

Jun 2016

Manuel du kit *ipsogen*[®] JAK2 MutaScreen



10 (n° de référence 673022)



24 (n° de référence 673023)

Version 1

IVD

Diagnostic quantitatif in vitro

À utiliser avec les instruments Rotor-Gene[®] Q,
Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] et LightCycler[®]



REF

673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE

R3

MAT

1072500FR



Sample & Assay Technologies

Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- Purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- Dosages d'acides nucléiques et de protéines
- Recherche micro-ARN et ARNi
- Automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Contenu	
Utilisation prévue	4
Résumé et explication	4
Principe de la procédure	6
Matériel fourni	8
Contenu du kit	8
Matériel nécessaire mais non fourni	9
Avertissements et précautions	10
Précautions générales	10
Stockage et manipulation des réactifs	11
Procédure	12
Préparation des échantillons ADN	12
Conservation des acides nucléiques	12
Protocoles	
■ qPCR sur instruments Rotor Gene Q avec rotor à 72 tubes	13
■ qPCR sur les instruments Applied Biosystems et ABI PRISM	23
■ qPCR sur l'instrument LightCycler 480	33
■ qPCR sur l'instrument LightCycler 2.0	42
Interprétation des résultats	47
Représentation graphique et critères de contrôle qualité	47
Calcul du ratio normalisé FAM/VIC et génotypage	48
Guide de dépannage	51
Contrôle qualité	53
Limitations	53
Caractéristiques des performances	54
Études non cliniques	54
Études cliniques	55
Références	61
Symboles	61
Coordonnées	62
Pour commander	63

Utilisation prévue

Les kits *ipsogen JAK2 MutaScreen* sont destinés à la détection de la mutation JAK2 V617F/G1849T à partir d'ADN génomique de sujets sur lesquels porte une suspicion de syndrome myéloprolifératif. L'absence de la mutation JAK2 V617F/G1849T n'exclut pas la présence d'autres mutations JAK2. Le test peut produire des résultats faux négatifs en cas de mutations additionnelles sur les codons 615 à 619 (1).

Remarque : ce kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, en combinaison avec les réactifs et les instruments validés. Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit, et/ou modification quelconque de l'un de ses composants, décharge QIAGEN de toute responsabilité.

Résumé et explication

Une mutation somatique récurrente, V617F, affectant la Tyrosine Kinase Janus 2 (JAK2), a été identifiée en 2005 (2-5), ce qui a permis une avancée majeure dans la compréhension, la classification et le diagnostic des syndromes myéloprolifératifs (SMP). Le JAK2 est une molécule de signalisation intracellulaire critique pour un certain nombre de cytokines dont l'érythropoïétine.

La mutation JAK2 V617F est détectée chez > 95 % des patients atteints de la maladie de Vaquez (PV), 50 à 60 % des patients atteints de thrombocythémie essentielle (TE) et chez 50 % des patients atteints de myélofibrose idiopathique (IMF). Le JAK2 V617F a également été détecté dans quelques rares cas de leucémie myélomonocytaire chronique, de syndrome myélodysplasique, de mastocytose systémique et de leucémie neutrophile chronique, mais dans 0 % des cas de LMC (6).

La mutation correspond au changement d'un seul nucléotide en position 1849 de la séquence JAK2, situé dans l'exon 14, entraînant la substitution d'une valine (V) par une phénylalanine (F) en position 617 de la protéine (domaine JH2). Elle entraîne l'activation constitutive de JAK2, la transformation hématopoïétique *in vitro* et la croissance des colonies érythroïdes, indépendante de l'érythropoïétine (CEE) chez les patients atteints de PV et chez un grand nombre de patients atteints de TE et d'IMF (7). Si la mutation JAK2 V617F représente un élément clé dans la transformation des cellules hématopoïétiques dans la SMP, les mécanismes pathologiques exacts menant avec la même mutation unique à des entités cliniques et biologiques différentes doivent encore être élucidés.

Le diagnostic de la SMP est généralement fondé sur des critères cliniques, des critères histologiques de la moelle osseuse et cytogénétiques. La découverte d'un marqueur moléculaire spécifique à une maladie permet de simplifier le processus de diagnostic et d'améliorer sa précision. La détection de la mutation JAK2 V617F fait désormais partie du critère de référence OMS (classification de

2008) pour le diagnostic des SMP BCR-ABL négatifs (tableau 1) et la présence de cette mutation est un critère majeur pour la confirmation du diagnostic.

Tableau 1. Critères de l’OMS pour le diagnostic des SMP (adaptés de la référence 8)

Critères pour le diagnostic de la maladie de Vaquez (PV)	
Majeur	<p>1. Hémoglobine (Hgb) > 18,5 g.dL⁻¹ (hommes) ou > 16,5 g.dL⁻¹ (femmes) ou Hgb ou hématocrite (Hct) > 99^{ème} centile de l’intervalle de référence pour l’âge, le sexe ou l’altitude de résidence ou Hgb > 17 g.dL⁻¹ (hommes) ou > 15 g.dL⁻¹ (femmes) si associé à une augmentation soutenue de ≥ 2 g.dL⁻¹ du niveau de ligne de base qui ne peut être attribuée à la correction de carences en fer ou Une masse élevée de globules rouges > 25 % au-dessus de la valeur normale médiane</p> <p>2. Présence de la mutation <i>JAK2V617F</i> ou d’une mutation similaire</p>
Mineur	<p>1. Myéloprolifération de la moelle osseuse sur les trois lignées 2. Niveau d’érythropoïétine dans le sérum inférieur à la normale 3. Croissance endogène des colonies érythroïdes</p>
Critères pour le diagnostic de la thrombocytémie essentielle (TE)	
Majeur	<p>1. Nombre de plaquettes ≥ 450 x 10⁹ L⁻¹ 2. Prolifération de la lignée mégacaryocytaire avec augmentation du nombre de mégacaryocytes matures et augmentés de taille Pas ou peu de prolifération de la lignée granulocytaire ou érythroïde 3. Ne correspond pas aux critères de l’OMS pour la leucémie myéloïde chronique (LMC), la maladie de Vaquez (PV), la myélofibrose idiopathique (IMF), le syndrome myélodysplastique (SMD) ou d’autres néoplasmes myéloïdes</p> <p>4. Démonstration de <i>JAK2V617F</i> ou d’un autre marqueur clonal ou Pas de preuve de thrombocytose réactive</p>
Mineur	-

Critères pour le diagnostic de la myélofibrose chronique (IMF)

- Majeur**
1. Prolifération de la lignée mégacaryocytaire et atypie accompagnée d'une fibrose réticulinique et/ou d'une fibrose collagène ou
En l'absence d'une fibrose réticulinique, les changements mégacaryocytaires doivent être accompagnés d'une augmentation du nombre de cellules de la moelle osseuse, d'une prolifération de la lignée granulocytaire et d'une érythropoïèse souvent diminuée (c'est-à-dire une forme préfibrotique d'IMF)
 2. Ne correspond pas aux critères de l'OMS pour (LMC), PV, SMD ou d'autres néoplasmes myéloïdes
 3. Démonstration de *JAK2V617F* ou d'un autre marqueur clonal ou
Pas de preuve de fibrose réactive de la moelle
- Mineur**
1. Leucoérythroblastose
 2. Augmentation du lactate déshydrogénase (LDH) dans le sérum
 3. Anémie
 4. Splénomégalie palpable

Récemment, des experts internationaux ont proposé des critères pour les essais thérapeutiques de PV et TE. En s'appuyant sur les données d'allogreffes, d'interférons alpha ou d'hydroxyurée, la quantification du JAK2 V617F a été intégrée comme outil potentiellement utile au suivi de la réponse au traitement (9). Une diminution du poids du JAK2 V617F a été observée en réponse à certains des nouveaux médicaments ciblés anti-JAK2 dans le développement clinique (10).

Principe de la procédure

La technique de discrimination allélique TaqMan[®] fait appel à l'utilisation de deux sondes fluorescentes dans un test multiplexe. L'une s'apparie parfaitement à la séquence de l'allèle 2 (par exemple l'allèle sauvage), l'autre étant complémentaire de la séquence de l'allèle 1 (par exemple l'allèle portant la mutation). Chaque sonde possède à son extrémité 5' un fluorophore spécifique, le Reporter, tel que le fluorophore FAM[™] ou VIC[®], ainsi qu'un chélateur de fluorescence (Quencher) à son extrémité 3'. Les sondes comportent également une boucle de repliement (MGB[™]) qui permet l'utilisation de sondes plus courtes avec une meilleure stabilité et donc une discrimination allélique plus précise.

Durant la phase d'extension de la PCR, la Taq ADN polymérase, qui possède une activité exonucléasique 5'→3', coupe la sonde parfaitement hybridée à la séquence cible, ce qui provoque la séparation du Reporter et du Quencher et permet ainsi une augmentation détectable de la fluorescence. La sonde imparfaitement hybridée est, elle, déplacée et non coupée par la Taq ADN

polymérase, ce qui ne permet pas la libération du fluorophore. Le signal VIC ou FAM généré est lu en fin de PCR (lecture en point final ou end point) et indique immédiatement la présence de la ou des séquences cibles dans l'échantillon (type sauvage ou wild type, allèle mutant ou les deux) en évitant les étapes post-PCR plus longues et laborieuses, et qui de plus augmentent le risque de contamination. La quantité réelle de la séquence cible n'est pas déterminée.

Le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen utilise cette technologie comme illustré ci-après (figure 1).

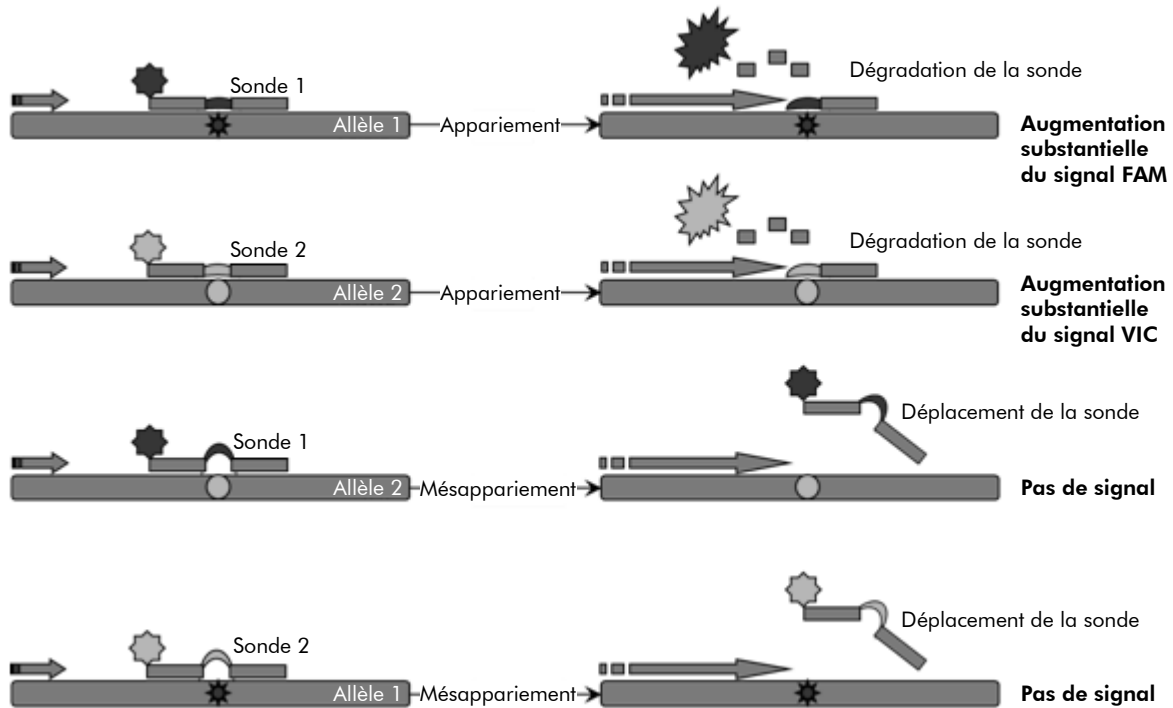


Figure 1. Test multiplexe avec sonde TaqMan Le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen utilise cette technologie pour la discrimination allélique.

Matériel fourni

Contenu du kit

Kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen		(10)	(24)
N° de référence		673022	673023
Nombre de réactions		24	10
V617F Positive Control* (témoin positif V617F)	PC-VF	30 µL	30 µL
V617F Negative Control† (témoin négatif V617F)	NC-VF	30 µL	30 µL
Cut-Off Sample (Échantillon Cut-Off)	COS-VF	30 µL	30 µL
Primers and probes mix (Mélange sonde et amorces) JAK2 V617F‡	PPM-VF 10x	70 µL	145 µL
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit Handbook (en anglais)		1	1

* Témoin positif : 100 % ADN V617F.

† Témoin négatif : 100 % ADN de type sauvage, 0 % V617F.

‡ Mélange spécifique d'amorces sens et anti-sens pour le gène JAK2 et de sondes V617F FAM spécifique de l'allèle muté et WT VIC spécifique de l'allèle sauvage.

Remarque : centrifuger brièvement les tubes avant utilisation.

Remarque : l'analyse d'échantillons inconnus avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen requiert l'extraction d'ADN génomique. Les réactifs nécessaires à l'extraction d'ADN (p. ex. QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit, n° réf. 51304) ne sont pas fournis et doivent être validés en combinaison avec le kit.

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Réactifs

- Eau exempte de nucléase pour PCR
- Tampon TE exempt de nucléase 1x, pH 8.0 (p. ex. Thermo Fisher Scientific Inc., n° réf. 12090015)
- Tampon et *Taq* ADN polymérase : les réactifs validés sont le TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., n° réf. 4304437) et le LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, n° réf. 04535286001)
- Réactifs sur gel contenant 0,8-1 % d'aragose dans tampon d'électrophorèse à 0,5x TBE

Consommables

- Cônes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants
- Tubes de PCR sans RNase et DNase de 0,5 ou 0,2 mL
- Glace

Équipement

- Pipettes* dédiées à la PCR (1–10 μ L ; 10–100 μ L ; 100–1 000 μ L)
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes de réaction de 0,2 mL/0,5 mL (capable d'atteindre 10 000 tr/min)
- Spectrophotomètre* pour la quantification de l'ADN
- Instrument de PCR en temps réel :* Rotor-Gene Q 5plex HRM ou autre instrument Rotor-Gene ; LightCycler 2.0 ou 480 ; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS ou ABI PRISM 7900HT SDS ; et matériels spécifiques associés
- Équipement pour l'électrophorèse par gel en champ pulsé

* S'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Jeter les échantillons et les tests usagés conformément aux réglementations de sécurité locales.

Précautions générales

Les tests de qPCR nécessitent de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et conformes aux réglementations applicables et les normes pertinentes.

L'utilisation de ce kit est destinée au diagnostic in vitro. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales. Des dilutions supplémentaires des réactifs ou une modification des temps d'incubation et des températures peuvent engendrer des données aberrantes ou erronées. Le réactif PPM-VF peut être altéré s'il est exposé à la lumière. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés dans le cadre de ce test. Aucune substitution ne doit être faite pour garantir les performances optimales du test.

Prendre des précautions afin de prévenir :

- Les contaminations par les DNases, qui peuvent causer la dégradation de la matrice d'ADN.
- Les contaminations par d'autres ADN ou les contaminations croisées par les produits de PCR, qui peuvent générer des signaux faux positifs.

Nous recommandons par conséquent :

- D'utiliser des consommables exempts de nucléase (par ex. pipettes, cônes, tubes) et de porter des gants lors de l'expérience.
- D'utiliser de nouveaux cônes aérosol-résistants à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
- De préparer le pré-mélange pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, cônes...) dans une zone où aucune matrice d'ADN (ADN, plasmides) n'est introduite. D'ajouter les échantillons dans une zone séparée (de préférence dans une pièce séparée) avec du matériel spécifique (pipettes, cônes, etc.).

Stockage et manipulation des réactifs

Les kits sont expédiés sur un lit de carboglace et doivent être stockés entre -30 °C et -15 °C à réception.

- Éviter toute exposition à la lumière des mélanges sonde et amorces (tube PPM-VF).
- Mélanger doucement et centrifuger les tubes avant leur ouverture.
- Stocker tous les composants du kit dans leur contenant original.

Ces conditions de stockage s'appliquent aux composants ouverts ou non. Tous les composants stockés dans des conditions autres que celles mentionnées sur l'étiquetage peuvent ne pas fonctionner correctement et affecter les résultats des tests.

Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions de stockage adéquates, le produit conservera ses performances jusqu'à la date imprimée sur l'étiquetage.

Il n'y a pas de signe visible indiquant une chute de stabilité du produit. Cependant, les témoins positifs et négatifs doivent être analysés systématiquement en parallèle de l'échantillon à quantifier.

Procédure

Préparation des échantillons ADN

L'ADN génomique peut être obtenu à partir de sang total, de lymphocytes issus du sang périphérique purifié, de cellules polynucléaires ou de granulocytes. Pour être en mesure de comparer les résultats, nous recommandons de conserver le même type de fraction cellulaire ainsi que la même méthode d'extraction ADN. L'extraction d'ADN peut être faite selon toute méthode « maison » ou commerciale validée.

La quantité d'ADN est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm. La qualité de l'ADN peut être vérifiée par spectrophotométrie ou par électrophorèse sur gel.

Le ratio A_{260}/A_{280} doit se situer entre 1,7 et 1,9. Un ratio inférieur indique habituellement une contamination par une protéine ou des produits chimiques organiques. L'analyse électrophorétique sur gel contenant entre 0,8 et 1 % d'agarose doit permettre d'identifier l'ADN isolé sous la forme d'une bande distincte d'environ 20 kb. Une étendue plus fine est acceptable.

L'ADN produit est dilué à 5 ng/ μ L dans du tampon TE. La réaction de qPCR est optimisée pour 25 ng d'ADN génomique purifié.

Conservation des acides nucléiques

Pour une conservation à court terme jusqu'à 24 heures, nous recommandons de stocker les acides nucléiques purifiés entre 2 et 8 °C. Pour une conservation à long terme au-delà de 24 heures, nous recommandons un stockage à -20 °C.

Protocole : qPCR sur instruments Rotor Gene Q avec rotor à 72 tubes

Pour l'utilisation de cet instrument, nous recommandons de réaliser toutes les mesures en double, comme indiqué dans le tableau 2.

Tableau 2. Nombre de réactions pour les instruments Rotor Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor Gene Q 5plex HRM avec rotor à 72 tubes

Échantillons	Réactions
Mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-VF) (56 réactions)	
24 échantillons d'ADN	24 x 2 réactions
3 ADN témoins	3 x 2 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Témoin eau	2 réactions

Traitement des échantillons sur les instruments Rotor-Gene Q avec rotor à 72 tubes

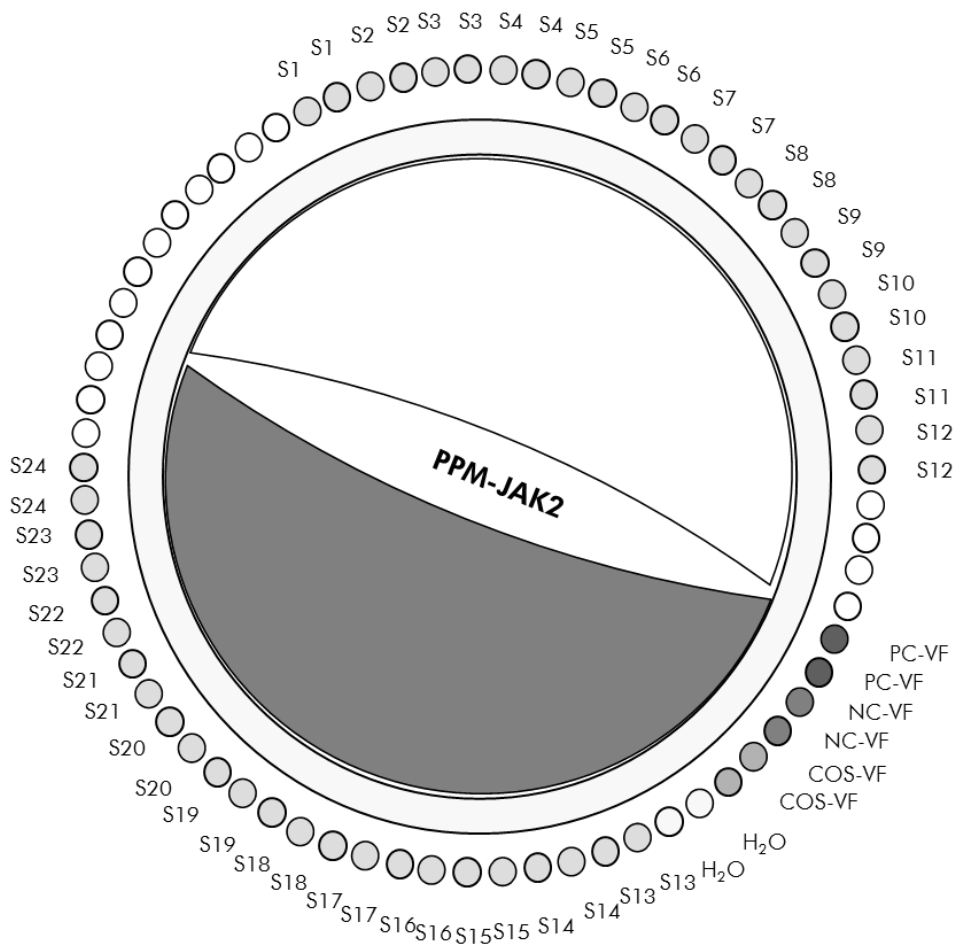


Figure 2. Suggestion de positionnement sur rotor pour chaque expérience avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen PC-VF : témoin positif ; NC-VF : témoin négatif ; COS-VF : échantillon Cut-Off ; S : échantillon ADN ; H₂O : témoin eau.

Remarque : veiller à toujours placer un échantillon à tester en position n° 1 du rotor. Dans le cas contraire, durant la phase de calibration, l'instrument n'effectuera pas de calibration et des données de fluorescences erronées seront acquises.

Compléter toutes les autres positions avec des tubes vides.

qPCR sur les instruments Rotor-Gene Q avec rotor à 72 tubes

Remarque : effectuer toutes les étapes sur de la glace.

Procédure

1. Décongeler tous les composants nécessaires et les placer sur de la glace.

Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

2. **Agiter au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.**
3. **Préparer le mélange de qPCR suivant selon le nombre d'échantillons à tester.**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 3 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 μ L. Un pré-mélange peut être préparé en fonction du nombre de réactions à l'aide du même mélange d'amorce et de sonde. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Sur les instruments Rotor-Gene, le kit *ipsogen JAK2 MutaScreen* peut être utilisé pour l'analyse de 24 échantillons testés en double en une expérience (figure 2), de 20 échantillons testés en double en 2 expériences ou de 15 échantillons testés en double en 3 expériences.

Tableau 3. Préparation du mélange qPCR

Composant	Nombre de réactions (μ L)				Concentration finale
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mélange sonde et amorces, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	5	285	145	95	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 5)	5	5 chac un	5 chac un	5 chac un	–
Volume total	25	25 cha cun	25 cha cun	25 cha cun	–

* 24 échantillons ; 1 expérience/kit.

† 10 échantillons ; 2 expériences/kit.

‡ 5 échantillons ; 3 expériences/kit.

4. **Agiter au vortex et centrifuger brièvement le mélange qPCR (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.**
5. **Déposer 20 μ L du pré-mélange de qPCR par tube.**
6. **Ajouter 5 μ L du matériel à quantifier (échantillon d'ADN ou de témoins) dans le tube correspondant (volume total 25 μ L).**
7. **Mélanger doucement en pipetant.**
8. **Fermer les tubes PCR. Placer les tubes dans le rotor à 72 tubes conformément aux recommandations du fabricant. Compléter toutes les autres positions avec des tubes vides.**
9. **S'assurer que la bague de fermeture (accessoire de l'instrument Rotor-Gene) est placée au-dessus du rotor pour empêcher toute ouverture accidentelle des tubes lors de l'analyse. Placer les tubes dans l'instrument Rotor-Gene Q conformément aux recommandations du fabricant.**
10. **Pour la détection de l'ADN JAK2, créer un profil de température en suivant les étapes suivantes.**

Réglage des paramètres de test généraux	Figures 3, 4
Amplification de l'ADN	Figure 5
Réglage de la sensibilité des canaux de fluorescence	Figure 6

Vous trouverez de plus amples informations sur la programmation des instruments Rotor-Gene dans le manuel de l'utilisateur de l'instrument. Dans les illustrations, les paramètres logiciels sont encadrés en gras et en noir. Les illustrations pour les instruments Rotor-Gene Q sont incluses.

11. **Lancer le logiciel du Rotor-Gene. Dans la fenêtre « New Run » (Nouvelle analyse), cliquer sur « New » (Nouveau).**

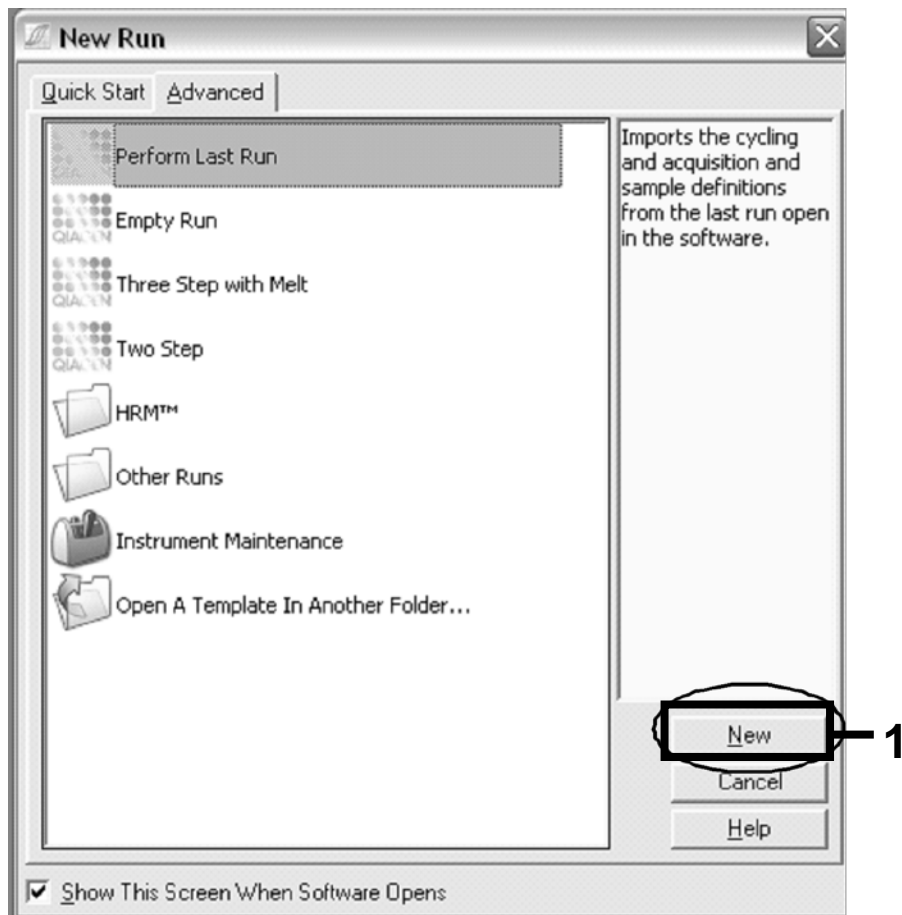


Figure 3. Boîte de dialogue « New Run » (Nouvelle analyse)

12. Dans « New Run Wizard » (Assistant nouvelle analyse), définir le volume à 25 μ L et cliquer sur « Next » (Suivant).

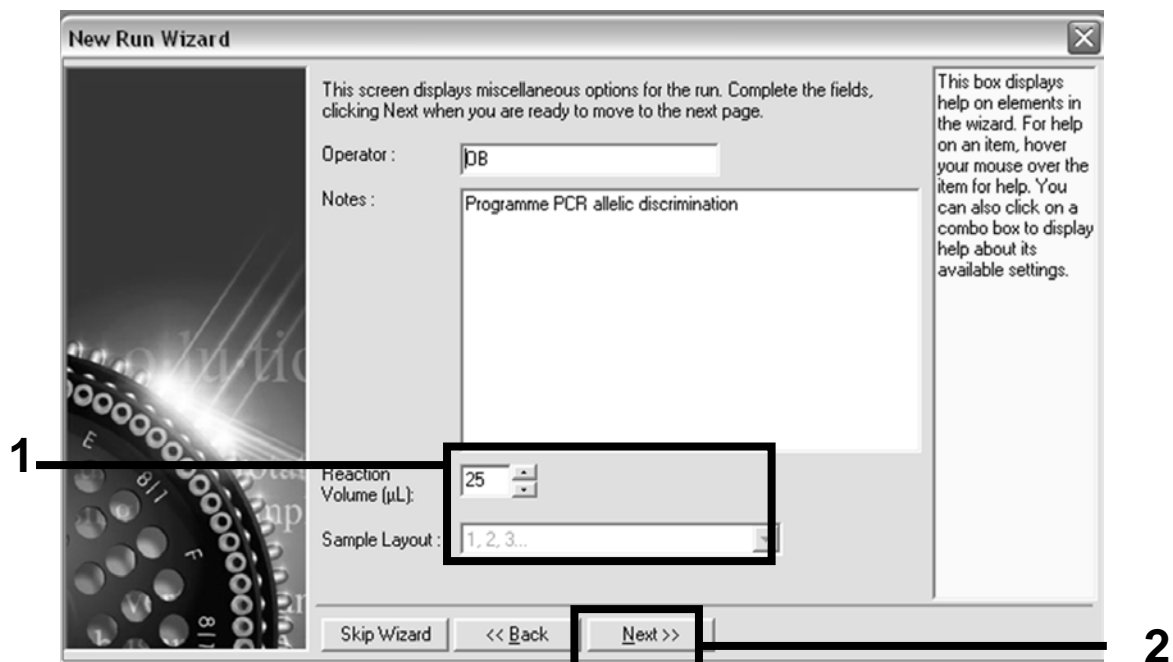


Figure 4. Réglage des paramètres de test généraux

13. Cliquer sur le bouton « Edit Profile » (Modifier profil) dans la boîte de dialogue suivante « New Run Wizard » (Assistant nouvelle analyse) puis programmer le profil de température conformément au tableau 4 et à la figure 5. S'assurer d'ajouter l'étape d'acquisition finale à 60 °C, à chaque cycle, et pour les deux canaux Green (FAM) et Yellow (VIC).

Tableau 4. Profil de température

Attente	Température : 50 degrés Temps : 2 min
Attente 2	Température : 95 degrés Temps : 10 min
Cycle	50 fois 92 degrés pour 15 s 60 degrés pour 1 min ; single Acquisition de la fluorescence FAM dans le canal Cycling A Green Acquisition de la fluorescence VIC dans le canal Cycling A Yellow

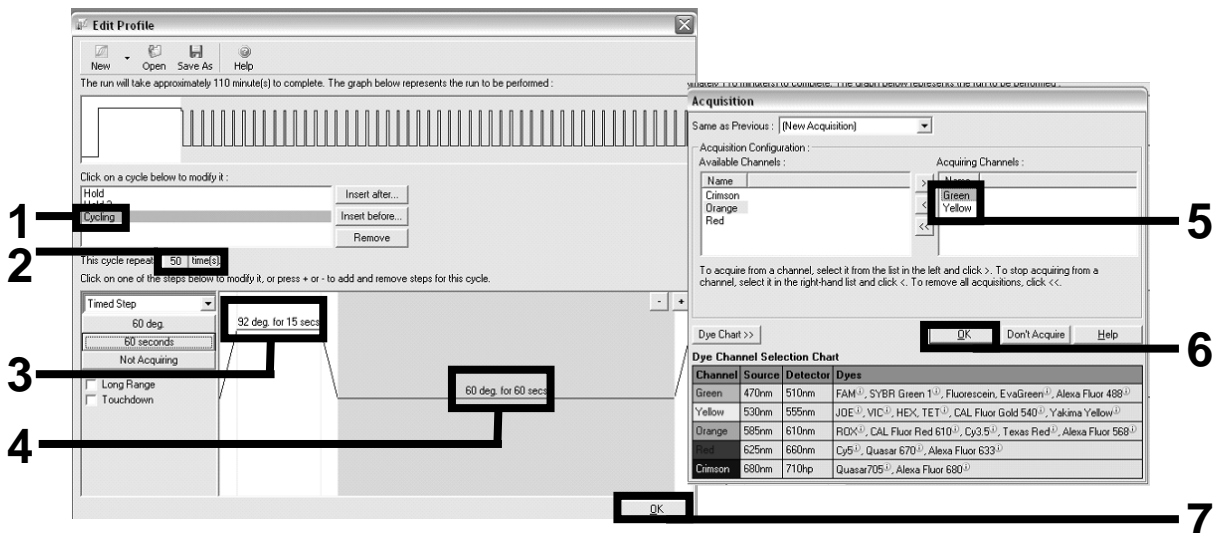


Figure 5. Amplification de l'ADN

14. L'intervalle de détection des canaux de fluorescence doit être déterminé conformément aux intensités de fluorescence des tubes PCR. Cliquer sur « Gain Optimisation » (Optimisation de l'augmentation) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant nouvelle analyse) pour ouvrir la boîte de dialogue

« Auto-Gain Optimisation Setup » (Réglage optimisation auto de l'augmentation). Cliquer sur « Optimise Acquiring » (Optimiser l'acquisition, figure 6) puis sur « OK » dans les boîtes de dialogue « Auto-Gain Optimisation Channel Settings » (Réglages du canal pour l'optimisation auto de l'augmentation) pour chaque canal (Green et Yellow, figure 6). S'assurer que la case « Perform Optimisation Before 1st Acquisition » (Procéder à l'optimisation avant la 1ère acquisition) est cochée pour chaque canal (figure 6).

