راهنمای کیت JAK2 RQ

جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-10-301

ویرایش ۳/۱

فروردین ۱۳۹۷

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۲
۲. محتویات کیت ۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۳
۴. سایر موارد مورد نیاز ۳
۵. نکات قابل توجه ۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۵
۷. عوامل مزاحم ۵
۸. استخراج DNA ۶
۹. کنترل داخلی ۶
۱۰. دستورکار PCR ۷
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۷
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne ۸
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها ۸
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۹
۱۵. آنالیز نتایج StepOne ۱۱
۱۶. میزان حساسیت ۱۳

کیت JAK2 RQ برای تشخیص موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی با استفاده از دستگاه های Rotor-Gene 6000/Q و StepOne طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

JAK2 مخفف Janus Kinase 2 است و معرف یک تیروزین کیناز است که در سیتوپلاسم واقع شده است. این آنزیم نقش مهمی در انتقال پیام های سیتوکین ها و هورمون های رشد دارد. موتاسیون اکتسابی G1849T درژن این آنزیم باعث جایگزینی آمینو اسید فنیل آلانین به جای والین می شود (V617F). در نتیجه این موتاسیون، JAK2 به صورت دائمی فعال شده و موجب رشد مهار نشده ی سلول در غیاب هورمون های رشد می شود. این موتاسیون در اکثر بیماران دچار اختلالات myeloproliferative که BCR-ABL منفی می باشند مشاهده می شود. همچنین این موتاسیون یکی از ابزارهای تشخیصی پایه در polycythemia vera (PV)، essential thrombocythemia (ET) و primary myelofibrosis (PMF) می باشد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص این موتاسیون را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. در این روش با استفاده از پروب های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که علاوه بر کنترل کیفیت استخراج نمونه، از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR نیز پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
JAK2 Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
Pos Ctrl 5%	شاهد مثبت ٪۵	۵۰ میکرولیتر
Pos Ctrl 0.1%	شاهد مثبت ٪۰/۱	۵۰ میکرولیتر
Negative Ctrl	شاهد منفی	۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیتهای ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر و بیش از سه بار این مواد خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)

- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخهای قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

- نمونه مناسب برای آزمایش JAK2 با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود.
- DNA را می توان مستقیماً از خون کامل استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد. یک نمونه مناسب باید حاوی پنج تا بیست میلیون گلبول سفید در هر میلی لیتر باشد.
- برای نگهداری نمونه در زمان های طولانی تر از چند روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمیکند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA و احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس واکنش علاوه بر JAK2، حاوی پرایمرها و پروب مخصوص یک ژن انسانی نیز می باشد. کنترل داخلی باید به تولید فلورسانس با تابش

زرد (VIC) و CT بین ۲۲ تا ۲۵ برای Rotor-Gene و ۲۴ تا ۲۸ برای دستگاه StepOne منجر شود. برای توضیحات بیشتر به بخش آنالیز رجوع کنید.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

برای رسیدن به حساسیت لازم، نمونه DNA استخراج شده باید دارای غلظت حدود ۲۵-۵۰ ng/µl باشد.

۱۰. دستورکار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، سه لوله برای شاهدهای مثبت، منفی و آب نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از JAK2 Mix اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا شاهد یا آب به هر لوله اضافه نمایید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل JAK2 0.2 و یا JAK2 0.1 (با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده) دو بار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده ضمیمه را انتخاب کنید. از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه View Well Table را انتخاب کنید. یک کنترل مثبت، یک کنترل منفی، یک NTC و پنج نمونه از پیش تعریف شده اند. کنترل ها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) میتوانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

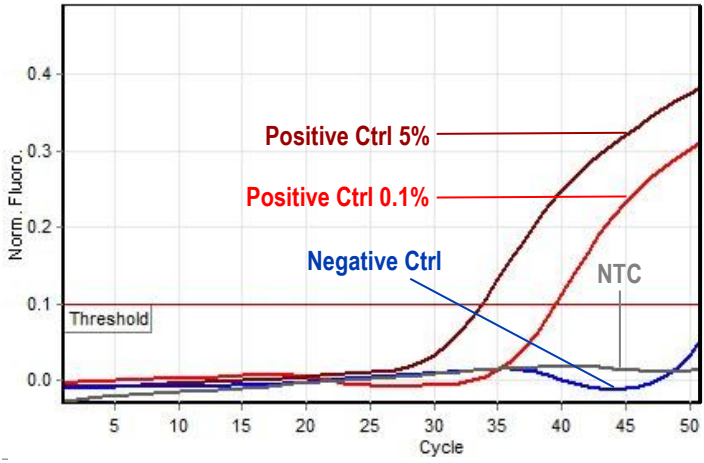
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

