

September 2017

ipsogen[®] JAK2 RGQ PCR Kit- handleiding



Voor gebruik in combinatie met het Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex
HRM-instrument

Versie 1
Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

IVD

CE

REF

673623



1107956



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R5 **MAT**

1107956NL

Inhoud

Beoogd gebruik	4
Samenvatting en uitleg	4
Uitgangspunt van de procedure	6
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit	9
Benodigde maar niet meegeleverde materialen.....	9
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	12
Algemene voorzorgsmaatregelen	12
Opslag en verwerking reagentia	14
Verzendcondities	14
Bewaarcondities	14
Stabiliteit.....	14
Opslag en verwerking van monsters	15
Procedure	15
Extractie van genomisch DNA uit volbloed en bereiding	15
Kwalificering en kwantificatie van DNA.....	22
Normalisatie van monsters van genomisch DNA.....	23
Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument	24
Interpretatie van de resultaten	33
Problemen oplossen.....	38
Kwaliteitscontrole	40
Beperkingen	40
Kwaliteitskenmerken	41
Blancolimiet.....	41
Detectielimiet	41
Lineariteit	42
Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid	42
Stoffen met een versturende werking	43
Klinische validatie en vergelijking van methoden.....	43

Referenties	45
Symbolen	46
Contactgegevens.....	47
Bestelgegevens	48

Beoogd gebruik

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is een kwantitatieve in-vitrotest die is bestemd voor de detectie van het JAK2 V617F/G1849T-allel in genomisch DNA geëxtraheerd uit volbloed. De test is bestemd als hulpmiddel bij de diagnose van myeloproliferatief neoplasma (MPN) in combinatie met andere clinico-pathologische factoren.

Samenvatting en uitleg

Een terugkerende somatische mutatie, V617F, die invloed heeft op het Janus-tyrosinekinase 2-gen (JAK2), werd ontdekt in 2005 (1–4). Dit betekende een grote doorbraak om MPN te begrijpen, classificeren en diagnosticeren. JAK2 is een kritisch intracellulair signaalmolecuul voor een aantal cytokinen, waaronder erytropoëtiëne.

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

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

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

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

Criteria voor een diagnose van PV	
Primair	<p>1. Hemoglobine (Hb) > 18,5 g/dl¹ (mannen) of > 16,5 g/dl¹ (vrouwen) of Hb of hematocriet > 99^e percentiel van het referentiebereik voor leeftijd, geslacht of hoogte van leefomgeving of Hb > 17 g.dl¹ (mannen) of > 15 g.dl¹ (vrouwen) indien verband houdend met een aanhoudende toename van ≥ 2 g.dl¹ ten opzichte van het basisniveau die niet kan worden toegeschreven aan het wegnemen van een ijzertekort; of</p> <p>Rodebloedcellenmassa van > 25% boven de gemiddelde normale voorspelde waarde</p> <p>2. Aanwezigheid van JAK2V617F of soortgelijke mutatie</p>
Secundair	<p>1. Myeloproliferatie van drie cellijnen van beenmerg</p> <p>2. Subnormaal erytropoëtiëgehalte in serum</p> <p>3. EEC-groei</p>
Criteria voor een diagnose van ET	
Primair	<p>1. Aantal bloedplaatjes $\geq 450 \times 10^9$ l⁻¹</p> <p>2. Proliferatie van megakaryocyten met grote en ontwikkelde morfologie; geen of weinig proliferatie van granulocyten of erythroïde proliferatie</p> <p>3. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor CML, PV, PMF, MDS of andere myeloproliferatieve neoplasieën</p> <p>4. Aanwezigheid van JAK2V617F of andere klonale merker; of</p> <p>Geen tekenen van reactieve trombocytose</p>
Secundair	–
Criteria for a diagnosis of PMF	
Primair	<p>1. Proliferatie van megakaryocyten en atypie in combinatie met ofwel reticuline- en/of collageenfibrose; of Indien er geen sprake is van reticulinefibrose, dient de verandering in megakaryocyten gepaard te gaan met een toegenomen cellulariteit van het beenmerg, proliferatie van granulocyten en dikwijls verminderde erytropoëse (d.w.z. prefibratische PMF)</p> <p>2. Voldoet niet aan de WHO-criteria voor CML, PV, MDS of andere myeloproliferatieve neoplasieën</p> <p>3. Aanwezigheid van JAK2V617F of andere klonale merker; of</p> <p>Geen tekenen van reactieve beenmergfibrose</p>
Secundair	<p>1. Leuko-erythroblastose</p> <p>2. Toename van lactaatdehydrogenase in serum</p> <p>3. Anemie</p> <p>4. Palpabele splenomegalie</p>

CML: Chronische myeloïde leukemie; EEC: Endogene erythroïde kolonie; ET: Essentiële trombocytemie; Hb: Hemoglobine; MDS: Myelodysplastisch syndroom; PMF: Primaire myelofibrose; PV: polycythaemia vera; WHO: Wereldgezondheidsorganisatie.

Sinds 2006 zijn er meerdere methoden beschikbaar die in feite zijn gebaseerd op PCR-technieken of sequencing, naarmate in laboratoria testen werden ontwikkeld voor het detecteren van de aanwezigheid en mogelijk ook het kwantificeren van JAK2V617F. Deze testen verschillen qua analytische prestaties, met name op het vlak van precisie en de mate van gevoeligheid. Dit verschil kan gevolgen hebben voor de noodzaak voor beenmerganalyse, de tijd die nodig is om een eindiagnose te stellen en mogelijk de diagnostische prestaties.

Uitgangspunt van de procedure

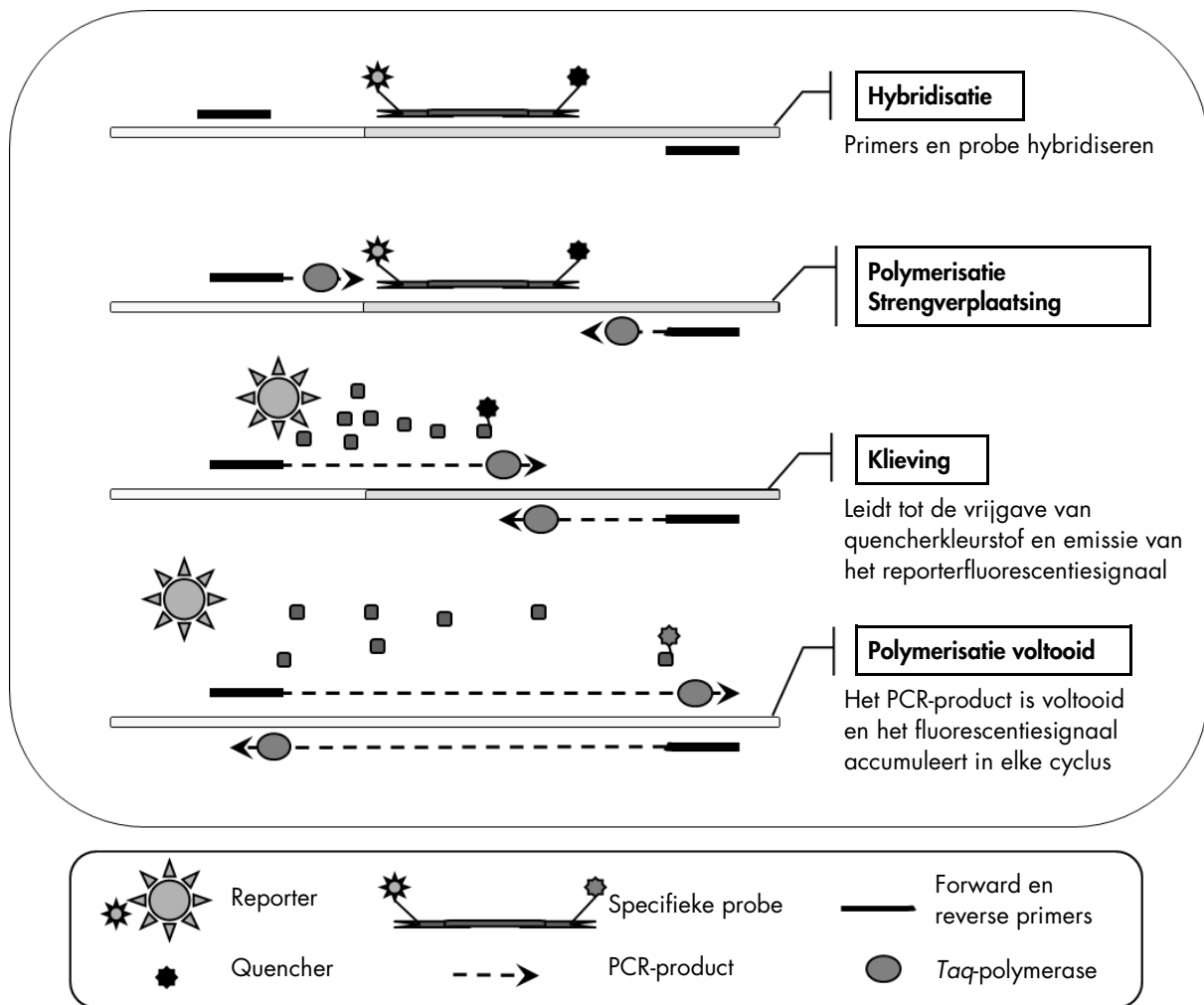
Er zijn verschillende technieken voorgesteld voor het kwantitatief vaststellen van de proportie van enkelvoudige nucleotidepolymorfismen (SNP's) in DNA-monsters. Enkele daarvan, zoals smeltcurves en sequencing, zijn slechts semikwantitatief. Methoden op basis van de real-time kwantitatieve polymerasekettingreactie (qPCR) genieten de voorkeur vanwege hun grotere gevoeligheid. Het gebruik van een speciaal voor SNP bestemde primer maakt selectieve amplificatie mogelijk van het mutant-allel (MT) of wildtype-allel (WT) die eenvoudig te detecteren is met een instrument voor real-time qPCR. Dit maakt een gevoeligheid mogelijk van $< 0,1\%$, en dat is in lijn met de momenteel geaccepteerde JAK2-grenswaarde van 1% die wordt gehanteerd voor klinische positiviteit. Sommige klinische experts beschouwen de aanwezigheid van elke JAK2-hoeveelheid als klinisch significant op het moment van diagnose, en daarom is een gevoelige methode als qPCR nodig (8). De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is gebaseerd op deze techniek.

Met qPCR is accurate kwantificatie van PCR-producten mogelijk gedurende de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces. Kwantitatieve PCR-gegevens kunnen snel worden verkregen, zonder verwerking na de PCR, dankzij real-time detectie van fluorescente signalen tijdens en/of na de PCR-cyclus. Zo wordt het risico van contaminatie van het PCR product drastische verminderd. Momenteel zijn er drie hoofdtypen qPCR-technieken beschikbaar: qPCR-analyse met SYBR® Green I-kleurstof, qPCR-analyse met hydrolyseprobes en qPCR-analyse met hybridisatieprobes.