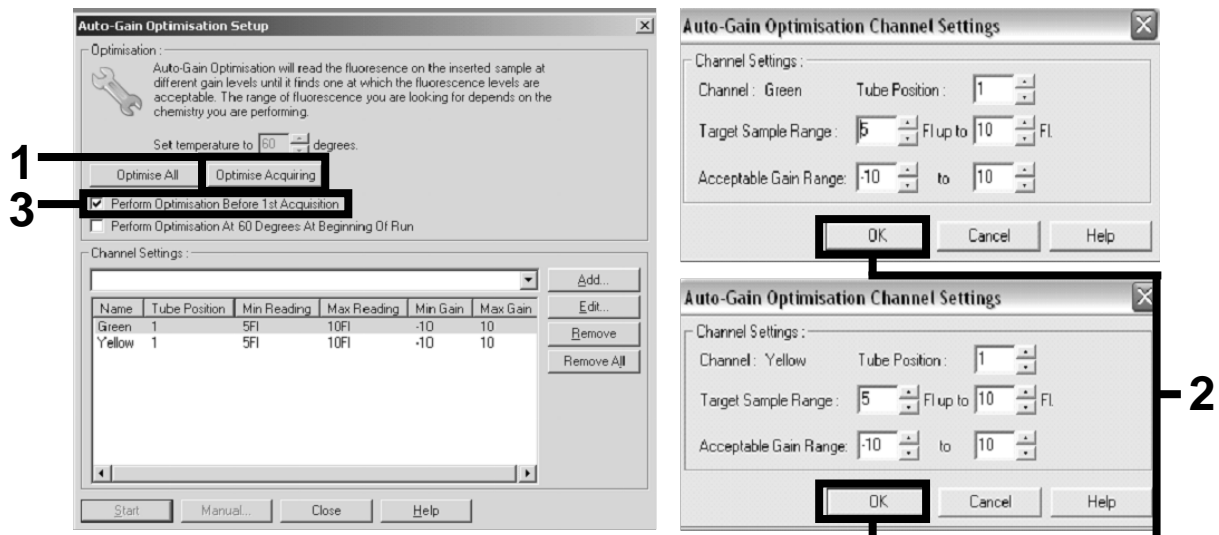


Figure 6. Réglage de la sensibilité des canaux de fluorescence

15. Les valeurs d'augmentation déterminées par la calibration de canal sont enregistrées automatiquement et listées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation. Cliquer sur « Start Run » (Démarrer l'analyse) pour lancer le programme.

16. Saisir le positionnement sur rotor dans le logiciel Rotor-Gene (figure 7).

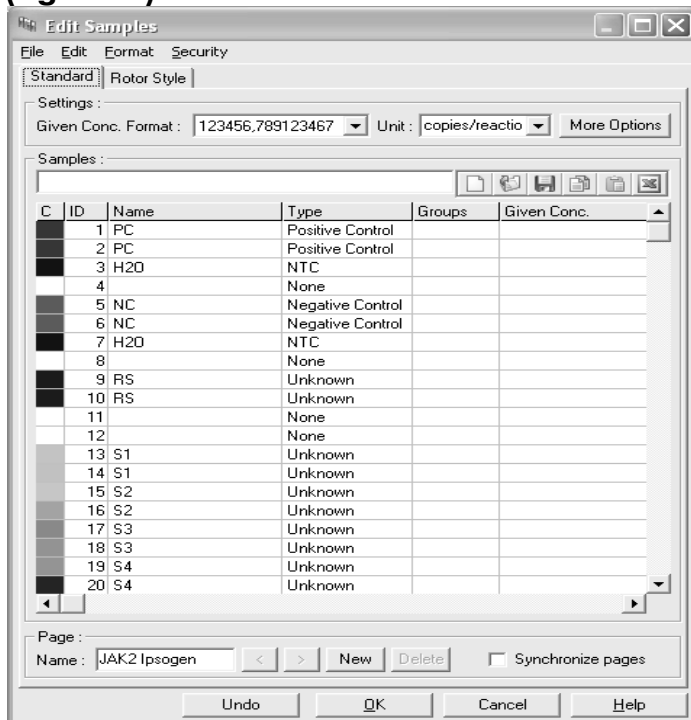


Figure 7. Positionnement Rotor-Gene : « Edit Samples » (Modifier échantillons)

Procédure d'analyse en End Point pour instruments Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. À la fin du programme de PCR, cliquer sur « Analysis » (Analyse) dans la barre d'outils (figure 8).



Figure 8. Analysis (Analyse)

18. Dans la boîte de dialogue « Analysis » (Analyse, figure 9), double-cliquer sur « Cycling A Green » (Cycle A vert) puis sur « OK ». Répéter l'opération pour « Cycling A Yellow » (cycle A jaune).

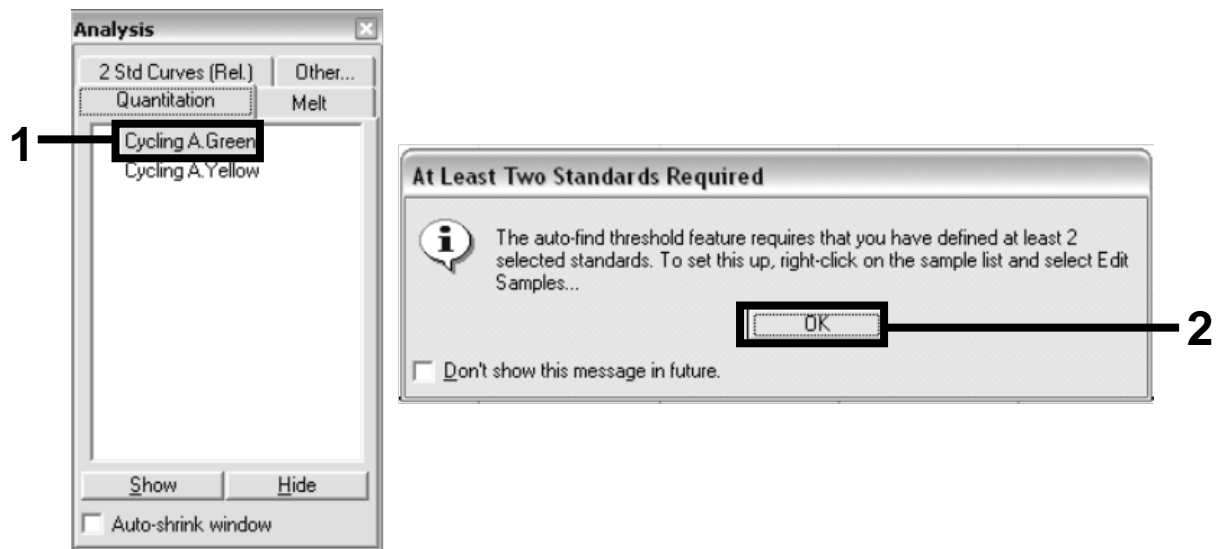


Figure 9. Quantitation (Quantification) : « Cycling A. Green » (Cycle A vert)

19. Une nouvelle fenêtre apparaît (figure 10). Cliquer sur « Slope Correct » (Pente correcte) dans les deux panneaux, comme indiqué dans la figure 10.

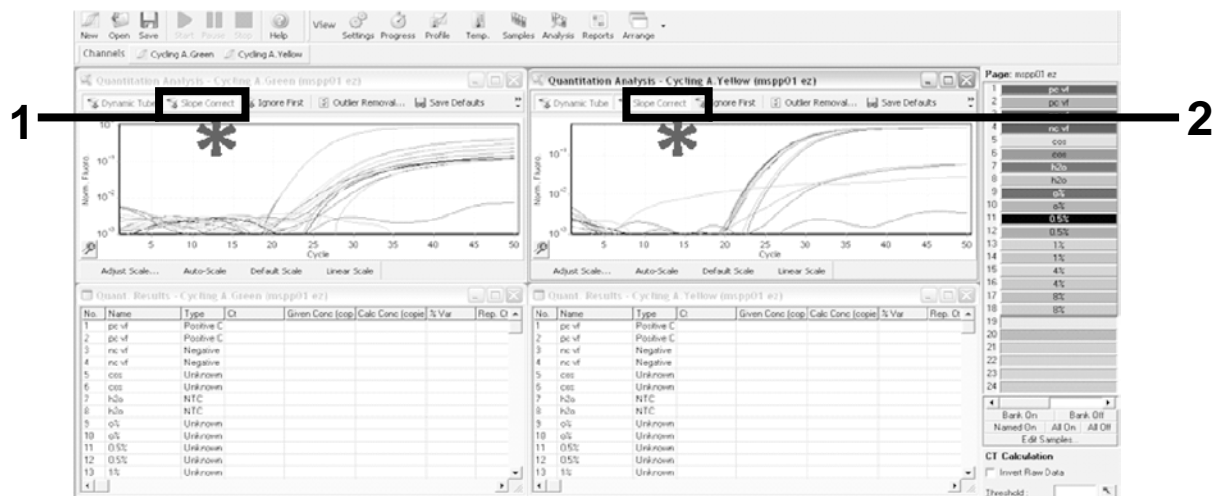


Figure 10. Paramètre « Slope Correct » (Pente correcte)

20. Pour exporter les données, enregistrer une feuille de calcul Excel®. Cliquer sur « OK », nommer le fichier d'export et sauvegarder ce fichier texte (*.txt).

21. Ouvrir le fichier texte sous Excel et sélectionner la colonne A. Cliquer sur « Data » (Données) puis « Convert » (Convertir) et « Next » (Suivant). Sélectionner « Comma » (Virgule) puis cliquer sur « End » (Terminer). Les résultats apparaîtront comme indiqué dans la figure 11.

Données brutes

ID	MSPP01	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	FAM	VIC
9	1 pC	5.67432	5.89797	5.88158	5.93228	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.87425	0.12669
10	2 pC	5.67392	5.93191	5.93755	5.93244	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.12847	0.12551
11	3 nC	5.74617	5.96677	5.96391	5.91854	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.79521	0.795
12	4 nC	6.10742	6.40127	6.41794	6.48171	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.90572	0.80735
13	5 rS	6.14824	6.24693	6.25727	6.30166	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.24818	0.78445
14	6 rS	5.989	5.93827	5.9459	5.98122	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.22323	0.78445
15	7 h20	6.01612	6.13835	6.13298	6.16018	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	2.24E-03	0.41E-03
16	8 h20	5.77198	5.954	5.98855	5.90239	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.1984	0.7831
17	9 0	5.78232	5.94288	5.9374	5.9049	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.12894	0.8052
18	10 0	5.88827	5.91948	5.92752	5.92732	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.12894	0.7831
19	11 0,5	5.7919	5.82568	5.86641	5.84186	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.12894	0.7831
20	12 0,5	6.19059	6.16999	6.16846	6.20521	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	0.19851	0.81144

Données standardisées

ID	MSPP01	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	FAM	VIC
39	1 pC	5.24E-03	5.07E-03	4.89E-03	4.72E-03	0	0	0	0	0	0	0	0.87425	0.12669
40	2 pC	4.85E-03	2.88E-03	3.1E-03	3.34E-03	0	0	0	0	0	0	0	0.12847	0.12551
41	3 nC	4.1E-03	2.23E-03	2.05E-03	1.88E-03	0	0	0	0	0	0	0	0.79521	0.795
42	4 nC	6.10742	6.40127	6.41794	6.48171	0	0	0	0	0	0	0	0.90572	0.80735
43	5 rS	6.14824	6.24693	6.25727	6.30166	0	0	0	0	0	0	0	0.24818	0.78445
44	6 rS	5.989	5.93827	5.9459	5.98122	0	0	0	0	0	0	0	0.22323	0.78445
45	7 h20	6.01612	6.13835	6.13298	6.16018	0	0	0	0	0	0	0	2.24E-03	0.41E-03
46	8 h20	5.77198	5.954	5.98855	5.90239	0	0	0	0	0	0	0	0.1984	0.7831
47	9 0	5.78232	5.94288	5.9374	5.9049	0	0	0	0	0	0	0	0.12894	0.8052
48	10 0	5.88827	5.91948	5.92752	5.92732	0	0	0	0	0	0	0	0.12894	0.7831
49	11 0,5	5.7919	5.82568	5.86641	5.84186	0	0	0	0	0	0	0	0.12894	0.7831
50	12 0,5	6.19059	6.16999	6.16846	6.20521	0	0	0	0	0	0	0	0.19851	0.81144

PCR (protocole n° 50)

Nom de l'échantillon

Colonne FAM

Colonne VIC

Figure 11. Exemple de résultats, affichés dans le fichier Excel

Remarque : le fichier contient à la fois les données brutes et les données « standardisées ». Seules les données « standardisées » doivent être utilisées. Ces données figurent dans les sections « Quantitative analysis of channel » « Cycling A Green » et « Quantitative analysis of channel Cycling A Yellow ». Les données destinées à être interprétées sont celles acquises au 50^{ème} cycle de PCR (dans les cercles à droite).

Protocole : qPCR sur les instruments Applied Biosystems et ABI PRISM

Pour l'utilisation d'une plaque à 96 puits, nous recommandons de réaliser toutes les mesures en double, comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5. Nombre de réactions pour les instruments Applied Biosystems 7300 et 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ou ABI PRISM 7900HT

Échantillons	Réactions
Mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-VF) (56 réactions)	
24 échantillons d'ADN	24 x 2 réactions
3 ADN témoins	3 x 2 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Témoin eau	2 réactions

Traitement des échantillons sur les instruments Applied Biosystems 7300 et 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ou ABI PRISM 7900HT

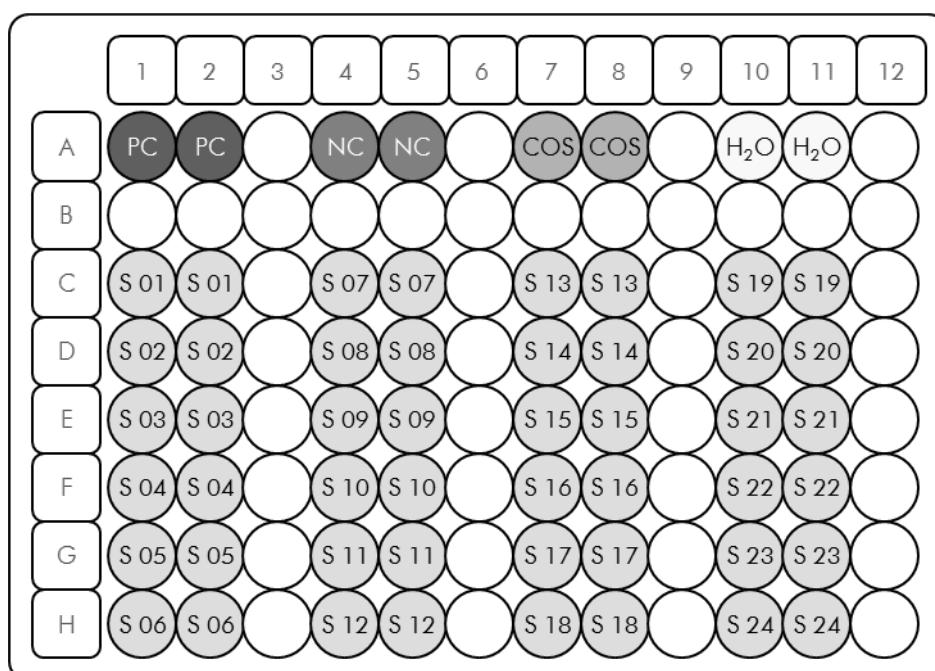


Figure 12. Suggestion de positionnement de plaque pour chaque expérience avec le kit ipsogen JAK2 MutaScreen PC : témoin positif ; NC : témoin négatif ; COS : échantillon Cut-Off ; S : échantillon ADN ; H₂O : témoin eau.

qPCR sur les instruments Applied Biosystems 7300 et 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ou ABI PRISM 7900HT

Remarque : effectuer toutes les étapes sur de la glace.

