próbki spowodowany niewystarczającym oczyszczeniem

Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj jakość (OD₂₆₀/OD₂₈₀) i stężenie DNA.

Powtórz przygotowanie DNA.

Zbyt niskie natężenie fluorescencji

- a) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu
- W celu przechowywania podzieli odczynniki na porcje.
- Przechowuj zestaw *ipsogen JAK2 MutaQuant* Kit w temperaturze od –15 do –30°C i chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem. Patrz „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 14.
- Unikaj wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.
- b) Bardzo niska początkowa ilość docelowego DNA
- Sprawdź ilość DNA próbki.
- Uwaga:** W zależności od wybranej metody przygotowania DNA może wystąpić efekt inhibicji.

Pozytywny sygnał w kontrolach negatywnych

- Zanieczyszczenie spowodowane przeniesieniem
- Wymień wszystkie kluczowe odczynniki.
- Powtórz eksperyment, używając nowych porcji wszystkich odczynników.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze postępuj z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.

Zmienne natężenie fluorescencji

- a) Błąd pipetowania
- Po rozmrożeniu wytrząsaj i odwiruj wszystkie odczynniki.
- Zmienność aparatu LightCycler spowodowaną tak zwanym „błędem pipetowania” można zmniejszyć, analizując dane w trybie F1/F2 lub 530 nm/640 nm.

Komentarze i wskazówki

- b) Niewystarczające odwirowanie płytki, probówek lub probówek kapilarnych lub przygotowana mieszanina do reakcji PCR może wciąż znajdować się w górnym naczyniu probówki kapilarnej lub pęcherzyk powietrza może być zaklinowany na końcu probówki kapilarnej
- c) Zewnętrzna powierzchnia końcówki probówki kapilarnej jest zabrudzona

Zawsze wiruj probówki kapilarne, do których załadowana jest mieszanina reakcyjna, w sposób opisany w instrukcji obsługi danego aparatu.

Podczas postępowania z probówkami kapilarnymi zawsze noś rękawiczki.

Kontrole pozytywne allelu typu dzikiego lub allelu V617F dają sygnał w przypadku zamiennego stosowania mieszanin PPM

Zanieczyszczenie krzyżowe, zanieczyszczenie odczynnika, zmiana miejsca dołka lub probówki kapilarnej

Wymień wszystkie kluczowe odczynniki.

Powtórz eksperyment, używając nowych porcji wszystkich odczynników.

Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, zawsze postępuj z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.

Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Wykrywanie kontroli pozytywnych w nieprawidłowej kolejności

Zamiana kolejności podczas dodawania mieszaniny PPM do studzienki, probówki kapilarnej lub wstępnej mieszaniny

Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Brak sygnału dla jednej lub obu kontroli pozytywnych

Pominięto mieszaninę PPM lub DNA kontrolne

Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.

Duży szum tła

Wyblaknięcie fluoroforu

Przechowywać sondę i postępować z nią w taki sposób, aby była chroniona przed światłem.

Słaba odtwarzalność dla powtórzeń próbek

Błąd pipetowania lub
zanieczyszczenie krzyżowe

Sprawdź schemat pipetowania
i konfigurację reakcji.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu. Certyfikaty analiz są dostępne na żądanie pod adresem www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Przed użyciem wyrobu użytkownicy muszą być przeszkoleni i zaznajomieni z tą technologią. Niniejszego zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanym aparatem wymienionym w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 12.

Wszelkie wyniki diagnostyczne należy interpretować łącznie z innymi obserwacjami klinicznymi lub laboratoryjnymi. Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami wydajności wykonanymi przez firmę QIAGEN.

Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.

Parametry skuteczności

Badania niekliniczne

Precyzja

Badanie precyzji przeprowadzono za pomocą 12 próbek DNA wyizolowanych z linii komórkowych, które odpowiadają różnym stopniom obciążenia allelem JAK2 V617F. Na każdej próbce wykonano łącznie 80 pomiarów, używając 3 różnych partii zestawu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. W tym badaniu precyzji korzystano z aparatu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Dane analityczne przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Dane precyzji dla próbek DNA

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

* Wykluczono wartości odstające. Zostały one zdefiniowane jako wartości mniejsze niż dolny kwartył minus 3-krotność rozstępu międzykwartyłowego lub większe niż górny kwartył plus 3-krotność rozstępu międzykwartyłowego na wykresie pudełkowym.

n = liczba zwalidowanych próbek; CV = globalny współczynnik zmienności.

Granica próby ślepej i granica wykrywalności

Poziom tła lub poziom ślepej próby (level of blank, LOB) określono na negatywnych próbkach (8 próbek, 76 pomiarów). Ustalono, że wynosi on 0,014%.

Granice wykrywalności (limit of detection, LOD) określono za pomocą próbek, o których wiadomo było, że są pozytywne, ale charakteryzują się niską ekspresją (7 próbek, 68 pomiarów). Ustalono, że wynosi ona 0,061%, z górną granicą 90-procentowego przedziału ufności przy 0,091%.

Tę optymalną czułość można uzyskać dla próbek zawierających co najmniej 10 000 kopii genu JAK2 (allel typu dzikiego lub mutacja V617F).