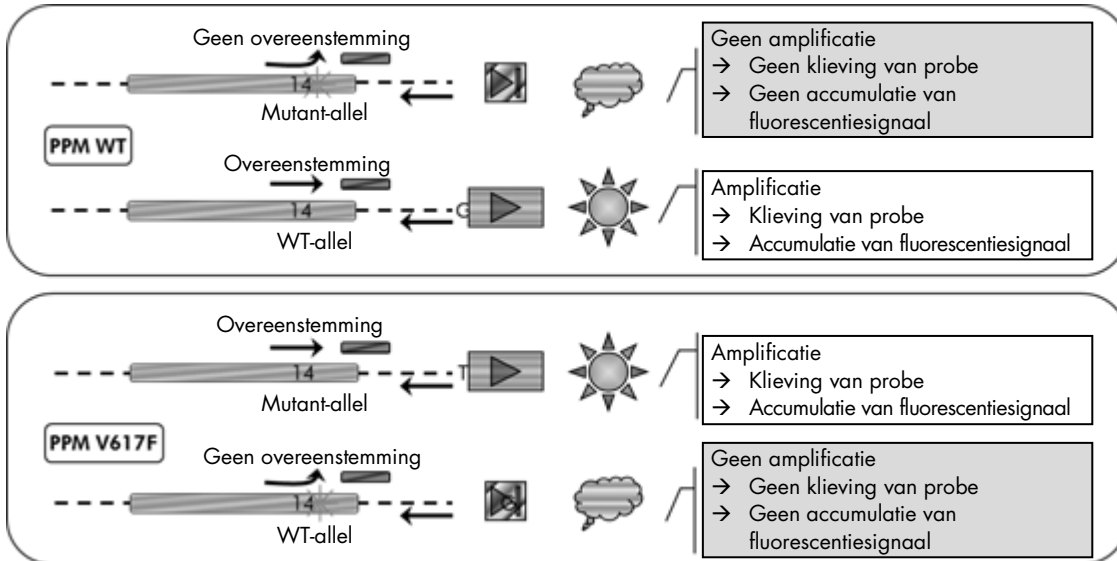
Deze assay benut het qPCR-principe van oligonucleotidehydrolyse. Gedurende de PCR worden forward en reverse primers gehybridiseerd volgens een specifieke sequentie. In hetzelfde mengsel bevindt zich nog een andere aan verfstof gekoppelde oligonucleotide. Deze probe, die bestaat uit een oligonucleotide dat is gemerkt met een 5'-reporterleurstof en een downstream 3'-leurstofvrije quencher, hybridiseert tot een doelsequentie in het PCR-product. qPCR-analyse met hydrolyseprobes benut de 5' → 3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase van *Thermus aquaticus* (*Taq*). Als de probe intact is, resulteert de nabijheid van de reporterleurstof ten opzichte van de quencher in suppressie van de reporterfluorescentie, voornamelijk door Förster-energieoverdracht.

Als het onderzochte doel aanwezig is, zullen gedurende de PCR de forward en reverse primers specifiek hybridiseren aan de probe en deze flankeren. De 5' → 3'-exonucleaseactiviteit van de DNA-polymerase klieft de probe tussen de reporter en de quencher alleen als de drie oligonucleotiden hybridiseren aan het doel. De probefragmenten worden vervolgens verplaatst van het doel en polymerisatie van de streng gaat verder. Het 3'-uiteinde van de probe wordt geblokkeerd om extensie van de probe tijdens de PCR te voorkomen (Afbeelding 1). Dit proces vindt plaats in elke cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet.

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



Afbeelding 1. Reactieprincipe. De kwantitatieve allel-specifieke PCR-technologie die in deze assaykit wordt gebruikt, maakt gevoelige, accurate en in grote mate reproduceerbare detectie van SNP's mogelijk. Deze techniek is gebaseerd op het gebruik van specifieke reverse primers voor wildtype- en V617F-allelen (8). Alleen bij perfecte overeenstemming van de primer en het doel-DNA is extensie en amplificatie in de PCR mogelijk (zie Afbeelding 2).



Afbeelding 2. Allel-specifieke PCR. Door het mengsel van wildtype- of V617F-primers en een probe is specifieke detectie mogelijk van het wildtype-allel of mutant-allel in twee afzonderlijke reacties die met hetzelfde monster plaatsvinden. Resultaten kunnen worden uitgedrukt als percentage van het aantal VF-kopieën in het totaal aantal JAK2-kopieën.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

ipsogen JAK2 RGQ PCR Kit (24)		
Catalogusnr.		673623
Aantal reacties		24
JAK2 Mutant Control (JAK2-mutantcontrole, 100% V617F-allel)	Rood	33 µl
JAK2 WT Control (JAK2 WT-controle, 100% wildtype-allel)	Groen	33 µl
JAK2 MT Quant Standard 1 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 1, 5×10^1 V617F-kopieën/5 µl)	Rood	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 2 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 2, 5×10^2 V617F-kopieën/5 µl)	Rood	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 3 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 3, 5×10^3 V617F-kopieën/5 µl)	Rood	20 µl
JAK2 MT Quant Standard 4 (JAK2 MT-kwantificatiestandaard 4, 5×10^4 V617F-kopieën/5 µl)	Rood	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 1 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 1, 5×10^1 wildtypekopieën/5 µl)	Groen	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 2 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 2, 5×10^2 wildtypekopieën/5 µl)	Groen	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 3 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 3, 5×10^3 wildtypekopieën/5 µl)	Groen	20 µl
JAK2 WT Quant Standard 4 (JAK2 WT-kwantificatiestandaard 4, 5×10^4 wildtypekopieën/5 µl)	Groen	20 µl
JAK2 MT Reaction Mix (JAK2 MT-reactiemengsel)*	Rood	1010 µl
JAK2 WT Reaction Mix (JAK2 WT-reactiemengsel)†	Groen	1010 µl
Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymerase, HotStarTaq® 5 eenheden/µl)	Mint	85 µl
TE buffer for sample dilution (TE-buffer voor monsterverdunding)	Wit	1,9 ml
Water for no template control (Water voor templateloze controle, NTC)	Wit	1,9 ml
ipsogen® JAK2 RGQ PCR Kit Handbook (handleiding in het Engels)		1

* PCR-mengsel met alle vereiste componenten, behalve Taq DNA-polymerase en het doel-DNA voor het MT-allel.

† PCR-mengsel met alle vereiste componenten, behalve Taq DNA-polymerase en het doel-DNA voor het WT-allel.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Voor meer informatie raadpleegt u de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's), verkrijgbaar bij de productleverancier.

Verbruiksartikelen en reagentia voor handmatige DNA-extractie

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104)
- Ethanol (96–100%)
Opmerking: Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien deze andere substanties bevat, zoals methanol of methylethylketon.

Verbruiksartikelen en reagentia voor geautomatiseerde DNA-extractie

- QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (monsterbereidingscartridges, 8 putjes, catalogusnr. 997002)
- 8-Rod Covers (afdekkingen voor 8 staafjes, catalogusnr. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (filtertips, 1500 µl, catalogusnr. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (filtertips, 200 µl, catalogusnr. 990332)
- Elution Microtubes CL (elutiemicrobuisjes CL, catalogusnr. 19588)
- Tip disposal bags (afvalzakken voor tips, catalogusnr. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (microbuisjes 2,0 ml type H, Sarstedt®, catalogusnr. 72.694, www.sarstedt.com)

Verbruiksartikelen en reagentia voor PCR

- Nuclease-free aerosol-resistant sterile PCR pipet tips with hydrophobic filters (nucleasevrije, aerosol-resistente, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters)
- 1.5 ml or 2.0 ml nuclease-free PCR tubes (nucleasevrije PCR-buisjes van 1,5 ml of 2,0 ml)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q (stripbuisjes met dopjes, 0,1 ml, voor de Rotor-Gene Q, catalogusnr. 981103 of 981106)
- Ijs

Apparatuur

- Micropipet (verstelbaar)* bestemd voor PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wegwerphandschoenen
- Vortexmixer
- Verwarmingsblok voor het lyseren van monsters op 56 °C

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

- Benchtop-centrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 0,5/1,5/2,0 ml (die snelheden van 13.000–14.000 tpm kan halen)
- Spectrofotometer

Instrumenten voor geautomatiseerde monsterbereiding

- QIASymphony SP-instrument (catalogusnr. 9001297), softwareversie 4.0 of hoger, bijbehorende accessoires en het **Blood_200_V7_DSP**-protocol
- Geleidebuisje 3B (geleidebuisje van 2,0 ml v2, monsterhouder) (24), Qsym, catalogusnr. 9242083)

Instrumenten voor PCR


- Real-time PCR-instrument*: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM en bijbehorende accessoires
- Rotor-Gene AssayManager®-software v2.1.x geïnstalleerd ($x \geq 0$)
- Gamma-invoegtoepassing Rotor-Gene AssayManager v1.0.x geïnstalleerd ($x \geq 0$)
- JAK2 CE-assayprofiel geïmporteerd (ipsogen_JAK2_blood_CE_V1_0_x [$x \geq 0$])

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

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) voor meer informatie. Deze zijn als handige en compacte PDF beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de VIB voor elke QIAGEN®-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

VOORZICHTIG 	VOORZICHTIG: VOEG GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.
---	---

Algemene voorzorgsmaatregelen

Voor het gebruik van qPCR-testen zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die gelden voor moleculaire biologie en die voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

Deze kit is bestemd voor in vitro diagnostisch gebruik. De reagentia en instructies in deze kit zijn gevalideerd voor optimale prestaties.

- De test is bestemd voor gebruik bij volbloedmonsters ontsteld met kalium-EDTA en gedurende maximaal 96 uur bewaard bij een temperatuur van 2 °C tot 8 °C tot DNA-extractie.
- Alle chemische en biologische materialen zijn potentieel gevaarlijk. Monsters zijn potentieel besmettelijk en dienen als biologisch gevaarlijk materiaal te worden behandeld.
- Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- De reagentia voor de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn optimaal verdund. Verdun reagentia niet nog meer, want dit kan leiden tot slechtere prestaties.
- Gebruik geen reactievolumes (reactiemengsel plus monster) van onder de 25 µl.
- Alle reagentia in de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde kit. U kunt geen enkel reagens van de ene kit vervangen door dezelfde reagens van een andere *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit, zelfs niet als de kits van dezelfde partij afkomstig zijn, want dit kan invloed hebben op de prestaties.

- Raadpleeg de gebruikershandleiding van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument en van RGAM 2.1 voor aanvullende waarschuwingen, voorzorgsmaatregelen en procedures.
- Het hanteren van andere incubatietijden of temperaturen kan leiden tot foutieve of discrepante gegevens.
- Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.
- Reactiemengsels kunnen veranderen als ze worden blootgesteld aan licht.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie van de mengsels met de synthetische materialen in de JAK2 MT-kwantificatiestandaard- en JAK2 WT-kwantificatiestandaardreagentia, en met de JAK2-mutantcontrole- en JAK2 WT-controlereagentia.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven DNA of PCR-product, die kan leiden tot een fout-positief signaal.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door DNase, die kan leiden tot degradatie van de template-DNA.
- Gebruik afzonderlijke, speciale pipetten om reactiemengsels te maken en templates toe te voegen.
- Open het Rotor-Gene Q MDx-instrument niet totdat de run is voltooid.
- Open Rotor-Gene Q-buisjes niet nadat de run is voltooid.
- Wees extra voorzichtig om te zorgen voor het correct testen van monsters en let op verkeerde invoer van monsters, fouten bij het laden en fouten met de pipetten.
- Zorg ervoor dat er op een systematische manier wordt omgegaan met de monsters om te zorgen voor correcte identificatie gedurende het hele proces en zodoende de traceerbaarheid te handhaven.

We raden het volgende aan:

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

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor veiligheidsinformatie met betrekking tot de extractiekit QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogus-nr. 61104) en QIASymphony DNA DSP Mini Kit (catalogusnr. 937236).

Opslag en verwerking reagentia

Verzendcondities

De *ipsogen* JAK2 PGQ PCR Kit wordt verzonden op droogijs. Als een component van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit (behalve het enzym) bij aankomst niet bevroren is, als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon, handleiding of reagentia bevat, neemt u contact op met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of met de lokale distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bewaarcondities

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit moet direct na ontvangst worden opgeslagen bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C. Gebruik daarvoor een vriezer met een constante temperatuur die is beschermd tegen licht.

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor opslaginformatie met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) en QIASymphony DNA DSP Mini Kit (catalogusnr. 937236).

Stabiliteit

Als de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit wordt bewaard in de gespecificeerde bewaarcondities, is de kit stabiel tot de vervaldatum die staat vermeld op het etiket op de doos.