Procédure

1. Décongeler tous les composants nécessaires et les placer sur de la glace.

Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

2. Agiter au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.

3. Préparer le mélange de qPCR suivant selon le nombre d'échantillons à tester.

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 6 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 μ L. Un pré-mélange peut être préparé en fonction du nombre de réactions à l'aide du même mélange d'amorce et de sonde. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Sur les instruments Applied Biosystems 7300 et 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ou ABI PRISM 7900HT, le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen peut être utilisé pour l'analyse de 24 échantillons testés en double en une expérience (figure 12), de 20 échantillons testés en double en 2 expériences ou de 15 échantillons testés en double en 3 expériences.

Tableau 6. Préparation du mélange qPCR

Composant	Nombre de réactions (μL)				Concentration finale
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mélange sonde et amorces, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	5	285	145	95	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	25 chacun	–

* 24 échantillons ; 1 expérience/kit.

† 10 échantillons ; 2 expériences/kit.

‡ 5 échantillons ; 3 expériences/kit.

4. **Agiter au vortex et centrifuger brièvement le mélange qPCR (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.**
5. **Déposer 20 μL du pré-mélange de qPCR par puits.**
6. **Ajouter 5 μL du matériel à quantifier (échantillon d'ADN ou de témoins) dans le puits correspondant (volume total 25 μL).**
7. **Mélanger doucement en pipetant.**
8. **Fermer la plaque et la centrifuger brièvement (300 x g, environ 10 s).**
9. **Placer la plaque dans le thermocycleur conformément aux recommandations du fabricant.**
10. **Programmer le thermocycleur avec le programme de cycle comme indiqué dans le tableau 7 et démarrer l'analyse.**

Tableau 7. Profil de température pour les instruments Applied Biosystems et ABI PRISM

Attente	Température : 50 °C Temps : 2 minutes
Attente 2	Température : 95 °C Temps : 10 minutes
Cycle	50 fois 92 °C pour 15 secondes 60 °C pour 1 minute

Procédure de l'analyse post-read pour les instruments Applied Biosystems et ABI PRISM

Pour plus de détails sur la programmation des instruments Applied Biosystems 7300 et 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 ou ABI PRISM 7900HT, se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument. Pour un meilleur aperçu, ces paramètres logiciels sont encadrés en gras et en noir.

- 11. Une fois l'analyse terminée, sélectionner « Start/Program » (Démarrer/Programmes) puis « File/New » (Fichier/Nouveau).**
- 12. Dans la boîte de dialogue « New Document Wizard » (Assistant nouveau document), cliquer dans la liste déroulante sur « Assay » (Test) et sélectionner « Allelic Discrimination » (Discrimination allélique, figure 13).**

13. Accepter les réglages par défaut proposés pour « Container » (Contenant) et « Template fields » (matrice) (« 96-Well Clear » et « Blank Document » ; figure 13). Dans le champ « Plate Name » (Nom de la plaque), saisir *AD Post-read* (figure 13) puis cliquer sur « Next > » (Suivant) pour accéder à la boîte de dialogue « Select Markers » (Sélectionner les marqueurs).

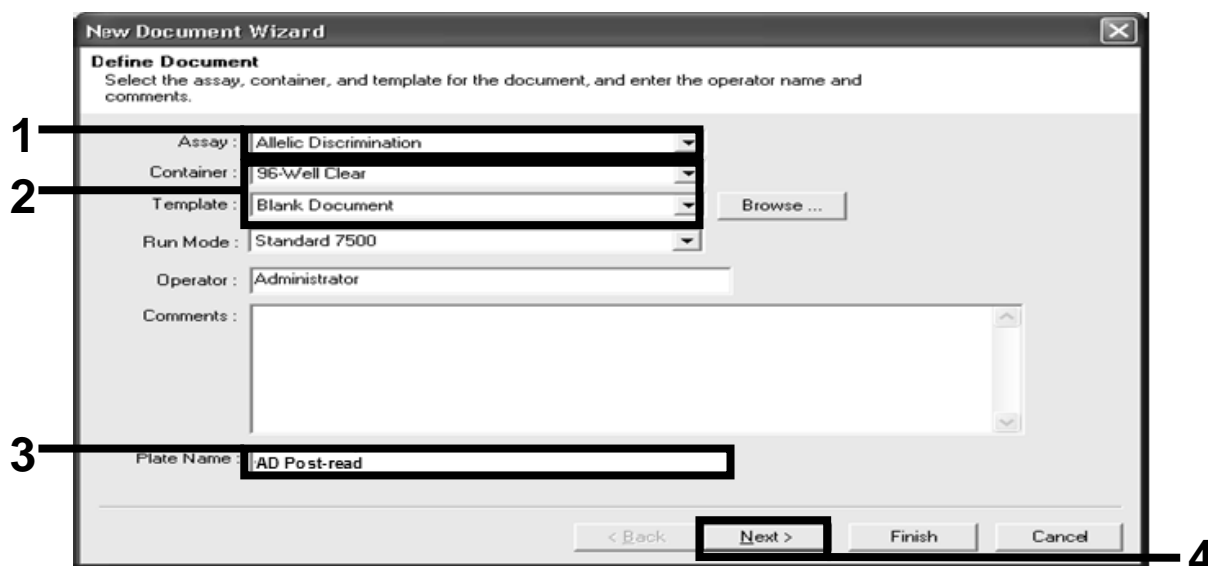


Figure 13. Préréglages pour la création d'une nouvelle analyse post-read (« New Document Wizard », Assistant nouveau document)

14. Si le panneau « Markers in Document » (Marqueurs dans le document) de la boîte de dialogue « Select Markers » (Sélectionner les marqueurs) contient le marqueur pour votre application, continuer avec l'étape 18. Sinon, continuer avec l'étape 15.

15. Créer les détecteurs et les marqueurs comme suit. Cliquer sur « New Detector » (Nouveau détecteur) (figure 14).

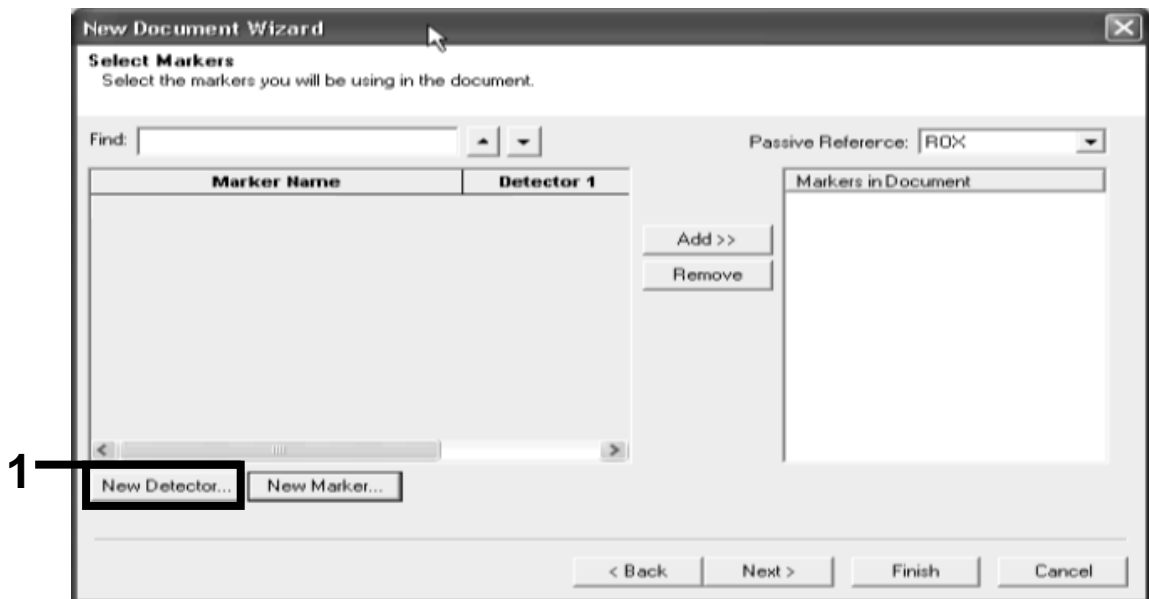


Figure 14. Le panneau « Markers in Document » (Marqueurs dans le document) ne contient pas de marqueur adapté à votre application

16. Dans la boîte de dialogue « New Detector » (Nouveau détecteur), saisir *Allele A* dans le champ « Name » (Nom) (figure 15). Laisser « Reporter Dye » (Marqueur de fluorescence) sur « FAM ». Cliquer sur le bouton « Color » (Couleur), sélectionner une couleur, puis cliquer sur « OK » (figure 15). Cliquer sur « Create Another » (Créer autre, figure 15).

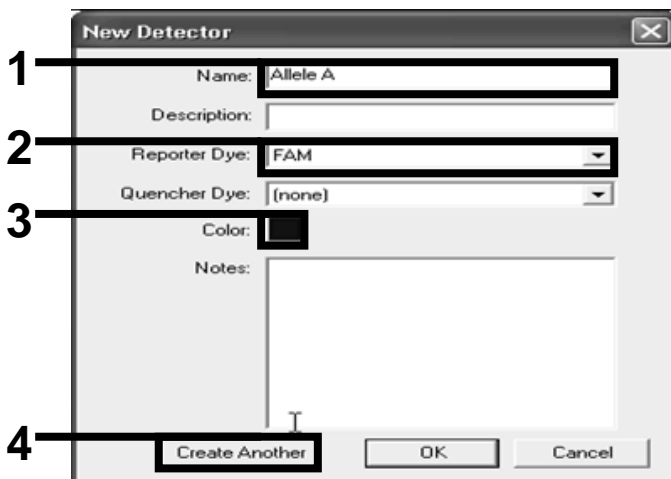


Figure 15. Création de détecteurs

17. Dans la boîte de dialogue « New Detector » (Nouveau détecteur), saisir *Allele B* dans le champ « Name » (Nom). Sélectionner « VIC » dans le champ « Reporter Dye » (Marqueur de fluorescence). Cliquer sur le bouton « Color » (Couleur), sélectionner une couleur, puis cliquer sur « OK ».
18. Cliquer sur « New Marker » (Nouveau marqueur) dans la boîte de dialogue « Select Markers » (Sélectionner marqueurs) (voir figure 14).
19. Dans la boîte de dialogue « New Marker » (Nouveau marqueur), saisir *JAK2* dans le champ « New Marker Name » (Nom du nouveau marqueur) (figure 16). Sélectionner les détecteurs « Allele A » et « Allele B » comme créés dans les étapes 16 et 17 (ou déjà définis) puis cliquer sur « OK » (figure 16).

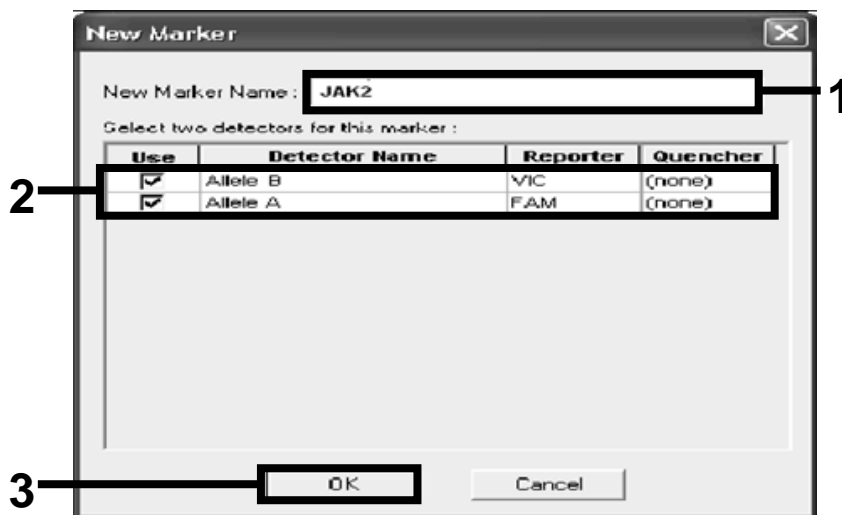


Figure 16. Création de marqueurs

20. Dans la boîte de dialogue « Select Markers » (Sélectionner marqueurs), sélectionner « JAK2 » comme créé ci-dessus ou un autre marqueur prédéfini puis cliquer sur « Add>> » (Ajouter, figure 17).

Remarque : pour enlever un marqueur, le sélectionner et cliquer sur « Remove » (Supprimer).

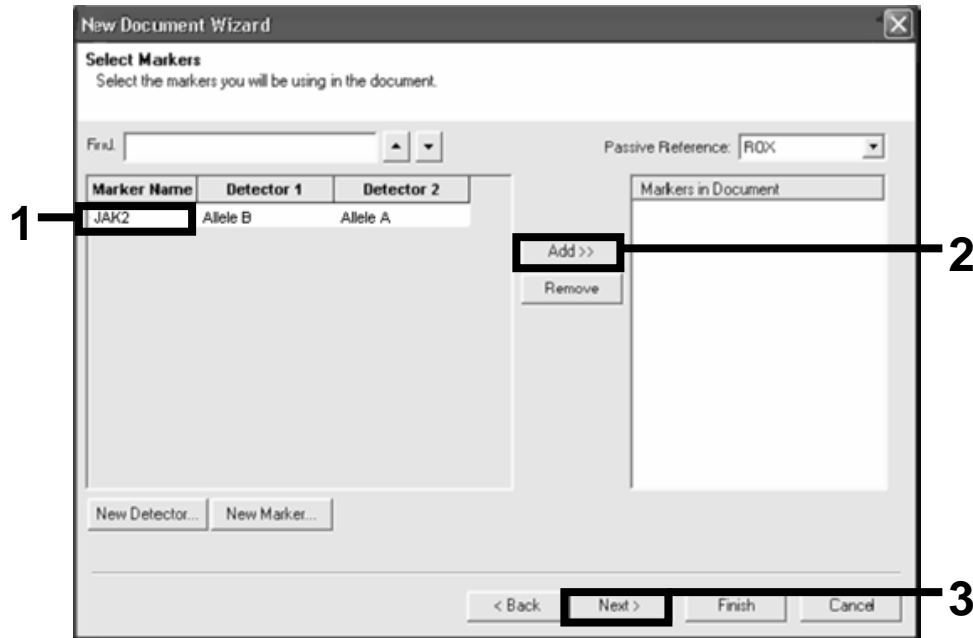


Figure 17. Sélection des marqueurs

21. Cliquer sur « Next> » (Suivant).

22. Dans la boîte de dialogue « Setup Sample Plate » (Configuration de la plaque d'échantillon), cliquer et faire glisser pour sélectionner le marqueur correspondant aux puits qui contiennent des échantillons. Cliquer sur « Finish » (Terminer).

23. Sélectionner l'onglet « Instrument » et modifier le volume d'échantillon à 25 μ L.

24. Sélectionner « File/Save » (Fichier/Enregistrer), puis cliquer sur « Save » (Enregistrer) pour conserver le nom attribué lorsque vous avez créé la plaque.

25. Charger la plaque réactionnelle sur l'instrument selon les recommandations du fabricant.

26. Lancer l'expérience de post-read. Cliquer sur « Post-Read ».

L'instrument effectuera une analyse d'1 cycle pour 60 s à 60 °C. Au cours de cette analyse, l'instrument collecte les fluorescences FAM et VIC dans chaque puits (figure 18).