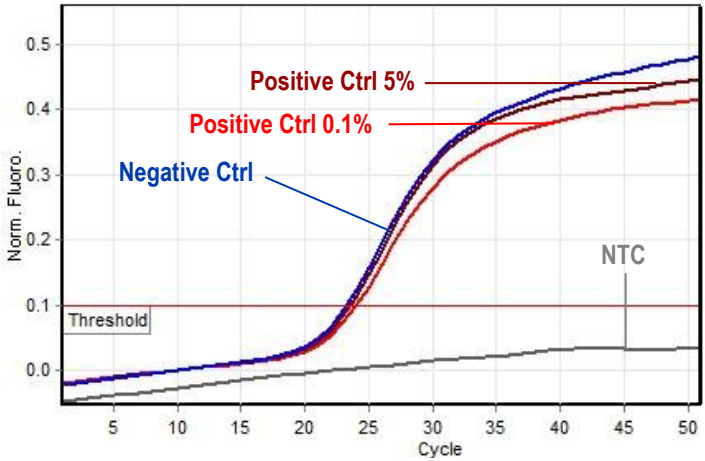
JAK2 Mix حاوی ROX است. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nMمیباشد.

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ و بالاتر از فلورسانس زمینه (نمونه منفی) قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱. نمودار شاهدهای JAK2 درکانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲. نمودارکنترل داخلی JAK2 درکانال زرد دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز **(Green)** مربوط به **JAK2** و افزایش تابش زرد **(Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

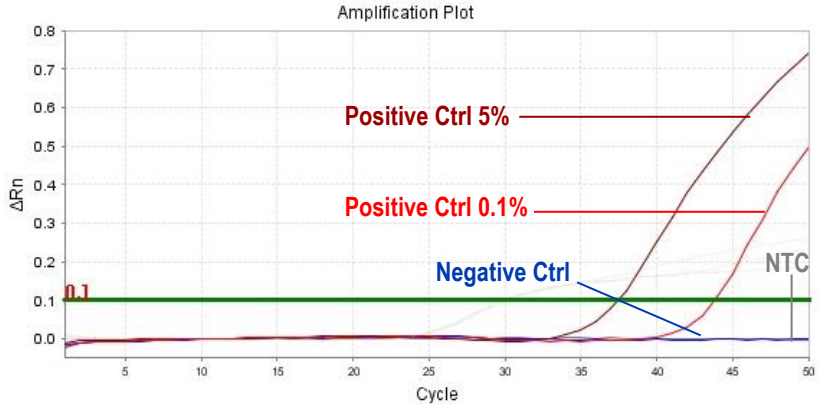
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و (CT آن)در صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

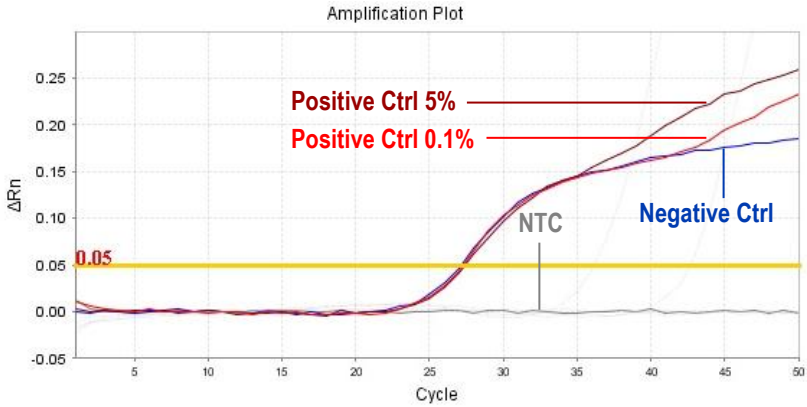
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باشد و در کانال زرد نیز دارای منحنی سیگموییدی با CT بین ۲۲ تا ۳۰ باشد،نمونه **مثبت** می باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال سبز منفی و فاقد منحنی سیگموییدی باشد، ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باCT بین ۲۲ تا ۲۵ باشد، نمونه **منفی** می باشد.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی و فاقد منحنی سیگموییدی باشد، آزمایش باید **تکرار** شود. در چنین مواردی احتمال خطا در انجام آزمایش و یا خطا در استخراج نمونه وجود دارد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی و فاقد منحنی سیگموییدی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی با CT بالاتر از ۲۵ باشد، آزمایش باید **تکرار** شود. در چنین مواردی غلظت DNA نمونه پایین بوده و میتواند منجر به گزارش **منفی کاذب** شود.