Eenmaal geopend kunnen reagentia in de originele verpakking worden bewaard bij een temperatuur van -30 tot -15 °C tot de vervaldatum die staat vermeld op het etiket op de doos. Vermijd herhaald ontdooien en invriezen. Houd een maximum van 5 cycli van invriezen en ontdooien aan.

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor stabiliteitsinformatie met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogus-nr. 61104) en QIASymphony DNA DSP Mini Kit (catalogusnr. 937236).

- Meng voorzichtig door het buisje 10 keer om te keren en alle buisjes behalve het enzym te centrifugeren voordat u deze openmaakt.

- De vervaldatum van de verschillende reagentia staan vermeld op de etiketten van de afzonderlijke componenten. Bij de juiste bewaarcondities blijven de prestaties van het product tot de vermelde tijd stabiel zolang dezelfde partijen componenten worden gebruikt.
- De procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN omvatten functionele testen van kits voor iedere afzonderlijke kitpartij. Meng daarom geen reagentia van verschillende kits, zelfs als deze van dezelfde partij afkomstig zijn.

Opslag en verwerking van monsters

Volbloedmonsters

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is bestemd voor gebruik met monsters van genomisch DNA geëxtraheerd uit volbloedmonsters ontsteld met kalium-EDTA, ofwel als volgt bewaard:

- bij 2 °C tot 8 °C gedurende maximaal 96 uur,
- bij 15 °C tot 25 °C gedurende maximaal 96 uur, of
- bevroren bij -15 °C tot -30 °C gedurende maximaal 1 maand,

Opmerking: Volbloedmonsters dienen te worden verzonden onder dezelfde condities als de condities die gelden voor de opslag. Zo worden temperatuurwijzigingen tijdens de opslag en verzending voorkomen.

Monsters van genomisch DNA

Zodra genomisch DNA is geëxtraheerd, kunnen monsters worden bewaard en verzonden bij een temperatuur van -30 °C tot -15 °C gedurende maximaal 15 maanden, ofwel direct na de extractie, dan wel na verdunning met TE-buffer.

Procedure

Extractie van genomisch DNA uit volbloed en bereiding

Genomisch DNA dient te worden geëxtraheerd met behulp van de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) of het QIASymphony SP-instrument in combinatie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236).

Zorg ervoor dat de vervaldatum van de reagentia niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities.

Opmerking: De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd in combinatie met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) of de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236). Gebruik geen ander DNA-extractieproduct.

Handmatige extractie van genomisch DNA met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Handmatige extractie van genomisch DNA dient te worden uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) conform de bijbehorende *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (Handleiding voor de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit).

Wat u moet doen voor u begint

- **Laat de bloedmonsters op kamertemperatuur komen (15–25 °C) en controleer of ze goed zijn gehomogeniseerd.**

- **De lysisbuffer bereiden**

Als er zich bezinsel heeft gevormd in de lysisbuffer (AL), lost u deze op door te incuberen op 56 °C.

- **QIAGEN-protease bereiden**

Voeg 1,2 ml proteaseoplosmiddel (PS) toe aan de flacon met gelyofiliseerde QIAGEN-protease (QP) en meng voorzichtig. Meng door de flacon meerdere keren om te keren. Zo voorkomt u dat het mengsel gaat schuimen. Zorg ervoor dat de QIAGEN-protease (QP) volledig wordt opgelost.

Opmerking: Voeg QP niet rechtstreeks toe aan de lysisbuffer (AL).

- **Spoelbuffer 1 bereiden**

Gebruik een maatcilinder om 25 ml ethanol (96–100%) toe te voegen aan de fles met 19 ml spoelbuffer 1-concentraat (AW1). Bewaar de gereconstitueerde spoelbuffer 1 (AW1) op kamertemperatuur (15–25 °C).

Opmerking: Meng de gereconstitueerde spoelbuffer 1 (AW1) altijd door de fles meerdere keren om te keren voordat u de procedure start.

- **Spoelbuffer 2 bereiden**

Gebruik een maatcilinder om 30 ml ethanol (96–100%) toe te voegen aan de fles met 13 ml spoelbuffer 2-concentraat (AW2). Bewaar de gereconstitueerde spoelbuffer 2 (AW2) op kamertemperatuur (15–25 °C).

Opmerking: Meng de gereconstitueerde spoelbuffer 2 (AW2) door de fles meerdere keren om te keren voordat u de procedure start.

- **De elutiebuffer bereiden**

De kit bevat één fles elutiebuffer (AE). Ter voorkoming van contaminatie van de elutiebuffer (AE) raden we ten eerste aan om pipettips met aerosolbarrières te gebruiken wanneer u de elutiebuffer (AE) uit de fles pipetteert en om de dop van de fles direct erna weer terug te plaatsen.

Laat de elutiebuffer (AE) op kamertemperatuur komen (15–25 °C).

- **Stel een verwarmingsblok in op 56 °C om te gebruiken in stap 4.**

Procedure

1. Pipetteer 20 µl QIAGEN-protease (QP) in een lysisbuisje (LT).

Opmerking: Controleer voor gebruik de vervaldatum van de gereconstitueerde protease.

2. Voeg 200 µl bloedmonster toe aan het lysisbuisje (LT).
3. Voeg 200 µl lysisbuffer (AL) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng gedurende 15 seconden met een pulse-vortexmixer.

Opmerking: Voor efficiënte lysis is het essentieel dat het monster en de lysisbuffer (AL) grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.

Opmerking: Aangezien lysisbuffer (AL) een hoge viscositeit heeft, moet u ervoor zorgen dat u het juiste volume aan lysisbuffer (AL) toevoegt door zorgvuldig te pipetteren of door een geschikte pipet te gebruiken.



Voeg QIAGEN-protease (QP) niet rechtstreeks toe aan de lysisbuffer (AL).

4. Incubeer bij 56 °C (± 1 °C) gedurende 10 minuten (± 1 minuut).
5. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ongeveer 5 seconden op volle snelheid om druppels van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
6. Voeg 200 µl ethanol (96–100%) toe aan het lysisbuisje (LT), sluit het deksel en meng grondig gedurende ≥ 15 seconden met een pulse-vortexmixer.
7. Centrifugeer het lysisbuisje (LT) gedurende ≥ 5 seconden op volle snelheid om eventuele druppels vloeistof van de binnenkant van het deksel te verwijderen.
8. Breng het volledige lysaat van stap 7 over naar de QIAamp Mini-draaikolom zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-draaikolom niet aan met de pipettip.
Opmerking: Als u meerdere monsters verwerkt, opent u slechts één lysisbuisje (LT) tegelijk.
9. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en centrifugeer op ongeveer 6000 × g gedurende 1 minuut. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon spoelbuisje (WT) en gooi het buisje met het filtraat weg.

Opmerking: Als het lysaat na centrifugeren op $6000 \times g$ (8000 tpm) nog niet volledig het membraan is gepasseerd, centrifugeert u opnieuw op volledige snelheid (maximaal $20.800 \times g$) gedurende 1 minuut.

Opmerking: Als het lysaat tijdens het centrifugeren nog steeds niet het membraan passeert, gooit u het monster weg en herhaalt u de stappen voor isolatie en zuivering met nieuw monstermateriaal.

10. Open voorzichtig de QIAamp Mini-draaikolom en voeg 500 μ l Spoelbuffer 1 (AW1) toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-draaikolom niet aan met de pipettip.
11. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en centrifugeer op ongeveer $6000 \times g$ (8000 tpm) gedurende 1 minuut. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon spoelbuisje (WT) en gooi het busje met het filtraat weg.
12. Open voorzichtig de QIAamp Mini-draaikolom en voeg 500 μ l Spoelbuffer 2 (AW2) toe zonder de rand te bevochtigen. Raak het membraan van de QIAamp Mini-draaikolom niet aan met de pipettip.
13. Sluit het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en centrifugeer op volledige snelheid (ongeveer $20.000 \times g$, oftewel 14.000 tpm) gedurende 1 minuut. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon spoelbuisje (WT) en gooi het busje met het filtraat weg.
14. Centrifugeer op volledige snelheid (ongeveer $20.000 \times g$, oftewel 14.000 tpm) gedurende 3 minuten om het membraan volledig te drogen.
15. Plaats de QIAamp Mini-draaikolom in een schoon elutiebusje (ET) en gooi het spoelbuisje (WT) met het filtraat weg. Open voorzichtig het deksel van de QIAamp Mini-draaikolom en breng 50 tot 200 μ l elutiebuffer (AE) over naar het midden van het membraan. Sluit het deksel en incubeer gedurende 1 minuut bij kamertemperatuur (15–25 °C). Centrifugeer op ongeveer $6000 \times g$ (8000 tpm) gedurende 1 minuut om het DNA uit te wassen.
16. Gooi gebruikte monsterbuisjes, schaaltes en afval weg conform uw lokale veiligheidsvoorschriften.

Geautomatiseerde extractie van genomisch DNA met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Geautomatiseerde extractie van genomisch DNA dient te worden uitgevoerd met het QIASymphony-instrument, waarbij de monsterbereidingsmodule wordt gebruikt in combinatie met de QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236). Volg daarbij de instructies in *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (Handleiding voor de QIASymphony DSP DNA Kit). Stappen van het JAK2-protocol worden in de onderstaande procedure aangeduid met het symbool



In combinatie met het QIASymphony SP-instrument maakt de QIASymphony DSP DNA Mini Kit geautomatiseerde DNA-zuivering uit humaan volbloed mogelijk (met behulp van het Blood_200_V7_DSP-protocol op de QIASymphony).

- Er is geen voorafgaande behandeling nodig.
- Buisjes worden rechtstreeks overgebracht naar de QIASymphony SP.
- DNA-zuivering wordt uitgevoerd met magnetische deeltjes.

Wat u moet weten voor u begint



- Het te extraheren volume volbloed is 300 µl.
- Zorg ervoor dat u bekend bent met de bediening van de QIASymphony SP. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van uw instrument voor bedieningsinstructies.
- Optioneel onderhoud is niet verplicht voor correcte werking van het instrument, maar wordt wel ten zeerste aanbevolen om de kans op contaminatie te reduceren.
- Voordat u de reagenscartridge voor de eerste keer gebruikt, dient u te controleren of de buffers QSL1 en QSB1 geen bezinksel bevatten. Verwijder indien nodig de bakjes met de buffers QSL1 en QSB1 uit de reagenscartridge en incubeer gedurende 30 minuten op 37 °C, waarbij u af en toe schudt om het bezinksel op te lossen. Zorg ervoor dat u de bakjes in de juiste posities plaatst. Als de reagenscartridge al is doorgestoken, moet u ervoor zorgen dat de bakjes zijn verzegeld met afsluitstrips voor hergebruik en moet u de volledige reagenscartridge gedurende 30 minuten incuberen op 37 °C in een waterbad dat u af en toe schudt.
- Vermijd dat u de reagenscartridge (RC) te hard schudt, want dan kan er schuim ontstaan, wat kan leiden tot detectieproblemen met de vloeistof.

Wat u moet doen voor u begint

- Voordat u de procedure start moet u ervoor zorgen dat de magnetische deeltjes volledig geresuspendeerd zijn. Voorafgaand aan het gebruik dient u het bakje met de magnetische deeltjes gedurende minstens 3 minuten grondig te vortexen.
- Zorg ervoor dat het doorsteekdeksel op de reagenscartridge wordt geplaatst en dat het deksel van het bakje met magnetische deeltjes is verwijderd; of zorg ervoor, als u een gedeeltelijk gebruikte reagenscartridge gebruikt, dat de afsluitstrips voor hergebruik zijn verwijderd.
- Vergeet niet de enzymbuisjes te openen.