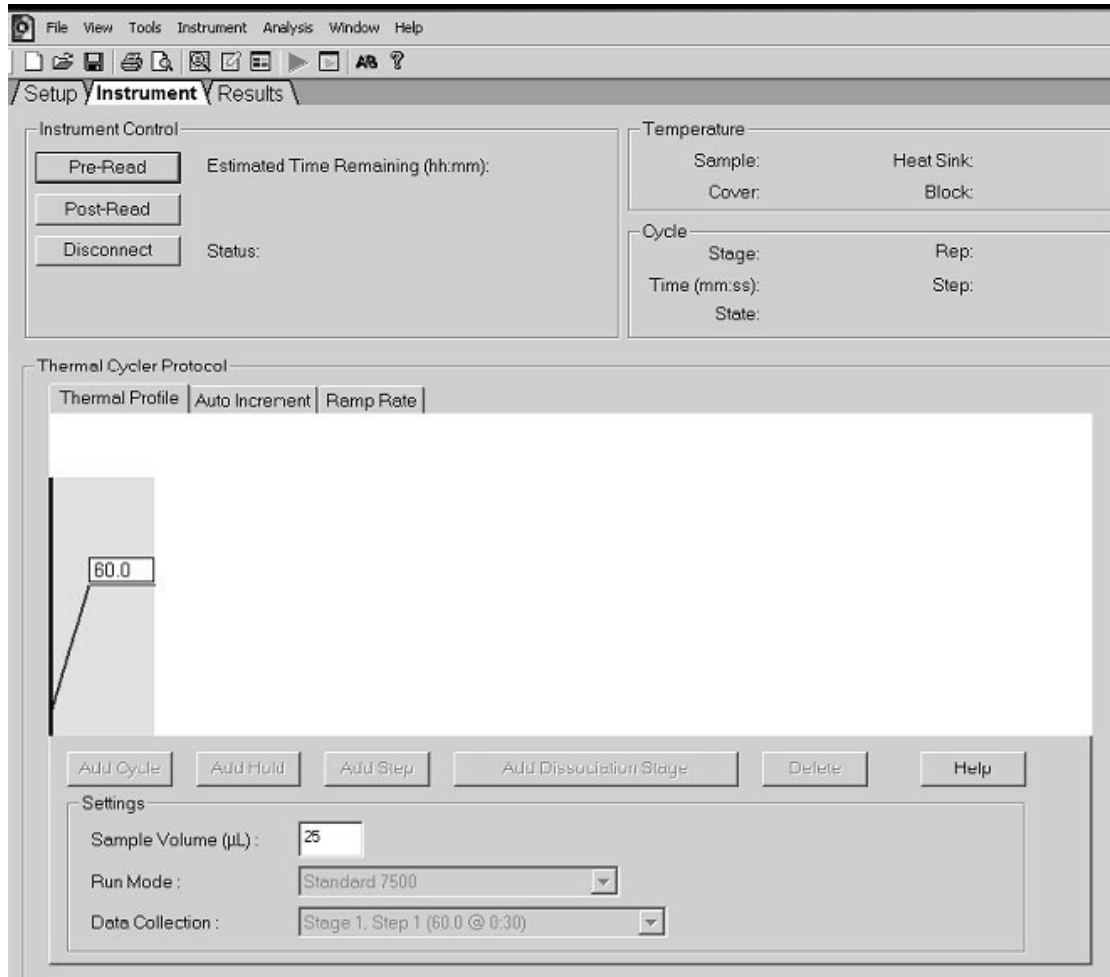


Figure 18. Étape Post-Read

27. Sélectionner « File/Export » (Fichier/Exporter) puis cliquer sur « Results » (Résultats) pour exporter les résultats vers un fichier Excel. Les résultats apparaîtront comme indiqué dans la figure 19.

		Échantillon 1 VIC						Échantillon 1 FAM				
12	Comments:											
13	SDS v1.2											
14												
15	Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Method
16	A1	sample 1	VIC	Unknown	247.897	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.184	6.221	Undetermined	100.00	Manual Call
17	A2	sample 1	VIC	Unknown	295.565	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.451	6.805	Undetermined	100.00	Manual Call
18	A3	sample 2	VIC	Unknown	351.338	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.595	6.2	Undetermined	100.00	Manual Call
19	A4	sample 2	VIC	Unknown	379.909	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.553	6.01	Undetermined	100.00	Manual Call
20	A5	sample 3	VIC	Unknown	372.895	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.913	5.329	Undetermined	100.00	Manual Call
21	A6	sample 3	VIC	Unknown	359.717	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.806	5.278	Undetermined	100.00	Manual Call
22	A7	sample wt	VIC	Unknown	343.536	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.569	1.948	Undetermined	100.00	Manual Call
23	A8	sample wt	VIC	Unknown	277.677	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.684	2.015	Undetermined	100.00	Manual Call
24	A9	C-	VIC	Unknown	330.943	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.623	1.967	Undetermined	100.00	Manual Call
25	A10	C-	VIC	Unknown	314.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.672	2.013	Undetermined	100.00	Manual Call
26	A11	C-	VIC	Unknown	269.500	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.82	1.892	Undetermined	100.00	Manual Call
27	A12	C+	VIC	Unknown	211.520	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.249	6.14	Undetermined	100.00	Manual Call
28	B1	C+	VIC	Unknown	270.623	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.346	6.894	Undetermined	100.00	Manual Call
29	B2	C+	VIC	Unknown	365.112	JAK2-VIC	JAK2-FAM	1.265	6.528	Undetermined	100.00	Manual Call
30	B3	ER	VIC	Unknown	372.150	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.214	2.03	Undetermined	100.00	Manual Call
31	B4	ER	VIC	Unknown	404.145	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.419	2.295	Undetermined	100.00	Manual Call
32	B5	ER	VIC	Unknown	410.977	JAK2-VIC	JAK2-FAM	2.681	2.52	Undetermined	100.00	Manual Call
33	B6	H2O	VIC	Unknown	395.431	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.655	1.346	Undetermined	100.00	Manual Call
34	B7	H2O	VIC	Unknown	415.223	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.727	1.241	Undetermined	100.00	Manual Call
35	B8	H2O	VIC	Unknown	366.885	JAK2-VIC	JAK2-FAM	0.606	1.277	Undetermined	100.00	Manual Call

Figure 19. Exemple de résultats, affichés dans le fichier Excel

Protocole : qPCR sur l'instrument LightCycler 480

Pour l'utilisation d'une plaque de qPCR à 96 puits, nous recommandons de réaliser toutes les mesures en double, comme indiqué dans le tableau 8.

Tableau 8. Nombre de réactions pour l'instrument LightCycler 480

Échantillons	Réactions
Avec le mélange amorces et sondes JAK2 V617F (PPM-JAK2)	
24 échantillons d'ADN	24 x 2 réactions
3 ADN témoins	3 x 2 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Témoin eau	2 réactions

Traitement des échantillons sur l'instrument LightCycler 480

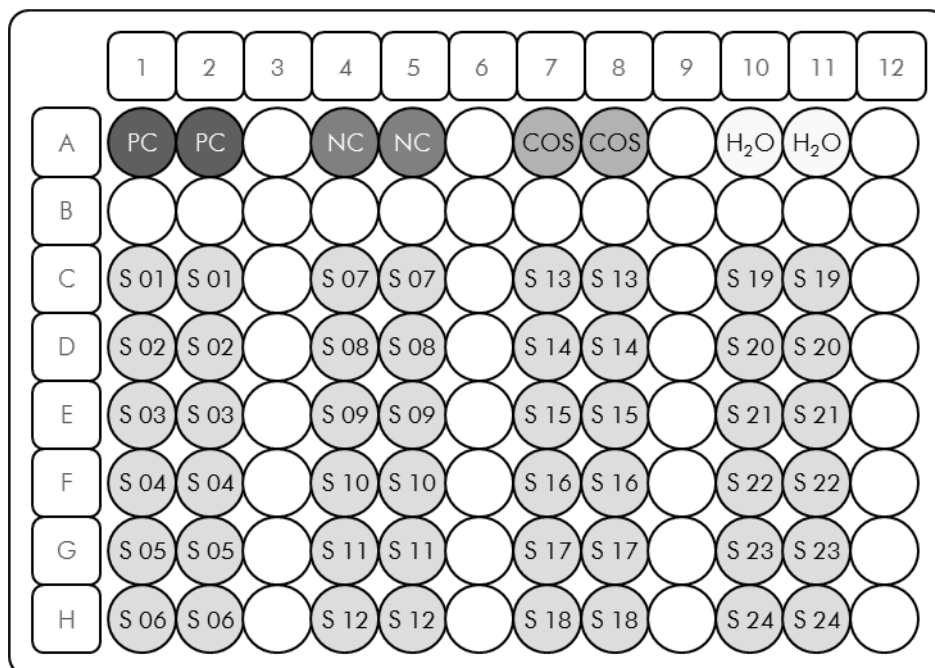


Figure 20. Suggestion de positionnement de plaque pour chaque expérience avec le kit ipsogen JAK2 MutaScreen PC : témoin positif ; **NC** : témoin négatif ; **COS** : échantillon Cut-Off ; **S** : échantillon ADN ; **H₂O** : témoin eau.

qPCR sur l'instrument LightCycler 480

Remarque : effectuer toutes les étapes sur de la glace.

Procédure

1. Décongeler tous les composants nécessaires et les placer sur de la glace.

Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

2. Agiter au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.

3. Préparer le mélange de qPCR suivant selon le nombre d'échantillons à tester.

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 9 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 μ L. Un pré-mélange peut être préparé en fonction du nombre de réactions à l'aide du même mélange d'amorce et de sonde. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Sur l'instrument LightCycler 480, le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen peut être utilisé pour l'analyse de 24 échantillons testés en double en une expérience (figure 20), de 20 échantillons testés en double en 2 expériences ou de 15 échantillons testés en double en 3 expériences.

Tableau 9. Préparation du mélange qPCR

Composant	Nombre de réactions (μL)				Concentration finale
	1	56+1*	28+1†	18+1‡	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Mélange sonde et amorces, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	5	285	145	95	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 6)	5	5 chacun	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	25 chacun	–

* 24 échantillons ; 1 expérience/kit.

† 10 échantillons ; 2 expériences/kit.

‡ 5 échantillons ; 3 expériences/kit.

- 4. Agiter au vortex et centrifuger brièvement le mélange qPCR (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.**
- 5. Déposer 20 μL du pré-mélange de qPCR par puits.**
- 6. Ajouter 5 μL du matériel à quantifier (échantillon d'ADN ou de témoins) dans le puits correspondant (volume total 25 μL).**
- 7. Mélanger doucement en pipetant.**
- 8. Fermer la plaque et la centrifuger brièvement (300 x g, environ 10 s).**
- 9. Placer la plaque dans le thermocycleur conformément aux recommandations du fabricant.**
- 10. Sur la page d'accueil, sélectionner « New Experiment » (Nouvelle expérience).**

11. Pour le LightCycler 480 I, suivre l'étape 11a. Pour le LightCycler 480 II, suivre l'étape 11b.

Pour plus de détails sur la programmation de l'instrument LightCycler 480, se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument. Pour un meilleur aperçu, ces paramètres logiciels sont encadrés en gras et en noir.

11a. LightCycler 480 I : sélectionner « Multi Color Hydrolysis Probe » (Sonde d'hydrolyse multicolore), cliquer sur « Customize » (Personnaliser) puis vérifier que les canaux « FAM (483–533) » et « Hex (533–568) » (c'est-à-dire VIC) sont sélectionnés (figure 21). Définir le volume réactionnel à 25 µL (figure 21) et continuer avec l'étape 12.

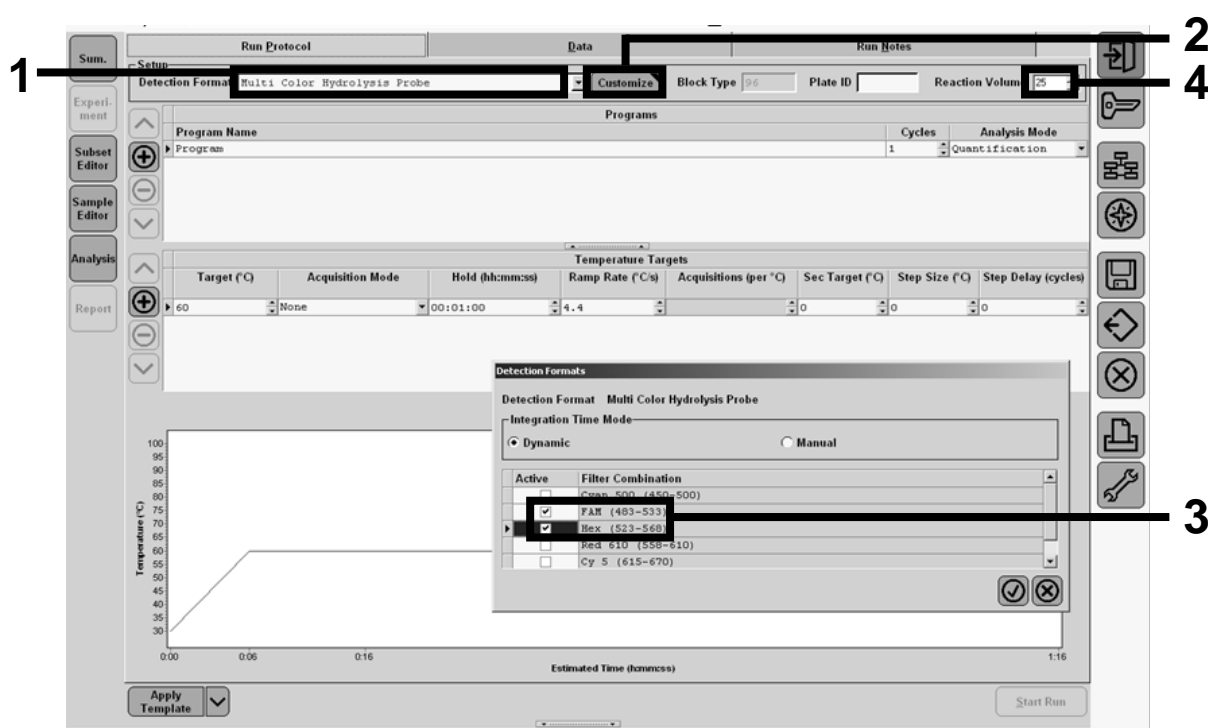


Figure 21. LightCycler 480 I : définition du format de détection

11b. LightCycler 480 II : sélectionner « Dual Color Hydrolysis Probe » (Sonde d'hydrolyse bicolore), cliquer sur « Customize » (Personnaliser) puis vérifier que les canaux « FAM (465-510) » et « Vic / Hex / (533-580) » sont sélectionnés (figure 22). Définir le volume réactionnel à 25 µL (figure 22) et continuer avec l'étape 12.

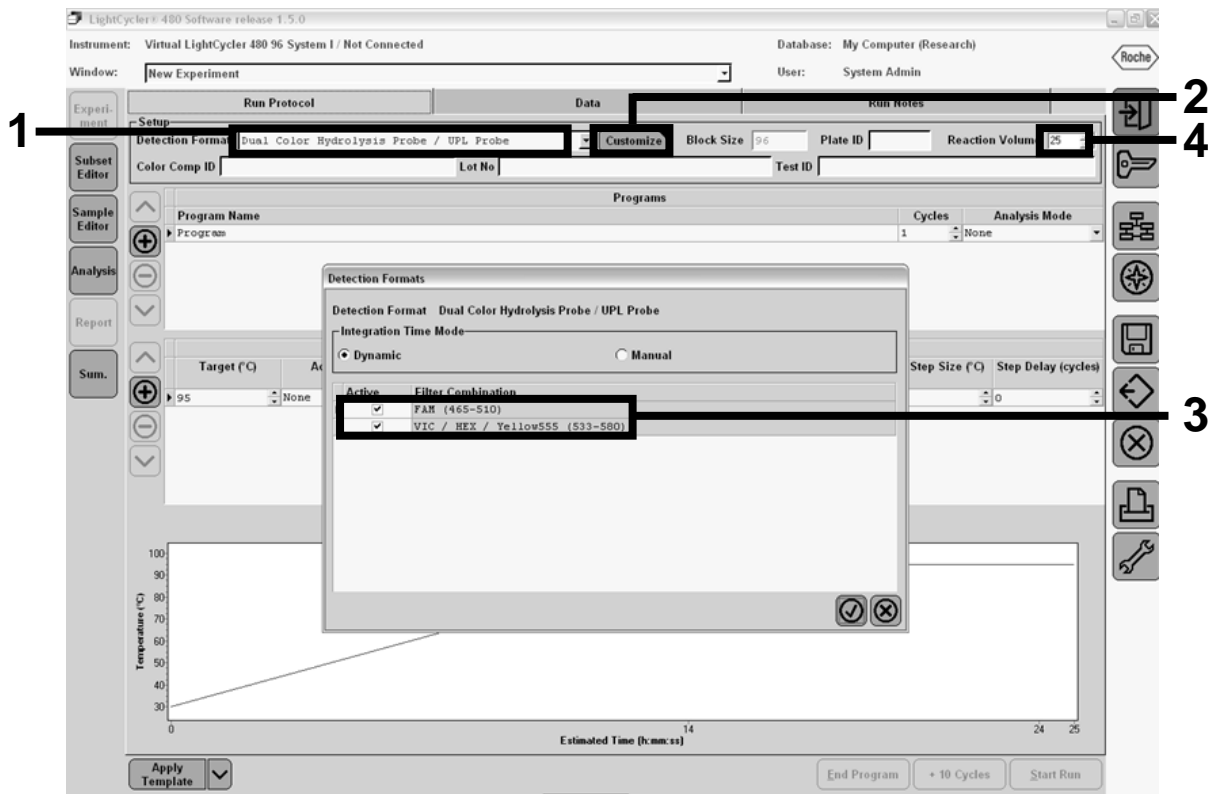


Figure 22. LightCycler 480 II : définition du format de détection

12. Programmer le thermocycleur avec le programme de cycle comme indiqué dans le tableau 10 et démarrer l'analyse.

Remarque : lors de la description du schéma de plaque sur l'instrument, sélectionner « Endpt Geno » dans la section « Step 1: select workflow » (Étape 1 : sélectionner le déroulement des opérations).

