## Príručka k ipsogen<sup>®</sup> JAK2 MutaScreen Kit

∑∕ 10 (kat. č. 673022) ∑∕ 24 (kat. č. 673023)

Verzia 1



Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s nástrojmi Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> a LightCycler<sup>®</sup>

CE



**F** 673022, 673023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

**R3** MAT 1072500SK



Sample & Assay Technologies

## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

#### QIAGEN stanovuje normy v:

- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a skúšok

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na **www.qiagen.com.** 

## Obsah

Účel použitia	4
Súhrn a vysvetlenie	4
Princíp postupu	6
Dodávané materiály	7
Obsah súpravy	7
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú	8
Varovania a preventívne opatrenia	9
Všeobecné bezpečnostné opatrenia	9
Skladovanie a manipulácia s činidlami	10
Postup	11
Príprava vzorky DNA	11
Skladovanie nukleových kyselín	11
Protokoly	
<ul> <li>qPCR o nástrojoch Rotor Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom</li> <li>qPCR o nástrojoch Applied Biosystems a ABI PRISM</li> <li>qPCR o nástroji LightCycler 480</li> <li>qPCR o nástroji LightCycler 2.0</li> </ul>	11 20 29 37
Interpretácia výsledkov	42
Grafické znázornenie a kritériá kontroly kvality	42
Výpočet normalizovaného pomeru FAM/VIC a genotypovania	43
Sprievodca riešením problémov	46
Kontrola kvality	48
Obmedzenia	48
Charakteristiky účinnosti	48
Neklinické štúdie	48
Klinické štúdie	50
Referenčná literatúra	55
Symboly	56
Kontaktné informácie	56
Informácie o objednávaní	57

## Účel použitia

*ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kits sú určené na detekciu JAK2 V617F/G1849T mutácie v genómovej DNA od subjektov s podozrením na myeloproliferatickú neoplazmu. Neprítomnosť JAK2 V617F/G1849T nevylučuje prítomnosť iných mutácií JAK2. Test môže hlásiť falošne negatívne výsledky v prípade ďalších mutácií lokalizovaných v kodónoch 615 až 619 (1).

**Poznámka:** Súprava by sa mala používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s validovanými reagenciami a nástrojmi. Používanie tohto produktu bez overenia a/alebo modifikácia komponentov ruší zodpovednosť spoločnosti QIAGEN.

## Súhrn a vysvetlenie

V roku 2005 bola identifikovaná recidivujúca somatická mutácia V617F, ktorá ovplyvňuje gén Janus tyrozínkinázy 2 (JAK2) (2-5), čo vedie k významnému prielomu v chápaní, klasifikácii a diagnostike myeloproliferatívnych novotvarov (MPN). JAK2 je kritická intracelulárna signalizačná molekula pre množstvo cytokínov, vrátane erytropoetínu.

Mutácia JAK2 V617F bola zistená u >95 % pacientov s polycytémiou vera (PV), 50-60 % pacientov s esenciálnou trombocytémiou (ET) a 50 % pacientov s primárnou myelofibrózou (PMF). JAK2 V617F bol zistený aj v zriedkavých prípadoch chronickej myelomonocytovej leukémie, myelodysplastického syndrómu, systémovej mastocytózy a chronickej neutrofilnej leukémie, ale v 0 % CML (6).

Mutácia zodpovedá jednonukleotidovej zmene JAK2 nukleotidu 1849 v exóne 14, čo vedie k jedinečnej substitúcii valínu (V) na fenylalanín (F) v pozícii 617 proteínu (doména JH2). Vedie ku konštitutívnej aktivácii JAK2, hematopoetickej transformácii in vitro a rastu erytroidných kolónií nezávislých od erytropoetínu (EHS) u všetkých pacientov s PV a veľkého podielu pacientov s ET a PMF (7). JAK2 V617F predstavuje kľúčovú hnaciu silu pri transformácii hematopoetických buniek v MPN, ale presné patologické mechanizmy vedúce pri rovnakej jedinečnej mutácii k takým rôznym klinickým a biologickým entitám je potrebné aj naďalej úplne objasniť.

Diagnóza MPN sa tradične zakladala na klinických kritériách, histológii kostnej drene a cytogenetických kritériách. Objavenie molekulárneho markera špecifického pre dané ochorenie malo za následok zjednodušenie postupu a zvýšenie diagnostickej presnosti. Detekcia mutácie JAK2 V617F je teraz súčasťou referenčných kritérií WHO 2008 na diagnostiku BCR-ABL negatívnych MPN (Tabuľka 1) a prítomnosť tejto mutácie je hlavným kritériom diagnostického potvrdenia.

#### Tabuľka 1. Kritériá WHO pre diagnostiku MPN (upravené z referencie 8)

Kritériá p	pre diagnostiku polycytémie vera (PV)
Hlavné	<ol> <li>Hemoglobín (Hgb) &gt; 1 8,5 g.dl<sup>-1</sup> (muži) alebo &gt; 16,5 g.dl<sup>-1</sup> (ženy) alebo Hgb alebo hematokrit (Hct) &gt;99. percentil referenčného rozsahu pre vek, pohlavie alebo nadmorskú výšku pobytu alebo Hgb &gt;1 7 g.dl<sup>-1</sup> (muži) alebo &gt;15 g.dl<sup>-1</sup> (ženy) ak je spojené s trvalým zvyšovaním &gt;2 g.dl<sup>-1</sup> od základných údajov, čo nemožno pripísať korekcii nedostatku železa alebo Zvýšená hmotnosť červených krviniek &gt;25 % nad priemernou normálnou predpokladanou hodnotou</li> <li>Prítomnosť <i>JAK2V617F</i> alebo podobnej mutácie</li> </ol>
Drobné	<ol> <li>Trilineárna myeloproliferácia kostnej drene</li> <li>Podnormálna hladina erytropoetínu v sére</li> <li>Rast endogénnych erytroidných kolónií (Endogenous Erythroid Colony, EEC)</li> </ol>
Kritériá p	ore diagnostiku esenciálnej trombocytémie (ET)
Hlavné	<ol> <li>Počet krvných doštičiek &gt;450 x 10<sup>9</sup> l<sup>-1</sup></li> <li>Proliferácia megakaryocytov s veľkou a zrelou morfológiou.</li> <li>Žiadna alebo malá proliferácia granulocytov alebo erytroidov</li> <li>Nie sú splnené kritériá WHO pre chronickú myeloidnú leukémiu (CML), PV, primárnu myelofibrózu (PMF), myelodysplastický syndróm (MDS) alebo iný myeloidný nádor.</li> <li>Preukázanie <i>JAK2V617F</i> alebo iného klonálneho markeru alebo</li> </ol>
	Žiadny dôkaz reaktívnej trombocytózy
Drobné	-
Kritériá p	ore diagnostiku primárnej myelofibrózy (PMF)
Hlavné	<ol> <li>Proliferácia a atypia megakaryocytov sprevádzaná fibrózou retikulínu a/alebo kolagénu alebo</li> <li>Pri absencii retikulínovej fibrózy musia byť zmeny megakaryocytov sprevádzané zvýšenou celularitou drene, granulocytickou proliferáciou a často zníženou erytropoézou (t. j. prefibrotickou PMF).</li> <li>Nie sú splnené kritériá WHO pre (CML), PV, MDS alebo iný myeloidný nádor</li> <li>Preukázanie JAK2V617F alebo iného klonálneho markeru alebo</li> <li>Žiadny dôkaz reaktívnej fibrózy kostnej drene</li> </ol>
Drobné	1. Leukoerytroblastóza
	2. Zvýšená laktátdehydrogenáza (LDH) v sére 3. Anémia 4. Hmatateľná splenomegália

Medzinárodní experti nedávno navrhli kritériá pre terapeutické pokusy v PV a ET. Na základe údajov o aloimplantáte, alfa-interferóne alebo hydroxymočovine bola kvantifikácia JAK2V617F začlenená ako potenciálne užitočný nástroj na monitorovanie reakcií na liečbu (9). V klinickom vývoji v reakcii na niektoré nové lieky zamerané proti JAK2 bolo pozorované zníženie zaťaženia JAK2 V617F (10).

## Princíp postupu

V teste na alelickú diskrimináciu sa v multiplexovanom teste používajú dve sondy TaqMan<sup>®</sup>. Jedna je perfektná zhoda so sekvenciou alely 2 (napr. alela divého typu) a druhá je perfektná zhoda so sekvenciou alely 1 (napr. alela s mutáciou). Každá sonda je na svojom 5' konci označená výrazným fluorescenčným farbivom, reportérom, ako je FAM<sup>™</sup> alebo VIC<sup>®</sup>, a na 3' konci obsahuje nefluorescenčné zhášadlo. Sondy tiež obsahujú malé spojivo drážok (MGB<sup>™</sup>), ktoré umožňuje použitie kratších sond s väčšou stabilitou a tým presnejšiu alelickú diskrimináciu.

Počas predlžovacej fázy PCR sa dokonale spárovaná sonda štiepi 5'→3' exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA polymerázy, čím sa separuje reportérové farbivo od zhášadla a tým sa uvoľňuje detekovateľná fluorescencia. Sonda, ktorá nie je dokonale spárovaná, sa skôr vytesní ako rozštiepi *Taq* DNA polymerázou a neuvoľní sa žiadne reportérové farbivo. Vytvorený fluorescenčný signál (VIC alebo FAM) sa zhromažďuje na konci PCR (koncový bod) a okamžite indikuje prítomnosť cieľovej sekvencie (sekvencií) vo vzorke (alela divého typu, mutovaná alela alebo obidve) bez požiadavky na dlhé a namáhavé kroky po PCR, ktoré tiež zvyšujú riziko kontaminácie. Skutočné množstvo cieľovej sekvencie nie je určené.

Súprava *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* využíva túto technológiu, ako je zobrazené (pozri Obrázok 1).



**Obrázok 1. Multiplexný test sondy TaqMan.** *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit využíva túto technológiu pre alelickú diskrimináciu.

## Dodávané materiály

### Obsah súpravy

ipsogen JAK2 MutaScreen Kit		(10).	(24).
Katalógové číslo		673022	673023
Počet reakcií		24	10
V617F Pozitívna kontrola*	PC-VF	30 <i>µ</i> I	30 <i>µ</i> I
V617F Negatívna kontrola <sup>†</sup>	NC-VF	30 <i>µ</i> I	30 <i>µ</i> I
Hraničná vzorka	COS-VF	30 <i>µ</i> I	30 <i>µ</i> I
Zmes primerov a sond JAK2 V617F <sup>‡</sup>	PPM-VF 10x	70 <i>µ</i> I	145 <i>µ</i> I
Príručka ipsogen <i>JAK2</i> MutaScreen (slovenčina)	Kit	1	1

\* Pozitívna kontrola: 100% V617F DNA.

<sup>†</sup> Negatívna kontrola: 100% DNA divého typu ; 0% V617F.

<sup>‡</sup> Zmes špecifických reverzných a priamych primerov pre gén JAK2, špecifickú V617F FAM sondu a VIC sondu divého typu.

Poznámka: Pred použitím skúmavky krátko odstreďte.

**Poznámka:** Pri analýze neznámych vzoriek s *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit sa vyžaduje extrakcia genómovej DNA. Reagencie potrebné na vykonanie extrakcie DNA (napr., QIAGEN<sup>®</sup> QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit, cat. no. 51304) nie sú poskytované a musia byť validované v kombinácii so súpravou.

## Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

#### Reagencie

- Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy
- Nuclease-free 1x TE buffer, pH 8.0 (napr., Thermo Fisher Scientific Inc., cat. no. 12090015)
- Polymeráza pufra a *Taq* DNA: Validované reagencie sú TaqMan Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Thermo Fisher Scientific Inc., cat. no. 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat. no. 04535286001)

Reagencie pre 0,8-1% agarózový gél v 0,5x TBE elektroforetickom pufri

#### Spotrebný materiál

- Sterilné špičky PCR pipiet bez obsahu nukleáz odolné voči aerosólom s hydrofóbnymi filtrami
- 0,5 ml alebo 0,2 ml PCR skúmavky neobsahujúce RNase a DNase
- 📕 Ľad

#### Zariadenie

- Pipety\* určené pre PCR (1-10 μl; 10-100 μl; 100-1000 μl)
- Stolná odstredivka\* s rotorom pre reakčné skúmavky s objemom 0,2 ml/0,5 ml (schopná dosiahnuť 10 000 ot/min)
- Spektrofotometer\* na kvantifikáciu DNA

Nástroj Real-time PCR:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM alebo iný nástroj Rotor-Gene; LightCycler 2.0, alebo 480; Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, ABI PRISM 7700 SDS, alebo ABI PRISM 7900HT SDS; a súvisiaci špecifický materiál

Zariadenie\* pre gélovú elektroforézu v pulznom poli

<sup>\*</sup> Overte, či boli zariadenia skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

## Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in vitro

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese **www.qiagen.com/safety**. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

## Všeobecné bezpečnostné opatrenia

Testy qPCR vyžadujú správne laboratórne postupy vrátane údržby zariadení, ktoré sú určené pre molekulárnu biológiu a sú v súlade s platnými predpismi a príslušnými normami.

Táto súprava je určená na diagnostické použitie in vitro. Reagencie a pokyny dodávané v tejto súprave boli validované pre optimálny výkon. Ďalšie riedenie reagencií alebo zmena inkubačných časov a teplôt môže viesť k chybným alebo nezhodným údajom. Ak je činidlo PPM-VF vystavené svetlu, môže sa zmeniť. Všetky reagencie sú pripravené na špecifické použitie s týmto testom. Pre optimálny výkon testu by sa nemali robiť žiadne substitúcie.

Buďte mimoriadne opatrní, aby ste zabránili:

- Kontaminácii DNázy, ktorá by mohla spôsobiť degradáciu templátovej DNA
- Kontaminácia prenosom DNA alebo PCR vedie k falošne pozitívnemu signálu

Preto odporúčame nasledujúce.

- Pri vykonávaní testu používajte laboratórne vybavenie neobsahujúce nukleázy (napr. pipety, hroty pipiet, reakčné fľaštičky) a noste rukavice.
- Na všetky pipetovacie kroky používajte čerstvé pipetové hroty odolné voči aerosolom, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii vzoriek a činidiel.
- Pripravte predbežnú zmes PCR master s príslušným materiálom (pipety, hroty atď.) v príslušnej oblasti, kde nie sú zavedené žiadne matrice DNA (DNA, plazmid). Šablónu pridajte do samostatnej zóny (najlepšie v samostatnej miestnosti) so špecifickým materiálom (pipety, hroty, atď.).

## Skladovanie a manipulácia s činidlami

Súpravy sa dodávajú na suchom ľade a po prijatí sa musia skladovať pri teplote -30 °C až -15 °C.

- Minimalizujte vystavenie zmesí primerov a sond (skúmavka PPM-VF) svetlu.
- Pred otvorením skúmavky jemne premiešajte a odstreďte.
- Všetky komponenty súpravy skladujte v pôvodných obaloch.

Tieto podmienky skladovania platia pre otvorené aj neotvorené komponenty. Komponenty skladované za iných podmienok, ako je uvedené na štítkoch, nemusia správne fungovať a môžu nepriaznivo ovplyvniť výsledky testu.