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای JAK2/FAM آستانه (threshold) رابالاتراز فلورسانس نمونه منفی و روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها وکنترل داخلی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمائید.



تصویر ۳. نمودار شاهدهای JAK2 درکانال FAM دستگاهStepOne



تصویر ۴. نمودار کنترل داخلی درکانال VIC دستگاهStepOne

توجه داشته باشید که افزایش تابش **FAM** مربوط به **JAK2** و افزایش تابش **VIC** حاصل از **کنترل داخلی**می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و (CT آن)در صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باشد، و در کانال VIC نیز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی با CT بین ۲۴ تا ۲۸ باشد، نمونه **مثبت** می باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال FAM منفی و فاقد منحنی سیگموییدی باشد، ولی در کانال VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی با CT بین۲۴ تا ۲۸ باشد، نمونه **منفی** می باشد.

- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال VIC و FAM منفی و فاقد منحنی سیگموییدی باشد، آزمایش باید **تکرار** شود. در چنین مواردی احتمال خطا در انجام آزمایش و یا خطا در استخراج نمونه وجود دارد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال FAM منفی و فاقد منحنی سیگموییدی باشد ولی در کانال VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی با CT بالاتر از ۲۸ باشد، آزمایش باید **تکرار** شود. در چنین مواردی غلظت DNA نمونه پایین بوده و میتواند منجر به گزارش **منفی کاذب** شود.

۱۶. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل یک در هزار یا ۰/۱٪ می باشد.به بیان دیگر در صورتی که از هزار گلبول سفید تنها یکی دارای این جهش باشد، در ۹۵٪ موارد توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. برای رسیدن به این میزان حساسیت، نمونه استخراج شده باید حاوی ۲۵ تا ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر باشد.

JAK2 RQ Kit Manual

For Real-Time PCR Detection of JAK2 V617F Mutation

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-10-301
Version 3.1
April 2018

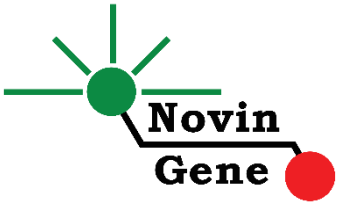


Table of Contents:

1. Introduction.....2
2. Kit Contents 3
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions.....3
5. Additionally Required Materials 4
6. Specimen, storage and transport 4
7. Interfering Substances.....4
8. DNA isolation.....5
9. Internal control (IC) 5
10. PCR Protocol.....5
11. Programming Rotor-Gene 6
12. Programming StepOne 6
13. Programming other machines.....6
14. Data Analysis: Rotor-Gene 7
15. Data Analysis: StepOne 8
16. Sensitivity 10

JAK2 RQ kit is intended for detection of JAK2 V617F mutation in human genomic DNA with Rotor-Gene 6000/Q or StepOne instrument. This kit is for research use only

1. Introduction

JAK2 (Janus Kinase 2) is a Tyrosine Kinase located in cytoplasm with essential role in signaling pathways for cytokines and growth factors. The acquired mutation G1849T replaces valine with phenylalanine (V617F). This substitution results in constitutively active JAK2 which leads to uncontrolled cell proliferation in the absence of growth factors. This mutation is found in the majority of BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders (MPDs) and has become a main diagnostic test for polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF).
JAK2 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of JAK2 V617F mutation with Rotor-Gene or StepOne machines. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.
This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to evaluate DNA extraction quality or PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
JAK2 Mix	PCR Master mix*	480 µl
Pos Ctrl 5%	Positive Control 5%	50 µl
Pos Ctrl 0.1%	Positive Control 0.1%	50 µl
Negative Ctrl	Negative Control	50 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits, respectively.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at-20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on crushed icecompletely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice while working.

- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood is the suitable sample for JAK2 test. We recommend EDTA or citrate as anticoagulant.
DNA can directly be extracted from whole blood. Alternately to increase sensitivity buffy coat can be used. For optimum results, a sample should contain about 5 to 20 million WBC per milliliter.
Whole blood or buffy coat can be shipped and stored at +4°C for few days or can be aliquoted and stored at -20°C which is stable for few months.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

To reach the sensitivity of 0.1%, extracted DNA should have a concentraton of 25-50 ng/ul.

9. Internal Control (IC)

To examine DNA extraction quality as well as the presence of PCR inhibitors and to prevent false negative results, primers and probe for an *Internal Control* (a housekeeping gene) is included in the PCR Master Mix. Internal control should generate a CT of 22-25 in Rotor-Gene and a CT of 24-28 in StepOne. See analysis section for more details.

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cooling or loading block. Consider one tube for each sample plus three for Positive control, Negative control and NTC.

Pipette 20ul of JAK2 Mix directly to each tube followed by adding 5ul of control or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached thelocking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on "JAK2 0.2" or on "JAK2-strip" depending on the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on "Template" and select the file on CD provided with the kit.Click on "Plate Setup". Few samples along with controls are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC/HEX dyes.
JAK2 Mix contains 300nM ROX in final reaction.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform qualitative analysis for **JAK2 (Green channel)** and **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on "Analysis" menu and then under "Quantitation" tab, double click on "Cycling A. Green".

Close the pop up for Automatic Threshold and set the threshold on 0.1 and above background or Negative control.

Repeat the above for "Cycling A. Yellow" and manually set threshold on 0.1.

Refer to figures 1 and 2 for typical graphs.

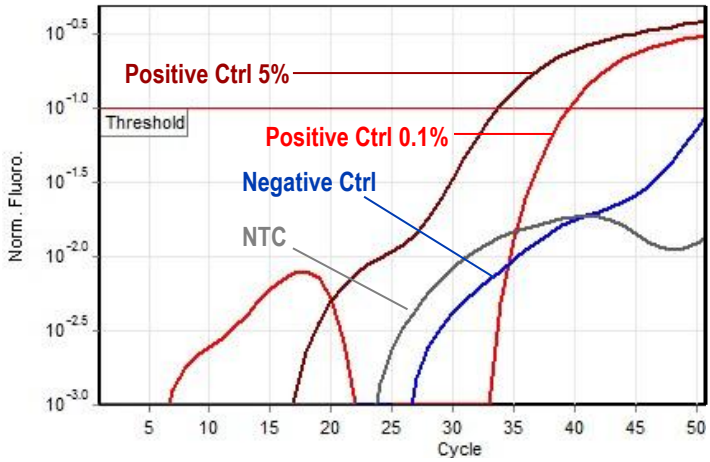


Figure 1. Typical graph of JAK2 controls in green channel for Rotor-Gene

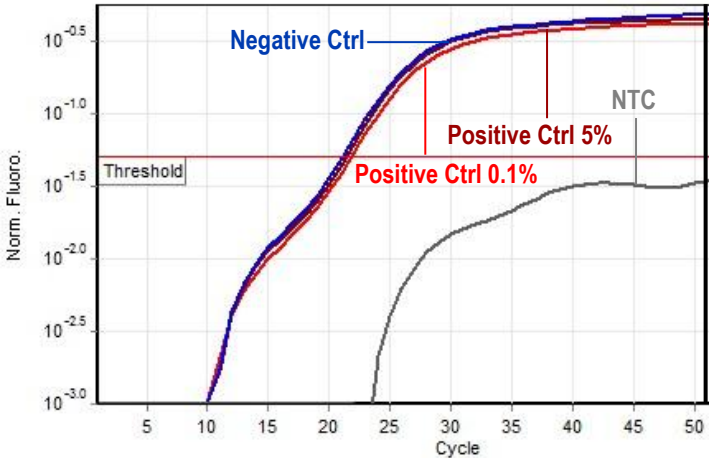


Figure 2. Typical IC graph in yellow channel for Rotor-Gene

Consider following points when analyzing:

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

- A sample is **Positive** when it is positive in Green channel with a sigmoid graph and also positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 22-25.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel but, positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 22 to 25.
- Results are **inconclusive** if a sample is negative in both of Green and Yellow channels. Improper DNA extraction or test set up could be the cause.