Tableau 10. Profil des températures pour l'instrument LightCycler 480

Attente	Température : 50 °C Temps : 2 min
Attente 2	Température : 95 °C Temps : 10 min
Cycle	50 fois 92 °C pour 15 s ; single 60 °C pour 1 min ; single
Attente 3	60 °C pour 1 min ; single

Procédure d'analyse en End Point pour l'instrument LightCycler 480

13. Une fois l'analyse terminée, cliquer sur « Analysis » (Analyse).
14. Dans la boîte de dialogue « Create New Analysis » (Créer nouvelle analyse), sélectionner « Endpoint Genotyping » (Génotypage en End Point) puis sélectionner le sous-groupe (subset) à analyser dans le menu « Subset » (figure 23).

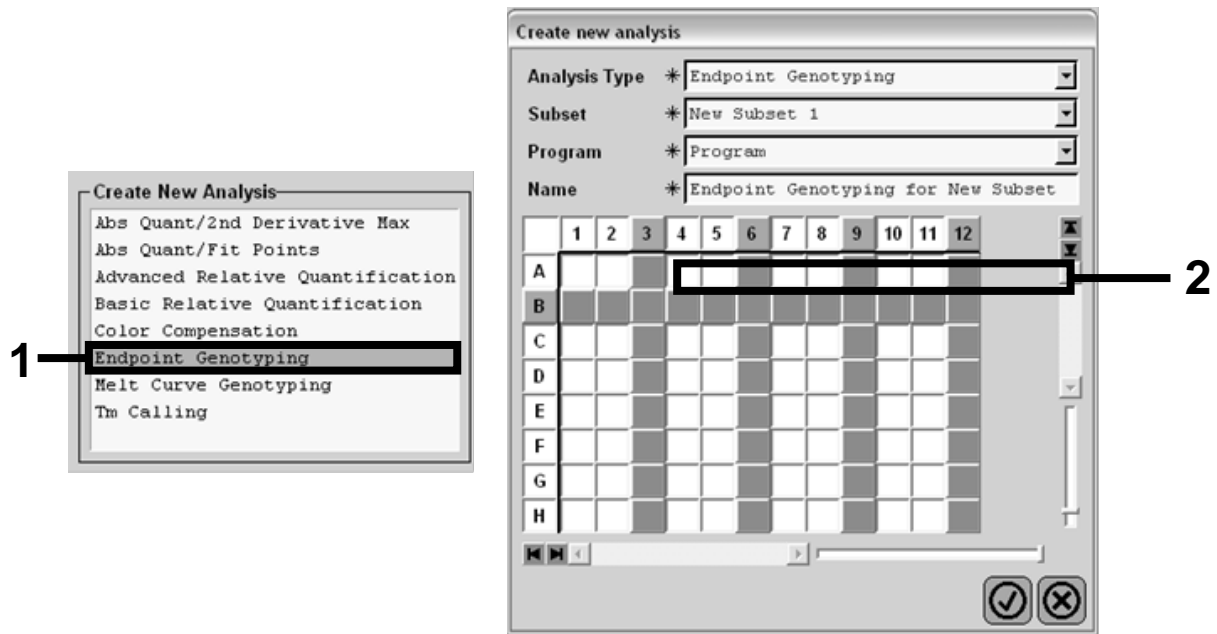


Figure 23. Sélection du type d'analyse et du sous-groupe à analyser

15. Dans la fenêtre suivante, sélectionner la fluorescence « Hex » (c'est-à-dire VIC) pour « Allele X » et la fluorescence « FAM » pour « Allele Y » (figure 24).



Figure 24. Sélection de la fluorescence pour « Allele X » et « Allele Y »

16. La fenêtre suivante (figure 25) indique le schéma de plaque (1, en haut à gauche), les résultats de fluorescence pour chaque échantillon (2, en bas à gauche) et le graphe de discrimination allélique) (3, à droite ; fluorescences FAM et VIC mesurées au 50^{ème} cycle de PCR).

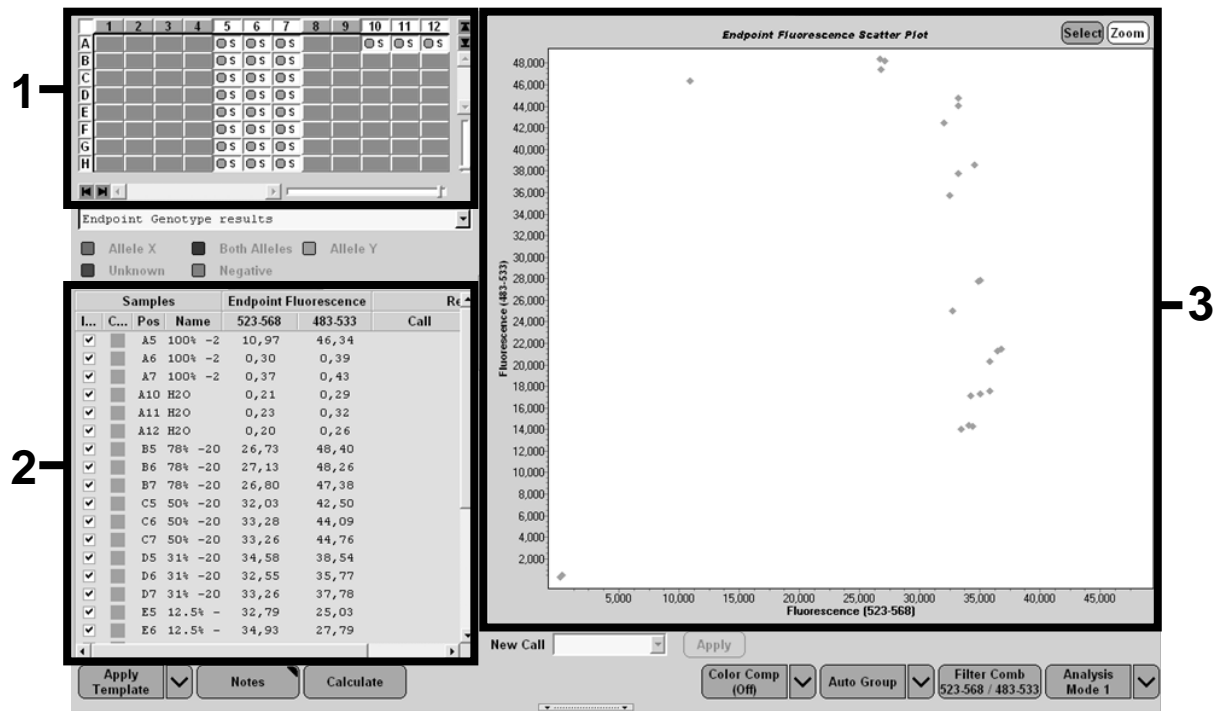


Figure 25. Présentation des données

17. Pour exporter les données, effectuer un clic droit sur le tableau de résultats puis sélectionner « Export Table » (Exporter tableau). Le fichier sera sauvegardé au format texte (.txt).

18. Pour visualiser et analyser les résultats, ouvrir le fichier sous Excel. Les résultats apparaîtront comme indiqué dans la figure 26.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Experiment: OB 08-12-16 Active filters: FAM (483-533), Hex (523-568)						
2	Include	Color	Pos	Name	523-568	483-533	Call
3	True	10789024	A5	100%-20	10,971	46,335	0,00
4	True	10789024	A6	100%-20	0,302	0,392	0,00
5	True	10789024	A7	100%-20	0,369	0,425	0,00
6	True	10789024	A10	H2O	0,207	0,290	0,00
7	True	10789024	A11	H2O	0,233	0,319	0,00
8	True	10789024	A12	H2O	0,203	0,261	0,00
9	True	10789024	B5	78%-20	26,731	48,396	0,00
10	True	10789024	B6	78%-20	27,125	48,262	0,00
11	True	10789024	B7	78%-20	26,803	47,383	0,00
12	True	10789024	C5	50%-20	32,035	42,495	0,00
13	True	10789024	C6	50%-20	33,278	44,086	0,00
14	True	10789024	C7	50%-20	33,261	44,760	0,00
15	True	10789024	D5	31%-20	34,584	38,536	0,00
16	True	10789024	D6	31%-20	32,549	35,766	0,00
17	True	10789024	D7	31%-20	33,262	37,780	0,00
18	True	10789024	E5	12.5%-20	32,794	25,028	0,00
19	True	10789024	E6	12.5%-20	34,932	27,788	0,00
20	True	10789024	E7	12.5%-20	35,089	27,848	0,00
21	True	10789024	F5	5%-20	35,838	20,289	0,00
22	True	10789024	F6	5%-20	36,786	21,487	0,00
23	True	10789024	F7	5%-20	36,546	21,319	0,00
24	True	10789024	G5	2%-20	35,082	17,334	0,00
25	True	10789024	G6	2%-20	35,834	17,589	0,00
26	True	10789024	G7	2%-20	34,299	17,124	0,00
27	True	10789024	H5	0%-20	34,449	14,315	0,00
28	True	10789024	H6	0%-20	33,520	14,012	0,00
29	True	10789024	H7	0%-20	34,125	14,335	0,00
30							

VIC
FAM

Figure 26. Exemple de résultats, affichés dans le fichier Excel

Protocole : qPCR sur l'instrument LightCycler 2.0

Remarque : en raison de certaines exigences technologiques, les expériences sur LightCycler 2.0 doivent être effectuées à l'aide des réactifs prévus à cet effet. Nous recommandons l'utilisation de LightCycler TaqMan Master. Suivre les instructions du fabricant pour la préparation du Master Mix 5x.

Pour l'utilisation d'un rotor à 32 capillaires, nous recommandons de réaliser toutes les mesures en double, comme indiqué dans le tableau 11.

Tableau 11. Nombre de réactions pour l'instrument LightCycler 2.0

Échantillons	Réactions
Mélange sonde et amorces JAK2 V617F (PPM-VF) (32 réactions)	
12 échantillons d'ADN	12 x 2 réactions
3 ADN témoins	3 x 2 réactions (PC-VF, NC-VF et COS-VF, chacun testé en double)
Témoin eau	2 réactions

Traitement des échantillons sur l'instrument LightCycler 2.0

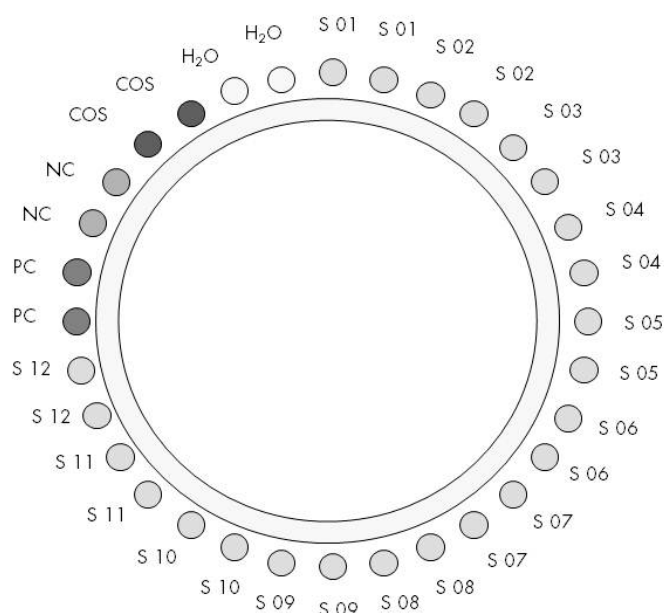


Figure 27. Suggestion de positionnement sur rotor pour chaque expérience avec le kit ipsogen JAK2 MutaScreen PC : témoin positif ; **NC** : témoin négatif ; **COS** : échantillon Cut-Off ; **S** : échantillon ADN ; **H₂O** : témoin eau.

qPCR sur l'instrument LightCycler 2.0

Remarque : effectuer toutes les étapes sur de la glace.

Procédure

1. Décongeler tous les composants nécessaires et les placer sur de la glace.

Les composants doivent être retirés du congélateur environ 10 min avant le début de la procédure.

2. Agiter au vortex et centrifuger brièvement tous les tubes (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.

3. Préparer le mélange de qPCR suivant selon le nombre d'échantillons à tester.

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 12 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 20 μ L. Un pré-mélange peut être préparé en fonction du nombre de réactions à l'aide du même mélange d'amorce et de sonde. Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Sur l'instrument LightCycler 2.0, le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen peut être utilisé pour l'analyse de 12 échantillons testés en double en une expérience (figure 27).

Tableau 12. Préparation du mélange qPCR pour l'instrument LightCycler 2.0

Composant	Nombre de réactions (μ L)		Concentration finale
	1	32+1	
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Mélange sonde et amorces, 10x	2	66	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	9	297	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	–
Volume total	20	20 chacun	–

4. Agiter au vortex et centrifuger brièvement le mélange qPCR (environ 10 s, 10 000 tr/min) pour collecter le liquide au fond du tube.
5. Déposer 15 μL du pré-mélange de qPCR par capillaire.
6. Ajouter 5 μL du matériel à quantifier (échantillon d'ADN ou de témoins) dans le capillaire correspondant (volume total 20 μL).
7. Mélanger doucement en pipetant.
8. Placer les capillaires dans l'adaptateur fourni avec l'instrument et centrifuger brièvement (700 x g, environ 10 s).
9. Charger les échantillons sur le thermocycleur conformément aux recommandations du fabricant.
10. Programmer le thermocycleur (figure 28) avec le programme comme indiqué dans le tableau 13.

Pour plus de détails sur la programmation de l'instrument LightCycler 2.0, se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument. Pour un meilleur aperçu, ces paramètres logiciels sont encadrés en gras et en noir.

Remarque : veiller à ce que le réglage corresponde à la quantification et à l'acquisition unique de fluorescence FAM ainsi qu'à l'acquisition unique de fluorescence VIC dans l'étape d'amplification/cycle et au cours de l'attente finale à 60 °C.