Dátum exspirácie pre každú reagenciu je uvedený na štítkoch jednotlivých komponentov. Za správnych skladovacích podmienok si produkt zachová svoju výkonnosť až do dátumu exspirácie, ktorý je uvedený na štítku.

Neexistujú žiadne zjavné znaky naznačujúce nestabilitu tohto produktu. Pozitívne a negatívne kontroly by sa však mali vykonávať súčasne s neznámymi skúšobnými vzorkami.

## Postup

## Príprava vzorky DNA

Genomická DNA by sa mala získavať z plnej krvi, purifikovaných lymfocytov periférnej krvi, polynukleárnych buniek alebo granulocytov. Aby bolo možné porovnať výsledky, odporúčame použiť rovnakú metódu bunkovej frakcie a metódu extrakcie DNA. Extrakcia DNA by sa mala uskutočňovať pomocou akejkoľvek domácej alebo komerčnej metódy.

Množstvo DNA sa stanoví meraním optickej hustoty pri 260 nm. Kvalita DNA by sa mala hodnotiť spektrofotometricky alebo gélovou elektroforézou.

Pomer A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> by mal byť 1,7-1,9. Menšie pomery zvyčajne naznačujú kontamináciu bielkovinami alebo organickými chemikáliami. Elektroforetická analýza na 0,8-1% agarózovom géli by mala umožniť vizualizáciu izolovanej DNA ako zreteľného pruhu približne 20 kb. Mierne rozmazanie je prijateľné.

Výsledná DNA sa zriedi na 5 ng/ $\mu$ l v TE pufri. Reakcia qPCR je optimalizovaná pre 25 ng purifikovanej genómovej DNA.

### Skladovanie nukleových kyselín

V prípade krátkodobého skladovania do 24 hodín odporúčame uchovávať vyčistené nukleové kyseliny pri teplote 2 - 8 °C. Pri dlhodobom skladovaní, ktoré je dlhšie ako 24 hodín, sa odporúča skladovanie pri -20 °C.

# Protokol: qPCR o nástrojoch Rotor Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

Použitím tohto nástroja odporúčame vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 2.

#### Tabuľka 2. Počet reakcií na prístroje Rotor Gene Q MDx 5plex HRM alebo Rotor Gene Q 5plex HRM so 72-skúmavkovým rotorom

Vzorky	Reakcie									
JAK2 V617F zmes primerov a sond (PPM-VF) (56 reakcií)										
24 DNA vzoriek	24 x 2 reakcie									
3 DNA kontroly	3 x 2 reakcie (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý jeden testovaný dvakrát)									
Kontrola vody	2 reakcie									

#### Spracovanie vzoriek inštrumentmi Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom



Obrázok 2. Navrhované nastavenie rotora pre experiment s ipsogen JAK2 MutaScreen Kit. PC-VF: pozitívna kontrola; NC-VF: negatívna kontrola; COS-VF: hraničná vzorka; S: Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

**Poznámka:** Vzorku, ktorá sa má testovať, vždy umiestnite do polohy 1 rotora. Inak počas kalibračného kroku prístroj nevykoná kalibráciu a získajú sa nesprávne údaje o fluorescencii.

Vyplňte všetky ostatné polohy prázdnymi skúmavkami.

#### qPCR na nástroje Rotor-Gene Q so 72-skúmavkovým rotorom

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

#### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.

Komponenty je potrebné vybrať z mrazničky približne 10 minút pred začiatkom procedúry.

Vírivo premiešajte a krátko odstreďte všetky skúmavky (približne 2. 10 s, 10 000 otáčok za minútu, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).

# 3. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 3 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagencií, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25  $\mu$ l. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a sond. Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Na nástrojoch Rotor-Gene môže byť *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit použitá na analýzu 24 vzoriek dvojmo v jednom experimente (Obrázok 2), 20 vzoriek dvojmo v dvoch experimentoch alebo 15 vzoriek dvojmo v troch experimentoch.

		Počet re			
Komponent	1	56 + 1*	28+1 <sup>†</sup>	18+1 <sup>‡</sup>	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Zmes primerov a sond, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	5	285	145	95	_
Vzorka (má byť pridan á v kroku 5)	5	5 každá	5 každá	5 každá	-
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	25 každá	-

#### Tabuľka 3. Príprava zmesi qPCR

\* 24 vzoriek; jeden experiment/súprava.

<sup>t</sup>10 vzoriek; dva experimenty/súprava.

<sup>‡</sup> 5 vzoriek; tri experimenty/súprava.

- 4. Vírivo miešajte a krátko odstreďujte zmes qPCR (približne 10 s, 10 000 ot/min, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 5. Dispenzujte 20  $\mu$ l predbežnej zmesi qPCR na skúmavku.
- 6. Pridajte 5  $\mu$ l vzorky materiálu DNA alebo kontrolného roztoku v zodpovedajúcej skúmavke (celkový objem 25 $\mu$ l).
- 7. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
- Zatvorte PCR skúmavky. Skúmavky umiestnite do 72-skúmavkového rotora podľa odporúčaní výrobcu. Vyplňte všetky ostatné polohy prázdnymi skúmavkami.
- Uistite sa, že poistný krúžok (príslušenstvo nástroja Rotor-Gene) je umiestnený na vrchu rotora, aby sa zabránilo náhodnému otvoreniu skúmaviek počas cyklu. Vložte rotor do nástroja Rotor-Gene Q podľa odporúčaní výrobcu.
- 10. Na detekciu DNA JAK2 vytvorte teplotný profil podľa nasledujúcich krokov.

Nastavenie všeobecných parametrov testu	Obrázky 3, 4
Amplifikácia DNA	Obrázok 5
Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála	Obrázok 6

Ďalšie informácie o programovaní nástrojov Rotor-Gene nájdete v príručke používateľa nástroja. Na ilustráciách sú nastavenia softvéru orámované tučne. Ilustrácie sú zahrnuté pre nástroje Rotor-Gene Q.

11. Spustite softvér Rotor-Gene. V dialógovom okne "New Run" (Nový cyklus) kliknite na "New" (Nový).

Francisco Francisco I	Tenerts the surface
Perform Last Run Empty Run Three Step with Melt Two Step HRM™ Other Runs Other Runs Other Runs	Imports the cycling and acquisition and sample definitions from the last run open in the software.
	<u>N</u> ew Cancel <u>H</u> elp

Obrázok 3. Dialógové okno "New Run" (Nový cyklus).

12. V "New Run Wizard" (Sprievodca novým cyklom) nastavte objem na 25  $\mu$ l a kliknite na "Next" (Ďalší).

	This screen disp clicking Next wh Operator :	ays miscellaneous options for the run. Complete the fields, en you are ready to move to the next page.	This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the
	Notes :	Programme PCR allelic discrimination	item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.
60, ap	Reaction Volume (μL): Sample Layout :	25	
	Skip Wizard	<< Back Next >>	

Obrázok 4. Nastavenie všeobecných parametrov testu.

13. Kliknite na tlačidlo "Edit Profile" (Upraviť profil) vedľa dialógového okna "New Run Wizard" (Sprievodca novým cyklom) a naprogramujte teplotný profil, ako je zobrazené v Tabuľke 4 a Obrázku 5. Nezabudnite pridať posledný krok získavania pri 60 °C v každom cykle pre oba kanály, v Green (FAM) aj Yellow (VIC).

Hold (Držiak)	Teplota: 50 °C
	Čas: 2 min
Hold 2 (Držiak 2)	Teplota: 95 °C
	Čas: 10 min
Cycling	50-krát
(Cyklovanie)	92 °C pre 15 s
	60 °C pre 1 min; jedno
	Získavanie fluorescencie FAM v kanáli Cycling A Green
	Získavanie fluorescencie VIC v kanáli Cycling A Yellow

Tabuľka 4. Teplotný profil



Obrázok 5. Amplifikácia DNA.

14. Detekčný rozsah fluorescenčných kanálov sa musí určiť podľa intenzity fluorescencie v skúmavkách PCR. Kliknutím na "Gain Optimisation" (Získať optimalizáciu) v dialógovom okne "New Run Wizard" (Sprievodca novým cyklom) otvoríte dialógové okno "Auto-Gain Optimisation Setup" (Nastavenie automatickej optimalizácie zisku). Kliknite na "Optimise Acquiring" (Optimalizujte akvizíciu) (Obrázok 6), a potom kliknite na dialógové okná "OK" v "Auto-Gain Optimisation Channel Settings" (Nastavenia kanálov automatickej optimalizácie zisku) pre každý kanál (Green a Yellow, Obrázok 6). Uistite sa, že dialógové okno "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Vykonajte optimalizáciu pred 1. akvizíciou) je zaškrtnuté pre každý kanál (Obrázok 6).

uto-Gain 0	ptimisation Seti	up				×	Auto-Gain Optimisation Channel Settings
Optimisation	Auto-Gain Optimisa different gain levels acceptable. The ra- chemistry you are p Set temperature to e All Optimis Optimisation Before Optimisation At 60	tion will read t until it finds o nge of fluores verforming 60	the fluoresence one at which the scence you are b grees.	on the inser fluorescen ooking for d	ted sample at ce levels are lepends on the	•	Channel Settings : Channel : Green Tube Position : 1 Target Sample Range : 5 Flup to 10 Fl Acceptable Gain Range - 10 to 10
Channel Se	lting:				•	Add	UK Cancer Hep
Name	Tube Position Mi	n Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain	Edit	Auto-Gain Optimisation Channel Settings
Green	5F		10FI	-10	10	Bemove	Channel Settings:
1 eaow	J		IUFI	-10	10	Demous All	
						rvemove Au	Lhannel: Tellow Tube Position:
						Kenove Aja	Target Sample Range: 5 1 Flup to 10
						nemove Ap	Target Sample Range: 5 + Fl up to 10 + FL
						Temore Aa	Target Sample Range: 5 + Fl up to 10 + FL Acceptable Gain Range: 10 + to 10 +
-						nemove Aa	Channel: Tellow     Tube Position:     1     •       Target Sample Range:     5     •     Fl up to 10     •       Acceptable Gain Range:     -10     •     to     10     •
Start	Manual	1 0		Heb		nemove Aa	Target Sample Range: 5 + Fl up to 10 + Fl Acceptable Gain Range: -10 + to 10 + DK Cancel Help

Obrázok 6. Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála.

- 15. Hodnoty navýšenia stanovené kalibráciou kanálov sa automaticky uložia a sú uvedené v poslednom okne ponuky postupu programovania. Na spustenie programu kliknite na "Start Run" (Spustiť cyklus).
- 16. Zadajte nastavenie rotora v softvéri Rotor-Gene (Obrázok 7).

-				
				X
Name	Type	Groups	Given Conc.	
PC	Positive Control			
PC	Positive Control			
H20	NTC			
	None			
NC	Negative Control			
NC	Negative Control			
H20	NTC			
	None			
RS	Unknown			
RS	Unknown			
	None			
	None			
S1	Unknown			
S1	Unknown			
S2	Unknown			
S2	Unknown			
S3	Unknown			
S3	Unknown			
S4	Unknown			
S4	Unknown			-
	Name PC PC H20 NC NC NC RS RS S1 S1 S1 S2 S2 S2 S3 S3 S3 S4 C4	Name         Type           PC         Positive Control           PC         Positive Control           H20         NTC           None         Nore           NC         Negative Control           H20         NTC           NC         Negative Control           H20         NTC           None         None           RS         Unknown           S1         Unknown           S2         Unknown           S3         Unknown           S3         Unknown           S4         Unknown	Name         Type         Groups           PC         Positive Control           PC         Positive Control           PC         None           NTC         None           NC         Negative Control           NC         None           RS         Unknown           S1         Unknown           S2         Unknown           S3         Unknown           S3         Unknown           S4         Unknown	Name     Type     Groups     Given Conc.       PC     Positive Control     PC       PC     Positive Control     PC       H2D     NTC     None       NC     Negative Control     NC       NC     Negative Control     PC       NC     Negative Control     NC       NC     Negative Control     PC       NC     Negative Control     NC       NC     Negative Control     NC       NC     None     None       RS     Unknown     S1       S1     Unknown     S2       S3     Unknown     S3       S4     Unknown     S4

Obrázok 7. Nastavenie Rotor-Gene: "Edit Samples" (Upraviť vzorky).

Postup analýzy koncového bodu pre nastavenie nástroja Rotor-Gene Q 5plex HRM

17. Keď program PCR skončil, kliknite na "Analysis" (Analýza) na paneli nástrojov (Obrázok 8).



Obrázok 8. Analýza.

18. V dialógovom okne "Analysis" (Analýza) (Obrázok 9), kliknite dvakrát na "Cycling A Green", a potom "OK". Opakujte pre Cycling A Yellow.



Obrázok 9. Kvantifikácia: "Cycling A. Green".

 Objaví sa nové okno (Obrázok 10). Kliknite na "Slope Correct" (Sklon správny) na oboch paneloch, ako je zobrazené na Obrázku 10.



Obrázok 10. Nastavenie "Slope Correct" (Sklon správny).

- 20. Ak chcete údaje exportovať, uložte ich ako dátový hárok Excel<sup>®</sup>. Kliknite na "OK", pomenujte exportovaný súbor a uložte textový súbor (\*.txt).
- Otvorte textový súbor v programe Excel a vyberte stĺpec A. Kliknite na "Data" (Údaje), potom na "Convert" (Konvertovať) a "Next" (Ďalší). Vyberte "Comma" (Čiarka) a potom kliknite na "End" (Ukončiť). Výsledky sa objavia ako je zobrazené na Obrázku 11.

