

therascreen[®] GIST RapidScreen Pyro[®] rinkinio vadovas



1 versija

IVD

In vitro diagnostiniam naudojimui



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R2 **MAT** 1075556LT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN yra inovacinių mėginių ir tyrimų technologijų, leidžiančių išskirti ir nustatyti bet kokio biologinio mėginio turinį, lyderis. Mūsų pažangūs, aukštos kokybės produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio paėmimo iki rezultato gavimo.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų išgryninimas
- Nukleino rūgščių ir baltymų tyrimai
- mikroRNR ir RNRi tyrimai
- Mėginių ir tyrimų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas yra padėti jums pasiekti išskirtinę sėkmę ir laimėjimus. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, apsilankykite adresu www.qiagen.com.

Turinys

Numatytas naudojimas

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinys yra in vitro nukleino rūgščių sekos pagrindo aptikimo tyrimas, kurio pagrindas yra Pyrosequencing® technologija, skirtas kiekybiniam mutacijų aptikimui žmogaus *KIT* geno 9 egzone ir žmogaus *PDGFRA* geno 18 egzone genominėje DNR, gaunamoje iš žmogaus audinio mėginių.

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinys turi suteikti gydytojams informacijos, padedančios gydyti pacientus, kuriems diagnozuotas virškinimo trakto stromos navikas (VTSN) ir tiems, kurie vartoja vaistus, nukreiptus į signalinius kelius, pvz., imatinibas. Jis skirtas in vitro diagnostiniam naudojimui.

Rinkinį galima naudoti tik su PyroMark® Q24 sistema. Į PyroMark Q24 sistemas įeina šie komponentai:

- PyroMark Q24 instrumentas ir PyroMark Q24 MDx instrumentas.
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation ir PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- PyroMark Q24 Software (2.0 versija) ir PyroMark Q24 MDx Software (2.0 versija).

Produktą turi naudoti profesionalūs vartotojai, pvz., technikai ir gydytojai, apmokyti atlikti in vitro diagnostikos procedūras, naudoti molekulinės biologijos technikas ir PyroMark Q24 sistemą.

Produkto negalima naudoti su plaučių audinio mėginiais.

Santrauka ir paaiškinimas

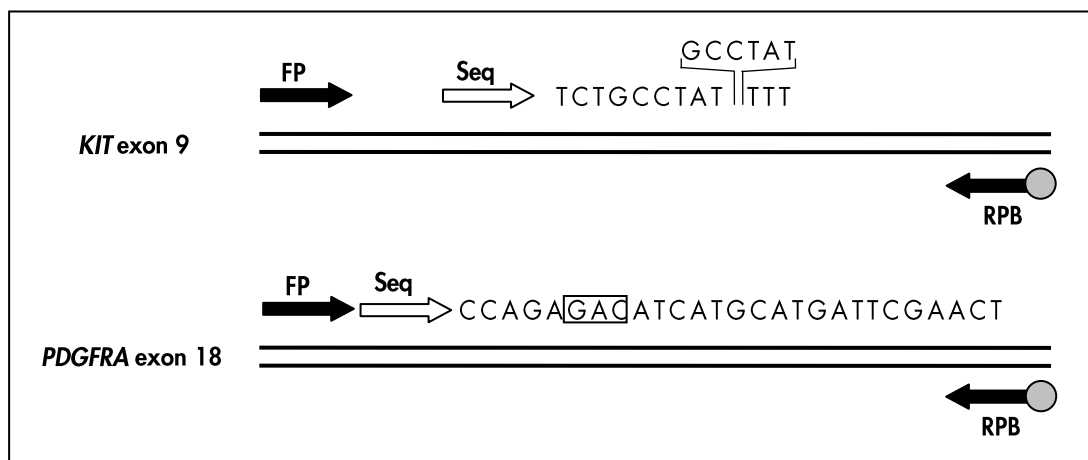
therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinys yra naudojamas kiekybiniam mutacijų matavimams *KIT* 9 egzone ir *PDGFRA* 18 egzone (žr. 1 pav.). *KIT* 9 egzono mutacijų aptikimas leidžia naudoti atitinkamą dozę imatinibo, o *PDGFRA* 18 egzono mutacijų aptikimas padeda atmesti ne tokius jautrius arba atsparius genotipus (1–3).