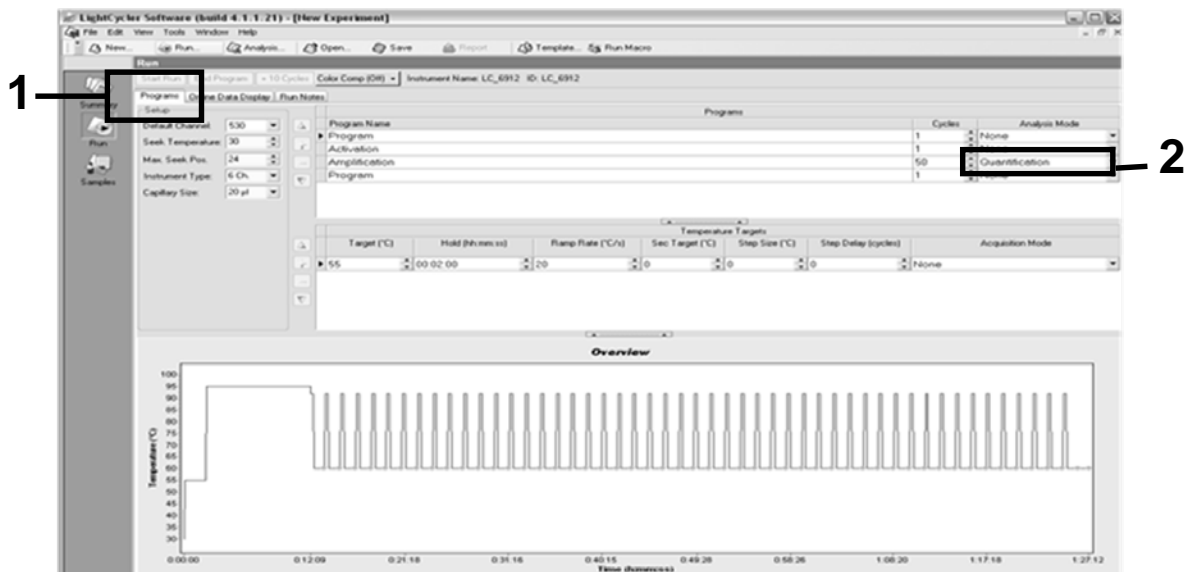


Figure 28. Écran de programmation pour LightCycler 2.0

Tableau 13. Profil des températures pour l'instrument LightCycler 2.0

Attente	Température : 55 °C Temps : 2 min Ramp : 20
Attente 2	Température : 95 °C Temps : 10 min Ramp : 20
Cycle	50 fois 92 °C pour 15 s ; ramp : 20 60 °C pour 1 min ; ramp : 20
Attente 3	60 °C pour 1 min ; ramp : 20

Procédure d'analyse en End Point pour l'instrument LightCycler 2.0

11. À la fin de l'étape d'amplification, cliquer sur l'onglet « Online Data Display » (Affichage des données en ligne, figure 29). Ouvrir le menu d'affichage en haut à gauche de la fenêtre « Current Fluorescence » (Fluorescence actuelle), puis noter 51 dans « Acquisition no » (Numéro d'acquisition).

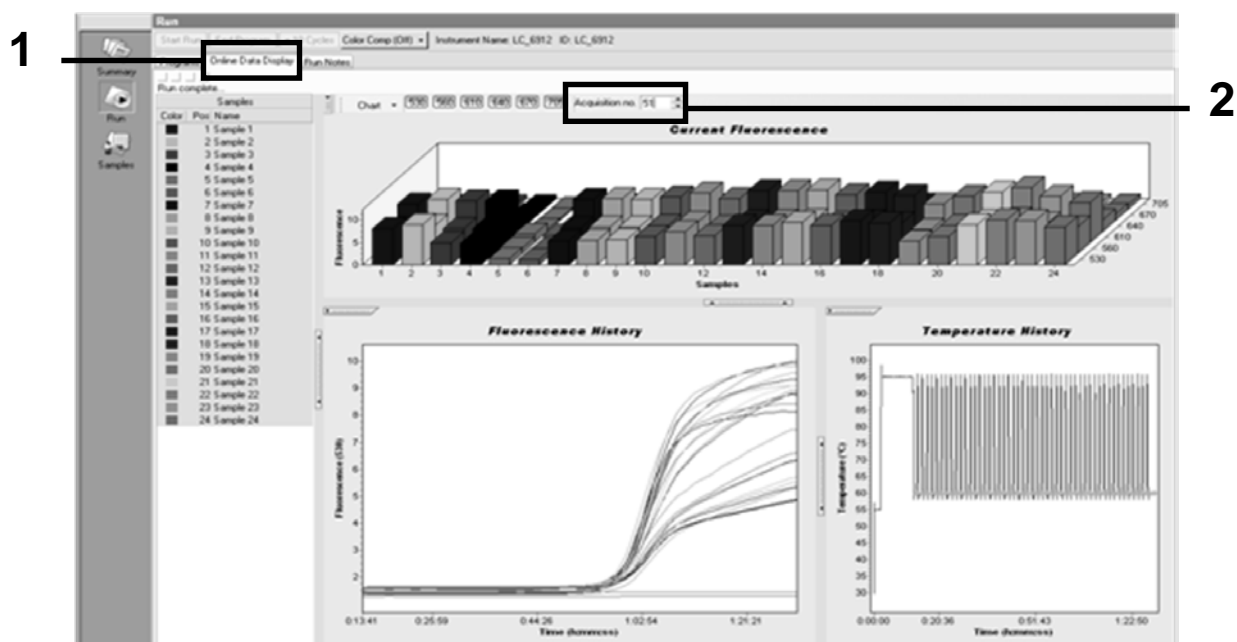



Figure 29. Résultats et historique dans « Online Data Display » (Affichage des données en ligne)

12. Faire un clic droit près du graphe « Current Fluorescence » (Fluorescence actuelle) et sélectionner « Export » (Exporter).
13. Cocher « Excel » dans la boîte de dialogue « Export Chart » (Exporter le graphique, figure 30). Saisir un nom dans le champ « Filename » (Nom du fichier). Sélectionner une destination d'exportation pour le fichier de résultats à l'aide du bouton . Cliquer sur « Export » (Exporter).

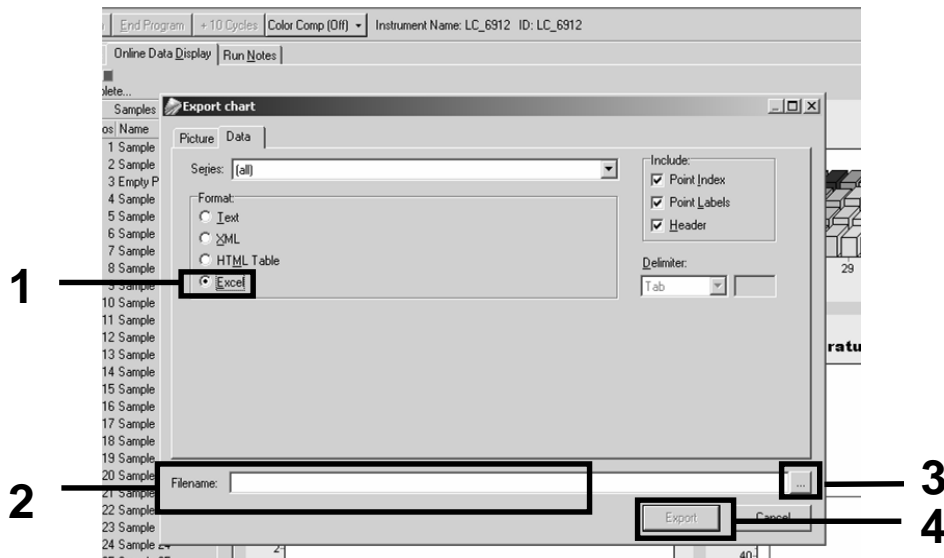


Figure 30. Sélection du format d'exportation et de la destination du fichier de données

14. Pour visualiser et analyser les résultats, ouvrir le fichier sous Excel. Les résultats pour l'instrument LightCycler 2.0 apparaîtront comme indiqué.

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

Figure 31. Exemple de résultats pour LightCycler 2.0, affichés dans le fichier Excel

Interprétation des résultats

Obtenir un fichier permettant d'extraire les données exportées pour tous les instruments : Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou autre instrument Rotor-Gene, LightCycler 2.0 ou 480 ; système de PCR en temps réel Applied Biosystems 7300 ou 7500, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS ou 7900HT SDS, et vérifier les niveaux de fluorescence (qui doivent être cohérents entre les doublons).

Préparer une représentation graphique des données de fluorescence. L'axe x représente la fluorescence VIC tandis que l'axe y représente la fluorescence FAM.

Représentation graphique et critères de contrôle qualité

La figure 32 donne un exemple de représentation graphique.

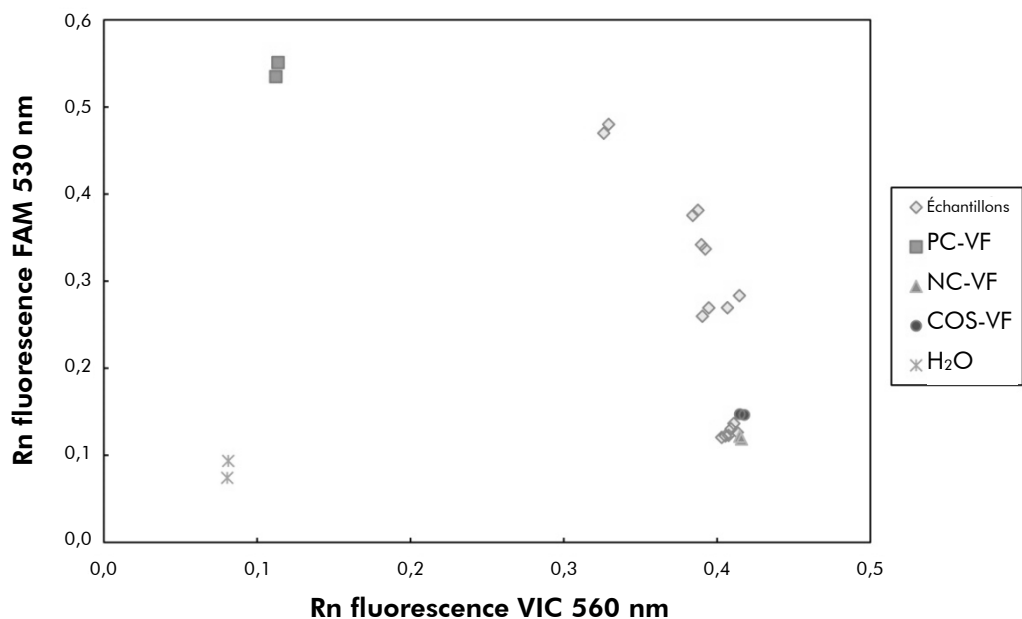


Figure 32. Représentation graphique d'une expérience de discrimination allélique
Instruments : Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM et LightCycler 480.

Les échantillons doivent être situés dans l'arc reliant les témoins négatifs (NC) aux témoins positifs (PC).

Tout positionnement incorrect de l'un des témoins indique une erreur expérimentale.

- Les témoins positifs doivent être situés en haut à gauche.
- Les témoins négatifs doivent être situés en bas à droite.
- Le mauvais positionnement d'un témoin négatif peut indiquer une contamination.

- L'échantillon Cut-Off doit se positionner au-dessus des témoins négatifs.
- Les témoins eau doivent être situés en bas à gauche.
- Le mauvais positionnement d'un témoin eau (supérieur au NC pour la mesure FAM ou supérieur au PC pour la mesure VIC) peut indiquer une contamination.

Remarque : le positionnement des témoins peut être différent pour une analyse des données de l'instrument LightCycler 2.0 (voir figure 33). Les témoins eau doivent malgré tout être situés en bas à gauche.

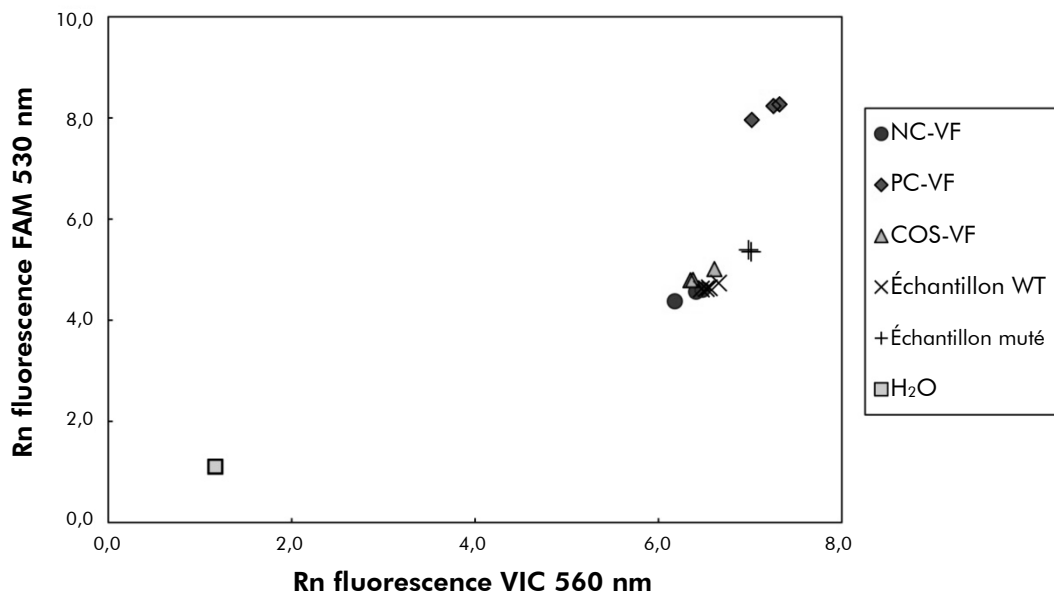


Figure 33. Représentation graphique d'une expérience de discrimination allélique
Instrument : LightCycler 2.0.

Calcul du ratio normalisé FAM/VIC et génotypage

Calculer les ratios FAM/VIC pour tous les échantillons. Calculer les ratios FAM/VIC pour le témoin positif (PC), les échantillons Cut-Off (COS) et le témoin négatif (NC). Les ratios doivent être cohérents entre les doublons. Calculer le ratio moyen de tous les doublons.

Calculer le ratio normalisé (NRatio) pour l'échantillon Cut-Off (COS) et pour tous les échantillons :

$$\text{NRatio}_{\text{échantillon}} = \frac{\text{Ratio}_{\text{échantillon}}}{\text{Ratio}_{\text{NC}}}$$

Remarque : la zone grise (GZ) du test est définie comme l'intervalle de valeurs pour lesquelles les performances du test ne permettent pas une discrimination suffisamment précise. Une valeur située dans la zone grise ne permet pas de

révéler la présence ou l'absence du marqueur cible. Cette zone grise doit être calculée pour chaque expérience.

Calculer la zone grise ou l'incertitude autour du ratio normalisé du COS (NRatio_{COS}) :

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

Comparer le ratio normalisé de chaque échantillon à la GZ du NRatio_{COS}. L'interprétation des résultats est présentée dans le tableau 14 et un exemple du calcul et de l'interprétation des données est fourni dans le tableau 15.

Tableau 14. Interprétation des résultats de génotypage à l'aide des ratios normalisés

Résultats	Interprétation
$NRatio_{Sample} > NRatio_{COS} \times 1,06$	JAK2 V617F est détectée
$NRatio_{Sample} < NRatio_{COS} \times 0,94$	JAK2 V617F n'est pas détectée
$NRatio_{Sample}$ dans la GZ de NRatio _{COS}	Résultat non concluant

Tableau 15. Exemple du calcul et de l'interprétation des données de fluorescence

Échantillon	VIC	FAM	Ratio	Ration moyen	NRatio	Interprétation
NC	2,415	1,782	0,738	0,747	1,000	Mutation non détectée
NC	2,46	1,861	0,757			
PC	1,241	5,606	4,517	4,672	6,253	Mutation détectée
PC	1,182	5,706	4,827			
COS	1,91	1,832	0,959	0,958	1,282	Échantillon Cut-Off
COS	2,035	1,946	0,956			
S 1	2,311	1,783	0,772	0,742	0,992	Mutation non détectée
S 1	2,555	1,818	0,712			
S 2	1,097	5,745	5,237	4,276	5,723	Mutation détectée
S 2	1,437	4,764	3,315			
S 3	2,265	2,149	0,949	0,927	1,241	Résultat non concluant
S 3	2,435	2,206	0,906			
S 4	2,385	2,063	0,865	0,904	1,210	Résultat non concluant
S 4	2,322	2,191	0,944			
GZ	1,205	1,359				

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la foire aux questions dans notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les techniciens de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir « Coordonnées » page 62).