		A		0	D	t	r	6 1	114	KL	нн	0 P 1	2 R S	TU	¥ ¥ 3	7 2 4		C AD A	AF 40	AH AI	AJ AK	AL AM	HAOA	40 A	ASAT	AU AI	AMAX	AT	AZ	<b>PA</b>
	1	Excel Ray	Data Expo	vt					1.1									11				11	11							
	2	Copyright	a QIAGEN	Company	, All rights	reserved.			++	++-																				
<b>4</b> )	3	Pile	Prog Allel	ic discrimin	14000 2010	-01-26 (1)1e	1	++	++	++			-				++	++-				++	++							
	1	Time					-	++	++	++-							++	++					++	++-						
. <u> </u>	1	1 mie						++	++	++					-		++	-					++							
ŝ	-							++	++	++-								++					++							
7	7	Chann	el Cyclii	ng A.Gr	een																									
U		D	MSPP01	1	2	3		4 5 1	671	89.	11 .																	49	50	
, T		1	pC	5.67432	5.81979	5.86158	5.9192	8 6 1	6 6 1	6 6 6	6 6	6.6	6 6 6	6 6	6 7 7	77	781			••	••							63.428	63.892195	
_		2	pC	5.83912	5.9781	5.97858	6.0234	4 6 1	5 6 1	5 5 5	6 6	6 6	5 5 5	6 6	111	77	781											64.7205	65.01611	
5	11	3	nC .C	0.7461/	0.79667	0.86391	0.8180	4 6 1	5 6 1	5 5 5	6 6	6 6	6 6 6	6 6	6 6 6	6 7	11	( 1 1	11	78	8 8	8.8	8 8 1	3 3	2.3			9.99629	10.035624	
Ψ	8		nu v0	6.10742	6.40127	0.41/34	6.4157	1 6			111	11	111	11	111	11	1 8		8.8	8 3	3 3			111	11 11			12.4178	12.60/9/5	
	0	0	10	6.19029	6.2463J	6.20121	6.3010	0 0	0 0 1				1			-		1.1	0 0	0 3	3 3							19.0072	19.399076	
		7	h20	6.01612	6 13935	6 13298	6 1601	0 0 1	2 6 1	2 6 6		1							7 7	7 7	7 7	7 7	7 7 3	7 7	7 7	7 7	7 7	7 40312	7 4200264	
σ	14	8	h20	5,77198	5.8514	5 90655	5 9023	3 8	6 6 1	8 8 8	8.0							1 7	7 7	7 7	7 7	7 7	7 7 3	77	7 7	7 7	77	7 13641	7,2198062	
~	17	9	0	5,76232	5.84288	5.89174	5.9014	9 6 1	8 8 1	8 8 6	1	6						17	7 7	8.8	8 8	8 9	9 9 1	9.8				10.4055	10.603087	
-	15	10	0	5.81827	5.91948	5.92752	5.9273	2 6 1	6 6 1	6 6 6	1/							17	77	77	8 8	8 8	8 8 5	9 9	9 #			10.2008	10.425509	
0	19	11	0,5	5.79919	5.82568	5.85641	5.8418	6 6 1	6 6 1	6 6 6								1 7	77	8 8	8 8	8 9	9 9 1	9.				10.5793	10.749218	
Ö	29	12	0,5	6.19059	6.16999	6.16846	6.2052	1 6 1	6 6 1	6 6 6		_						1 7	77	78	8 8	8 9	994		# 11	11 #		12.5759	12.872075	
2	25							1																						
σ	22	Chann	el Cyclin	ng A.Ye	llow																									
<u> </u>	23	D	MSPP01	1	2	3		4 5 1	6 7 1									1/1-										49	50	
5	24	1	pC	4.59685	4,62247	4.6819	4.6347	1 5 1	5 5 1	5 5 5								15 6	6 6	6 6	6 6	7 7	773	7 7	7 7	78	8 8	7.93092	8.0828056	
<u> </u>	25	2	pC	4.66363	4.72438	4.71819	4.7474	1 5 1	5 5 1	5 5 5							1	1 5 5	6.6	6 6	6.6	6 7	771	77	7 8	8 8	8 8	8.06134	8.2352941	
Ś	26	3	nC	4.53005	4.67231	4.64528	4.7207	151	5 5 1	5 5 5		9						1.4										42.335	42.626586	
a:	27	4	nC	5.02795	5.05531	5.22326	5.2250	7 5 1	5 5 1	5 5 5	E						/											53.1528	53.465324	
Ψ	20	5	rS	5.02092	5.01981	5.04675	5.1216	4 5 1	5 5 1	5 5 5		1				_		1.0										47.5771	47.706823	
7	29	6	r\$	4.71329	4,71646	4,76223	4.717	2 5 1	5 5 1	5 5 5		and la		-	-	~	-	11										42.1167	42.237559	
~	20	7	h20	4.87286	4.33455	4.92549	5.0087	2.5	0 0 0	000	0 0	5 5	0 0 0	0 0	0 0 0	0 0	5 5 1	5 5 5	5 5	5 5	5 5	6 6	5 5 3	6 6	6 6	5 5	6 6	6.14522	6.0208579	
	21		0	4.06801	4.00001	4.5305	4.0004	0 0 0	001	5 0 0 5 6 6	0 0	00	000	0 0	0 0 0	0 0	0 0 1	7 0 0	0.0	0 0	0.6	0 0	0 0 0	0 0	00	0.0	00	0.84073	0.0/62433	
					• 540051	9.78013		0 0 0	3: DI 0					0 0			0 0	( 2 ) 1										99.30.30	45.011115	
	32	10	0	4 7174	4.97296	4 92910	4 0014	7 5 1	C 15. 1	5 5 5			E E E	5 5	REE	5.6	2 2											474705	44.035357	
	32	10	0	4.7134	4.87286	4.82816	4.8014	751	555	555	55	55	555	55	555	56	6 6	-	~						~	<b>`</b>	1.1.1	43.4785	44.035357 42.437756	
	32 33 24 35	10	0 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.8515	4.87286 4.72921 5.0297	4.82816 4.71081 5.04229	4.8014 4.7212 5.0148	751	555	5555	55555555	55555	55555555555	55555	5555555555	5656	6 6 6 7 6 6	5	n	C	v	۲lı	19	F	7	<b>.</b> F	₹	43.4785 42.478 47.002	44.035357 42.437756 47.084982	
Ð	22 23 24 25 24	10 11 12	0 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.8515	4.87286 4.72921 5.0297	4.82816 4.71081 5.04229	4.8014 4.7212 5.0148	7 5 1	5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	55555555	55 55 55	55555555555	55 55 55	5555555566	5 6 5 6 6 6	6 6 6 7 6 6	5	Э.	С	yl	ĸ١	JS	F	20	CF	R	43.4785 42.478 47.002	44.035357 42.437756 47.084982	
je	22 23 24 25 24	10 11 12	0 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.8515	4.87286 4.72921 5.0297	4.82816 4.71081 5.04229	4.8014 4.7212 5.0148	751	555	555555555555555555555555555555555555555	555555555555	555555	555555555555	555555	555555566	5666	6 6 6 7 6 6	5	Э.	С	yl	ĸ١	JS	F	20	CF	२	43.4785 42.478 47.002	44.035357 42.437756 47.084982	
aje	22 23 34 25 34 25 34 21	10 11 12	0 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.8515	4.87296 4.72921 5.0297	4.82816 4.71081 5.04229	4.8014 4.7212 5.0148	7 5 1	555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	555555555	55555	55555555	5 5 5 5 5 5	55555556	5656	6 6 6 7 6 6	5	). 	С	yl	<lu< td=""><td>JS</td><td>F</td><td>20</td><td>CF</td><td>२</td><td>43.4785 42.478 47.002</td><td>44.035357 42.437756 47.084982</td><td>\ \</td></lu<>	JS	F	20	CF	२	43.4785 42.478 47.002	44.035357 42.437756 47.084982	\ \
laje	22 22 24 25 24 25 24 25 24 24	10 11 12	0 0,5 0,5 MSP+VI	4.7134 4.6817 4.8515	4.87286 4.72921 5.0297	4.82816 4.71081 5.04229 4.89E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0	7 5 1 3 5 1 3 5 1 4 5 1	5 5 5	5 5 5 5 5 5	555555	5 5 5 5 5 5 5	55555555	555555	5555	565668	6 6 6 7 6 6	5	).	c	yl •••	<lu< td=""><td>JS</td><td>• F</td><td>&gt;C</td><td>CF</td><td><b>२</b> ••</td><td>43.4785 42.478 47.002 43 0.87425</td><td>44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453</td><td>\</td></lu<>	JS	• F	>C	CF	<b>२</b> ••	43.4785 42.478 47.002 43 0.87425	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453	\
daje	22 22 23 24 25 25 25 25 25 24 40	10 11 12 10 11 12	0 0,5 0,5 MSPPVI pC pC	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 9.65E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.88E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0	7 5 1 3 5 1 3 5 1 3 5 1 4 5 1 3 8 1	5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5	555555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	555555	555555566	5 6 6 6 6 • • • • • • • •	6 6 6 7 6 6 0 0	5	).	C	yl !!	<	JS	• •	•••	CF	<b>२</b>	43.4785 42.478 47.002 41 0.87425 0.88433	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446	)
údaje	22 22 24 25 24 25 25 26 41	10 11 12 10 1 2 3	0 0,5 0,5 0,5 MSPPUT pC nC	4.7104 4.8817 4.8515 5.24E-00 2.65E-00 41E-00	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.88E-03 2.23E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0	7 5 1 3 5 1	5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5555555	555555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	555555566	56 566 88 88 88 88	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0	5	). 	C	yl	< u		• •	• • 1 1 1 1 0 0		<b>R</b>	43,4785 42,478 47,002 40,87425 0,88433 0,1284	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137	)
údaje	22 33 34 35 34 31 32 32 34 41 42	10 11 12 10 11 2 3 4	0 0,5 0,5 0,5 MSHPUT PC NC NC	4.7104 4.8817 4.8515 5.24E-00 2.65E-00 41E-00	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.88E-03 2.23E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0	7 5 1 3 6 1 3 6 1 3 6 1	5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	555555	555555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 6 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		5 6 5 6 6 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0	5	D.	C	yl 	< u			<b>P</b> ( <b>* *</b> 1 1 1 1 0 0 0 0		<b>R</b>	43,4785 42,478 47,002 40,87425 0,88433 0,1284 0,1535	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15798	
é údaje	22 22 24 25 24 27 27 28 24 47 47 47	10 11 12 12 12 12 12 12 12 13 14 5	0 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,	4.7154 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 41E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.89E-03 2.23E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0			5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5		5555555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8	555555			6 6 6 7 6 6 0 0 0 0	5	). ••• •••	C	yl !!!	< u			<b>* * * * * * * * * *</b>		<b>R</b>	43,4785 42,478 47,002 40,87425 0,88433 0,1284 0,1535 0,2481	44.035357 42.437756 47.084982 0.87453 0.88446 0.13137 0.15798 0.25652	
é údaje	22 23 24 25 24 2 25 25 25 26 47 47 44	10 11 12 12 10 1 1 2 3 4 5 6		4.7154 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 41E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.80E-03 2.23E-03 2.23E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ		rk	5 5 5 5 5 5 5 5 5 7 7		5555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	555 555 88 88 88 88		5 6 5 6 6 8 ** **	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0	50	D.		yl !!	<lu 111 1</lu 			<b>* *</b> 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0		<b>R</b>	43,4785 42,478 47,002 47,002 40,87425 0,88433 0,1284 0,1535 0,2481 0,2253	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15798 0.25652 0.23531	
né údaje	22 23 24 25 24 27 25 28 45 47 44 48 2	10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	0 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,	4.7154 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 41E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.88E-03 2.23E-03 2.23E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03 <b>CV</b>	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ		-k	y y		55555		5555	55555556	5 6 5 6 6 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		50 ec	D.		yl 	<lu 11 /</lu 			<b>PC</b> <b>* *</b> <b>1</b> 1 <b>1</b> 1 <b>0</b> 0 <b>0</b> 0		<b>R</b>	43,4785 42,478 47,002 41 0,87425 0,88433 0,1284 0,1535 0,2485 0,2253 -5,77E-0 2,245	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15798 0.25652 0.23531 -5.81E-03	
ané údaje	***********	10 11 12 11 23 34 45 66 77 8	0 0,5 0,5 0,5 M5H+01 pC nC rC rC rS rS k20 k20	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 6.55E-03 4.1E-03 4.1E-03	4,87286 4,72921 5,0297 2,507E-03 2,80E-03 2,20E-03 2,20E-03 2,20E-03 2,20E-03 2,20E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03 <b>2.05E-03</b>	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ(		-k	y y		555555		55555	555556	5 6 5 6 6 6	6 6 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	50 ec	D.	С ::: - А	yl 	<lu 11 /</lu 					<b>R</b>	43,4785 42,478 47,002 0,87425 0,88433 0,1535 0,2488 0,2233 -5,77E-0 2,248-0 0,1994	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15798 0.25652 0.23531 -5.81E-03 2.47E-03 0.1728	
ané údaje	***********	10 11 12 12 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 9 9 9	0 0,5 0,5 0,5 PC PC NC NC NC NC N20 N20 0 0	4.7134 4.6817 4.6515 5.24E-03 4.6555-03 44E-03 44E-03 6.49E-03 3,79E-03	4,87286 4,72921 5,0297 2,507E-03 2,88E-03 2,23E-03 2,23E-03 5,73E-03 3,24E-03	4.82816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.722-0 3.34E-0 1.88E-0 VZO 4.22E-0 2.55E.0		-k	y y				55555	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 6 5 6 6 6 ** ** 5tĺ	6 6 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	50 ec	D.		yl 	<lu 111 /1</lu 					<b>R</b>	43,4785 42,478 42,478 47,002 42 0,87425 0,88433 0,1284 0,8555 0,2283 0,1284 0,2283 5,77E-0 2,24E-0 0,1188 0,1284 0,1284 0,1284 0,1285 0	44.035357 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15798 0.25652 0.23531 5.81E-03 0.12178 0.12789	
vané údaje	22 23 23 25 24 25 25 25 25 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26	10 10 11 12 12 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 9 9 9 10	0 0,5 0,5 0,5 MSPPUT pC pC nC rS rS h20 h20 0 0 0,5	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 6.65E-03 41E-03 3.79E-03 4.15E-03 3.79E-03	4,87286 4,72921 5,0297 2,888-03 2,238-03 2,238-03 2,238-03 2,238-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,478-03	4.82816 4.71081 5.04229 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.80E-03 2.80E-03 2.80E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ( 4.22E-0 2.8E-0 2.9E-0 2.92E-0		٠ K	y 5		5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6		50 ec	D.			<lu 111 /1</lu 			<b>* *</b> 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0			43,4785 42,478 42,478 47,002 42 0,8742 0,8742 0,88433 0,1284 0,1555 0,2483 0,1284 0,1555 0,2283 0,2283 0,2285 0,20	44.035357 42.437756 47.094982 9.87453 0.88446 0.13137 0.15798 0.25652 0.23531 -5.81E-03 2.47E-03 0.12178 0.13259 0.15372	$\Big)$
wané údaje	22 22 25 25 25 22 25 25 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26 26	10 11 12 12 1 1 2 3 3 4 4 5 6 6 7 7 8 9 9 10 11 11 2 3 3 4 4 5 6 6 10 10 12	0 0,5 0,5 0,5 PC PC NC rS rS h20 0 0 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 44E-03 2.65E-03 44E-03 3.79E-03 4.55E-03 6.43E-03 6.42E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.89E-03 2.23E-03 2.23E-03 5.73E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 5.58E-03	4.82816 4.7061 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.70E-03 2.70E-03 2.89E-03 3.89E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.722-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ 4.22E-0 2.18E-0 2.12E-0 2.12E-0 2.62E-0		-k	y 5				5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6		50 ec	D.			<) 						43,4785 42,478 47,002 47,002 40,87425 0,89433 0,1294 0,87425 0,89433 0,1295 0,2482 0,2293 5,776-0 2,2482 0,12884 0,12884 0,12884 0,139851	44.035357 42.437756 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15759 0.25652 0.23531 5.81E-03 2.47E-03 0.12178 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259	$\Big)$
ované údaje	12 33 34 35 31 31 31 31 31 31 31 31 31 31 31 31 31	10 11 12 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 9 9 10 11 12	0 0,5 0,5 0,5 PC PC PC NC rS h20 h20 0 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 44E-03 2.65E-03 44E-03 3.79E-03 4.15E-03 6.42E-03	4,87286 4,72921 5,0297 2 5,07E-03 2,89E-03 2,23E-03 2,23E-03 3,23E-03 3,23E-03 3,24E-03 3,47E-03 5,98E-03	4.82816 4.70061 5.04229 3 4.89E-00 3.11E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.00E-00 3.89E-00	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ 2.18E-0 2.16E-0 2.162E-0 2.62E-0	751 353 351 351 351 351 351 351 351 351 3	-k	y y				5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		5 6 6 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		50 ec	D.	C F A	yl N	<lu </lu 						43,4785 42,478 47,002 47,002 40,87425 0,88433 0,1284 0,2285 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2485 0,2285 0,1985 1,1985 0,1985 1,1985	44 03557 42 437756 47 084982 50 0.87453 0.88446 0.03137 0.85745 0.25652 0.25531 0.15738 0.15275 0.13275 0.13275 0.13275 0.13275	$\Big)$
zované údaje	12 33 34 35 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	10 11 12 1 2 3 4 4 5 6 6 7 7 8 9 9 10 0 11 12	0 0,5 0,5 0,5 PC PC NC rS rS rS rS rS rS rS rS 0,5	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 4.4E-03 3.79E-03 4.15E-03 6.43E-03 4.15E-03 6.42E-03	4,87286 4,72921 5,0297 2,808-03 2,828-03 2,828-03 2,228-03 <b>5</b> ,738-03 3,2478-03 3,2478-03 3,2478-03 3,2478-03 3,2478-03	4.82816 4.7061 5.04229 3 4.89E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.705E-03 2.705E-03 2.806E-03 3.89E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ0 4.22E-0 2.%E-0 2.%E-0 2.%E-0 2.62E-0	751 353 353 351 351 351 351 351 351 351 3	ĸ	y				5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		5 6 6 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	6 6 6 7 6 6	5( eC	).		yl N	<lu 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</lu 					<b>R</b>	43.4785 42.478 47.002 42.478 47.002 42.0.87425 0.87425 0.87425 0.1824 0.1555 0.2245 0.2256 0.2556 0.2556 0.2556 0.2556 0.2556 0.2556 00	44.035557 42.437756 47.084982 47.084982 0.87453 0.87453 0.87453 0.87453 0.87453 0.813137 0.15738 0.23553 0.22553 0.12178 0.12552 0.12578 0.12578	$\Big)$
izované údaje	12 33 34 35 34 35 35 35 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36	10 11 12 3 4 5 5 6 6 7 7 8 9 9 10 11 11 12	0 0,5 0,5 0,5 PC PC PC NC NC NC NC NC NC NC NC NC NC NC NC NC	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 4.650-03 4.650-03 4.450-03 3.790-03 4.150-03 6.42E-03	4,87286 4,72921 5,0297 2,868-03 2,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 3,298-03 5,598-03 3,298-03 5,599-03 5,599-03 5,599-03 5,599-03 5,599-0	4.82816 4.7061 5.04229 3 4.896-03 2.116-03 2.106-03 2.006-03 2.006-03 2.806-03 3.896-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 VZ0 4.22E-0 2.86E-0 2.62E-0	751 353 353 351 351 351 351 351 351 351 3	<b>k</b>	y				5555		5 6 5 6 6 6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	5( eC	D.		yl A	<lu 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</lu 						43.4785 42.478 47.002 0.87425 0.88433 0.1294 0.2285 0.2485 0.2485 0.2285 0.2485 0.2285 0.2485 0.2285 0.2485 0.2285 0.2485 0.1184 0.15866 0.19851	44 03557 42 437756 47 084982 50 0.87453 0.887453 0.83446 0.13137 0.15798 0.25652 0.22531 5.01E 03 2.47E 03 0.12778 0.13259 0.12259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.13259 0.12259 0.13572 0.2559 0.13572 0.2559 0.13572 0.2559 0.13572 0.2559 0.13572 0.2559 0.13572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.15572 0.2559 0.2559 0.15572 0.25590000000000000000000000000000000000	$\Big)$