Dane ilościowe należy raportować w następujący sposób.

- Wynik JAK2 V617F $\leq 0,014\%$ można interpretować jako brak wykrycia mutacji JAK2 V617F.
- Wynik JAK2 V617F $> 0,014\%$, ale $< 0,091\%$ można interpretować jako wynik niejednoznaczny.
- Wynik JAK2 V617F $\geq 0,091\%$ można interpretować jako wynik pozytywny — wykryto mutację JAK2 V617F.

Liniowość

Badania liniowości wykonano na 12 próbkach, każdą otrzymano z innej mieszaniny DNA wyizolowanego z linii komórkowych pozytywnych i negatywnych pod względem mutacji JAK2 V617F. Każdą próbkę testowano 5 razy. Dane z tego badania dowodzą, że zestaw *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit daje liniowe wyniki w obrębie zakresu dynamicznego.

Badania kliniczne

Wyizolowano DNA z 87 próbek krwi lub szpiku kostnego pacjentów i przeanalizowano je za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit. Ponadto określono ilościowy odsetek mutacji JAK2 V617F i porównano z wynikami testu przesiewowego uzyskanymi za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit (nr kat. 673223). Uzyskane dane przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Tabela kontyngencji przedstawiająca zgodność wyników uzyskanych za pomocą zestawu *ipsogen* JAK2 MutaQuant Kit i zestawu *ipsogen* JAK2 MutaScreen EZ Kit











		Wyniki z zestawu <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen EZ Kit			
		Wykryto mutację	Wynik niejednoznaczny	Nie wykryto mutacji	n
Wyniki z zestawu <i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit	Wykryto mutację	40	2	7	49
	Wynik niejednoznaczny	0	0	21	21
	Nie wykryto mutacji	0	0	17	17
	n	40	2	45	87
Zgodność wyników pozytywnych	100% (95-procentowy przedział ufności: 91%, 100%)				
Zgodność wyników negatywnych	71% (95-procentowy przedział ufności: 51%, 85%)				
Zgodność ogółem	89% (95-procentowy przedział ufności: 79%, 95%)				

Literatura

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R. L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E. J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. 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.
12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:

 Σ <N>	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Termin ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem **www.qiagen.com/Support**, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona **www.qiagen.com**).

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (12)	Na 12 reakcji: kontrola genu JAK2 typu dzikiego, kontrola genu JAK2 V617F, mieszanina starterów i sondy PPM-WT, mieszanina starterów i sondy PPM-VF	673522
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaQuant Kit (24)	Na 24 reakcje: kontrola genu JAK2 typu dzikiego, kontrola genu JAK2 V617F, mieszanina starterów i sondy PPM-WT, mieszanina starterów i sondy PPM-VF	673523
Rotor-Gene Q MDx — do analizy PCR w czasie rzeczywistym w zastosowaniach klinicznych, zwalidowany do użytku w diagnostyce in vitro (IVD)		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; obejmuje instalację i przeszkolenie	9002033

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie **www.qiagen.com**. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Ten produkt jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Produkty *ipsogen* nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży lub wykorzystywane do produkcji komercyjnych produktów bez pisemnej zgody firmy QIAGEN.

Informacje zawarte w niniejszym dokumencie mogą ulec zmianie bez powiadomienia. Firma QIAGEN nie ponosi żadnej odpowiedzialności za błędy, które mogą wystąpić w niniejszym dokumencie. Dokument ten uważa się za kompletny i dokładny w momencie jego opublikowania. Firma QIAGEN nie ponosi w żadnym wypadku odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody przypadkowe, specjalne lub wynikowe ani z tytułu odszkodowań wielokrotnych w związku z niniejszym dokumentem lub jego użyciem.

Produkty *ipsogen* są objęte gwarancją w odniesieniu do podanych specyfikacji. Wyłącznym obowiązkiem firmy QIAGEN i jedynym zadośćuczynieniem przysługującym klientowi jest bezpłatna wymiana produktów w przypadku, gdy ich działanie nie będzie zgodne z zapisami gwarancji.

Mutacja JAK2 V617F i jej zastosowania są chronione prawami patentowymi, w tym patentem europejskim EP1692281, patentami amerykańskimi 7,429,456 i 7,781,199, amerykańskimi zgłoszeniami patentowymi US20090162849 i US20120066776 i zagranicznymi odpowiednikami.

Zakup tego produktu nie przenosi żadnych praw do jego wykorzystania w badaniach klinicznych leków ukierunkowanych na JAK2V617F. Firma QIAGEN opracowuje specjalne programy licencyjne dla takich zastosowań. Z naszym działem prawnym można skontaktować się pod adresem jak2licenses@qiagen.com.

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

Umowa ograniczonej licencji

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* na następujące warunki:

1. Zestawu *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit* można używać wyłącznie zgodnie z dokumentem *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit — Instrukcja obsługi* i tylko razem ze składnikami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w dokumencie *ipsogen JAK2 MutaQuant Kit — Instrukcja obsługi* oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

Sie-16 HB-1353-003 © 2013–2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com