<i>KIT</i>	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCC
9	ACCGTTTGGAAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCAC
egzonas	AATGGCACGGTTGAATGTAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTAT TTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAACAAAG
<i>PDGFR</i>	
A	
18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC
egzonas	TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGCATCATGCATGATTCGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

1 pav. Žmogaus *KIT* ir *PDGFRA* genų sekvenuojamų sričių genomis kontekstas (Ensembl IDs ENSG00000157404 ir ENSG00000134853). *KIT* geno 503 kodoną ir *PDGFRA* geno 842 kodoną rodo kvadratėliai.

Rinkinį sudaro du tyrimai: vienas yra skirtas mutacijų aptikimui *KIT* 9 egzone, o kitas – mutacijų aptikimui *PDGFRA* 18 egzone (2 pav.). Dvi sritys atskirai amplifikuojamos PGR metu ir sekvenuojamos tikslinę sritį. Aplink nustatytas padėtis esančios sekos veikia kaip normalizacijos ir atskaitinės viršūnės, rodančios analizės kiekio nustatymą ir kokybės vertinimą.

Pastaba: Abu rinkiniai sekvenuojami tiesiogine kryptimi.



2 pav. *KIT/PDGFRA* tyrimų pavaizdavimas. Parodyta seka yra analizuojama laukinio tipo mėginio seka. Parodyta 6 bp dubliavimo *KIT* 9 egzone padėtis ir sekvenavimas. Kvadratėlis rodo *PDGFRA* 18 egzono 842 kodoną. FP: Tiesioginiai PGR pradmenys; RPB: Atvirkštiniai PGR pradmenys (B reiškia biotinilaciją); Seq: Sekvenavimo pradmenys

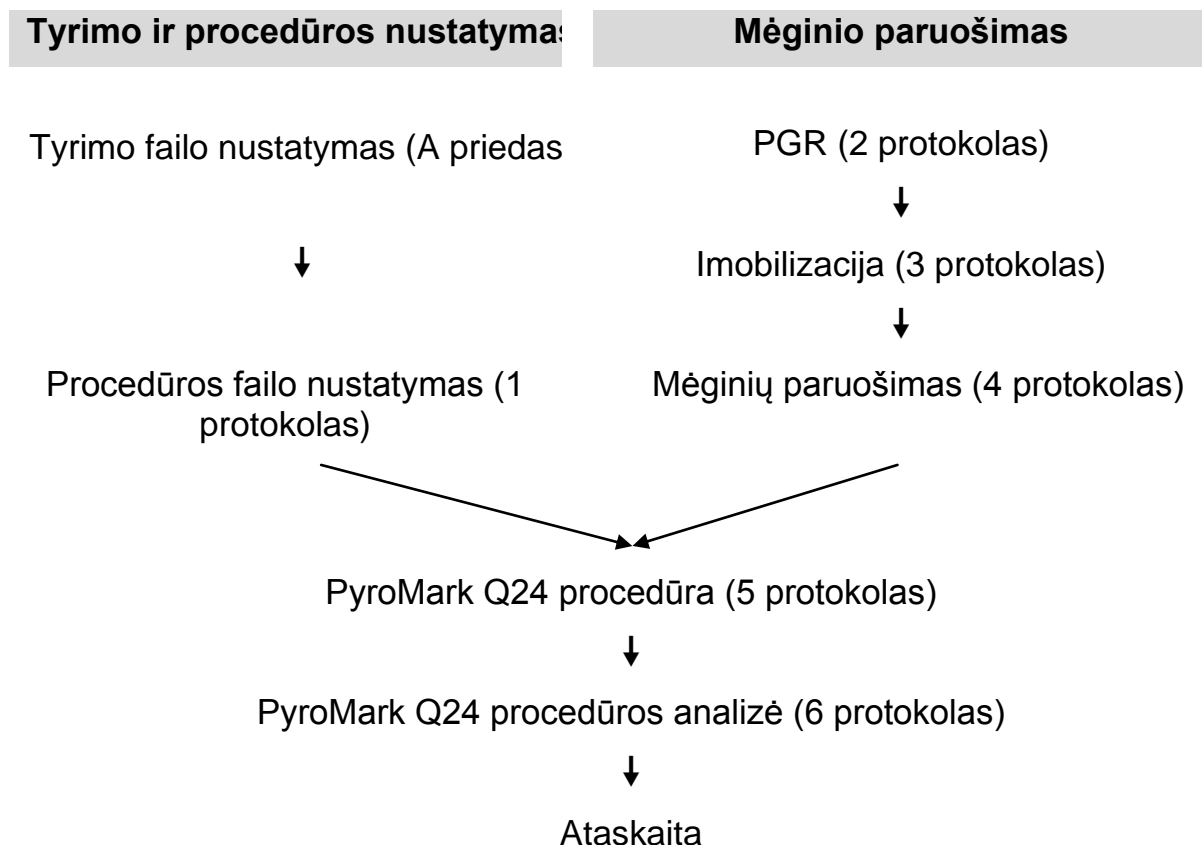
Produktą sudaro PGR pradmenų mišinys ir sekvenavimo pradmuo, skirti kiekvienam tyrimui. Pradmenys tiekiami tirpale. Kiekviename buteliuke yra 32 µl kiekvieno pradmens arba pradmenų mišinio.