dizované údaje	122 333 343 353 353 353 353 353 353 353 353	10 11 12 12 12 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 9 9 10 11 12 12 12 11 11 12 12 12 12 12 12 12	0 0,5 0,5 0,5 PC nC rS rS rS k20 k20 0 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	4,7134 4,6817 4,8515 5,24E-03 8,65E-03 4,42E-03 4,42E-03 4,15E-03 6,43E-03 4,15E-03 6,43E-03 1,270E-04	4,87286 4,72921 5,0297 2,2896-03 2,2986-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 2,298-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 2,298-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 3,248-03 2,248-03 3,248-03 2,248-03 3,248-03 2,249-03 2,249	4.82816 4.7061 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.89E-03 3.89E-03 3.89E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.722-0 3.34E-0 1.88E-0 2.88E-0 2.88E-0 2.88E-0 2.62E-0 2.62E-0	751 355 355 355 455 355 455 355 455 355 455 355 455 1 355 1 1 355 1 1 1 1	<b>k</b>	y 8 9			5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		56 56 66 51		5( eC	D.			111 <tr< td=""><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>43.4785 42.478 47.00200 47.002</td><td>44 025557 42 437756 42 437756 47 084982 50 0.88446 0.82457 0.88446 0.884666 0.884666 0.884666 0.884666 0.88466666666666666666666666666666666666</td><td></td></tr<>						43.4785 42.478 47.00200 47.002	44 025557 42 437756 42 437756 47 084982 50 0.88446 0.82457 0.88446 0.884666 0.884666 0.884666 0.884666 0.88466666666666666666666666666666666666	
dizované údaje	32 33 34 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35	10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 10 11 12 12 10	0 0,5 0,5 0,5 PC PC NC rS rS h20 0 0,5 0,5 0,5 0,5 MSPP01 PC	4,7134 4,6817 4,8515 2,455-03 4,555-03 4,555-03 4,555-03 4,455-03 0,795-03 4,155-03 6,425-03 1,705-03 4,195-04 4,195-04	4,87286 4,72921 5,0297 2 5,072-03 2,888-03 2,238-03 2,238-03 2,238-03 2,238-03 2,238-03 3,248-03 2,248-03 3,248-03 2,248-03 3,248-03 2,248	4.82816 4.7081 5.04229 3 4.89E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.00E-03 2.80E-03 2.80E-03 3.89E-03 3.89E-03 3.89E-03 1.18E-03 1.18E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.72E-0 3.34E-0 1.88E-0 2.82E-0 2.82E-0 2.82E-0 2.82E-0 1.87E-0 1.5E-0	7 5 1 3 5 5 3 5 5 3 5 5 4 5 1 3 5 1 4 5 1 3 6 1 7 7 5 1 7 7 5 1 7 7 5 1 7 7 5 1 7 7 7 7 7 7 5 1 7	۰ ۲	y 3 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5			5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		566 566 51 51	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	5( eC	D.			<lu> <li>1</li> <li>1&lt;</li></lu>						43.4785 42.478 47.002 4	44.025557 42.427756 47.004982 47.004982 47.004982 47.004982 47.004982 0.88446 0.13137 0.284453 0.284453 0.284453 0.28459 0.285452 0.20768 0.12259 0.12259 0.122589 0.122689 0.125689 0.125689	
rdizované údaje	32 33 34 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35	10 10 11 12 12 33 44 55 66 77 89 99 90 11 12 12 10 11 22 33	о 0,5 0,5 0,5 PC PC nC rS rS rS rS rS rS rS rS к20 0 0,5 0,5 МЗРРОП МЗРРОП МЗРРОП РС С пС	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 2.65E-03 4.1E-03 2.65E-03 4.1E-03 3.78E-03 6.42E-03 3.78E-03 6.42E-03 1.3.70E-03 4.18E-04 2.20E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.89E-03 2.23E-03 2.23E-03 2.23E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 7.54E-04 2.3.09E-03 7.64E-04 2.44E-00	4.82816 4.70081 5.04229 3 4.89E-03 3.10E-03 2.00E-03 2.00E-03 2.70E-03 2.70E-03 2.70E-03 2.89E-03 3.89E-03 3.89E-03 1.15E-03 2.48E-03 1.15E-03 2.65E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.7225-0 3.346-0 1.886-0 2.866-0 2.826-0 2.626-0 1.876-0 1.576-0 2.926-0	7 5 1 3 5 1 3 5 1 3 5 1 3 5 1 4 5 1 3 6 1 1 7 1 1 7 1 7 1 1 7 1 7 1 1 7 1 7 1 7	ĸ	y 8 9			5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		566 666 51 51 51	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	5( eC	D.		yl N	<lu </lu 						43.4785 42.478 47.002 47.002 48.0.87425 0.87425 0.88433 0.12945 0.5555 0.22480 0.2235 5.77E-0 2.2480 0.12884 0.15566 0.19851 0.19851 0.19851 0.12275 0.12292 0.7252	44.025/57 42.427756 47.094982 47.094982 47.094982 47.094982 0.88446 0.13137 0.15739 0.25652 0.225531 0.132553 0.132553 0.12653 0.12653 0.12653 0.125551 0.7355	
ardizované údaje	32 33 34 35 32 31 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32	10 11 12 12 12 12 12 12 12 15 6 6 7 7 8 9 9 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 14 14 14 15 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	о 0,5 0,5 0,5 PC PC PC NC rS rS k20 k20 k20 k20 k20 k20 k20 k20 k20 k20	4,7134 4,6817 4,8515 5,24E-00 2,655E-03 4,8515 5,24E-00 2,655E-03 4,455E-03 4,255E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.072-03 2.88E-03 2.23E-03 3.24E-03 3.34E-04 3.34E	4.82816 4.70081 5.04229 3 4.89E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.80E-03 3.89E-03 3.89E-03 1.55E-03 2.55E-03 3.55E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.722-0 1.324E-0 1.88E-0 2.182E-0 2.182E-0 2.182E-0 2.182E-0 2.182E-0 2.182E-0 2.182E-0 2.182E-0 1.187E-0 1.57E-0 1.57E-0 3.59E-0	7 5 1 3 6 1 1 7 1 7 1 7 1	<b>K</b>	ь ь ь ь ь ь ь ь ь ь ь ь ь ь						5 6 6 5 6 6 5 6 5 6 6 6 5 6 6 6 5 6 6 6 5 6 6 6 5 6 6 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	6 6 6 7 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	5( ••••	D.			   						43,4765 42,478 47,002 47,002 42,5 0,87425 0,88433 0,1555 0,2485 0,5555 0,2485 0,15556 0,2485 0,155560 0,155560 0,155560 0,155560 0,155560 0,155560 0,155560 0,155560 0,15556000000000000000000000000000000000	44.025557 47.084982 42.427756 47.084982 0.88446 0.13137 0.88446 0.13137 0.15738 0.25652 0.22531 0.12578 0.12578 0.12559 0.12578 0.12559 0.1259 0.1255900000000000000000000000000000000000	$\Big)$
lardizované údaje	12 33 34 35 34 35 35 35 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36	10 10 11 12 3 3 4 5 5 6 6 7 7 8 9 9 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 14 5 5	0 0,5 0,5 0,5 0,5 PC PC NC rS N20 N20 N20 N20 N20 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 N20 N20 N20 N20 N20 N20 N20 N20 N20 N20	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-00 2.65E-03 4.65E-03 3.79E-03 4.15E-03 6.49E-03 3.79E-03 4.15E-03 6.42E-03 5.70E-03 2.64E-03 5.97E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.82E-03 2.22E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 5.75E-03 3.24E-04 5.75E-03 3.24E-04 2.22E-03 5.76E-04 2.22E-03 5.76E-04 2.22E-03 5.76E-04 5.76E-03 2.22E-03 2.24E-03 2.24E-03 2.24E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.35E-03 5.58E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.35E-03 2.34E-03 2.34E-03 2.35E-03 2.34E-03 2.35E	4.92816 4.71081 5.04229 3 4.89E-03 3.11E-03 2.05E-03 2.05E-03 2.80E-03 3.89E-03 3.89E-03 3.89E-03 3.89E-03 3.89E-03 3.89E-03 3.58E-03 3.58E-03 3.58E-03 3.58E-03 3.58E-03 4.66E-03 3.54E-03	4.8014 4.7212 5.0148 4.7225-0 3.346-0 1.886-0 2.186-0 2.186-0 2.1826-0 2.1926-0 2.19	7 5 1 3 5 1 3 5 1 4 5 1 3 3 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1	<b>K</b>	с с с с с с с с с с с с с с				55555 5555 888 888 888 888 888 888 888		5666 666 000		5( eC	<b>P</b>									43,4795 42,478 42,478 47,002 0,87425 0,88433 0,1284 0,1555 0,2285 0,1555 0,2285 0,1555 0,1298 0,15951 0,1298 0,15951 0,1298 0,15951 0,12985 0,15955 0,27952 0,27952 0,27952 0,27952	44.025557 42.427756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13736 0.22531 0.22531 0.15736 0.22552 0.22531 0.15736 0.125652 0.12559 0.125659 0.125760 0.1257700 0.1257700 0.1257700 0.1257700 0.1257700 0.1257700000000000000000000000000000000000	
dardizované údaje	22 23 34 35 34 35 34 35 34 35 34 35 34 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 34 35 35 35 34 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35	10 11 12 12 12 12 12 12 12 10 11 12 12 10 11 12 12 10 11 12 12 10 11 12 12 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	о 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	4.7134 4.6817 4.6515 5.24E-03 2.65E-03 4.6515 4.645E-03 3.79E-03 6.49E-03 4.15E-03 6.42E-03 4.15E-03 6.42E-03 1.370E-03 5.375E-03 5.375E-03 5.670E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.072-03 2.88E-03 2.23E-03 2.23E-03 2.23E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 3.24E-03 5.26E-03 5.27E-03 5.26E-03 5.26E-03 5.26E-03 5.27E	4 82816 4 70081 5.04229 3 4 896-03 2.056-03 2.056-03 2.056-03 2.066-03 2.806-03 2.806-03 2.806-03 2.697-03 2.697-03 2.696-03 2.697-	4.8014 4.7212 5.0148 4.7212 5.0148 4.722-0 1.88E-0 2.82E-0 2.62E-0 2.62E-0 2.62E-0 2.62E-0 2.52E-0 2.52E-0 3.99E-0 3.99E-0 3.99E-0 3.99E-0 3.99E-0 3.99E-0	7 5 1 3 5 1 3 5 1 4 5 1 3 3 6 1 3 6 1 3 6 1 3 6 1 3 6 1 1 7 1 7	۲ ۲ ۲	y y y y y y y y y y y y y y y y y y y				55555 5555 888 888 888 888 888 888 888		stí		50 ec	D.			<li>1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</li>						43,4795 42,478 42,478 47,002 42,00200 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,0000 42,00000 42,0000000000	44.03557 42.437756 47.094992 0.87453 0.88446 0.13137 0.25551 0.22551 0.12559 0.122551 0.122551 0.122551 0.122551 0.122551 0.122551 0.122551 0.82814 0.82814 0.8735 0.82814	
ndardizované údaje	32 33 34 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35 35	10 11 12 2 3 4 4 5 6 6 7 7 8 9 9 10 11 12 2 3 10 11 12 2 3 10 11 12 2 3 10 11 12 2 3 3 4 4 5 6 6 7 7 11 12 2 3 3 11 12 2 3 3 11 12 2 3 3 11 12 2 3 3 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 12 2 3 3 10 11 11 12 2 3 3 10 11 11 12 2 3 3 10 11 11 12 2 3 3 10 11 11 12 2 3 3 10 11 11 12 2 3 3 10 11 11 12 2 10 11 11 12 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11	0 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,	4.7134 4.6817 4.6515 5.24E-03 5.24E-03 5.24E-03 4.45E-03 3.796-03 6.49E-03 3.796-03 6.42E-03 6.43E-03 6.73E-03E	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.83E-03 2.22E-03 2.22E-03 3.247E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.758E-03 5.778	4 92896 4 70081 5.04229 3 4 89E-00 3.18E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.05E-00 2.80E-00 3.89E-00 3.89E-00 3.89E-00 3.89E-00 1.15E-00 2.48E-00 3.54E-00 1.55E-	4.8014 4.72E-0 3.34E-0 1.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.80E-0 2.93E-0 3.93E-0 1.93E-0 1.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 3.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 3.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 3.93E-0 2.93E-0 2.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 2.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 3.93E-0 2.93E-0 3.93E-0	7 5 3 5 3 3 5 1 3 3 5	ъ Т К	y 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9				5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5		5 6 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5		5( ec	D.			<li>1</li>						43.4795 42.4795 42.478 42.478 42.478 42.478 42.478 42.478 42.478 42.478 42.478 0.1894 0.1284 0.1284 0.2290 0.2290 0.2290 0.2290 0.1284 0.15566 0.19851 0.1284 0.15566 0.19851 0.129500 0.129500 0.1295000000000000000000000000000000000000	44.03557 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.87453 0.87453 0.87453 0.87453 0.87453 0.131798 0.23531 0.23531 0.22531 0.12259 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12559 0.12551 0.735 0.82014 0.118E-03 0.1	
indardizované údaje	22 23 34 35 35 35 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36	10 11 12 3 3 4 5 5 6 7 7 8 9 9 9 9 9 9 9 9 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	0 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,	4.7134 4.6817 4.8515 5.24E-03 5.65E-03 4.655E-03 4.45E-03 4.45E-03 4.15E-03 6.43E-03 4.15E-03 6.43E-03 4.15E-03 6.43E-03 2.44E-03 5.44E-03 5.44E-03 2.44E-03	4.87286 4.72921 5.0297 2 5.07E-03 2.88E-03 2.23E-03 2.23E-03 2.23E-03 3.24E-03 5.26E	4 82816 4 77061 5 04229 3 4 886-00 3 11E-00 2 05E-00 2 70E-00 2 70E-00 2 70E-00 2 70E-00 2 70E-00 2 70E-00 2 70E-00 1 8E-00 1 8E-00	4.8014 4.7212 5.0149 4.722-0 3.34E-0 1.88E-0 2.422E-0 2.4	7 5 1 3 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1 5 1	<b>~</b> K	5 5 5 5 5 5 5 5 5 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9				5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5		stí		50 ec	D.		yl N							43,4795 42,478 42,478 47,002 47 0,894130 0,894130 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,2845 0,15550000000000	44.03557 42.427756 47.084982 50 0.87453 0.88446 0.13137 0.15738 0.25652 0.23531 2.476-03 0.12259 0.12276 0.12259 0.12259 0.12551 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814 0.82814	
andardizované údaje	22 22 22 23 24 25 25 24 25 25 24 25 25 24 25 25 24 25 25 24 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25	10 10 11 12 3 3 4 5 6 6 7 7 8 9 3 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	о 0 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	4.7034 4.6817 4.6817 5.24E-03 5.524E-03 6.65E-03 4.42E-03 6.43E-03 6.43E-03 6.43E-03 6.43E-03 6.43E-03 6.43E-03 6.43E-03 7.370E-03 6.43E-03 7.370E-03 6.43E-03 7.370E-	4.97296 4.72921 5.0297 2.507E-03 2.288E-03 2.288E-03 2.22E-03 <b>5.73E</b> -03 <b>3.24E</b> -03 <b>3.24E</b> -03 <b>3.24E</b> -03 <b>3.24E</b> -03 <b>3.24E</b> -03 <b>5.78E</b> -03 <b>5.7</b>	4 828% 4 7061 5.04229 3 4.896-03 3.116-03 2.056-03 2.056-03 2.056-03 2.056-03 2.006-03 2.006-03 2.006-03 3.896-03 3.896-03 3.696-03 4.697-03 4.696-03 4.697-03 4.696-03 4.697-03	4 0014 4 725-0 3.345-0 1.885-0 2.855-0 2.855-0 2.855-0 3.955-0 3.955-0 3.955-0 3.955-0 3.955-0 3.955-0 3.955-0 5.955-0		<b>~</b> K	ь						stí			D.		yl N	<li>1</li>						43,4795 42,4795 42,478 47,002 4 47,002 4 4 0,89435 0,89435 0,89435 0,89435 0,2946 0,89455 0,2465 0,2465 0,22465 0,22465 0,22465 0,22465 0,22465 0,22465 0,22465 0,12256 0,12566 0,12566 0,1256 0,12566 0,12566 0,	44.035557 42.437756 47.084982 9.87453 9.88446 0.13317 0.157598 0.25652 0.225531 0.12767 0.125759 0.125579 0.125759 0.125759 0.125759 0.125759 0.12559 0.125659 0.12665900000000000000000000000000000000000	$\Big)$
tandardizované údaje	22 22 22 23 24 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25	10 11 12 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 10 11 12 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	о 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4.7124 4.6817 4.6817 5.24E-00 5.524E-00 5.55E-00 4.45E-00 3.79E-00 4.45E-00 3.79E-00 4.45E-00 5.77E-00 2.44E-00	4 87286 4 72281 5 0287 2 5 0287 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	4 2028 4 7001 5 04229 3 4596-00 2 006-00 2 006-00	4 8014 4 7225 0 3 345 0 1 885 0 2 852 0 2 852 0 2 852 0 3 355 0 2 855 0 3 355		<b>r</b> k	y 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3				5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5		Stĺ			D.									42,4795 42,4795 42,4795 47,002 0,874,25 0,884,32 0,884,32 0,884,32 0,284,4 0,884,32 0,284,4 0,884,32 0,284,4 0,284,4 0,2284,4 0,2284,4 0,2284,4 0,2284,4 0,2284,4 0,2284,4 0,1289,4 0,129,4 0,12	44.03557 42.437756 47.084982 50 0.87453 0.87453 0.887453 0.838446 0.13137 0.15738 0.25652 0.22531 0.25672 0.22531 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12259 0.12659 0.12659 0.20766	$\Big)$
Štandardizované údaje	22 22 22 24 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25	10 11 12 3 3 4 5 5 6 6 7 7 9 9 10 11 12 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 7 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	0 0,0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	4.754 4.601 5.246.00 4.6515 5.266.00 4.6515 6.4526 7.756 6.425.00 1.0 2.6462.00 1.0 2.6462.00 2.6462.00 2.6462.00 2.6462.00 2.6462.00 2.6462.00 5.577762.00 5.57762.00 5.57762.00 5.57762.00 5.57762.00 5.577762.00 5.5777777777777777777777777777777777	4 47268 4 72521 5 0237 2 5 078-0 5 028-0 2 2 008-00 2 2226-00 5 078-00 5 078-00 3 24E-00 2 2226-00 5 078-00 5 078-00 3 24E-00 2 009-00 5 078-00 3 078-00 2 009-00 5 078-00 2 009-00 5 078-00 2 009-00 5 078-00 2 009-00 5 078-00 2 009-00 5 078-00 2 009-00 2 000-00 000-000-00 000-000-000 000-000-0	4 2078 4 7001 5 04229 3 306 00 2 056 00 2 056 00 2 056 00 3 386 00 3 246 00 3 246 00 1 156 00 3 246 00 1 156 00 3 246 00 1 156 00 3 156 00000000000000000000000000000000000	4 8014 4 7226-0 5 50449 4 7226-0 1 1086-0 4 2266-0 2 1086-0 2 1086-0 2 1086-0 2 1086-0 2 1086-0 2 1086-0 3 1086-0 1 1086-0 3 1086-0 3 1086-0 1 1086-0 3 1086-0 3 1086-0 3 1086-0 3 1086-0 3 1086-0 3 1086-0 1 1086	7 5 3 5 1 3 5 1 3 5 1 3 5 1 4 5 1 3 3 1 4 5 1 3 3 1 3 1 3 1 3 1 3 1 3 1 3 1 3 1 3 1	° <b>k</b>	y						stí			D.		yl A IC							42.4795 42.4795 42.4795 47.002 0.87425 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.88433 0.8555 0.15951 0.1295 0.01955 0.01955 0.01955 0.0225 0.01955 0.01955 0.01955 0.0225 0.01955 0.01955 0.0225 0.01955 0.0225 0.01955 0.0225 0.01955 0.0225 0.01955 0.0225 0.01955 0.0225 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.0255 0.0255 0.01955 0.0255 0.0255 0.0255 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.0255 0.0255 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.0255 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.0255 0.01955 0.01955 0.0255 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.01955 0.0255 0.019555 0.019550 0.019550 0.019550 0.019550 0.01955000000000000000000000000000000000	44.03557 42.437756 47.084982 0.87453 0.87453 0.887453 0.887453 0.887453 0.887453 0.887453 0.887453 0.887453 0.25672 0.22553 0.22653 0.22653 0.22553 0.25653 0.12555 0.22664 0.12555 0.12555 0.12555 0.12555 0.22664 0.125555 0.125555 0.125555 0.125555 0.1255555 0.12555555555555555555555555555555555555	$\Big)$