- Als de monsters van streepjescodes zijn voorzien, plaatst u de monsters zodanig in de buisjeshouder dat de streepjescodes naar de streepjescodelezer aan de linkerkant van de QIASymphony SP zijn gericht.

Procedure

1. Sluit alle lades en de kap.
2. Schakel de QIASymphony SP in en wacht tot het scherm "Sample Preparation" (Monsterbereiding) wordt weergegeven en de initialisatieprocedure is voltooid.

Opmerking: De aan/uit-schakelaar bevindt zich in de linkeronderhoek van de QIASymphony SP.

3. Meld u aan bij het instrument.
4. Zorg ervoor dat de lade "Waste" (Afval) correct is voorbereid en controleer of de componenten van de lade "Waste" (Afval) aanwezig zijn, waaronder de tipafvoer en container voor vloeibaar afval. Vervang indien nodig de afvalzak voor tips.
5. Plaats het benodigde elutierek in de lade "Eluate" (Eluaat).

Plaats geen plaat met 96 putjes in "Elution slot 4" (Elutiepositie 4).

Gebruik "Elution slot 1" (Elutiepositie 1) uitsluitend met de bijbehorende koelingsadapter.

Als u een plaat met 96 putjes gebruikt, moet u ervoor zorgen dat de plaat in de juiste richting wordt geplaatst, aangezien een onjuiste plaatsing ertoe kan leiden dat bij latere analyse de monsters door elkaar worden gehaald.

6. Plaats de vereiste reagenscartridge(s) en verbruiksartikelen in de lade "Reagents and Consumables" (Reagentia en verbruiksartikelen).

Opmerking: Zorg ervoor dat de pipettips correct zijn bevestigd.

7. Controleer of de componenten van de lade "Reagents and Consumables" (Reagentia en verbruiksartikelen) aanwezig zijn.



8. Breng **300 µl** van het te extraheren volbloedmonster over naar een microbuisje (2,0 ml type H) en plaats het buisje in de 3b 2 ml-adapter op de monsterbuisjeshouder. Plaats de monsterbuisjes in de lade "Sample" (Monster).
9. Voer met het aanraakscherm de benodigde informatie in voor elke batch monsters die moet worden verwerkt:
 - Monsterinformatie: pas het standaard buisjesformaat aan (selecteer "Select All" [Alles selecteren] en vervolgens "Sarstedt reference 72.694" [Sarstedt-referentienr. 72.694] in het overzicht "Tube Insert" [Geleidebuisje])

- Protocol dat moet worden uitgevoerd: selecteer "Select All" (Alles selecteren) en selecteer de categorie "DNA Blood" (DNA-bloed) → Blood_200_V7_DSP voor het volbloedmonster



- Elutievolume en uitvoerpositie: 100 µl voor volbloedprotocol.

Opmerking: Nadat u informatie over de partij hebt ingevoerd, verandert de status van "LOADED" (Geladen) in "QUEUED" (In de wachtrij). Zodra er een partij in de wachtrij staat, verschijnt de knop "Run" (Verwerken).

10. De run starten:

- Druk op de knop "Run" (Verwerken) om de run te starten.
- Lees en bevestig het bericht dat wordt weergegeven.

Opmerking: We raden aan om bij het instrument te blijven wachten totdat de vloeistofniveaudetectie van de interne controlebuisjes is voltooid en de status van de QIASymphony SP-houder verandert in "RUNNING" (Bezig met verwerken).

Opmerking: Onderbreek of stop de run niet tijdens het verwerken (behalve in een noodgeval), aangezien monsters dan worden gemarkeerd als "unclear" (onduidelijk).

Opmerking: Het is mogelijk doorlopend monsters te plaatsen en toe te voegen aan deze run (totdat de reagentia worden geplaatst). Druk op de knop "Run" (Verwerken) om de zuiveringsprocedure te starten.

11. Aan het eind van de protocolrun verandert de status van de partij van "RUNNING" (Bezig met verwerken) in "COMPLETED" (Voltooid). Haal het elutierek met de gezuiverde nucleïne-zuren uit de lade "Eluate" (Eluaat).

We raden aan de elutieplaat direct nadat de run is voltooid, te verwijderen van de lade "Eluate" (Eluaat). Afhankelijk van de temperatuur en vochtigheidsgraad kan er sprake zijn van condensatie of verdamping bij elutieplaten die in de QIASymphony SP worden gelaten nadat de run is voltooid.

Opmerking: In het algemeen worden magnetische deeltjes niet overgedragen naar eluaten. Als een eluaat zware deeltjes bevat, kunnen de magnetische deeltjes als volgt worden verwijderd:

Breng het buisje met het DNA over naar een geschikte magnetische separator (zoals QIAGEN 12-Tube Magnet, catalogusnr. 36912) totdat de magnetische deeltjes zijn gescheiden. Breng het buisje met het DNA over naar een geschikte magnetische separator (zoals QIAGEN 96-Tube Magnet, catalogusnr. 36915) totdat de magnetische deeltjes zijn gescheiden. Als u geen geschikte magnetische separator voorhanden hebt, centrifugeert u het buisje met het DNA gedurende 1 minuut op volledige snelheid in een microcentrifuge om eventuele resterende magnetische deeltjes te pelletiseren.

12. Exporteer het QIASymphony SP-resultatenbestand: dit rapport wordt voor elke elutieplaat gegenereerd.

- Plaats de USB-stick in een van de USB-poorten aan de voorzijde van de QIASymphony SP.
 - Klik op de knop "Tools" (Hulpmiddelen).
 - Selecteer "File Transfer" (Bestandsoverdracht).
 - Selecteer op het tabblad "In-/Output Files" (In-/uitvoerbestanden) "Results Files" (Resultatenbestanden) en klik op "Transfer" (Overdragen).
Zorg dat de naam van de bestandsexport de volgende indeling heeft:
jjjj-mm-dd hh:mm:ss_Elutierek-ID
13. Controleer de kolom "Validity of result" (Geldigheid van resultaat) voor elk monster in het QIASymphony SP-resultatenbestand:
- Geldige en onduidelijke status: ga verder met DNA-kwalificering en -kwantificatie.
 - Ongeldige status: monster wordt afgekeurd. Voer de extractiestap opnieuw uit.
14. Als een reagenscartridge slechts gedeeltelijk wordt gebruikt, sluit u deze af met de meegeleverde afsluitstrips voor hergebruik en sluit u buisjes met proteïnase K direct na de protocolrun af met schroefdoppen om verdamping te voorkomen.
15. Gooi gebruikte monsterbuisjes, schaalpjes en afval weg conform uw lokale veiligheidsvoorschriften.
16. Reinig de QIASymphony SP.
Volg de onderhoudsinstructies in de gebruikershandleidingen van uw instrument. Reinig de tipbeveiligingen geregeld om het risico van kruiscontaminatie te minimaliseren.
17. Sluit de laden van het instrument en schakel de QIASymphony SP uit.

Kwalificering en kwantificatie van DNA

Voor de kalibratie van de spectrofotometer dient een blanco ATE- of AE-buffer te worden gebruikt. Deze buffers moeten worden gebruikt omdat elutiebuffers die worden gebruikt in extractiekits voor genomisch DNA, het conserveringsmiddel natriumazide bevatten, dat absorbeert bij 260 nm.

- De verhouding A_{260}/A_{280} moet $\geq 1,7$ zijn, aangezien kleinere verhoudingen doorgaans duiden op proteïnecontaminatie of de aanwezigheid van organische chemicaliën en van invloed zijn op de PCR-stap.
- De DNA-kwantiteit wordt bepaald door de optische dichtheid te meten bij 260 nm.
- Totale hoeveelheid gezuiverd DNA = concentratie x volume van het monster in μL .
- Als de verhouding A_{260}/A_{280} lager is dan 1,7 en als de concentratie van genomisch DNA minder is dan $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, mag het monster niet verder worden verwerkt.

Normalisatie van monsters van genomisch DNA

Het DNA dient te worden verdund tot 10 ng/ μ l in de TE-buffer uit de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

De Rotor-Gene Q PCR is geoptimaliseerd voor 50 ng gezuiverd genomisch DNA verdund in een eindvolume van 5 μ l.

Protocol: qPCR met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

Wat u moet weten voor u begint

- De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit moet worden gebruikt met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument in combinatie met Rotor-Gene AssayManager v2.1. Neem de tijd om bekend te raken met het Rotor-Gene Q MDx-instrument voordat u het protocol start. Raadpleeg de gebruikershandleidingen van het instrument, Rotor-Gene AssayManager v2.1 en de Gamma-invoegtoepassing voor meer informatie.
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 maakt geautomatiseerde interpretatie van de PCR-resultaten mogelijk. De cyclusparameters worden vergrendeld voor de run.

Wat u moet doen voor u begint

Versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software moet zijn geïnstalleerd op de computer die is aangesloten op de Rotor-Gene Q en kunt u downloaden van de QIAGEN-website: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Voor meer informatie over de installatie van de Rotor-Gene AssayManager-basissoftware v2.1 raadpleegt u de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).

- De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit vereist de specifieke Gamma-invoegtoepassing. Deze invoegtoepassing kunt u downloaden van de QIAGEN-website: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Deze invoegtoepassing dient te worden geïnstalleerd op een computer waarop versie 2.1 van Rotor-Gene AssayManager is geïnstalleerd.
- Voor de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is bovendien een assayprofiel nodig. Dit assayprofiel (.iap-bestand) bevat alle parameters die nodig zijn voor het uitvoeren van de cyclus en het analyseren van de qPCR-assay. Het assayprofiel kan worden gedownload van de speciale webpagina voor de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit op de QIAGEN-website: www.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-jak2-rgq-pcr-kit-ce/#resources. Het assayprofiel moet worden geïmporteerd in versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager-software.

Opmerking: De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit kan alleen worden uitgevoerd als bepaalde configuratie-instellingen worden ingesteld in de Rotor-Gene AssayManager-software.

Voor de veiligheid van het gehele systeem moeten de volgende vereiste configuratie-instellingen worden ingesteld voor de gesloten modus:

- “Material number required” (Materiaalnummer vereist)
- “Valid expiry date required” (Geldige vervaldatum vereist)
- “Lot number required” (Partijnummer vereist)

De Gamma-invoegtoepassing installeren en het assayprofiel importeren

Het installeren van de Gamma-invoegtoepassing en het importeren van het assayprofiel worden beschreven in *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1) en de *Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing).

- Download de Gamma-invoegtoepassing en de nieuwste versie van het JAK2 CE-assayprofiel van de QIAGEN-website.
- Start de installatie door te dubbelklikken op het bestand RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi. Volg de installatie-instructies op het scherm. Voor een gedetailleerde beschrijving van dit proces raadpleegt u het gedeelte “Installing plug-ins” (Invoegtoepassingen installeren) in de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1).
Opmerking: Voor de veiligheid van het gehele systeem selecteert u het tabblad “Settings” (Instellingen) en schakelt u de selectievakjes “Material number required” (Materiaalnummer vereist), “Valid expiry date required” (Geldige vervaldatum vereist) en “Lot number required” (Partijnummer vereist) in voor de gesloten modus (in het gedeelte “Work list” [Werklijst]). Als deze niet zijn ingeschakeld, klik u erop om ze in te schakelen.
- Nadat de invoegtoepassing is geïnstalleerd, moet iemand met administratorrechten voor de Rotor-Gene AssayManager-software het assayprofiel ipsogen_JAK2_blood_CE als volgt importeren:
 1. Meld u als gebruiker met administratorrechten aan bij de Rotor-Gene AssayManager-software.
 2. Selecteer de configuratieomgeving.
 3. Selecteer het tabblad “Assay Profiles” (Assayprofielen).
 4. Klik op de knop “Import” (Importeren).
 5. Selecteer in het dialoogvenster het assayprofiel ipsogen_JAK2_blood_CE dat u wilt importeren en klik op “Open” (Openen).
 6. Zodra het assayprofiel is geïmporteerd, kan het worden gebruikt in de omgeving “Setup” (Instellen).