Procedūros principas

Žemiau parodyta darbo eiga iliustruoja visą tyrimo procedūrą. Po PGR panaudojus pradmenis, skirtus į *KIT 9* egzoniui ir *PDGFRA 18* egzoniui, amplikonai imobilizuojami ant Streptavidin Sepharose® High Performance rutuliukų. Paruošiama vienos grandinės DNR ir atitinkami sekvenavimo pradmenys atkaitinami prie DNR. Tada mėginiai analizuojami su PyroMark Q24 naudojant procedūros nustatymo failą ir procedūros failą.

Rekomenduojama procedūros analizavimui naudoti GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą. GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą galima gauti el. paštu pyro.plugin@qiagen.com. Tačiau procedūros analizę taip pat galima atlikti su analizės įrankiu, įeinančiu į PyroMark Q24 sistemą. „Sequence to Analyze“ galima pritaikyti retų mutacijų aptikimui po procedūros (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl., ir „A priedas: *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimų nustatymas“, 47 psl.).

therascreen GIST RapidScreen Pyro procedūros darbo eiga



Kontrolės

Nedenatūruota kontrolinė DNR įeina į rinkinį kaip PGR ir sekvenavimo reakcijų teigiama kontrolė. Ši kontrolinė DNR turi laukinio tipo genotipą

sekvenuojamose srityse ir yra reikalinga norint tinkamai interpretuoti rezultata bei identifikuoti žemo lygio mutacijas (žr. „Rezultatų interpretavimas“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.). Kiekvienam tyrimui per kiekvieną Pyrosequencing procedūrą įtraukite mėginį su nedematūruota kontroline DNR.

Be to, per kiekvieną PGR nustatymą mažiausiai su vienu tyrimu reikia įtraukti neigiamą kontrolę (be šabloninės DNR).

Tiekiamos medžiagos

Rinkinio turinys

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinys (1/2 dėžių)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro rinkinys (24)	(24)
Katalogo Nr.	971510
Reakcijų skaičius	24
Seq Primer KIT 9 egzonas	32 µl
Seq Primer PDGFRA 18 egzonas	32 µl
PGR Primer Mix KIT 9 egzonas	32 µl
PGR Primer Mix PDGFRA 18 egzonas	32 µl
PyroMark PGR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl	100 µl

therascreen Pyro buferiai ir reagentai (2/2 dėžių)

therascreen Pyro buferiai ir reagentai	
PyroMark Binding Buffer	10 ml
PyroMark Annealing Buffer	10 ml
PyroMark Denaturation Solution*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x	25 ml
Enzyme Mixture	1 buteliukas
Substrate Mixture	1 buteliukas
dATP α S	1180 μ l
dCTP	1180 μ l
dGTP	1180 μ l
dTTP	1180 μ l
therascreen <i>GIST RapidScreen Pyro</i> rinkinio vadovas (anglų kalba)	1

* Sudėtyje yra natrio hidroksido.

Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, prašom perskaityti atitinkamus saugos duomenų lapus.

Reagentai

- DNA išskyrimo rinkinys (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalogo Nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Labai švarus vanduo (Milli-Q[®] 18.2 M Ω x cm ar jo atitikmuo)

Pastaba: Rinkinyje tiekiami pakankamai vandens PGR, DNR imobilizavimui bei Enzyme Mixture ir Substrate Mixture ištirpinimui; papildomas labai švarus vanduo yra reikalingas norint 10x atskiesti PyroMark Wash Buffer, 10x.

- Etanolis (70%)*

Vartojimo priedai

- Sterilūs pipečių antgaliai (su filtrais PGR supilstymui)
- 24 šulinėlių PGR plokštelės (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.)
- Lipni folija

Įranga

- Pipetės (reguliuojamos)[†]
- Stalinė mikrocentrifuga[†]
- Termomaišytuvas[†] ir atitinkami PGR mėgintuvėliai
- PyroMark Q24 (katalogo Nr. 9001513 ar 9001514)^{†‡}
- PyroMark Q24 Software (katalogo Nr. 9019063 ar 9019062)[‡]
- PyroMark Q24 Plate (katalogo Nr. 979201)[‡]
- PyroMark Q24 Cartridge (katalogo Nr. 979202)[‡]
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (katalogo Nr. 9001515 ar 9001517)^{†‡}
- Rutuliukų imobilizavimui skirtas plokštelių maišytuvas[†] (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.)
- Kaitinimo blokas[§], galintis pasiekti 80°C

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų substancijų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

[†] Įsitikinkite, kad instrumentai buvo patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

[‡] Pažymėtas CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EB. Visi kiti į sąrašą įtraukti produktai nėra pažymėti CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EB.

[§] Įsitikinkite, kad instrumentai buvo patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Rekomenduojamos 24 šulinėlių plokštelės

Su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu rekomenduojama naudoti Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. Išvardintas 24 šulinėlių plokšteles.

1 lentelė. 24 šulinėlių plokštelės, rekomenduojamos naudoti su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu

Gamintojas	Produktas	Katalogo Nr.
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PGR plokštelė	AB-0624
Axygen	24 šulinėlių PGR mikroplokštelė	PGR-24-C
4titude	FrameStar® 96 nulaužiami šulinėliai, skaidrūs mėgintuvėliai	4ti-1000
Kisker	Quali – PGR plokštelės be rėmo	G030

Rekomenduojami plokštelių maišytuvai

Su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu rekomenduojama naudoti Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. išvardintus plokštelių maišytuvus.

2 lentelė. Plokštelių maišytuvai, rekomenduojami naudoti su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu

Gamintojas	Produktas	Katalogo Nr.
	Komfortiškas termomaišytuvas (bazinis produktas)	5355 000.011
Eppendorf	MTP termoblokas	5363 000.012
	Adapterio plokštelė, skirta 96 x 0.2 ml PGR mėgintuvėliams, įdedamiems į mikrotitrinių plokštelių blokus	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

In vitro diagnostiniam naudojimui.

Saugumo informacija

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, prašom perskaityti atitinkamus saugos duomenų lapus. Juos rasite internete patogiu ir kompaktišku PDF formatu adresu www.qiagen.com/safety, kur jūs galėsite susirasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir rinkinio komponento saugos duomenų lapus.

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinio komponentams taikomos šios rizikos ir saugumo frazės:

PyroMark Denaturation Solution



Atsargiai! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Gali ēsdinti metalus. Absorbuoti išsiliejusią medžiagą, siekiant išvengti materialinės žalos. Laikyti tik originalioje talpykloje. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Bendrosios atsargumo priemonės

Vartotojas visada privalo atkreipti dėmesį į šiuos dalykus:

- Norėdami gauti optimalius rezultatus, visada griežtai laikykitės vadove pateiktų nuorodų. Nerekomenduojama skiesti reagentų kitaip negu aprašyta šiame vadove, nes pablogės jų veikimas.
- Šio produkto komponentų pakanka 24 reakcijoms atliekant 5 atskiras procedūras.
- Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais (PGR supilstymui).
- Laikykite ir ištraukite teigiamas medžiagas (mėginius, teigiamas kontroles ir amplikonus) atskirai nuo visų kitų reagentų ir sulašinkite jas į reakcijos mišinį naudodami erdvės atžvilgiu atskirtą įrangą.
- Prieš pradėdami tyrimą, gerai atitirpinkite visus komponentus kambario temperatūroje (15-25°C).
- Atitirpinę išmaišykite komponentus (pakartotinai pipetuojuant aukštyn ir žemyn arba atlikdami impulsų sukuriavimą) ir trumpai centrifuguokite.
- Nepavykę rezultatai nėra priežastis spręsti apie mutacinę būklę.

Reagentų laikymas ir apdorojimas

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinys yra tiekiamas dviejose dėžėse. *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinys (1/2 dėžių) yra gabenamas ant sauso ledo. Atvežtus PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, Unmethylated Control DNA ir visus pradmenis reikia laikyti $-15 - -30^{\circ}\text{C}$.

therascreen buferiai ir reagentai (2/2 dėžių) su buferiais, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP α S, dCTP, dGTP ir dTTP (reagentais Pyrosequencing analizei) yra gabenami ant vėsių paketų. Atvežtus šiuos komponentus reikia laikyti $2-8^{\circ}\text{C}$. Norint iki minimumo sumažinti aktyvumo praradimą, patartina laikyti fermento mišinį ir substrato mišinį tiekiamuose buteliukuose.

Atskiesti fermento ir substrato mišiniai yra stabilūs mažiausiai 10 dienų $2-8^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Atskiestus fermento ir substrato mišinius galima užšaldyti ir laikyti buteliukuose $-15 - -30^{\circ}\text{C}$. Su šaldytais reagentais negalima atlikti daugiau kaip 6 užšaldymo-atitirpinimo ciklų.

Pastaba: Nukleotidų negalima šaldyti.

Laikant tokiomis sąlygomis, *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinys išlieka stabilus iki rinkinio galiojimo datos pabaigos.

Mėginių apdorojimas ir laikymas

Visus mėginius reikia apdoroti kaip potencialiai užkrečiamą medžiagą.

Mėginių medžiaga yra žmogaus DNR, išskirta iš formaline fiksuotų, į parafiną įterptų (FFPE) mėginių.

Negalima naudoti žmonių, kuriems taikomas gydymas heparinu, mėginių. Negalima naudoti kraujo mėginių, paimtų į mėgintuvėlius, kuriuose kaip antikoagulianto yra heparino. Heparinas įtakoja PGR.

Procedūra

DNR išskyrimas

Sistemos veikimas buvo nustatytas naudojant EZ1[®] DNA Tissue rinkinį ir QIAamp[®] DNA FFPE Tissue rinkinį, skirtą žmogaus DNR išskyrimui iš formaline fiksuotų, į parafiną įterptų auglio mėginių. Naudojant QIAamp DSP DNA Blood Mini rinkinio sistemą, veikimas buvo nustatytas naudojant sveikų donorų kraujo mėginius, dalinai papildytus navikinėmis ląstelėmis.

3 lentelėje parodyti QIAGEN[®] rinkiniai yra rekomenduojami DNR išgryninimui iš nurodyto tipo žmogaus mėginių ir yra skirti naudojimui su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu. Išgryninkite DNR pagal instrukcijas rinkinių vadovuose.

3 lentelė. DNR išgryninimo rinkiniai, rekomenduojami naudoti su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu

Mėginio medžiaga	Nukleino rūgščių išskyrimo rinkinys	Katalogo Nr. (QIAGEN)
Parafine įterptas audinys	QIAamp DNA FFPE Tissue rinkinys (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue rinkinys (48)*	953034
Kraujas	QIAamp DSP DNA Blood Mini rinkinys [†]	61104

* Laikykitės į parafiną įterpto audinio naudojimo protokolo. EZ1 DNA Tissue rinkinys turi būti naudojamas kartu su EZ1 Advanced (katalogo Nr. 9001410 arba 9001411) ir EZ1 Advanced DNA parafino dalies kortele (katalogo Nr. 9018298), su EZ1 Advanced XL (katalogo Nr. 9001492) ir EZ1 Advanced XL DNR parafino dalies kortele (katalogo Nr. 9018700) arba BioRobot[®] EZ1 (katalogo Nr. 9000705; nebegaminama) ir EZ1 DNA parafino dalies kortele (katalogo Nr. 9015862).