Obrázok 11. Príklad výsledkov zobrazený v súbore Excel.

**Poznámka:** Súbor obsahuje nespracované aj štandardizované údaje. Do úvahy je potrebné brať iba štandardizované údaje.

Tieto údaje sú uvedené v častiach tabuľky Kvantitatívna analýza kanálu Cycling A Green a Kvantitatívna analýza kanálu Cycling A Yellow. Údaje určené na interpretáciu sú tie, ktoré sa získali pri PCR cykle 50 (v kruhoch vpravo).

# Protokol: qPCR o nástrojoch Applied Biosystems a ABI PRISM

Pri použití zariadenia qPCR s doštičkou s 96 jamkami sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 5.

# Tabuľka 5. Počet reakcií pre nástroje Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700, alebo ABI PRISM 7900HT

Vzorky	Reakcie
JAK2 V617F zmes primerov a so	nd (PPM-VF) (56 reakcií)
24 DNA vzoriek	24 x 2 reakcie
3 DNA kontroly	3 x 2 reakcie (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testovaný dvakrát)
Kontrola vody	2 reakcie

#### Spracovanie vzoriek na nástrojoch Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700, alebo ABI PRISM 7900HT



**Obrázok 12. Navrhované rozloženie platničiek pre experiment s** *ipsogen* JAK2 **Muta***Screen* Kit. PC: pozitívna kontrola; NC: negatívna kontrola; COS: hraničná vzorka; S: Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

# qPCR pre nástroje Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700, alebo ABI PRISM 7900HT

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

#### Postup

#### 1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.

Komponenty je potrebné vybrať z mrazničky približne 10 minút pred začiatkom procedúry.

- Vírivo premiešajte a krátko odstreďte všetky skúmavky (približne 10 s, 10 000 otáčok za minútu, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 3. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 6 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagencií, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25  $\mu$ l. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a sond. Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Na nástrojoch Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700, or ABI PRISM 7900HT môže byť *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit použitá na analýzu 24 vzoriek dvojmo v jednom experimente (Obrázok 12), 20 vzoriek dvojmo v dvoch experimentoch alebo 15 vzoriek dvojmo v troch experimentoch.

|--|

		Počet re			
Komponent	1	56 + 1*	28+1 <sup>†</sup>	18+1 <sup>‡</sup>	Konečná koncentrácia
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x
Zmes primerov a sond, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	5	285	145	95	-
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	5 každá	5 každá	-
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	25 každá	-

\* 24 vzoriek; jeden experiment/súprava.

<sup>t</sup> 10 vzoriek; dva experimenty/súprava.

<sup>‡</sup> 5 vzoriek; tri experimenty/súprava.

- 4. Vírivo miešajte a krátko odstreďujte zmes qPCR (približne 10 s, 10 000 ot/min, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 5. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na jednu jamku.
- 6. Pridajte 5  $\mu$ l materiálu vzorky DNA alebo kontrolného roztoku do príslušnej jamky (celkový objem 25  $\mu$ l).
- 7. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
- 8. Zatvorte doštičku a krátko odstreďujte (300 x g, približne 10 s).
- Doštičku umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
- 10. Naprogramujte tepelný cyklovač programom tepelného cyklu, ako je uvedené v Tabuľke 7, a spustite cyklus.

Hold (Držiak)	Teplota: 50 °C			
	Čas: 2 min			
Hold 2 (Držiak 2)	Teplota: 95 °C			
	Čas: 10 min			
Cycling	50-krát			
(Cyklovanie)	92 °C pre 15 s			
	60 °C pre 1 min			

# Tabuľka 7. Teplotný profil pre nástroje Applied Biosystems a ABI PRISM

# Postup analýzy po vykonaní cyklu pre nástroje Applied Biosystems a ABI PRISM

Podrobnosti o programovaní nástrojov Applied Biosystems 7300 a 7500, ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7700 alebo ABI PRISM 7900HT nájdete v príručke používateľa nástroja. Pre lepšiu prehľadnosť sú nastavenia softvéru orámované tučne.

- 11. Po dokončení cyklu vyberte "Start/Program" (Spustiť/Program) a potom vyberte "File/New" (Súbor/Nový).
- 12. V dialógovom okne "New Document Wizard" (Sprievodca novým dokumentom) kliknite na rozbaľovací zoznam "Assay" (Test) a vyberte "Allelic Discrimination" (Alelická diskriminácia) (Obrázok 13).
- 13. Prijmite predvolené nastavenia pre polia "Container" (Zásobník) a "Template" (Šablóna) ("96-Well Clear" (96-jamkový čistý) a "Blank Document" (Prázdny dokument), Obrázok 13). Do poľa "Plate Name" (Názov doštičky) napíšteAD Post-read (Obrázok 13), a potom kliknutím na "Next>" (Ďalší>) získate prístup do dialógového okna "Select Markers" (Zvoľte markery).

Assay :	Allelic Discrimination	*		
Container :	96-Well Clear	-	Preume 1	
Run Mode :	Standard 7500		blowse	
Operator :	Administrator			
Comments :				
				~

Obrázok 13. Predvolené nastavenia pre vytvorenie nového spustenia po prečítaní (New Document Wizard (Sprievodca novým dokumentom)).

- 14. Ak panel "Markers in Document" (Markery v dokumente) v dialógovom okne "Select Markers" (Vyberte markery) obsahuje vhodnú značku pre vašu aplikáciu, pokračujte krokom 18. Ak nie, pokračujte krokom 15.
- 15. Detektory a značky vytvorte nasledujúcim spôsobom. Kliknite na "New Detector" (Nový detektor) (Obrázok 14).

Marker	Name		-	Markers in Document	
		Dottotta 1			
			Remove		
<		10	>	1	

Obrázok 14. Panel "Markers in Document" (Markery v dokumente) neobsahuje vhodnú značku pre vašu aplikáciu.