Opmerking: Het is niet mogelijk twee keer dezelfde versie van een assayprofiel te importeren.

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

We raden aan om acht monsters van genomisch DNA te testen in dezelfde proef om zo het gebruik van de controles, standaarden en reactiemengsels te optimaliseren.

Tabel 2 geeft het aantal reacties weer dat kan worden geanalyseerd met de rotor voor 72 buisjes.

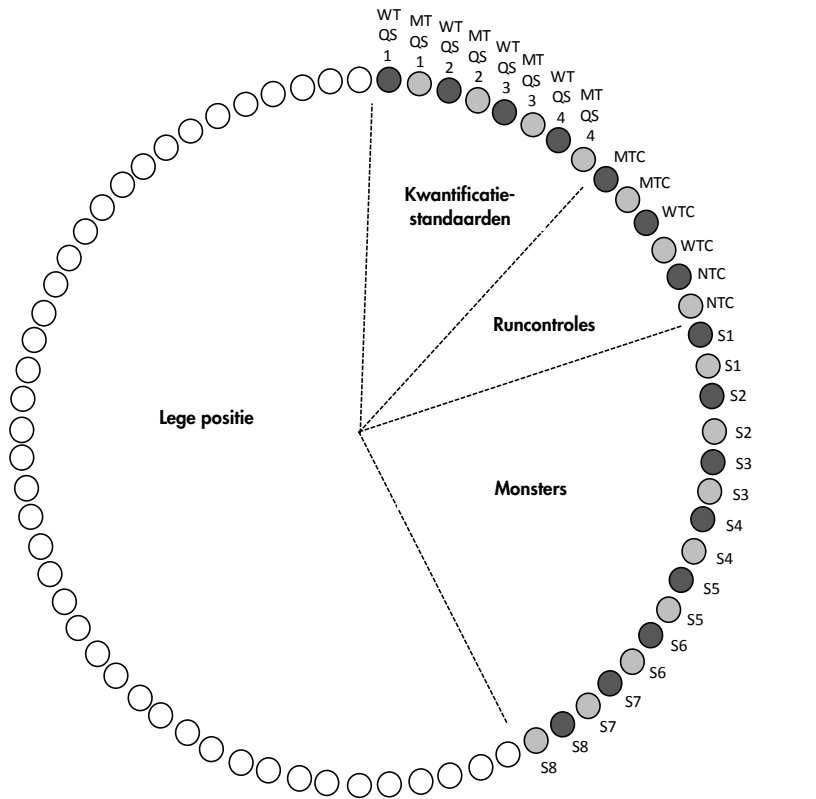
Het schema in Afbeelding 3 toont een voorbeeld van de instelling van het laadblok of de rotor voor een proef met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit.

De getallen geven de posities in het laadblok en de uiteindelijke rotorpositie aan.

Tabel 2. Aantal reacties voor Rotor-Gene Q MDx-instrumenten met rotor voor 72 buisjes

Monsters	Aantal reacties
Met JAK2 MT-reactiemengsel	
8 monsters van genomisch DNA	8
JAK2 MT-kwantificatiestandaarden	4
JAK2 MT-controle (mutant)	1
JAK2 WT-controle (wildtype)	1
Water voor templateloze controle (NTC)	1
Met JAK2 WT-reactiemengsel	
8 monsters van genomisch DNA	8
JAK2 WT-kwantificatiestandaarden (wildtype)	4
JAK2 MT-controle (mutant)	1
JAK2 WT-controle (wildtype)	1
Water voor NTC	1

1	WT QS1	9	MT C	17	S2	25	S6	33		41		49		57		65	
2	MT QS1	10	MT C	18	S2	26	S6	34		42		50		58		66	
3	WT QS2	11	WT C	19	S3	27	S7	35		43		51		59		67	
4	MT QS2	12	WT C	20	S3	28	S7	36		44		52		60		68	
5	WT QS3	13	NT C	21	S4	29	S8	37		45		53		61		69	
6	MT QS3	14	NT C	22	S4	30	S8	38		46		54		62		70	
7	WT QS4	15	S1	23	S5	31		39		47		55		63		71	
8	MT QS4	16	S1	24	S5	32		40		48		56		64		72	



WT-reactiemengsel
 MT-reactiemengsel
 Lege positie

Afbeelding 3. Instelling van de plaat en rotor voor een proef met de *ipsogen JAK2 RGG PCR Kit*. **WTC:** JAK2 WT-controle; **MTC:** JAK2 MT-controle; **WT-QS:** JAK2 WT-standaarden; **MT-QS:** JAK2 MT-kwantificatiestandaarden; **S:** monster van genomisch DNA; **NTC:** templateloze controle (water).



Buisjes dienen in de rotor te worden geplaatst zoals aangeduid in Afbeelding 3, aangezien de geautomatiseerde analyse die in het assayprofiel is ingesteld, is gebaseerd op deze ordening. Als een andere indeling wordt gebruikt, zullen afwijkende resultaten het gevolg zijn.

Opmerking: Vul alle resterende posities met lege buisjes.

qPCR met Rotor-Gene Q MDx-instrumenten met rotor voor 72 buisjes

1. Maak als volgt een werklIJst voor de monsters die u wilt verwerken.

- Schakel het Rotor-Gene Q MDx-instrument in.
- Open de Rotor-Gene AssayManager v2.1-software en meld u aan als gebruiker met de operatorrol in de gesloten modus.
- Klik op de knop "New work list" (Nieuwe werklIJst) in het werklIJstoverzicht (in de omgeving "Setup" [Instellen]).
- Selecteer het "JAK2 CE assay profile" (JAK2 CE-assayprofiel) uit de lijst met beschikbare assayprofielen in de stap "Assay".
- Klik op de knop "Move" (Verplaatsen) om het geselecteerde assayprofiel te verplaatsen naar de lijst "Selected assay profiles" (Geselecteerde assayprofielen). Het assayprofiel wordt nu weergegeven in de lijst "Selected assay profiles" (Geselecteerde assayprofielen).
- Geef het aantal monsters op in het daarvoor bestemde veld.
- Voer de volgende informatie over de JAK2-kit in, die u vindt op het deksel van de doos:
 - Materiaalnummer: 1079182
 - Geldige vervaldatum
 - Partijnummer.Eventueel kan de streepjescode van de kit worden ingevoerd of gescand.
- Selecteer de stap "Samples" (Monsters). Er wordt een lijst met monsterdetails weergegeven. Deze lijst staat voor de verwachte indeling van de rotor.
- Geef de monster-ID's op in deze lijst. Voer eventueel ook extra informatie en opmerkingen over de monsters in.
- Selecteer de stap "Properties" (Eigenschappen) en voer een naam voor de werklIJst in.
- Schakel het selectievakje "is applicable" (Is van toepassing) in.
- Sla de werklIJst op.
- U kunt de werklIJst afdrukken als hulpmiddel bij het voorbereiden en instellen van de qPCR. Als u de werklIJst wilt afdrukken, drukt u op de knop "Print work list" (WerklIJst afdrukken). De monsterdetails maken deel uit van deze werklIJst.

Opmerking: U kunt de werklIJst maken zodra de proef is ingesteld in het instrument, of u kunt het werklIJstbestand opslaan voordat u de monsters in het instrument plaatst..

2. Stel de qPCR-proef in.

- Ontdooi alle benodigde componenten, behalve de *Taq* DNA-polymerase, die u in de vriezer moet bewaren wanneer deze niet wordt gebruikt. Plaats de buisjes met componenten die u wilt ontdooien op ijs.

Opmerking: Ontdooi niet langer dan 30 minuten om degradatie van het materiaal te voorkomen.

- Reinig het gedeelte van de tafel waar u het PCR-mengsel bereidt om contaminatie van de template of nucleasen te voorkomen.
- Meng voorzichtig door de buisjes met de standaarden, controles en reactiemengels 10 keer om te keren en kort te centrifugeren voor gebruik.

3. Bereid de volgende qPCR-mengsels op basis van het aantal monsters dat u wilt verwerken.

Alle concentraties gelden voor het uiteindelijke volume van de reactie.

In Tabel 3 en Tabel 4 ziet u het pipetteerschema voor de bereiding van één MT- en één WT-reagensmengsel, berekend voor uiteindelijke reactievolumes van 25 µl. Extra volumes zijn opgenomen om te compenseren voor pipetteerfouten en maken 8 monsters en controles mogelijk.

Tabel 3. Bereiding van qPCR-mengsels voor de detectie van JAK2-mutantsequenties

Onderdeel	1 reactie (µl)	15+1* reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
JAK2 MT-reactiemengsel	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA-polymerase	0,2	3,2	1x
Monster (toe te voegen in stap 4)	5	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	–

* Een extra reactievolume is opgenomen als dood volume.

Tabel 4. Bereiding van qPCR-mengsels voor de detectie van JAK2-wildtypesequenties

Onderdeel	1 reactie (µl)	15+1* reacties (µl)	Uiteindelijke concentratie
JAK2 WT-reactiemengsel	19,8	316,8	1x
<i>Taq</i> DNA-polymerase	0,2	3,2	1x
Monster (toe te voegen in stap 4)	5	5 elk	–
Totaal volume	25	25 elk	–

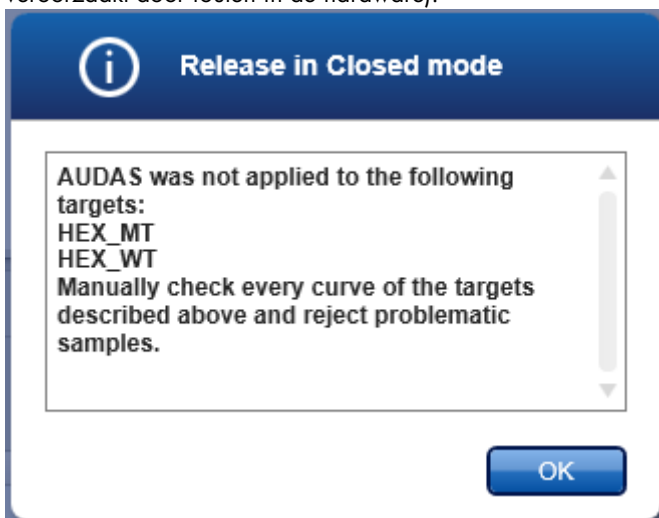
* Een extra reactievolume is opgenomen als dood volume.

- Voordat u 20 µl van het qPCR-voormengsel per stripbuisje pipetteert, dient u te vortexen en kort te centrifugeren.
- Ook dient u het DNA te vortexen en kort te centrifugeren (monster van genomisch DNA plus QS en controles). Voeg vervolgens 5 µl van het te kwantificeren materiaal toe aan het desbetreffende buisje voor een totaalvolume van 25 µl. Meng door de pipet voorzichtig op en neer te bewegen.