- Results are **inconclusive** if a sample is negative in Green channel but, positive in Yellow channel with CTs higher than 25. Low DNA concentration could be the cause.

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on "Analyze" and set the threshold at 0.1 for **JAK2 (FAM channel)** and 0.05 for **Internal Control (VIC channel)**.
Refer to figures 3 and 4 for typical graphs.

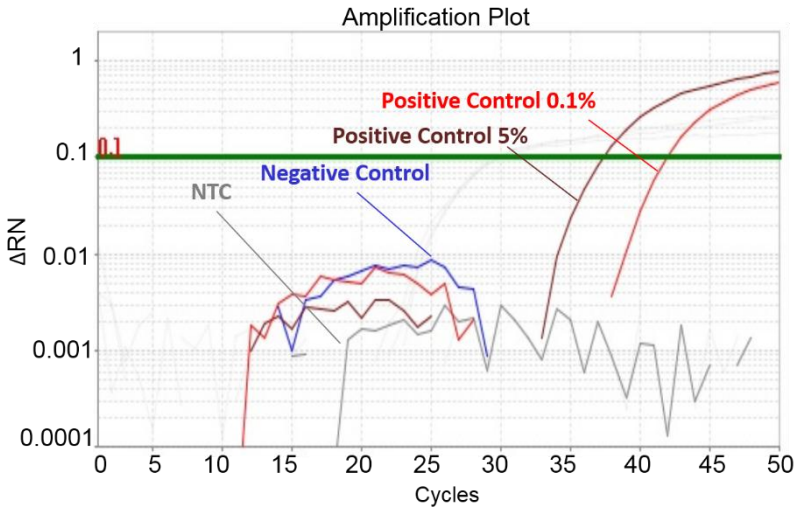


Figure 3. Typical graph for JAK2 controls in FAM Channel for StepOne

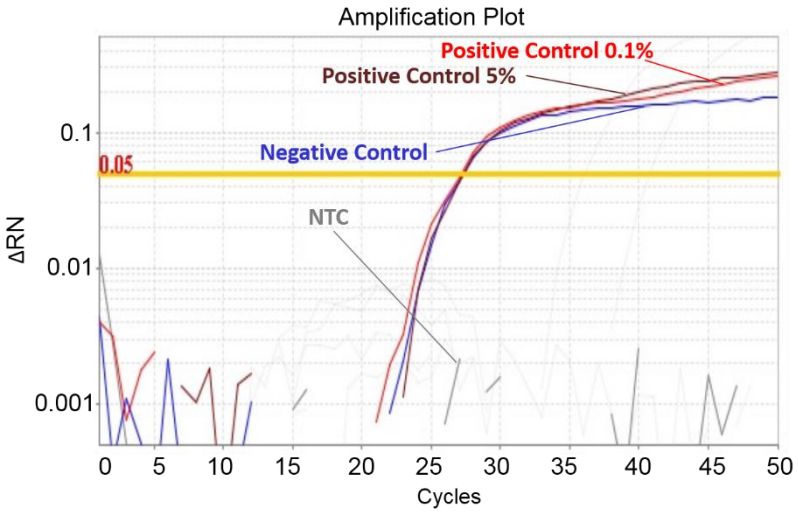


Figure 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.
In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** when it is positive in FAM channel with a sigmoid graph and also positive in VIC channel with a sigmoid graph and CT of 24-28.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM channel but, positive in VIC channel with a sigmoid graph and CT of 24-28.
- Results are **inconclusive** if a sample is negative in both of FAM and VIC channels. Improper DNA extraction or test set up could be the cause.

- Results are **inconclusive** if a sample is negative in FAM channel but, positive in VIC channel with CTs higher than 28. Low DNA concentration could be the cause.

16. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the positive target in negative DNA and showed a limit of detection equal to 0.1% or 1 in 1,000. In other words, if in 1,000 cells only one is positive, it will be detected in 95% cases. To meet this level of sensitivity, extracted sample should contain 25-50 ng/µl DNA.