16. V dialógovom okne "New Detector" (Nový detektor) napíšte Allele A do poľa "Name" (Názov) (Obrázok 15). Nechajte "Reporter Dye" (Reportérové farbivo) nastavené na "FAM". Kliknite na tlačidlo "Color" (Farba), zvoľte farbu a kliknite na "OK" (Obrázok 15). Kliknite na "Create Another" (Vytvoriť ďalší) (Obrázok 15).



Obrázok 15. Vytváranie detektorov.

- 17. V ďalšom dialógovom okne "New Detector" (Nový detektor) napíšte Allele B do poľa "Name" (Názov). Zvoľte "VIC" v poli "Reporter Dye" (Reportérové farbivo). Kliknite na tlačidlo "Color" (Farba), vyberte farbu a potom kliknite na "OK"
- 18. Kliknite na "New Marker" (Nový marker) v dialógovom okne "Select Markers" (Vybrať markery) (pozri Obrázok 14).
- V dialógovom okne "New Marker" (Nový marker) napíšte JAK2 do poľa "New Marker Name" (Názov nového markera) (Obrázok 16). Zvoľte detektory "Allele A" (Alela A) a "Allele B" (Alela B) ako boli vytvorené v krokoch 16 a 17 (alebo už určené), a kliknite na "OK" (Obrázok 16).



Obrázok 16. Vytvorenie markerov.

20. V dialógovom okne "Select Markers" (Vybrať markery) vyberte "JAK2", ako je vytvorené vyššie, alebo vhodný preddefinovaný marker a potom kliknite na "Add>>" (Pridať>>) (Obrázok 17).

**Poznámka:** Ak chcete marker odstrániť, vyberte ju a potom kliknite na "Remove" (Odstrániť).

m		<u> </u>	Pa	ssive Reference: ROX	-
larker Name	Detector 1	Detector 2		Markers in Document	
AK2	Allele B	Allele A			
			Add >>		_
			Remove		

Obrázok 17. Výber markerov.

- 21. Kliknite na "Next>" (Ďalší).
- 22. V dialógovom okne "Setup Sample Plate" (Nastaviť doštičku vzoriek) kliknite a potiahnutím vyberte marker pre jamky, ktoré obsahujú vzorky. Kliknite na "Finish" (Ukončiť).
- 23. Vyberte kartu "Instrument" (Nástroj) a zmeňte objem vzorky na 25 µl.
- 24. Vyberte "File/Save" (Súbor/Uložiť) a potom kliknite na "Save" (Uložiť), aby ste zachovali názov, ktorý ste priradili pri vytváraní doštičky.
- 25. Vložte reakčnú doštičku do prístroja podľa odporúčaní výrobcu

#### 26. Spustite cyklus po načítaní. Kliknite na "Post-Read" (Po načítaní).

Prístroj vykoná 1 cyklus počas 60 s pri 60 °C. Počas tohto cyklu prístroj zhromaždí fluorescenciu FAM a VIC v každej jamke(Obrázok 18).

, y macramer	in fricouns f				
iment Control		Temperature			
re-Read	Estimated Time Remaining (hh:mm):	Sample:	Heat Sink:		
ost-Read		Cover:	Block:		
oorriouu		- Cycle			
isconnect	Status:	Stage:	Rep:		
		Time (mm:ss):	Step:		
		State:			
10 1 5	toral				
nal Cycler Pro					
ermal Profile	Auto Increment Ramp Rate				
60.0	Auto Increment   Ramp Rate				
60.0 Add Cycle	Auto Increment Ramp Rate	ssociation Stage	ele <b>Help</b>		
60.0 Add Cycle Settings	Auto Increment Ramp Rate	ssoulation Stage Del	ele Help		
60.0 Add Cycle Settings Sample Vol	Auto Increment   Ramp Rate   Auto Huid Auto Siep Auto Dir ume (jul.) : 25	soulation Stage	ele Help		

Obrázok 18. Cyklus po načítaní.

#### 27. Zvoľte "File/Export" (Súbor/Exportovať) a potom kliknutím na "Results" (Výsledky) exportujete výsledky do súboru Excel. Výsledky sa objavia ako je zobrazené na Obrázku 19.

12	Comm	ents:					<b>^</b>					
13	SDS v1	.2				- VI	C vzor	ka 1		- FAN	l vzorka	1 —
14												
15	Well	Sample Name	Marker	Task	Passive Ref	Allele X	Allele Y	Allele X Rn	Allele Y Rn	Gall	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

Obrázok 19. Príklad výsledkov zobrazených v súbore Excel.

## Protokol: qPCR o nástroji LightCycler 480

Pri použití zariadenia qPCR s 96 jamkami sa odporúča vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 8.

Tabuľka	8.	Počet	reakcií	pre	nástroj	LightC	ycler 480
---------	----	-------	---------	-----	---------	--------	-----------

Vzorky	Reakcie				
S JAK2 V617F zmesou primerov a sond (PPM-JAK2)					
24 DNA vzoriek	24 x 2 reakcie				
3 DNA kontroly	3 x 2 reakcie (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testovaný dvakrát)				
Kontrola vody	2 reakcie				

#### Spracovanie vzorky na nástroji LightCycler 480



**Obrázok 20. Navrhované rozloženie platničiek pre experiment s** *ipsogen* JAK2 **MutaScreen Kit. PC:** pozitívna kontrola; **NC:** negatívna kontrola; **COS:** hraničná vzorka; **S:** Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

#### qPCR o nástroji LightCycler 480

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

#### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.

Komponenty je potrebné vybrať z mrazničky približne 10 minút pred začiatkom procedúry.

- Vírivo premiešajte a krátko odstreďte všetky skúmavky (približne 10 s, 10 000 otáčok za minútu, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 3. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 9 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagencií, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 25  $\mu$ l. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a sond. Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Na nástroji LightCycler 480 môže byť *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit použitá na 24 vzoriek dvojmo v jednom experimente (Obrázok 20), 20 vzoriek dvojmo v dvoch experimentoch alebo 15 vzoriek dvojmo v troch experimentoch.

	Počet reakcií (μl)							
Komponent	1	56 + 1*	28+1 <sup>†</sup>	18+1 <sup>‡</sup>	Konečná koncentrácia			
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	712,5	362,5	237,5	1x			
Zmes primerov a sond, 10x	2,5	142,5	72,5	47,5	1x			
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	5	285	145	95	-			
Vzorka (má byť pridaná v kroku 6)	5	5 každá	5 každá	5 každá	-			
Celkový objem	25	25 každá	25 každá	25 každá	-			

\* 24 vzoriek; jeden experiment/súprava.

<sup>t</sup> 10 vzoriek; dva experimenty/súprava.

<sup>‡</sup> 5 vzoriek; tri experimenty/súprava.

- 4. Vírivo miešajte a krátko odstreďujte zmes qPCR (približne 10 s, 10 000 ot/min, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 5. Dispenzujte 20 µl predbežnej zmesi qPCR na jednu jamku.
- 6. Pridajte 5  $\mu$ l materiálu vzorky DNA alebo kontrolného roztoku do príslušnej jamky (celkový objem 25  $\mu$ l).
- 7. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
- 8. Zatvorte doštičku a krátko odstreďujte (300 x g, približne 10 s).
- Doštičku umiestnite do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
- 10. Na domovskej stránke vyberte "New Experiment" (Nový experiment).

11. Pre LightCycler 480 I, pokračujte krokom 11a. Pre LightCycler 480 II, pokračujte krokom 11b.

Podrobnosti o programovaní nástroja LightCycler 480 nájdete v príručke používateľa nástroja. Pre lepšiu prehľadnosť sú nastavenia softvéru orámované tučne.

11a. LightCycler 480 I: Vyberte položku "Multicolor Hydrolysis Probe" (Viacfarebná hydrolytická sonda), kliknite na "Customize" (Prispôsobiť) a potom skontrolujte, či sú vybraté kanály "FAM (483-533)" a "Hex (533-568)" (t. j. VIC). (Obrázok 21). Nastavte reakčný objem na "25" μl (Obrázok 21) a pokračujte krokom 12.



Obrázok 21. LightCycler 480 I: Nastavenie formátu detekcie.

11b. LightCycler 480 II: Vyberte "Dual Color Hydrolysis Probe" (Dvojfarebná hydrolytická sonda), kliknite na "Customize" (Prispôsobiť), a potom skontrolujte, že sú zvolené kanály "FAM (465-510)" a "VIC/HEX/(533-580)" (Obrázok 22). Nastavte reakčný objem na "25" μl (Obrázok 22) a pokračujte krokom 12.

E-VELANCE.	Run	Pretaced	Data	_	Run Notes	100
model	- Setup					2
Subset Editor	Celor Comp ID	Color Hydrolysis Probe / UPL 1	No Customize	Block Size 96 Plate ID Test ID	Reaction Volume	6=
Sample Editor	Program Name		Programs		Cycles Analysis Mode	. 8
Analysis	0	Detection Formats				*
Report Sum.	Target (°)	At Detection Format Dual Co Integration Time Mode Dynamic At Stree Silter Comb	lor Hydrolysis Probe / UPL Probe C Manual ination 510)		Step Size (°C) Step Delay (cycles	
	D	AIC / HIX	/ Yellow555 (533-580)			8
	100	_				S.
	000 300 030 50 50			Ø	8	S.

Obrázok 22. LightCycler 480 II: Nastavenie formátu detekcie.

# 12. Naprogramujte tepelný cyklovač programom tepelného cyklu, ako je uvedené v Tabuľke 10, a spustite cyklus.

**Poznámka:** Pri popisovaní nastavenia doštičky na nástroji vyberte v časti "Step 1: "select workflow" (Krok 1: vyberte pracovný tok) položku "Endpt Geno".

Hold (Držiak)	Teplota: 50 °C			
	Čas: 2 min			
Hold 2 (Držiak 2)	Teplota: 95 °C			
	Čas: 10 min			
Cycling	50-krát			
(Cyklovanie)	92 °C pre 15 s; jedno			
	60 °C pre 1 min; jedno			
Hold 3 (Držiak 3)	60 °C pre 1 min; jedno			

Tabuľka 10. Teplotný profil nástroja LightCycler 480

Postup analýzy koncového bodu pre nástroj LightCycler 480

- 13. Po dokončení cyklu kliknite na "Analysis" (Analýza).
- 14. V dialógovom okne "Create New Analysis" (Vytvoriť novú analýzu) zvoľte "Endpoint Genotyping" (Genotypizácia koncového bodu), a potom vyberte podmnožinu, ktorú chcete analyzovať v ponuke"Subset" (Podmnožina) (Obrázok 23).



Obrázok 23. Výber typu analýzy a podmnožiny na analýzu.

15. V ďalšom okne zvoľte "Hex" (napr. VIC) fluorescenciu pre "Allele X" (Alela X) a "FAM" fluorescenciu pre "Allele Y" (Alela Y) (Obrázok 24).

Create new analysis		
Allele X	Allele Y	
EAN (192 522)	FAM (483-533)	
Hex (523-568)	Hex (323-366)	

Obrázok 24. Výber fluorescencie pre "Allele X" (Alela X) a "Allele Y" (Alela Y).

- 16. V ďalšom okne (Obrázok 25) sa zobrazuje nastavenie doštičiek (1, vľavo hore), výsledky fluorescencie pre každú vzorku
  - (2, vľavo dole) a graf rozptylu s alelickou rozlišovacou schopnosťou (3, vpravo; FAM a VIC fluorescencia meraná v 50. cykle PCR).
- Endpoint Fluorescence Scatter Plo Select Zoon 48.00 45,000 44 000 05 05 05 05 05 05 42.000 40.00 38,00 36.00 34.00 results 32,00 Allele X 🐻 Both Alleles 📴 Allele Y 000 28.00 3 Endpoint Fluorescence 26.00 Pos Name 523-568 483.533 Call 24,000 A5 100% -2 10,97 46,34 22.00 A6 100% -2 10 0,30 0,39 20.00 A7 100% -2 0.37 0.43 18.00 A10 H20 0,21 0,29 16.00 A11 H20 0,23 0,32 A12 H2O 0,20 14,000 B5 78% -20 26,73 48,40 12:00 2 B6 78% -20 B7 78% -20 27,13 48,26 10,000 26,80 100 47,38 8.00 CS 50% -20 C6 50% -20 32,03 33,28 42,50 6.00 44,09 4.00 10 C7 504 -20 33,26 44,76 DS 314 -20 34,58 38,54 2,000 201 D6 314 -20 32,55 35,77 D7 314 -20 33,26 37,78 5 000 10,000 25,000 30,000 nce (523-568) 35,000 40,000 45.00 E5 12.5% -32,79 25,03 E6 12.5% -34,93 27,79 New Call Color Comp (Off) Auto Group Siz3.568 / 483.533 Mode 1 Apply Template Notes Calculate

Obrázok 25. Zhrnutie údajov.

17. Ak chcete exportovať údaje, kliknite pravým tlačidlom myši na šablónu výsledkov vzorky a potom vyberte možnosť "Export Table" (Exportovať tabuľku). Súbor sa uloží vo formáte textového súboru (.txt).

# 18. Ak chcete zobraziť a analyzovať výsledky, otvorte súbor pomocou programu Excel. Výsledky sa objavia ako je zobrazené na Obrázku 26.

2	Eichier	Edition Affichage	Insertion F	orma <u>t O</u> utils	Données Fe	nêtre <u>?</u>		
D	i 🗟	3 B. X B.	<b>₿ • 🛷</b> 👘	2 × Ci × Σ	- 18 2 Z	10. la	ta ta 🖂 (	🔄 🦹 Ca
	A1	▼ fx Ex	periment: OB	3 08-12-16 Act	ve filters: FAN	1 (483-533), He	x (523-568)	
	A	8	С	D	E	F	G	
1	Experime	nt: 08 08-12-16 Ac	tive filters: F	AM (483-533), I	Hex (523-568)			
2	Include	Color	Pos	Name	523-568	483-533	Call	Score
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	H20	0,207	0,290		0,00
7	True	10789024	A11	H20	0,233	0,319		0,00
8	True	10789024	A12	H20	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
.3	True	10789024	C6	50%-20	33,278	44,086		0,00
4	True	10789024	C7	50%-20	33,261	44,760		0,00
5	True	10789024	D5	31%-20	34,584	38,536		0,00
6	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
5	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	HS	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

Obrázok 26. Príklad výsledkov zobrazených v súbore Excel.

## Protokol: qPCR o nástroji LightCycler 2.0

**Poznámka:** Kvôli osobitným technologickým požiadavkám sa musia experimenty LightCycler 2.0 vykonávať s použitím špecifických reagencií. Odporúčame použiť LightCycler TaqMan Master. Pri príprave Master Mix 5x postupujte podľa odporúčaní výrobcu.

Pri použití 32-kapilárneho rotora odporúčame vykonať všetky merania dvakrát, ako je uvedené v Tabuľke 11.

Tabuľka 1	l1. Poče	t reakcií pr	e nástroj	LightCycler 2.	0
-----------	----------	--------------	-----------	----------------	---

Vzorky	Reakcie				
JAK2 V617F zmes primerov a sond (PPM-VF) (32 reakcií)					
12 DNA vzoriek	12 x 2 reakcie				
3 DNA kontroly	3 x 2 reakcie (PC-VF, NC-VF, a COS-VF, každý testovaný dvakrát)				
Kontrola vody	2 reakcie				

#### Spracovanie vzorky v nástroji LightCycler 2.0



Obrázok 27. Navrhované nastavenie rotora pre experiment s *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit. PC: pozitívna kontrola; NC: negatívna kontrola; COS: hraničná vzorka; S: Vzorka DNA; H<sub>2</sub>O: kontrola vody.