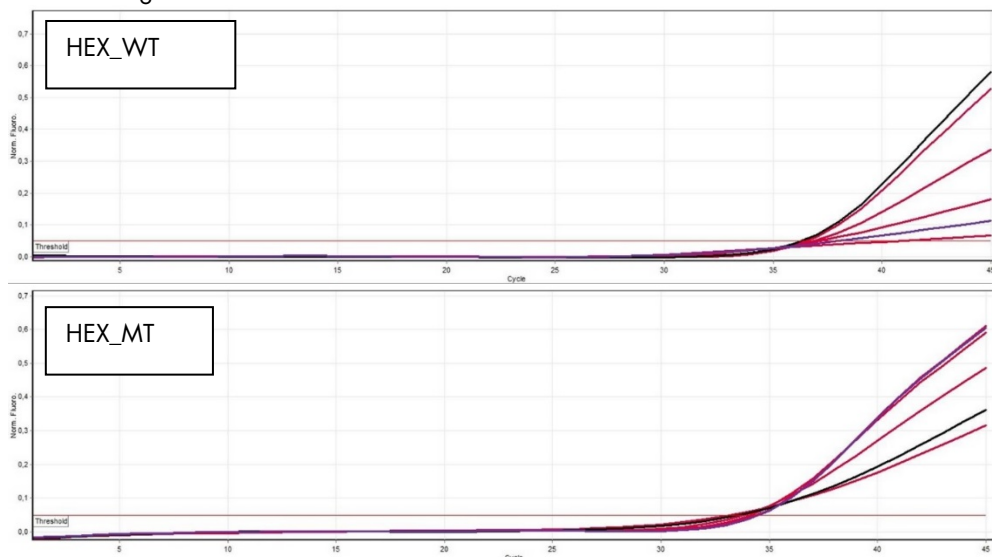
- Opmerking: Verwissel voor elk buisje de tip, zodat u niet-specifieke contaminatie van de template of het reactiemengsel voorkomt en zodoende fout-positieve resultaten voorkomt.
 - Plaats alle componenten van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit terug in de vriezer om te voorkomen dat het materiaal degradeert.
4. Bereid de Rotor-Gene Q MDx voor en start als volgt een run.
- Plaats een rotor met 72 putjes op de Rotor-Gene Q MDx-rotorhouder.
 - Vul de rotor met stripbuisjes conform de toegewezen posities. Start daarbij bij positie 1, zoals staat aangeduid in afbeelding 3. In alle ongebruikte posities dienen lege stripbuisjes met dop te worden geplaatst.
- Opmerking:** Zorg ervoor dat het eerste buisje op positie 1 wordt geplaatst en dat de stripbuisjes in de juiste richting worden geplaatst op de posities die in afbeelding 3 worden weergegeven.
- Maak de vergrendelingsring vast.
 - Plaats de rotor en vergrendelingsring in het Rotor-Gene Q MDx-instrument en sluit het deksel van het instrument.
 - Selecteer in de Rotor-Gene AssayManager v2.1-software de desbetreffende werklIJst in het werklIJstoverzicht en klik op de knop "Apply" (Toepassen); als de werklIJst nog open is, kunt u direct op de knop "Apply" (Toepassen) klikken.
- Opmerking:** Als er nog geen werklIJst speciaal voor de proef is gemaakt, meldt u zich aan bij Rotor-Gene AssayManager v2.1 en volgt u stap 2 voordat u als volgt verdergaat.
- Voer een naam in voor de proef.
 - Selecteer in het gedeelte "Cycler selection" (Cycler selecteren) de cycler die u wilt gebruiken.
 - Controleer of de vergrendelingsring correct is bevestigd en bevestig op het scherm dat de vergrendelingsring is bevestigd.
 - Klik op de knop "Start run" (Run starten).
 - De JAK2 RGQ PCR-run start.
5. Voer het volgende uit om de run te beëindigen.
- Zodra de run is voltooid, klikt u op "Finish run" (Run beëindigen).
 - Geef de run vrij en keur deze goed:
 - Voor gebruikers die zijn aangemeld met de rol Approver (Goedkeurder): Klik op "Release and go to approval" (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan).
 - Voor gebruikers die zijn aangemeld met de rol Operator: Klik op "Release" (Vrijgeven).

6. Geef de resultaten vrij.

- Als op "Release and go to approval" (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) is geklikt, worden de resultaten van de proef weergegeven.
- De volgende AUDAS-waarschuwing (automatische datascan) wordt weergegeven. Controleer in het gedeelte "Plots and Information" (Plots en informatie) handmatig of de HEX-targets van de curves van de ruwe gegevens afwijkingen vertonen (bijv. pieken veroorzaakt door fouten in de hardware).



Let op dat de curves van de HEX-targets van de interne controle niet de typische sigmoïde vormen hebben (zoals in de voorbeeldcurves hieronder) en moeten worden beschouwd als valide curves. Alle andere interne validiteitscriteria (bijv., C_T -drempelwaarden) worden automatisch gecontroleerd door de software.



- Als op "Release" (Vrijgeven) is geklikt door een gebruiker met een operatorrol, dient iemand met de rol "Approver" (Goedkeurder) zich aan te melden en de omgeving "Approval" (Goedkeuring) te selecteren.
 - Filter op de assay die moet worden goedgekeurd door de filteropties te selecteren en op de knop "Apply" (Toepassen) te klikken.
 - De bovengenoemde AUDAS-waarschuwing (automatische datascan) verschijnt. Controleer in het gedeelte "Plots and Information" (Plots en informatie) handmatig of de HEX-targets van de curves van de ruwe gegevens afwijkingen vertonen (bijv. pieken veroorzaakt door fouten in de hardware).
 - Let op dat de curves van de HEX-targets van de interne controle niet de typische sigmoïde vormen hebben (zoals in de voorbeeldcurves hierboven) en moeten worden beschouwd als valide curves. Alle andere interne validiteitscriteria (bijv., Ct-drempelwaarden) worden automatisch gecontroleerd door de software.
 - Controleer de resultaten en klik op de knop "Release/Report data" (Gegevens vrijgeven/rapporteren).
 - Klik op "OK". Het rapport wordt gegenereerd in PDF-indeling en wordt automatisch opgeslagen in de vooraf gedefinieerde map.

Standaard is het pad van de map:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Opmerking: Dit pad en de map kunt u wijzigen in de omgeving "Configuration" (Configuratie).

Opmerking: Voor het oplossen van problemen is een ondersteuningspakket van de run vereist. U kunt een ondersteuningspakket genereren in de goedkeurings- of archiveringsomgeving (zie de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*, hoofdstuk "Troubleshooting", "Creating a support package" [Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1, hoofdstuk "Problemen oplossen", "Een ondersteuningspakket maken"]). Daarnaast kan de audittrail vanaf het moment van het voorval ± 1 dag handig zijn. De audittrail kunt u downloaden in de serviceomgeving (zie de *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*, hoofdstuk 1.5.5.5) [Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager-basistoepassing v2.1, hoofdstuk 1.5.5.5]).

7. Maak het Rotor-Gene Q MDx-instrument weer leeg en gooi de stripbuisjes weg conform de lokale veiligheidsvoorschriften.

Interpretatie van de resultaten

De analyse is volledig geautomatiseerd.

Rotor-Gene AssayManager analyseert eerst* amplificatiecurves en verklaart mogelijk niet-overeenstemmende curves ongeldig, afhankelijk van de vorm en ruisamplitude. Als dit het geval is, wordt de ongeldige curve gemarkeerd.

De resultaten van de testmonsters zijn automatisch geanalyseerd en ingesteld door versie 2.1 van de Rotor-Gene AssayManager, maar moeten worden goedgekeurd en vrijgegeven door de gebruiker die is aangemeld met de rol goedkeurder. Er staan bij monsterresultaten die moeten worden goedgekeurd drie extra goedkeuringsknoppen aan het eind van de bijbehorende rij. Met deze knoppen kunnen de monsterresultaten interactief worden geaccepteerd of afgekeurd. Raadpleeg de *Gamma Plug-in User Manual* (Gebruikershandleiding van de Gamma-invoegtoepassing) voor meer informatie.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyseert vervolgens de controles van de run:

- NTC wordt gecontroleerd op de afwezigheid van specifieke amplificatie (JAK2 WT en JAK2 MT) en de aanwezigheid van amplificatie van de interne controle.
- WT- en MT-QS: De validatie is gebaseerd op de waarden van R^2 en de helling van elk.
- WTC: Het totaal aantal JAK2-kopieën (TCN) moet hoog genoeg zijn om deze controle te kunnen interpreteren. Als dit het geval is, wordt het JAK2-mutatiepercentage berekend. Deze runcontrole wordt gevalideerd als de status WT is volgens de test.
- MTC: Het totaal aantal JAK2-kopieën moet hoog genoeg zijn om deze controle te kunnen interpreteren. Als dit het geval is, wordt het JAK2-mutatiepercentage berekend. Deze runcontrole wordt gevalideerd als de status sterk positief is voor de JAK2-mutatie.

Opmerking: Het rapport dat aan het eind van de run wordt gegenereerd, toont de resultaten die zijn verkregen met runcontroles. Voor ongeldige gegevens staan waarschuwingen die de ongeldigheid laten zien.

Als alle controles in de run overeenstemmen, analyseert Rotor-Gene AssayManager v2.1 de onbekende monsters.

- Het totaal aantal kopieën in het monster moet hoog genoeg zijn om de resultaten te kunnen interpreteren. Dan wordt het JAK2-mutatiepercentage berekend en wordt het resultaat getoond. Als er geen specifieke amplificatie wordt waargenomen in een buisje (WT of MT),

* Alleen ingeschakeld voor FAM-targets.

wordt de amplificatie van de interne controle gecontroleerd om er zeker van te zijn dat het geen artefact betreft. Er moet ten minste één CT-waarde worden waargenomen in elk buisje (WT en MT) voordat een monster wordt gevalideerd door Rotor-Gene AssayManager v2.1 en voordat het bijbehorende resultaat geldig kan zijn.

Opmerking: Als zowel de runcontroles als de monsterresultaten geldig zijn, toont het rapport voor elk monster het aantal kopieën en het mutatiepercentage.

- Tabel 5 toont de waarschuwingen voor ongeldige monsters die kunnen worden toegekend aan een afzonderlijk buisje tijdens de analyse door Rotor-Gene AssayManager v2.1. Bij elke waarschuwing staat een uitleg.

Tabel 6 (page 37) geeft waarschuwingen voor monsters en beschrijvingen van de termen.

Tabel 5. Waarschuwingen voor ongeldige monsters met beschrijving van de termen

Waarschuwing	Beschrijving
ANALYSIS_FAILED	Assay is ingesteld als ongeldig, omdat de analyse is mislukt. Neem contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN.
ASSAY_INVALID	De assay is ongeldig omdat minstens één externe controle ongeldig is.
CONSECUTIVE_FAULT	Een doel dat voor de berekening voor dit doel is gebruikt, is ongeldig.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	De amplificatiecurve met onbewerkte gegevens heeft een vorm die afwijkt van het normale gedrag van deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten.
FLAT_BUMP	De amplificatiecurve met onbewerkte gegevens heeft de vorm van een platte bobbel die afwijkt van het normale gedrag van deze assay. Er is een grote kans dat er sprake is van incorrecte resultaten of incorrecte interpretatie van resultaten (zoals een onjuist vastgestelde C _T -waarde).
INVALID_CALCULATION	Berekening voor dit doel mislukt.
MC_IC_HIGH_CT (WT)	De gedetecteerde C _T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MC_IC_LOW_CT (WT)	De gedetecteerde C _T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MC_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C _T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het mutantreactiemengsel.
MC_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C _T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de mutantcontrole met het wildtypereactiemengsel.
MC_LOW_CN	Het aantal kopieën voor de mutantcontrole is te laag.
MC_LOW_PERCENTAGE	Het mutatiepercentage van de mutantcontrole is te laag.
MC_NO_CN	Er is geen aantal kopieën vastgesteld voor de mutantcontrole.
MC_NO_CT (MT)	Er is geen C _T detecteerbaar voor de mutantcontrole met het mutantreactiemengsel.
MC_NO_VALUE	Het mutatiepercentage van de mutantcontrole heeft geen waarde.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	De amplificatiecurve overschrijdt meer dan eens de drempelwaarde. Er kan geen duidelijke C _T worden vastgesteld.
NO_BASELINE	Er is geen basisniveau gevonden. Er kan geen verdere analyse worden uitgevoerd.
NTC_IC_HIGH_CT (MT)	De gedetecteerde C _T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het mutantreactiemengsel.
NTC_IC_HIGH_CT (WT)	De gedetecteerde C _T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het wildtypereactiemengsel.
NTC_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C _T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het mutantreactiemengsel.
NTC_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C _T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het wildtypereactiemengsel.
NTC_IC_LOW_CT (MT)	De gedetecteerde C _T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het mutantreactiemengsel.
NTC_IC_LOW_CT (WT)	De gedetecteerde C _T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de templateloze controle met het wildtypereactiemengsel.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C _T gedetecteerd in de templateloze controle.
OTHER_TARGET_INVALID	Een andere target voor hetzelfde monster is ongeldig.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	De berekende concentratie voor dit monster overschrijdt de technische limiet.