[†] CE-IVD pažymėtas pagal ES direktyvą 98/79/EC.

1 protokolas: Procedūros nustatymas PyroMark Q24 sistemai



Svarbus patarimas prieš pradėdant

- Prireikus galima patvirtinti TVR su laukinio tipo mėginiu, kad būtų generuota pilna rezultatų plokštelė. Smulkmenas rasite CLSI potvarkyje EP17-A „Aptikimo ribų ir kiekio apskaičiavimo ribų nustatymo protokolas; patvirtintas potvarkis“.

Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Jeigu neinstaliuota GIST RapidScreen įjungiamo ataskaita, sukurkite tyrimo nustatymą (žr. „A priedas: *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimų nustatymas“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.). Tai turi būti padaryta prieš pirmą kartą atliekant *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimą. Jeigu instaliuota GIST RapidScreen įjungiamo ataskaita, iš anksto nustatytus tyrimo nustatymus rasite PyroMark Q24 software trumpųjų šaukinių naršyklėje, takelyje „Example Files/PyroMark Setups/GIST“. GIST rapidScreen įjungiamą ataskaitą gausite, jeigu kreipsitės elektroniniu paštu pyro.plugin@qiagen.com.

Procedūra

1. Įrankių juostoje spustelkite .
Bus sukurtas naujas procedūros failas.
2. Įveskite procedūros parametrus (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.).
3. Nustatykite plokštelę, priskirdami KIT 9 egzono ir PDGFRA 18 egzono tyrimus šulinėliams, atitinkantiems analizuojamus mėginius.
Pastaba: Bent į vieną tyrimą reikia įtraukti neigiamos kontrolės mėginį (be šabloninės DNR) į kiekvieną PGR nustatymą.
Pastaba: Į kiekvieną tyrimą kiekvienoje Pyrosequencing procedūroje įtraukite mėginį su nedematūruota kontroline DNR (žr. „Kontrolės“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.).
4. Kai procedūra jau nustatyta ir galima ją atlikti su PyroMark Q24 sistema, išspausdinkite reikiamų fermento mišinio, substrato mišinio ir nukleotidų kiekių sąrašą ir plokštelės nustatymą. Meniu „Tools“ pasirinkite „Pre Run Information“, o kai pasirodys ataskaita, spustelkite .
5. Uždarykite procedūros failą ir nukopijuokite jį į USB atmintinę (tiekiamą su sistema), naudodami Windows® Explorer.

Pastaba: Išspausdintą Pre Run Information galima naudoti kaip mėginio nustatymo šabloną (žr. „3 protokolai: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance“, 21 psl.).

Norėdami išnagrinėti plokštelę su PyroMark Q24 sistema, žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, 27 psl.

Procedūros parametrai

Run name:	Procedūros pavadinimas duodamas išsaugojus failą. Pervardinus failą, pasikeičia ir procedūros pavadinimas.
Instrument method:	Pasirinkite instrumento metodą pagal kasetę, kurią naudosite per procedūrą. Žr. su produktais tiekiamas instrukcijas.
Plate ID:	Pasirinktis: Įveskite PyroMark Q24 plokštelės ID.
Bar code:	Pasirinktis: Įveskite plokštelės brūkšninį kodą, o jeigu turite brūkšninių kodų skaitytuvą, prijungtą prie kompiuterio, patalpinkite pelės žymeklį tekstiniame laukelyje „Barcode“ (spusteldami laukelį) ir nuskenuokite brūkšninį kodą.
Kit and Reagent ID:	Pasirinktis: Įveskite naudojamo <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro rinkinio 1 dėžės ir 2 dėžės partijos numerį. Partijos numerį rasite ant produkto etiketės. Pastaba: Mes rekomenduojame įvesti abu partijos numerius taip, kad būtų galima atsekti netikėtas su <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro rinkiniu iškilusias problemas.
Run note:	Pasirinktis: Įveskite pastabą apie procedūros turinį ar tikslą.