#### qPCR o nástroji LightCycler 2.0

Poznámka: Vykonajte všetky kroky na ľade.

#### Postup

1. Rozmrazte všetky potrebné komponenty a položte ich na ľad.

Komponenty je potrebné vybrať z mrazničky približne 10 minút pred začiatkom procedúry.

- Vírivo premiešajte a krátko odstreďte všetky skúmavky (približne 10 s, 10 000 otáčok za minútu, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 3. Pripravte nasledujúcu zmes qPCR podľa počtu vzoriek, ktoré by mali byť spracované.

Všetky koncentrácie sú pre konečný objem reakcie.

Tabuľka 12 opisuje schému pipetovania pre prípravu jednej zo zmesí reagencií, vypočítanej tak, aby sa dosiahol konečný reakčný objem 20  $\mu$ l. Predbežná zmes sa môže pripraviť podľa počtu reakcií s použitím rovnakej zmesi primerov a sond. Zahrnuté sú aj ďalšie objemy na kompenzáciu chyby pipetovania.

Na nástroji LightCycler 2.0 môže byť *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit použitý na analýzu 1 2 vzoriek dvojmo v jednom experimente (Obrázok 27).

	t reakcií		
Komponent	1	32 + 1	Konečná koncentrácia
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4	132	1x
Zmes primerov a sond, 10x	2	66	1x
Voda PCR stupňa bez obsahu nukleázy	9	297	-
Vzorka (má byť pridaná v kroku 4)	5	5 každá	-
Celkový objem	20	20 každá	-

#### Tabuľka 12. Príprava zmesi qPCR pre nástroj LightCycler 2.0

- 4. Vírivo miešajte a krátko odstreďujte zmes qPCR (približne 10 s, 10 000 ot/min, aby sa zozbierala kvapalina na dne skúmavky).
- 5. Dispenzujte 15  $\mu$ l predbežnej zmesi qPCR na kapiláru.
- 6. Pridajte 5  $\mu$ l vzorku materiálu DNA alebo kontrolného roztoku do príslušnej kapiláry (celkový objem 20  $\mu$ l).
- 7. Opatrne premiešajte pipetovaním hore a dole.
- 8. Vložte kapiláry do adaptéra dodaného s nástrojom a krátko odstreďte (700 x g, približne 10 s).
- 9. Vložte vzorky do tepelného cyklovača podľa odporúčaní výrobcu.
- 10. Naprogramujte tepelný cyklovač (Obrázok 28) programom, ako je uvedené v Tabuľke 13.

Podrobnosti o programovaní nástroja LightCycler 2.0 nájdete v príručke používateľa nástroja. Pre lepšiu prehľadnosť sú nastavenia softvéru orámované tučne.

**Poznámka:** Uistite sa, že nastavenie je pre kvantifikáciu a jedno získanie fluorescencie FAM a jednu akvizíciu fluorescencie VIC v kroku amplifikácie/cyklovania a konečného udržania pri 60 °C.



Obrázok 28. Programovanie obrazovky pre LightCycler 2.0

Hold (Držiak)	Teplota: 55 °C
	Čas: 2 min
	Sklon: 20
Hold 2 (Držiak 2)	Teplota: 95 °C
	Čas: 10 min
	Sklon: 20
Cycling	50-krát
(Cyklovanie)	92 °C pre 15 s; sklon: 20
	60 °C pre 1 min; sklon 20
Hold 3 (Držiak 3)	60 °C pre 1 min; sklon 20

Tabuľka 13. Teplotný profil pre nástroj LightCycler 2.0

Postup analýzy koncového bodu pre nástroj LightCycler 2.0

11. Na konci cyklu zosilnenia kliknite na kartu pre "Online Data Display" (Zobrazenie online údajov) (Obrázok 29). Otvorte ponuku zobrazenia v ľavom hornom okienku "Current Fluorescence" (Aktuálna fluorescencia), potom napíšte 51 do "Acquisition no" (Č. akvizície).



Obrázok 29. Výsledky a história v zobrazení údajov online.

12. Pravým tlačidlom myši kliknite na graf "Current Fluorescence" (Aktuálna fluorescencia) a vyberte príkaz "Export" (Exportovať). 13. Kliknite na "Excel" v dialógovom okne "Export chart" (Exportovať diagram) (Obrázok 30). Zadajte názov do dialógového poľa "Filename" (Názov súboru). Vyberte cieľ exportu pre súbor s výsledkami pomocou tlačidla J. Kliknite na "Export" (Exportovať).



Obrázok 30. Výber formátu exportu a cieľového súboru s údajmi.

14. Ak chcete zobraziť a analyzovať výsledky, otvorte súbor v programe Excel. Výsledky pre LightCycler 2.0 sa zobrazia tak, ako je zobrazené.

								Pol	loł	าล			
1	J	K	L	M	N	0	Р	Q	R	S	Г	U	
X	Bar	Text	Х	Bar	Text	Х	Bar	Text	¥	Bar		1	
1	2,9709	1: Sample 1 (610)	1	8,2734	1: Sample 1 (560)	1	6,6361	1: Sample 1 (530)	1	4,9943			
2	3,0182	2: Sample 2 (610)	2	8,4428	2: Sample 2 (560)	2	6,7659	2: Sample 2 (530)	2	5,0767			
3	2,9496	3: Sample 3 (610)			3: Sample 3 (560)	3	6,5568	3: Sample 3 (530)	3	4,9699			
4	2,9526	4: Sample 4 (610)	4	8,2887	4: Sample 4 (560)	4	6,6163	4: Sample 4 (530)	4	4,9119			
5	2,9450	5: Sample 5 (610)	5	8,2689	5: Sample 5 (560)	5	6,6209	5: Sample 5 (530)	5	4,9638			
6	2,9969	6: Sample 6 (610)	6	8,4184	6: Sample 6 (560)	6	6,7674	6: Sample 6 (530)	6	5,1209			
7	3,0045	7: Sample 7 (610)	- 7	8,4520	7: Sample 7 (560)	7	6,7506	7: Sample 7 (530)	7	5,0507			
8	3,2822	8: Sample 8 (610)	8	9,1936	8: Sample 8 (560)	8	7,3960	8: Sample 8 (530)	8	5,5314			
9	3,0274	9: Sample 9 (610)	9	8,5557	9: Sample 9 (560)	9	6,8437	9: Sample 9 (530)	9	5,0843			
10	2,8336	10: Sample 10 (610)	10	7,9713	10: Sample 10 (560)	10	6,3905	10: Sample 10 (530)	10	4,7883			
11	2,8275	11: Sample 11 (610)	11	7,9774	11: Sample 11 (560)	11	6,3874	11: Sample 11 (530)	11	4,7669			
12	2,8351	12: Sample 12 (610)	12	8,0171	12: Sample 12 (560)	12	6,4118	12: Sample 12 (530)	12	4,7944			
13	2,9511	13: Sample 13 (610)	13	8,3726	13: Sample 13 (560)	13	6,6957	13: Sample 13 (530)	13	4,9699			
14	2,8367	14: Sample 14 (610)	14	8,0217	14: Sample 14 (560)	14	6,4439	14: Sample 14 (530)	14	4,7654			
15	2,9908	15: Sample 15 (610)	15	8,4337	15: Sample 15 (560)	15	6,7445	15: Sample 15 (530)	15	5,0523			
16	2,8885	16: Sample 16 (610)	16	8,1498	16: Sample 16 (560)	16	6,5568	16: Sample 16 (530)	16	4,9577			
17	3,0152	17: Sample 17 (610)	17	8,4901	17: Sample 17 (560)	17	6,8193	17: Sample 17 (530)	17	5,1225			
							VIC			FAM			

Obrázok 31. Príklad výsledkov LightCycler 2.0 zobrazený v súbore Excel.

## Interpretácia výsledkov

Získajte súbor vhodný na extrahovanie exportovaných údajov pre všetky nástroje: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM alebo iný nástroj Rotor-Gene, LightCycler 2.0, alebo 480; Applied Biosystems 7300 alebo 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS, alebo 7900HT SDS a skontrolujte úrovne fluorescencie (tieto musia byť zhodné medzi duplikátmi).

Pripravte grafické znázornenie (bodový diagram) fluorescenčných údajov. Os x je fluorescencia VIC; os y je fluorescencia FAM.

## Grafické znázornenie a kritériá kontroly kvality



Príklad bodového diagramu je uvedený na Obrázku 32.

# Obrázok 32. Bodový diagram experimentu s reprezentatívnou alelickou diskrimináciou.

Nástroje: Rotor-Gene Q, Applied Biosystems, ABI PRISM, a LightCycler 480.

Vzorky by mali byť umiestnené na oblúku spájajúcom negatívne kontroly (NK) s pozitívnymi kontrolami (PK).

Nesprávne umiestnenie ktorejkoľvek kontroly môže naznačovať experimentálnu chybu.

- Pozitívne kontroly by mali byť umiestnené v ľavom hornom rohu.
- Negatívne kontroly by sa mali nachádzať vpravo dole.
- Nesprávne umiestnenie negatívnej kontroly môže naznačovať kontamináciu.
- Hraničná vzorka by sa mala objaviť nad negatívnymi kontrolami.

Kontroly vody by mali byť umiestnené vľavo dole.

Zlá poloha kontroly vody (vyššia ako NK pre meranie FAM alebo vyššia ako PK pre VIC) môže naznačovať kontamináciu.

**Poznámka:** Umiestnenie kontrol sa môže pri analýze údajov nástroja LightCycler 2.0 líšiť (pozri Obrázok 33). Kontroly vody by mali byť stále umiestnené vľavo dole.



Obrázok 33. Bodový diagram experimentu s reprezentatívnou alelickou diskrimináciou. Nástroj: LightCycler 2.0.

# Výpočet normalizovaného pomeru FAM/VIC a genotypovania

Vypočítajte pomery FAM/VIC pre všetky vzorky. Vypočítajte pomery FAM/VIC pre pozitívnu kontrolu (PK), hraničnú vzorku (HV) a negatívnu kontrolu (NK). Pomery musia byť medzi duplikátmi rovnaké. Vypočítajte priemerný pomer všetkých duplikátov.

Vypočítajte normalizovaný pomer (NRatio) pre hraničnú vzorku (HV) a pre všetky vzorky:

NRatio<sub>Vzorka</sub> =  $\frac{Pomer_{Vzorka}}{Pomer_{NK}}$ 

**Poznámka:** Šedá zóna (ŠZ) testu je definovaná ako oblasť hodnôt, kde diskriminačný výkon nie je dostatočne presný. Hodnota v šedej zóne označuje, že cieľový marker nemôže byť hodnotený ako prítomný alebo neprítomný. Šedú zónu je potrebné vypočítať pre každý experiment.

Vypočítajte šedú zónu alebo oblasť neistoty okolo normalizovaného pomeru HV (NRatio<sub>HV</sub>):

ŠZ: [(NRatio<sub>HV</sub> x 0,94); (NRatio<sub>HV</sub> x 1,06)]

Porovnajte normalizovaný pomer každej vzorky s NRatio<sub>HV</sub> ŠZ. Interpretácia výsledkov je uvedená v Tabuľke 14 príklad výpočtu a interpretácie údajov je uvedený v Tabuľke 15.

Tabuľka 14. Interpretácia výsledkov genotypizácie použitím normalizovaných pomerov

Výsledky	Interpretácia
NRatio <sub>Vzorka</sub> > NRatio <sub>HV</sub> x 1,06	JAK2 V617F zistený
NRatio <sub>Vzorka</sub> < NRatio <sub>HV</sub> x 0,94	JAK2 V617F nezistený
NRatio <sub>∨zorka</sub> v rámci NRatio <sub>HV</sub> ŠZ	Nepresvedčivý výsledok

Vzorka	VIC	FAM	Pomer	Stredný pomer	NRatio	Interpretácia
NK	2,415	1,782	0,738	0 747	1 000	Mutácia
NK	2,46	1,861	0,757	0,747	1,000	nezistená
PK	1,241	5,606	4,517	1 672	6 253	Mutácia
PK	1,182	5,706	4,827	4,072	0,233	zistená
HV	1,91	1,832	0,959	0 058	1 282	Hraničná
HV	2,035	1,946	0,956	0,950	1,202	vzorka
S 1	2,311	1,783	0,772	0 742	0.002	Mutácia
S 1	2,555	1,818	0,712	0,742	0,992	nezistená
S 2	1,097	5,745	5,237	1 276	5 723	Mutácia
S 2	1,437	4,764	3,315	4,270	5,725	zistená
S 3	2,265	2,149	0,949	0.027	1 0/1	Nepresvedčivý
S 3	2,435	2,206	0,906	0,921	1,241	výsledok
S 4	2,385	2,063	0,865	0.004	1 210	Nepresvedčivý
S 4	2,322	2,191	0,944	0,904	1,210	výsledok
ŠZ	1,205	1,359				

Tabuľka 15. Príklad výpočtu a interpretácie údajov fluorescencie

### Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: **www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.** Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na "Kontaktné informácie", strana 56).

#### Komentáre a návrhy

#### Signál pozitívnej kontroly je negatívny

a)Chyba pipetovania	Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie. Zopakujte cyklus PCR.
b)Nesprávne skladovanie komponentov súpravy	Skladujte <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit pri teplote od -30 do -15°C a zmes primerov a sond (ZPS) chráňte pred svetlom. Pozri "Skladovanie a manipulácia s činidlami", strana 10.
	Vyhnite sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.
	Alikvotné reagencie na skladovanie.

#### Negatívne kontroly sú pozitívne

Krížová kontaminácia	Vymeňte všetky kritické reagencie. Experiment opakujte s novými alikvotmi všetkých
	So vzorkami, komponentmi súpravy a spotrebným materiálom vždy zaobchádzajte v súlade so všeobecne uznávanými postupmi, aby ste zabránili kontaminácii pri prenose.

#### Ziadny signál, ani pri pozitívnych kontrolách

a)Chyba pipetovania alebo vynechanie reagencií	Skontrolujte schému pipetovania a nastavenie reakcie. Zopakujte cyklus PCR.
b)Inhibičné účinky materiálu vzorky spôsobené nedostatočnou purifikáciou	Zopakujte prípravu DNA.

<ul> <li>c)LightCycler: Bol zvolený nesprávny detekčný kanál</li> </ul>	Nastavte nastavenie kanálov na F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.
d)LightCycler: Nie je naprogramovaná žiadna akvizícia údajov	Skontrolujte programy cyklov. Vyberte režim akvizície "single" na konci každého segmentu hybridizácie primerov programu PCR.
Chýbajúci alebo je slabý s poriadku	signál vo vzorkách, ale pozitívne kontroly sú v

Nízka kvalita DNA alebo Pred začiatkom vždy skontrolujte kvalitu a koncentrácia DNA.