Waarschuwing	Beschrijving
QS_HIGH_SLOPE (MT)	De bovenlimiet van de mutanthelling wordt overschreden.
QS_HIGH_SLOPE (WT)	De bovenlimiet van de wildtypehelling wordt overschreden.
QS_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een of meer van de wildtypekwantificatiestandaarden.
QS_LOW_SLOPE (MT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor de mutanthelling.
QS_LOW_SLOPE (WT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor de wildtypehelling.
QS_LOW_RSQUARED (MT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor de mutant R^2 .
QS_LOW_RSQUARED (WT)	Er wordt niet voldaan aan de onderlimiet voor het wildtype R^2 .
QS_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C_T voor een of meer mutantkwantificatiestandaarden.
QS_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor een of meer wildtypekwantificatiestandaarden.
RUN_FAILED	De assay is ingesteld als ongeldig vanwege een probleem met de cycler of de aansluiting van de cycler.
RUN_STOPPED	De assay is ingesteld als ongeldig, omdat de run handmatig is gestopt.
SAMPLE_LOW_CN	Het aantal kopieën voor een testmonster is te laag.
SAMPLE_MT_IC_HIGH_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het mutantreactiemengsel.
SAMPLE_MT_IC_LOW_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het mutantreactiemengsel.
SAMPLE_MT_IC_NO_CT	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het mutantreactiemengsel.
SAMPLE_NO_CN	Geen aantal kopieën voor een testmonster.
SAMPLE_NO_VALUE	Het mutatiepercentage van een testmonster heeft geen waarde.
SAMPLE_WT_IC_HIGH_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SAMPLE_WT_IC_LOW_CT	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SAMPLE_WT_IC_NO_CT	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als een testmonster met het wildtypereactiemengsel.
SATURATION	De fluorescentie van onbewerkte gegevens raakt sterk verzadigd voor het buigpunt van de amplificatiecurve.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Er is in de amplificatiecurve een piek gedetecteerd dicht bij de C_T .
STEEP_BASELINE	Er is in de amplificatiecurve een snelle stijging in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
STRONG_BASELINE_DIP	Er is in de amplificatiecurve een sterke daling in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
STRONG_NOISE	Er is sterke ruis gedetecteerd buiten de groeifase van de amplificatiecurve.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Er is sterke ruis gedetecteerd in de groeifase (exponentiële fase) van de amplificatiecurve.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Er is in de amplificatiecurve een golving in het basisniveau gedetecteerd voor de fluorescentie van onbewerkte gegevens.
WTC_HIGH_PERCENTAGE	Het mutatiepercentage van de wildtypecontrole is te hoog.
WTC_IC_HIGH_CT (MT)	De gedetecteerde C_T -waarde is hoger dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.

Waarschuwing	Beschrijving
WTC_IC_LOW_CT (MT)	De gedetecteerde C_T -waarde is lager dan verwacht voor een interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.
WTC_IC_NO_CT (MT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het mutantreactiemengsel.
WTC_IC_NO_CT (WT)	Er is geen detecteerbare C_T voor de interne controle in hetzelfde buisje als de wildtypecontrole met het wildtypereactiemengsel.
WTC_LOW_CN	Het aantal kopieën voor de wildtypecontrole is te laag.
WTC_NO_CT (WT)	Er is geen C_T detecteerbaar voor de wildtypecontrole met het wildtypereactiemengsel.
WTC_NO_CN	Er is geen aantal kopieën vastgesteld voor de wildtypecontrole.
WTC_NO_VALUE	Het mutatiepercentage van de wildtypecontrole heeft geen waarde.

Tabel 6. Waarschuwingen voor monsters met beschrijving van de termen

Waarschuwing	Beschrijving
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Het percentage fluorescentiewijziging van dit monster ten opzichte van het monsterbuisje met de grootste fluorescentiewijziging is kleiner dan een opgegeven limiet.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	De reactie-efficiëntie voor dit monster heeft een opgegeven limiet niet bereikt.
SPIKE	Er is in de fluorescentie van onbewerkte gegevens een piek gedetecteerd in de amplificatiecurve, maar buiten de regio waar de C_T is bepaald.

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de lijst met veelgestelde vragen op ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers van de afdeling technische services van QIAGEN beantwoorden graag uw vragen over de informatie of het protocol in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (zie "Contactgegevens", pagina 47 voor contactgegevens).

Raadpleeg de desbetreffende handleidingen voor informatie over het oplossen van problemen met betrekking tot de extractiekits QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104) en QIASymphony DNA DSP Mini Kit (catalogusnr. 937236).

	Opmerkingen en suggesties
Geautomatiseerde extractie	
Monster gemarkeerd als "unclear" (onduidelijk)	Dit kan te maken hebben met een onderbreking tijdens de extractierun. Als de extractierun is voltooid, gaat u verder met de stap voor het meten van de OD-verhouding en de concentratie. Zo niet, dan herhaalt u de extractierun.
Monster gemarkeerd als "unprocessed" (onverwerkt)	Dit duidt op een fout met het aanvankelijke monstervolume. Controleer het bloedvolume door te pipetteren. Als het volume te klein is, vergroot u het volume, zodat er 300 µl aan monster is. Start vervolgens opnieuw de run.
Monster gemarkeerd als "invalid" (ongeldig)	Er is een fout opgetreden tijdens de extractierun. Herhaal de extractiestap voor dit monster.
Fout met de temperatuur van het koelblok	Als er aan het eind van de run een foutbericht wordt weergegeven over de koeltemperatuur, betekent dit dat de monsters vanaf het eind van de extractierun op kamertemperatuur (15–25 °C) zijn bewaard. Als de monsters gedurende < 12 uur op kamertemperatuur zijn bewaard, mag de kwaliteit van genomisch DNA niet worden aangepast en kan genomisch DNA worden gekwantificeerd. Als > 12 uur is verstreken, zijn de monsters van genomisch DNA mogelijk gedegradieerd. Als dit het geval is, herhaalt u de extractie.
Fout bij verwijdering van de elutieplaat	Aan het eind van de run wordt mogelijk een foutbericht weergegeven als de elutieplaat is verwijderd zonder de relevante bewerking op het scherm te selecteren. Dit kunt u herstellen door op het relevante selectievakje te klikken.
Algemene omgang met betrekking tot de beoordeling van de JAK2-mutatiestatus met de <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit	
Het totaal aantal kopieën stemt niet overeen en het bijbehorende monster is ongeldig: de amplificatie is te laag	
a) Controleer de verhouding A_{260}/A_{280}	Als dit < 1,7 is, voert u een nieuwe DNA-extractie uit.
b) Controleer de DNA-concentratie	De <i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit is geoptimaliseerd voor een werkconcentratie van 10 ng/µl. Als het DNA niet deze concentratie heeft, verdunt u het DNA of extraheert u opnieuw DNA uit het bloed.
c) Als beide parameters voldoen, zijn mogelijk de pipetteervolumes onjuist	Controleer de pipetten en kalibreer deze opnieuw voordat u de qPCR-stap herhaalt.

Runcontrole mislukt bij een QS-standaard

- a) Flacon omgekeerd
- b) Omkering tijdens distributie
- c) Kruiscontaminatie
- d) Gedeeltelijke degradatie van standaard
- e) Gedeeltelijke degradatie van PCR-reagentia
- f) Niet-specifieke amplificatie

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.
Bewaar de inhoud van de kit bij een temperatuur van -30 tot -15 °C en bescherm de reactiemengsels tegen licht.
Vermijd herhaald ontdooien en invriezen.

Geen of zwak signaal voor één standaard

- a) Distributieprobleem
- b) Gebruik hetzelfde reactiemengsel voor WT- en MT-QS

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.
Herhaal de PCR-run.

Templateleze controle (NTC) van H₂O is positief

- a) Kruiscontaminatie
- b) Contaminatie van reagentia
- c) Stripbuisje omgekeerd
- d) Degradatie van probe

Vervang alle kritieke reagentia.
Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
Bescherm reactiemengsels tegen licht.
Controleer de fluorescentiecurve op fout-positieven.

Geen signaal, zelfs niet in de standaardcontroles

Pipetteerfout of reagentia vergeten

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.
Herhaal de PCR-run.

Geen of zwakke signalen in monsters, maar de controles worden normaal verwerkt

Remmende effecten van het monstermateriaal veroorzaakt door onvoldoende zuivering

Controleer altijd de DNA-kwaliteit door de verhouding A_{260}/A_{280} en de concentratie te meten voordat u begint.
Herhaal de DNA-bereiding.

Wildtypecontrole (WTC) is positief, maar mutantcontrole (MTC) is niet positief genoeg

Contaminatie door achtergebleven materiaal

Vervang alle kritieke reagentia.
Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.
Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
Zorg ervoor dat de tips worden verwisseld voordat een andere reagens wordt gepipetteerd.

Wildtypecontrolesignaal (WTC) of mutantcontrolesignaal (MTC) bij omgewisselde reactiemengsels

- a) Kruiscontaminatie
- b) Contaminatie van reagentia
- c) Buisje omgekeerd

Vervang alle kritieke reagentia.
Herhaal de proef met nieuwe aliquots van alle reagentia.
Hanteer monsters, componenten van kits en verbruiksartikelen altijd conform algemeen geaccepteerde methoden ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven materiaal.
Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Omgekeerde detectie van de positieve controle

- a) Kruiscontaminatie
- b) Omgekeerde distributie van het reactiemengsel in het busje of voormengsel

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie.

Geen signaal voor een monster of controle, zelfs niet voor de interne controle

- a) Geen reactiemengsel toegevoegd
- b) Reactiemengsel is gedegradéerd

Controleer het pipetteerschema en de instellingen van de reactie. Als de interne controle niet wordt geamplificeerd, is het reactiemengsel niet toegevoegd of gedegradéerd.
Herhaal de qPCR-stap met een nieuw reactiemengsel.

Opmerking: Als het probleem niet te wijten valt aan een van de bovenstaande oorzaken of als het niet lukt het probleem op te lossen met de voorgestelde actie, neemt u contact op met de afdeling Technische Services van QIAGEN voor advies.

Kwaliteitscontrole

De volledige kit is aan een kwaliteitscontrole op een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument onderworpen. Deze kit is geproduceerd conform de norm ISO 13485:2012. Op aanvraag is een analysecertificaat verkrijgbaar via www.qiagen.com/support/.

Beperkingen

De kit is bestemd voor professioneel gebruik.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciaal is opgeleid en getraind in het gebruik van moleculaire biologische technieken en bekend is met deze technologie.

De kit dient te worden gebruikt conform de instructies in deze handleiding, in combinatie met een gevalideerd instrument dat wordt genoemd in "Benodigde maar niet meegeleverde materialen", pagina 9.

Let goed op de vervaldatum op het etiket van de doos. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken.

Alle reagentia in de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde kit. Dit kan invloed hebben op de prestaties. Het niet opvolgen van deze richtlijn kan invloed hebben op de prestaties.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor volbloed ontsteld met kalium-EDTA dat is afgenomen bij patiënten bij wie MPN wordt vermoed.

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor gebruik in combinatie met de QIASymphony DNA DSP Mini Kit (catalogusnr. 937236) of de DSP DNA Blood Mini Kit (catalogusnr. 61104).

De *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit is uitsluitend gevalideerd voor gebruik met de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (voor PCR) en de QIASymphony SP (voor monsterbereiding).