Tyrimo failų pridėjimas

Norėdami priskirti tyrimą prie šulinėlio, jūs galite:

- Spustelti ant šulinėlio dešinį pelės klavišą ir kontekstiniame meniu pasirinkti „Load Assay“.
- Pasirinkti tyrimą trumpųjų šaukinių naršyklėje, spustelti ir tempti tyrimą į šulinėlį.

Šulinėlis yra užkoduotas pagal spalvą, priklausomai nuo jam priskirto tyrimo.

Mėginių ID ir pastabų įvedimas

Norėdami įvesti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite elementą ir įveskite tekstą.

Norėdami redaguoti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite elementą (bus pasirinktas tuometinis turinys) arba du kartus spustelkite elementą.

2 protokolą: PGR, atliekama naudojant su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu tiekiamus reagentus

Šis protokolą yra skirtas srities su *KIT* 9 egzonu PGR amplifikacijai ir atskirai srities su *PDGRFA* 18 egzonu PGR amplifikacijai naudojant *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinj.

Svarbūs patarimai prieš pradędant

- HotStarTaq[®] polimerazei su PyroMark Master Mix reikalingas 15 minučių 95°C aktyvavimo veiksmas.
- Supilstykite visus reakcijos mišinius tokiame plote, kuris būtų atskirtas nuo naudojamo DNR išgryninimui, įtraukdami šabloninę DNR į PGR, PGR produktų analizę ar mėginių paruošimą prieš Pyrosequencing analizę
- Naudokite vienkartinius antgalius su hidrofobiniais filtrais, kad iki minimumo sumažintumėte kryžminį užteršimą.

Ką reikia padaryti prieš pradędant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su PGR pradmenimis, trumpai juos centrifuguokite, kad surinktumėte turinį mėgintuvėlių dugne.
- Sureguliuokite kontrolės ir mėginio DNR koncentraciją iki 0.4-2 ng/μl, jeigu to reikia.

Procedūra

1. Atitirpinkite visus reikiamus komponentus (žr. 4 lentelę).

Prieš naudojimą gerai išmaišykite.

2. Pagal 4 lentelę paruoškite reakcijos mišinį kiekvienam PGR pradmenų rinkiniui.

Į reakcijos mišinį paprastai įeina visi komponentai, kurių reikia PGR, išskyrus mėginį.

Paruoškite didesnj negu reikia visam atliekamų PGR tyrimų skaičiui reakcijos mišinio kiekį.

4 lentelė. Reakcijos mišinio paruošimas kiekvienam PGR pradmens mišiniui

Komponentas	Kiekis/reakcija μl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5 μl
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5 μl
PGR Primer KIT 9 egzonus ar PGR Primer PDGFRA 18 egzonus	1 μl
Vanduo (H_2O , tiekiamas)	4 μl
Visas kiekis	20 μl

3. Kruopščiai išmaišykite reakcijos mišinį ir įlašinkite 20 μl į kiekvieną PGR mėgintuvėlį.

PGR mėgintuvėlių nereikia laikyti ant ledo, nes HotStarTaq DNR polimerazė kambario temperatūroje nėra aktyvi.

4. Įlašinkite į atskirus PGR mėgintuvėlius (žr. 5 lentelę) 5 μl šabloninės DNR (2-10 ng genominės DNR) ir gerai išmaišykite.

Pastaba: Kiekvienam PGR nustatymui bent į vieną tyrimą reikia įtraukti neigiamos kontrolės mėginį (be šabloninės DNR).

Pastaba: Į kiekvieną tyrimą kiekvienoje Pyrosequencing procedūroje įtraukite mėginį su nedenatūruota kontroline DNR (žr. „Kontrolės“ Fehler! Textmarke nicht definiert. psl.).