#### LightCycler: Intenzita fluorescencie je príliš nízka

a)Nevhodné skladovanie komponentov súpravy	Skladujte <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit pri teplote od -30 do -15°C a chráňte zmes primerov a sond (ZPS) pred svetlom. Pozri "Skladovanie a manipulácia s činidlami", strana 10.	
	Vyhnite sa opakovanému zmrazeniu a roztápaniu.	
	Alikvotné reagencie na skladovanie.	
b)Veľmi malé počiatočné	Zvýšte množstvo vzoriek DNA.	
mnozstvo cieľovej DNA	<b>Poznámka:</b> V závislosti od zvolenej metódy prípravy DNA sa môžu vyskytnúť inhibičné účinky.	

#### LightCycler: Intenzita fluorescencie sa líši

a)Chyba pipetovania	Variabilitu spôsobenú tzv. "chybou pipetovania" je možné znížiť analýzou údajov v režime F1/F2 alebo 530 nm/640 nm.
b)Nedostatočné odstredenie kapilár	Pripravená zmes PCR môže byť ešte vždy v hornej nádobe kapiláry, alebo môže byť v kapilárnom hrote zachytená vzduchová bublina. Kapiláry naplnené reakčnou zmesou vždy odstreďte, ako je to opísané v osobitnom návode na obsluhu nástroja.
c)Vonkajší povrch kapilárneho hrotu je znečistený	Pri manipulácii s kapilárami vždy noste rukavice.

## Kontrola kvality

V súlade so systémom riadenia kvality QIAGEN ISO, každá šarža*ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit je testovaná podľa vopred stanovených špecifikácií, aby sa zabezpečila konzistentná kvalita výrobkov. Certifikáty analýzy sú k dispozícii na vyžiadanie na adrese **www.qiagen.com/support/.** 

## Obmedzenia

Pred použitím tohto zariadenia musia byť používatelia zaškolení a oboznámení s touto technológiou. Táto súprava by sa mala používať podľa pokynov uvedených v tejto príručke v kombinácii s overeným nástrojom uvedeným v "Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú", strana 8.

Všetky získané diagnostické výsledky sa musia interpretovať v spojení s inými klinickými alebo laboratórnymi nálezmi. Používateľ je zodpovedný za overenie výkonu systému pre všetky postupy používané v jeho laboratóriu, na ktoré sa nevzťahujú štúdie výkonnosti QIAGEN.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom exspirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

## Charakteristiky účinnosti

## Neklinické štúdie

Vykonali sa neklinické štúdie s cieľom stanoviť analytickú výkonnosť *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit.

#### Presnosť

Boli testované tri úrovne riedenia genómovej DNA z bunkových línií nesúcich mutáciu JAK2 V617F v DNA divokého typu s *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit. Riedenia zodpovedajú mutačným zaťaženiam 1%, 2% a 3%. Nezávislé riediace šarže sa získali pre každú úroveň a replikácie týchto riedení sa testovali v 3 nezávislých experimentoch. Pomery získané pre každú vzorku DNA (Pomer<sub>Vzorka</sub>) boli porovnané s negatívnym kontrolným pomerom (JAK2 100% DNA divého typu, Pomer<sub>NK</sub>). Výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 16.

Tabuľka 16.	Presné	údaje	pre	neklinické	štúdie
-------------	--------	-------	-----	------------	--------

Úroveň mutácie	Pomer <sub>vzorka</sub> >Pomer <sub>NK</sub>	%CV (pomer)
1% V617F DNA	100% (n = 183)	6,8
2% V617F DNA	100% (n = 72)	4,5
3% V617F DNA	100% (n = 135)	5,1

#### Medzilaboratórne analitycké údaje

Uskutočnila sa multicentrická štúdia, do ktorej bolo zapojených 13 laboratórií. Analytické údaje sa zbierali o riedeniach genómovej DNA nesúcej mutáciu JAK2 V617F v DNA štandardného typu. V každom laboratóriu boli vykonané tri experimenty. Pre každý experiment sa testovali nasledujúce vzorky DNA z bunkových línií:

- 1 negatívna kontrola (NK) 0% V617F
- 1 pozitívna kontrola (PK) 100% V617F
- 1 hraničná vzorka (HV) 2% V617F
- 3 vzorky nesúce stredne veľké mutačné zaťaženie (20%, 50% a 80%)

Experimenty sa uskutočnili na siedmich rôznych nástrojových modeloch:

- ABI PRISM 7000 SDS
- Systém Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR
- Systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR
- ABI PRISM 7700 SDS
- ABI PRISM 7900 SDS
- LightCycler 2.0
- iCycler<sup>®</sup>

Výsledky sú zhrnuté vTabuľke 17.

#### Tabuľka 17. Medzilaboratórne analytické údaje získané z riedení genómovej DNA z bunkových línií nesúcich mutáciu JAK2 V617F v DNA divokého typu

Detekcia vzorky	Pozitívne vzorky	Negatívne vzorky	
JAK2 V617F	177*	0	
JAK2 divého typu	0	36	

\* Pozitívne vzorky zahŕňali 36 pozitívnych kontrol (PC-VF), 36 hraničných vzoriek (COS-VF; 2% V617F), 34 vzoriek nesúcich 20% JAK2 V617F, 35 vzoriek nesúcich 50% JAK2 V617F a 36 vzoriek nesúcich 80% JAK2 V617F.

## Klinické štúdie

#### Porovnanie medzi ipsogen JAK2 MutaScreen Kit a metódou ARMS®

Vzorky DNA od 141 pacientov s podozrením na MPN sa testovali súbežne s *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit a qPCR testom založenom na princípe amplifikačného refrakčného mutačného systému (ARMS) (11). Výsledky porovnania sú zobrazené v Tabuľke 18 (2 x 3 tabuľka náhodnosti) a Tabuľka 19 (percentuálna zhoda).

		Výsledky testovacej metódy ARMS		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 divého typu (JAK2 V617F <2%)	Celkom
JAK Výsledky testovacej metódy <i>ipsogen</i> ý vý JAK2 Muta <i>Screen</i> JAK	JAK2 V617F Mutácia zistená	91	0	91
	Nepresvedčiv ý výsledok	1	2	3
	JAK2 WT Mutácia nezistená	1	46	47
Celkom		93	48	n = 141

#### Tabuľka 18. Porovnanie medzi metódami: Súprava *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* a ARMS

#### Tabuľka 19. Porovnanie medzi metódami: Súprava *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* a ARMS

	Zhoda (%)	95% CI* (%)
Pozitívne údaje Zhoda medzi <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit a ARMS	98,9	94,1-99,8
Negatívne údaje Zhoda medzi <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit a ARMS	100	92,3-100
Úplná zhoda	99,3	96,0-99,9

\* Intervaly spoľahlivosti boli vypočítané podľa CLSI EP12-A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Protokol používateľa na vyhodnotenie kvalitatívnych výsledkov testu; Schválené usmernenie).

# Porovnanie medzi *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit a sekvenčným usporiadaním

Vzorky DNA od 51 pacientov s podozrením na MPN boli testované súbežne s testom *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit a referenčnou technikou ("gold standard"), priame sekvenčné usporiadanie. Jedna vzorka sa nedala interpretovať z dôvodu zlyhania sekvenčného usporiadania. Porovnanie výsledkov získaných z 50 interpretovateľných vzoriek je zhrnuté v Tabuľke 20 (2 x 3 tabuľka náhodnosti) a Tabuľka 21 (percentuálna zhoda).

ʻabuľka 20. Porovnanie medzi metódami: <i>ipsogen</i> JAK2 MutaS <i>creen</i> Kit	
sekvenčné usporiadanie	

		Výsledky priameho sekvenčného usporiadania		
		JAK2 V617F >2%	JAK2 divého typu (JAK2 V617F <2%)	Celkom
Výsledky testovacej metódy <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i>	JAK2 V617F Mutácia zistená	26	1	27
	Nepresvedčiv ý výsledok	0	1	1
	JAK2 WT Mutácia nezistená	2	20	22
Celkom		28	22	n = 50

# Tabuľka 21. Porovnanie medzi metódami: *ipsogen* JAK2 MutaScreen Kit a sekvenčné usporiadanie

	Zhoda (%)	95% CI* (%)
Pozitívne údaje Zhoda medzi <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit a sekvenčným usporiadaním	92,9	77,4-98,0
Negatívne údaje Zhoda medzi <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit a sekvenčným usporiadaním	95,2	77,3-99,2
Úplná zhoda	93,9	83,5-97,9

\* Intervaly spoľahlivosti boli vypočítané podľa CLSI EP12-A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Protokol používateľa na vyhodnotenie kvalitatívnych výsledkov testu; Schválené usmernenie).

#### Multicentrická štúdia na 228 vzorkách pacientov

Vzorky DNA od pacientov boli analyzované domácimi technikami domáceho v 13 laboratóriách zúčastňujúcich sa medzilaboratórnej štúdie. V každom laboratóriu sa uskutočnili 3 experimenty, pri ktorých sa použila DNA z bunkových línií, ako je opísané pre údaje neklinických údajov o presnosti (pozri vyššie), a s DNA od 10 pacientov dostupných v laboratóriu.

228 vzoriek so známym genotypom JAK2 sa testovalo súbežne s testom *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit a domácimi metódami vrátane kvalitatívnej PCR, alelovej špecifickej PCR, fluorescenčného prenosu energie rezonancie (FPER), sekvenčného usporiadania, alelovo špecifickej oligonukleotidovej PCR, RFLP a alelickej diskriminácie. Výsledky porovnaní sú zobrazené v Tabuľke 22 (2 x 3 tabuľka náhodnosti) a Tabuľka 23 (percentuálna zhoda).

		Výsledky domáceho testovania		
		Mutácia zistená JAK2 V617F	Mutácia nezistená JAK2 divého typu	Celkom
Výsledky testovacej metódy <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i>	JAK2 V617F Mutácia zistená	139	3	142
	Nepresvedčiv ý výsledok	5	17	22
	JAK2 WT Žiadna mutácia nezistená	3	61	64
Celkom		147	81	n = 228

# Tabuľka 22. Porovnanie medzi metódami: *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit a domáce metódy

# Tabuľka 23. Porovnanie medzi metódami: *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* Kit a domáce metódy

	Zhoda (%)	95% CI* (%)
Pozitívne údaje Zhoda medzi <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit a domácou metódou	97,9	94,0-99,3
Negatívne údaje Zhoda medzi <i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit a domácou metódou	95,3	87,1-98,4
Úplná zhoda	97,1	93,8-98,7

\* Intervaly spoľahlivosti boli vypočítané podľa CLSI EP12-A "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline" (Protokol používateľa na vyhodnotenie kvalitatívnych výsledkov testu; Schválené usmernenie).

#### Robustnosť: testovanie vzoriek od zdravých darcov

Vzorky DNA od 103 zdravých darcov krvi boli analyzované pomocou *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* RS Kit. Všetky vzorky boli detegované ako JAK2 divého typu. Analýza 38 vzoriek pomocou prístroja LightCycler 480 je znázornená na Obrázku 34.



**Obrázok 34. Analýza zdravých donorov.** LightCycler 480 analýza u 38 zdravých darcov (\*) s *ipsogen* JAK2 Muta*Screen* RS Kit (cat. no. 673123). Pozitívne výsledky v duplikáte (\*) zodpovedajú referenčnej stupnici dodávanej so súpravou. Hodnoty fluorescencie VIC sú zakreslené na osi x a hodnoty FAM sú zakreslené na osi y.

## Referenčná literatúra

- 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.

## Symboly

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť na balení a štítkoch:

∑ <n></n>	Obsahuje činidlá postačujúce na <n> reakcií</n>
$\sum$	Použite do
IVD	Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro
REF	Katalógové číslo
LOT	Číslo šarže
MAT	Číslo materiálu
GTIN	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
	Teplotné obmedzenia
<b>**</b> *	Výrobca
i	Prečítajte si návod na použitie

## Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese **www.qiagen.com/Support**, , na telefónnom čísle 00800-22-44-6000, alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú časť alebo navštívte lokalitu **www.qiagen.com).** 

## Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.	
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit (10)	Pre 10 reakcií: V617F pozitívna kontrola, V617F negatívna kontrola, V617F hraničná vzorka, zmes primerov a sond JAK2 divého typu a JAK2 V617F	673022	
<i>ipsogen</i> JAK2 Muta <i>Screen</i> Kit (24)	Pre 24 reakcií: V617F pozitívna kontrola, V617F negatívna kontrola, V617F hraničná vzorka, zmes primerov a sond JAK2 divého typu a JAK2 V617F	673023	
Rotor-Gene Q MDx — pre IVD-validované analýzy real-time PCR v klinických aplikáciách			
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032	
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie	9002033	

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite **www.qiagen.com** alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Táto strana je zámerne prázdna

Tento produkt je určený na diagnostické použitie in vitro. *ipsogen* produkty sa nemôžu opätovne predávať, upravovať na ďalší predaj ani používať na výrobu komerčných výrobkov bez písomného súhlasu spoločnosti QIAGEN.

Informácie uvádzané v tomto dokumente sa môžu zmeniť bez predchádzajúceho upozornenia. Spoločnosť QIAGEN nenesie žiadnu zodpovednosť za chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť v tomto dokumente. Tento dokument sa v čase uverejnenia považuje za úplný a presný. Spoločnosť QIAGEN v žiadnom prípade nezodpovedá za náhodné, špeciálne, viacnásobné alebo následné škody, ktoré vzniknú v súvislosti s používaním tohto dokumentu alebo vyplývajúce z jeho použitia.

Na produkty *ipsogen* sa poskytuje záruka, že spĺňajú uvedené špecifikácie. Jediný záväzok spoločnosti QIAGEN a jediný prostriedok nápravy zákazníkom je obmedzený na bezplatnú výmenu produktov v prípade, že produkty nebudú fungovať v súlade so zárukou.

Tento produkt sa predáva na základe licenčnej zmluvy so spoločnosťou Epoch Biosciences na použitie iba v diagnostike in vitro a nesmie sa používať na žiadny iný výskum, komerčný, klinický výskum ani na iné použitie mimo oblasti diagnostiky in vitro.

Mutácia JAK2 V617F a jej použitia sú chránené patentovými právami vrátane európskeho patentu EP1 692281, amerických patentov 7 429 456 a 7 781 199, amerických patentových prihlášok US20090162849 a US20120066776 a zahraničných náprotivkov.

Nákup tohto produktu neposkytuje žiadne právo na jeho použitie na klinické skúšky liekov zameraných na JAK2 V617F. QIAGEN vyvíja špecifické licenčné programy pre takéto použitie. Kontaktujte naše právne oddelenie na jak2licenses@qiagen.com.

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

#### Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa ipsogen JAK2 MutaScreen Kit s nasledovnými podmienkami:

- ipsogenJAK2 MutaScreen Kit môže byť použitý výlučne len v súlade s príručkou ipsogen JAK2 MutaScreen Kit a na použitie iba s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy s akýmikoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v príručke ipsogen JAK2 MutaScreen Kit a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com.
- Iné než výslovne uvedené licencie spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
- 3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použítie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
- 4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
- 5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k ním napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

#### Aktualizované licenčné podmienky nájdete na www.giagen.com.

HB-1371-003 © 2013-2016 QIAGEN, všetky práva vyhradené.



www.qiagen.com

## Sample & Assay Technologies