Commentaires et suggestions

Témoin positif signal négatif

- | | |
|--|--|
| a) Erreur de pipetage | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'expérience de PCR. |
| b) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>ipsogen JAK2 MutaScreen</i> entre -30 et -15 °C et conserver le mélange amorces et sondes (PPM) à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 11.
Éviter les cycles congélation-décongélation.
Répartir les réactifs en aliquotes pour le stockage. |

Les témoins négatifs sont positifs

- | | |
|-----------------------|--|
| Contamination croisée | Remplacer tous les réactifs critiques.
Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs.
Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables en accord avec les pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées. |
|-----------------------|--|

Commentaires et suggestions

Pas de signal, même pour les témoins positifs

- | | |
|--|--|
| a) Erreur de pipetage ou réactifs omis | Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'expérience de PCR. |
| b) Effets inhibiteurs du matériel de l'échantillon dus à une purification insuffisante | Recommencer la préparation de l'ADN. |
| c) LightCycler : le canal de détection choisi est incorrect | Définir le canal sur F1/F2 ou 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler : pas d'acquisition des données programmée | Vérifier la programmation des cycles.
Sélectionner le mode d'acquisition « single » à la fin de chaque phase d'hybridation de la PCR. |

Signal nul ou de faible intensité avec les échantillons mais témoins positifs OK

- | | |
|--|--|
| Mauvaise qualité ou faible concentration d'ADN | Toujours vérifier la qualité de l'ADN et la concentration avant analyse. |
|--|--|

LightCycler : l'intensité de fluorescence est trop faible

- | | |
|--|--|
| a) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit | Conserver le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen entre -30 et -15 °C et conserver le mélange amorces et sondes (PPM) à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 11.
Éviter les cycles congélation-décongélation.
Répartir les réactifs en aliquotes pour le stockage. |
| b) Quantité initiale très faible d'ADN cible | Augmenter la quantité d'échantillon d'ADN.
Remarque : selon la méthode de préparation de l'ADN choisie, des effets inhibiteurs peuvent survenir. |

Commentaires et suggestions

LightCycler : l'intensité de fluorescence varie

- | | |
|--|--|
| a) Erreur de pipetage | La variabilité, causée par ce que l'on appelle les « erreurs de pipetage », peut être réduite en analysant les données en mode F1/F2 ou 530 nm/640 nm. |
| b) Centrifugation insuffisante des capillaires | <p>Le mélange de PCR est peut-être toujours dans la partie haute des capillaires ou une bulle d'air est dans l'extrémité du capillaire.</p> <p>Toujours centrifuger les capillaires chargés avec le mélange de réaction de la manière décrite dans le guide de fonctionnement de l'appareil.</p> |
| c) La surface extérieure de l'extrémité du capillaire est sale | Toujours porter des gants durant la manipulation des capillaires. |

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit. Les certificats d'analyse sont disponibles sur demande à l'adresse suivante :

www.qiagen.com/support/.

Limitations

Les utilisateurs doivent être entraînés et familiarisés avec cette technologie avant d'utiliser ce dispositif. Ce kit doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, en combinaison avec les instruments validés mentionnés sous « Matériel nécessaire mais non fourni », page 9.

Tous les résultats de diagnostic générés doivent être interprétés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés.

Caractéristiques des performances

Études non cliniques

Des études non cliniques ont été menées pour établir la performance analytique du kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen.

Précision

Trois niveaux de dilution d'ADN génomique de lignées cellulaires présentant la mutation JAK2 V617F dans l'ADN de type sauvage ont été testés avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen. Les dilutions correspondaient à des charges mutationnelles de 1 %, 2 % et 3 %. Des lots de dilution indépendants ont été obtenus pour chaque niveau ; les réplicats de ces dilutions ont été testés dans 3 expériences indépendantes. Les ratios obtenus pour chaque échantillon d'ADN ($\text{Ratio}_{\text{Échantillon}}$) ont été comparés au ratio du témoin négatif (JAK2 100 %, ADN de type sauvage, Ratio_{NC}). Les résultats sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16. Données de précision pour études non cliniques

Niveau de mutation	$\text{Ratio}_{\text{Échantillon}} > \text{Ratio}_{\text{NC}}$	%CV (ratio)
1 % ADN V617F	100 % (n = 183)	6,8
2 % ADN V617F	100 % (n = 72)	4,5
3 % ADN V617F	100 % (n = 135)	5,1

Données analytiques interlaboratoires

Une étude multicentrique a été menée sur 13 laboratoires. Les données analytiques ont été recueillies sur des dilutions d'ADN génomique présentant la mutation JAK2 V617F dans de l'ADN de type sauvage. Trois expériences ont été menées dans chaque laboratoire. Pour chaque expérience, les échantillons d'ADN suivants ont été testés à partir des lignées cellulaires :

- 1 témoin négatif (NC) 0 % V617F
- 1 témoin positif (PC) 100 % V617F
- 1 échantillon Cut-Off (COS) 2 % V617F
- 3 échantillons présentant des charges mutationnelles intermédiaires (20 %, 50 % et 80 %)

Les expériences ont été menées sur 7 modèles d'instruments différents :

- ABI PRISM 7000 SDS
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
- ABI PRISM 7700 SDS
- ABI PRISM 7900 SDS
- LightCycler 2.0
- iCycler®

Les résultats sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17. Données analytiques interlaboratoires obtenues à partir de dilutions d'ADN génomique de lignées cellulaires présentant la mutation JAK2 V617F dans de l'ADN de type sauvage

Détection de l'échantillon	Échantillons positifs	Échantillons négatifs
JAK2 V617F	177*	0
JAK2 de type sauvage	0	36

* Les échantillons positifs incluaient 36 témoins positifs (PC-VF), 36 échantillons Cut-Off (COS-VF ; 2 % V617F), 34 échantillons présentant 20 % de JAK2 V617F, 35 échantillons présentant 50 % de JAK2 V617F et 36 échantillons présentant 80 % de JAK2 V617F.

Études cliniques

Comparaison entre le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et la méthode ARMS®

Des échantillons d'ADN de 141 patients présentant une suspicion de SMP ont été testés en parallèle avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et une analyse qPCR fondée sur le principe de système de mutation réfractaire par amplification (ARMS) (11). Les résultats de la comparaison sont présentés dans le tableau 18 (tableau de contingence 2 x 3) et dans le tableau 19 (concordance en pourcentage).

Tableau 18. Comparaison entre les méthodes : kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et ARMS

		Résultats de la méthode de test ARMS		
		JAK2 V617F > 2 %	JAK2 de type sauvage (JAK2 V617F < 2 %)	Total
Résultats de la méthode de test <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutation détectée	91	0	91
	Résultat non concluant	1	2	3
	JAK2 WT Mutation non détectée	1	46	47
Total		93	48	n = 141

Tableau 19. Comparaison entre les méthodes : kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et ARMS

	Concordance (%)	IC* de 95 % (%)
Données positives		
Concordance entre le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen et ARMS	98,9	94,1-99,8
Données négatives		
Concordance entre le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen et ARMS	100	92,3-100
Concordance totale	99,3	96,0-99,9

* Les intervalles de confiance ont été calculés conformément à la norme CLSI EP12-A « User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline ».

Concordance entre le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et le séquençage

Des échantillons d'ADN de 51 patients présentant une suspicion de SMP ont été testés en parallèle avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et la technique de référence de séquençage direct. Un échantillon n'a pas pu être interprété en raison d'une erreur de séquençage. Les comparaisons des résultats obtenus à partir des 50 échantillons interprétables sont présentés dans le tableau 20

(tableau de contingence 2 x 3) et dans le tableau 21 (concordance en pourcentage).

Tableau 20. Comparaison entre les méthodes : kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et séquençage

		Résultat du séquençage direct		
		JAK2 V617F > 2 %	JAK2 de type sauvage (JAK2 V617F < 2 %)	Total
Résultats de la méthode de test <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutation détectée	26	1	27
	Résultat non concluant	0	1	1
	JAK2 WT Mutation non détectée	2	20	22
Total		28	22	n = 50

Tableau 21. Comparaison entre les méthodes : kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et séquençage

	Concordance (%)	IC* de 95 % (%)
Données positives		
Concordance entre le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen et le séquençage	92,9	77,4-98,0
Données négatives		
Concordance entre le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen et le séquençage	95,2	77,3-99,2
Concordance totale	93,9	83,5-97,9

* Les intervalles de confiance ont été calculés conformément à la norme CLSI EP12-A « User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline ».

Étude multicentrique sur 228 échantillons de patient

Des échantillons ADN de patients ont été analysés à l'aide de techniques « maison » dans 13 laboratoires pour contribuer à une étude interlaboratoire. Dans chaque laboratoire, 3 expériences ont été menées à l'aide d'ADN de lignées cellulaires tel que décrit pour les données de précision non-clinique (voir ci-dessus) et avec l'ADN de 10 patients disponible au laboratoire.

Les 228 échantillons avec un génotype JAK2 connu ont été testés en parallèle avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et par des méthodes « maison », dont l'analyse PCR qualitative, l'analyse PCR spécifique d'un allèle, le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET), le séquençage, la PCR par oligonucléotide spécifique de l'allèle, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et la discrimination allélique. Les résultats de la comparaison sont présentés dans le tableau 22 (tableau de contingence 2 x 3) et dans le tableau 23 (concordance en pourcentage).

Tableau 22. Comparaison entre les méthodes : kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et méthodes « maison »

		Résultats du test « maison »		
		Mutation détectée JAK2 V617F	Mutation non détectée JAK2 de type sauvage	Total
Résultats de la méthode de test <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen	JAK2 V617F Mutation détectée	139	3	142
	Résultat non concluant	5	17	22
	JAK2 WT Pas de mutation détectée	3	61	64
Total		147	81	n = 228

Tableau 23. Comparaison entre les méthodes : kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen et méthodes « maison »

	Concordance (%)	IC* de 95 % (%)
Données positives Concordance entre le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen et la méthode « maison »	97,9	94,0-99,3
Données négatives Concordance entre le kit <i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen et la méthode « maison »	95,3	87,1-98,4
Concordance totale	97,1	93,8-98,7

* Les intervalles de confiance ont été calculés conformément à la norme CLSI EP12-A « User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline ».

Robustesse : test d'échantillons de donneurs sains

Les échantillons ADN de 103 donneurs de sang sains ont été analysés avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS. Tous les échantillons ont été détectés comme JAK2 de type sauvage. L'analyse des 38 échantillons avec l'instrument LightCycler 480 est présentée dans la figure 34.

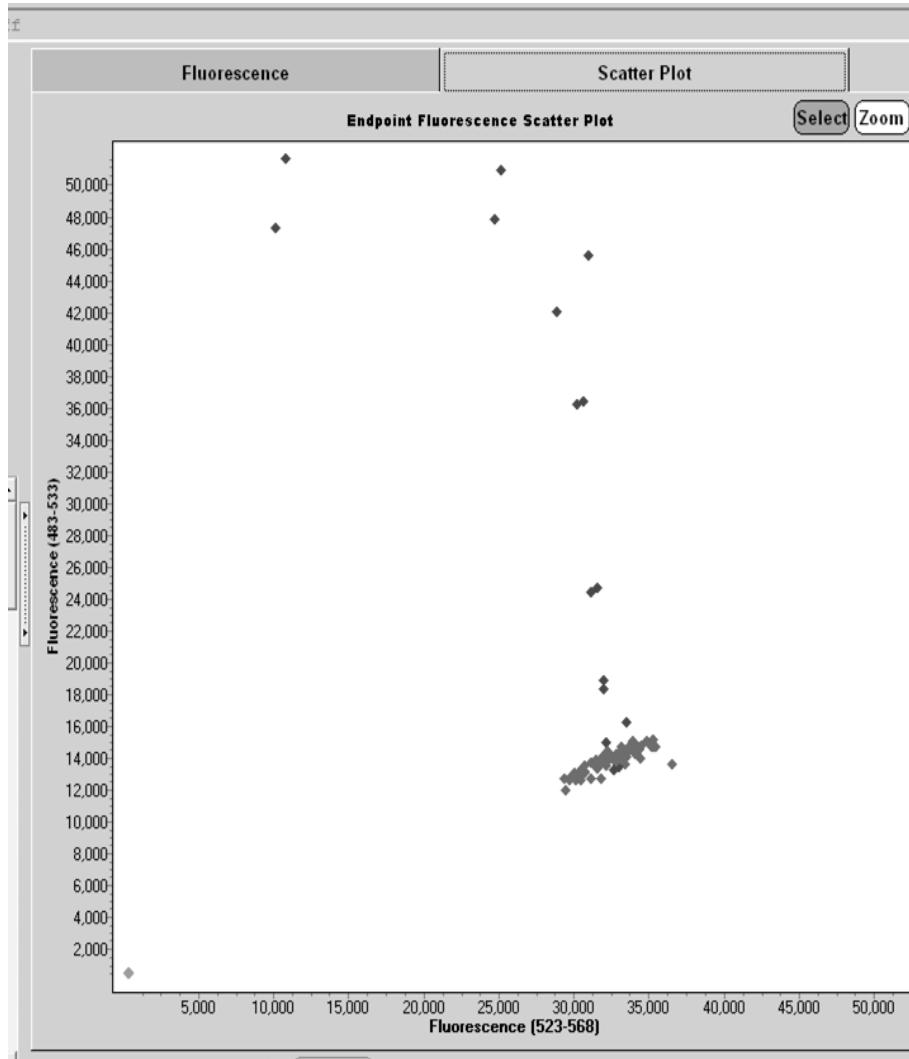


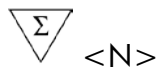
Figure 34. Analyse des donneurs sains Analyse LightCycler 480 de 38 donneurs sains (◆) avec le kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen RS (n° réf. 673123). Les résultats positifs en duplicat (◆) correspondent à une échelle de référence fournie avec le kit. Les valeurs de fluorescence VIC sont tracées sur l'axe x tandis que les valeurs FAM sont sur l'axe y.

Références

1. Ma, W. et al. (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diagn.* **11**, 49.
2. James, C. et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
3. Levine, R.L. et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
4. Kralovics, R. et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
5. Baxter, E.J. et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
6. Tefferi, A. et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
7. Prchal, J.F. and Axelrad, A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
8. Tefferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14.
9. Barosi, G. et al. (2009) Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829.
10. Pardanani, A. et al. (2011) Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789.
11. Lippert, E. et al. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l’emballage et l’étiquetage :



Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



Numéro de lot



Numéro de matériel



Code article international (GTIN)



Limite de température



Fabricant



Consulter les instructions d'utilisation

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse **www.qiagen.com/Support**, de téléphoner au 00800-22-44-6000 ou de contacter l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site **www.qiagen.com**).

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (10)	Pour 10 réactions : témoin positif V617F, témoin négatif V617F, échantillon Cut-Off V617F, mélange sonde et amorces JAK2 de type sauvage et JAK2 V617F	673022
<i>ipsogen</i> JAK2 MutaScreen Kit (24)	Pour 24 réactions : témoin positif V617F, témoin négatif V617F, échantillon Cut-Off V617F, mélange sonde et amorces JAK2 de type sauvage et JAK2 V617F	673023
Rotor-Gene Q MDx – for IVD-validated real-time PCR analysis in clinical applications		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Instrument de PCR en temps réel et analyseur de fusion haute résolution à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation	9002033

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Ce kit est destiné au diagnostic in vitro. Les produits *ipsogen* ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN décline toute responsabilité pour toute éventuelle erreur apparaissant dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenu responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits *ipsogen* sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

Ce produit est vendu sous accord de licence avec Epoch Biosciences pour une utilisation exclusive dans le cadre du diagnostic in vitro et ne peut être utilisé pour toute autre utilisation de recherche, commerciale, de recherche clinique ou tout autre utilisation sortant du cadre du diagnostic in vitro.

La mutation JAK2 V617F et ses applications sont protégées par des brevets dont le brevet européen EP1692281, les brevets US 7,429,456 et 7,781,199, les demandes de brevet US20090162849 et US20120066776 et leurs équivalents étrangers.

L'achat de ce produit ne confère aucun droit pour son utilisation dans le cadre d'essais cliniques pour des thérapies ciblant ou utilisant JAK2 V617F. QIAGEN développe des programmes de licences spécifiques pour ce type d'utilisation. Veuillez contacter notre département Licences et Propriété Intellectuelle à l'adresse suivante : jak2licenses@qiagen.com.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group) ; ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, VIC® (Life Technologies Corporation) ; ARMS® (AstraZeneca Ltd.) ; Excel® (Microsoft Corporation) ; iCycler® (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ; LightCycler®, TaqMan® (Roche Group) ; MGB™ (Epoch Biosciences).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *ipsogen* JAK2 MutaScreen accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *ipsogen*JAK2 MutaScreen ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit ipsogen JAK2 MutaScreen* et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence de propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception des indications figurant dans le *Manuel du kit JAK2 MutaScreen* et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont octroyés sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN est susceptible de faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application du présent Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com.

HB-1371-003 © 2013–2016 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