Bij off-label gebruik van dit product en/of modificatie van de componenten vervalt de aansprakelijkheid van QIAGEN.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen. De afwezigheid van JAK2 V617F/G1849T-mutatie sluit de aanwezigheid van andere JAK2-mutaties niet uit.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

Kwaliteitskenmerken

Blancolimiet

De blancolimiet (LOB) is vastgesteld conform de CLSI/NCCLS EP17-2A-norm voor gezonde volbloedmonsters, met een wildtype-JAK2-status, 30 monsters, 120 metingen/partij, 3 partijen).

De LOB-resultaten zijn samengevat in Tabel 7.

Tabel 7. Overzicht van de blancolimietresultaten

	Gemeten blancolimiet	Uiteindelijke blancolimiet
Validatie van partij 1	0%	
Validatie van partij 2	0%	0%
Validatie van partij 3	0%	

Detectielimiet

De detectielimiet (LOD of analytische gevoeligheid) is vastgesteld conform de "Probit approach" (Probit-aanpak) die wordt beschreven in de norm CLSI/NCCLS EP17-2A. In dit onderzoek zijn 6 lage niveaus van mutatie geanalyseerd voor 3 onafhankelijke monsters (MPN-volbloed-DNA gespiket in WT-volbloed-DNA), met 3 partijen, 60 metingen per monster en per mutatie. De verkregen resultaten gaven aan dat de analytische gevoeligheid 0,042% was van de JAK2 V617F-mutatie.

De LOD-resultaten zijn samengevat in Tabel 8.

Tabel 8. Overzicht van de detectielimietresultaten

	Gemeten detectielimiet	Uiteindelijke detectielimiet
Validatie van partij 1	0,041%	
Validatie van partij 2	0,029%	0,042%
Validatie van partij 3	0,042%	

Lineariteit

De lineariteit van de kwantificatie van de JAK2-mutatie bij MPN-patiënten is beoordeeld conform de norm CLSI/NCCLS EP06AE, met één partij van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en met testen op 11 niveaus van mutatie voor 5 verschillende DNA-monsters. De kwantificatie van de JAK2-mutatielast in MPN-monsters is lineair. Dat betekent dat de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit monsters kan kwantificeren vanaf de LOD-waarde tot 100% mutatie, mits de gekwantificeerde monsterconcentratie dicht bij 10 ng/µl ligt (tussen 5 en 20 ng/µl).

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

Het precisieonderzoek is uitgevoerd conform de norm CLSI/NCCLS EP5-A2. Er zijn testen uitgevoerd op 11 niveaus van mutatie. Elk niveau is dubbel getest op 54 runs die in een periode van 27 dagen zijn verwerkt, wat 108 metingen per niveau van mutatie opleverde. De resultaten zijn samengevat in Tabel 9.

Tabel 9. Resultaten van precisieonderzoek

Monster	Gemiddeld JAK2-mutatiepercentage	SA _{H+}	SA _{RUN++}	SA _{TOTAAL+++}	VC _{TOTAAL}
S1	72,67	1,99	2,99	5,45	7,50%
S2	53,96	2,48	3,16	6,52	12,09%
S3	23,13	1,59	1,95	4,51	19,52%
S4	11,97	1,10	1,17	2,79	23,27%
S5	6,01	0,71	0,63	1,57	26,17%
S6	2,39	0,31	0,36	0,70	29,23%
S7	1,23	0,17	0,16	0,34	27,38%
S8	0,63	0,13	0,12	0,24	37,88%
S9	0,13	0,05	0,03	0,07	52,31%
S10	0,07	0,03	0,02	0,04	65,01%
S11	0,007	0,01	0,002	0,01	146,84%

H+: Herhaalbaarheid.

RUN++: Reproduceerbaarheid tussen runs.

TOTAAL+++ : Totale precisie (inclusief tussen instrumenten, tussen operators en tussen partijen).

VC_{TOTAAL}: Variatiecoëfficiënt voor de totale precisie (%JAK2 MT).

Stoffen met een versturende werking

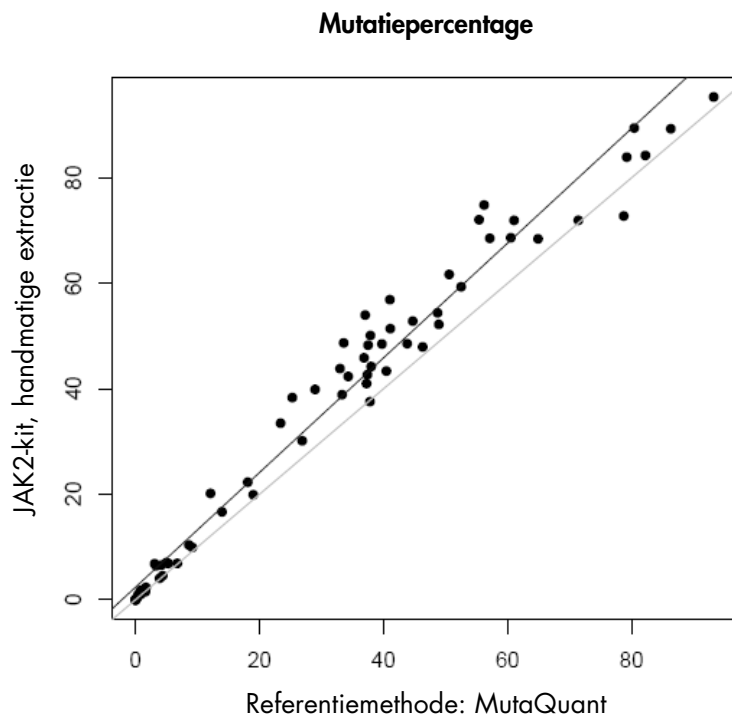
De opzet van het onderzoek was gebaseerd op aanbevelingen die worden beschreven in de NCCLS-norm EP7-A2 "Interference Testing in clinical Chemistry" (Interferentietesten in klinische chemie). In totaal werden 17 stoffen die potentieel aanwezig zijn in bloedmonsters uitgekozen vanwege hun potentiële effect op de PCR (busulfan, citalopram-hydrobromide, paroxetine-hydrochloridehemihydraat, sertraline-hydrochloride, fluoxetine-hydrochloride, acetaminophen [paracetamol], ongeconjugeerde bilirubine, kalium-EDTA, hemoglobine [humaan], triglyceride, lisinopril-dehydraat, hydroxyurea, acetylsalicylzuur, salicylzuur, thiotepa, anagrelide, interferon alfa 2b). De verkregen resultaten duiden niet op een versturende werking van deze stoffen.

Klinische validatie en vergelijking van methoden

In twee Franse klinische centra is een onderzoek met 65 klinische MPN-bloedmonsters uitgevoerd om de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit te vergelijken met de *ipsogen* JAK2 MutaQuant® Kit van QIAGEN, die als referentiemethode werd gebruikt.

In totaal werden 65 MPN-bloedmonsters ingevroren en ontdooid; van deze monsters werd genomisch DNA geëxtraheerd. Alle monsters voldoen aan de DNA-kwaliteitscontroles voor beide extractiemethoden voor genomisch DNA.

Via Deming-regressie zijn de gemeten percentages JAK2-mutatie van beide methodes vergeleken. Er was sprake van een sterke correlatie tussen de referentiemethode en de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit voor monsters met JAK2-mutaties met mutatieniveaus tussen 0% en 95% ($R^2 = 0,969$), zoals wordt weergegeven in Afbeelding 4.



Afbeelding 4. Grafiek van JAK2 V617F-mutatiepercentages verkregen met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit en een referentiemethode met dezelfde monsters.

De JAK2-mutatiepercentages die werden verkregen met de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit lagen in zijn geheel genomen hoger dan de percentages die werden verkregen met de referentiemethode. Dit duidt op een grotere gevoeligheid van de nieuwe kit (~1 log) (9).

Referenties

1. James C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. 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.
3. Kralovics R., et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Tefferi A., et al. (2009) Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 627.
6. Prchal J.F. and Axelrad A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382.
7. Tefferi A. and Vardiman J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, **22**, 14.
8. Lippert E. et al. (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica*. **99**, e98.
9. Jovanovic J., et al (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2V617F associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* **27**, 2032.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen worden weergegeven op de verpakking en etiketten:



Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer



Global Trade Item Number



Temperatuurbepanking



Fabrikant



Bescherm tegen licht



Raadpleeg Instructies voor gebruik



Waarschuwing

Contactgegevens

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

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>ipsogen</i> JAK2 RGQ PCR Kit (24)	Voor 24 reacties: Wildtype-JAK2-gencontrole, JAK2 V617F-controlegen, JAK2 WT-kwantificatiestandaarden, JAK2 MT-kwantificatiestandaarden, JAK2 WT-reactiemengsel, JAK2 MT-reactiemengsel, Taq DNA-polymerase, TE-buffer voor verdunning, water voor NTC	673623
Rotor-Gene Q MDx – voor IVD-gevalideerde real-time PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler en smeltanalyse met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Software voor routinetests in combinatie met de Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Software met enkele licentie voor installatie op één computer	9025620
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor het handmatig instellen van reactiemengsel met een eenkanaalspipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips van 4 buisjes met doppen voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips van 4 buisjes met doppen voor 10.000 reacties	981106
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Voor 50 bereidingen: QIAamp Mini-draaikolommen, buffers, reagentia, buisjes, VacConnectors	61104
QIAasymphony DSP DNA Mini Kit	Voor 192 bereidingen van elk 200 µl: Bevat 2 reagenscartridges en enzymrekken en accessoires.	937236
QIAasymphony SP en accessoires		
QIAasymphony SP System	QIAasymphony-module voor monsterbereiding: bevat installatie en opleiding, 1 jaar garantie op onderdelen en werk	9001751
QIAasymphony SP	QIAasymphony-module voor monsterbereiding: bevat 1 jaar garantie op onderdelen en werk	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Monsterbereidingscartridges met 8 putjes voor gebruik in combinatie met de QIAasymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Afdekkingen voor 8 staafjes voor gebruik in combinatie met de QIAasymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Wegwerffiltertips, in een rek; (8 x 128). Voor gebruik in combinatie met de QIAcube®- en QIAasymphony SP/AS-instrumenten	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Wegwerffiltertips, in een rek; (8 x 128). Voor gebruik in combinatie met de QIAasymphony SP/AS-instrumenten	997024
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Niet-steriele buisjes van polypropyleen (0,85 ml maximumcapaciteit, minder dan 0,7 ml opslagcapaciteit, 0,4 ml elutiecapaciteit); 2304 in rekken van 96; inclusief doppenstrips	19588
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 eenheden/ml, oplossing)	19101
Buffer ATL (200 ml)	200 ml lysisbuffer voor weefsels voor 1000 bereidingen	19076

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwarings-clausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijg-baar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke leverancier.

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

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

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

JAK2 V617F-mutatie en het gebruik daarvan zijn beschermd door patentrechten, waaronder het Europees patent EP1692281, de Amerikaanse patenten 7,429,456 en 7,781,199, de Amerikaanse patentaanvragen US20090162849 en US20120066776 en buitenlandse tegenhangers.

De aankoop van dit product betekent niet dat u daarmee het recht verwerft het te gebruiken voor klinische trials voor JAK2 V617F-medicijnen. QIAGEN ontwikkelt specifieke licentieprogramma's voor dergelijk gebruik. Neem contact op met onze juridische afdeling via jak2licenses@qiagen.com.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, HotStarTaq®, *ipsogen*®, MutaQuant®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co).

Beperkte licentieovereenkomst

or dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *ipsogen* JAK2 RGQ PCR Kit zich akkoord met de volgende voorwaarden:

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

Zie www.qiagen.com voor bijgewerkte licentievoorwaarden.

HB-1829-005 1107956 157038730 © 2017 QIAGEN, all rights reserved.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com