5 lentelė. PGR paruošimas

Komponentas	Kiekis/reakcija
Reakcijos mišinys	20 μl
Mėginio DNR	5 μl
Visas kiekis	25 μl

5. Užprogramuokite termomaišytuvą pagal gamintojo instrukcijas, laikydamiesi 6 lentelėje aprašytų sąlygų.

6 lentelė. Optimizuotas ciklo atlikimo protokolas

			Komentariai
Pradinis aktyvavimo veiksmas:	15 minučių	95°C	HotStarTaq DNR polimerazė aktyvuojama per šį kaitinimo veiksmą.
3 veiksmų ciklo atlikimas:			
Denatūravimas	20 sekundžių	95°C	
Hibridizacija	30 sekundžių	53°C	
Elongacija	20 sekundžių	72°C	
Ciklų skaičius	42		
Galutinė elongacija:	5 minutės	72°C	

6. Sudėkite PGR mėgintuvėlius į termomaišytuvą ir paleiskite ciklo atlikimo programą.
7. Po amplifikacijos pereikite prie „3 protokolą: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance“, 21 psl. PGR mėginius galima laikyti 2–8°C iki 3 dienų.

3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance rutuliukų

Šis protokolas skirtas šabloninės DNR imobilizavimui prie Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) prieš analizę su PyroMark Q24 sistema.

Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Prieš pradėdami, leiskite visiems reikiamiems reagentams ir tirpalams pasiekti kambario temperatūrą (15-25°C).
- Įjunkite PyroMark Q24 likus bent 30 minučių iki procedūros pradžios. Elektros jungtukas yra galinėje instrumento pusėje.
- Uždėkite vieną PyroMark Q24 Plate Holder ant iš anksto įšildyto iki 80°C kaitinimo bloko. Palikite antrą PyroMark Q24 Plate Holder kambario temperatūroje (15–25°C).
- PyroMark Wash Buffer yra tiekiamas kaip 10x koncentratas. Prieš panaudodami pirmą kartą, atskieskite jį iki 1x darbinio tirpalo, įlašindami 225 ml labai švaraus vandens į 25 ml 10x PyroMark Wash Buffer (galutinis kiekis 250 ml).

Pastaba: 1x PyroMark Wash Buffer darbinis tirpalas išlieka stabilus 2–8°C iki pažymėtos galiojimo datos pabaigos.

- Paruoškite PyroMark Q24 Vacuum Workstation mėginių paruošimui, kaip aprašyta PyroMark Q24 vadove.

Procedūra

1. Švelniai papurtykite buteliuką su Streptavidin Sepharose High Performance rutuliukais, kol gausite homogenišką tirpalą.

Paruoškite Master Mix DNR imobilizavimui, kaip aprašyta 7 lentelėje. Paruoškite didesnę kiekį negu reikia visų reakcijų atlikimui (visoms + vienai papildomai reakcijai).

7 lentelė. Master mix DNR imobilizavimui

Komponentas	Kiekis/mėginys
PyroMark Binding Buffer	40 µl
Streptavidin Sepharose High Performance	1 µl
Vanduo (H ₂ O, tiekiamas)	29 µl
Visas kiekis	70 µl

Pastaba: Šis protokolas taikomas Streptavidin Sepharose High Performance, kurio partijos numeris 10057037 ar didesnis. Naudojant Streptavidin Sepharose High Performance rutuliukus, kurių partijos numeris mažesnis negu 10057037, vienam mėginiui naudojamų rutuliukų kiekį reikia padidinti iki 2 µl, kaip nurodyta procedūros nustatyme.

- 2. Įlašinkite 70 µl Master Mix į 24 šulinėlių PGR plokštelės ar juostelių šulinėlius, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, 14 psl.).**

Sefarozės rutuliukai greitai nusėda. Užtikrinkite Master Mix homogeniškumą, dažnai maišydami su pipete ar atlikdami impulsų sukuriavimą. Nacentrifuguokite Master Mix.

- 3. Įlašinkite 10 µl biotiniuoto PGR produkto iš 2 protokolo į kiekvieną šulinėlį, kuriame yra Master Mix, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, Fehler! Textmarke nicht definiert. psl.).**

Pastaba: Po Master Mix ir PGR produkto įlašinimo šulinėlyje turi būti bendras kiekis 80 µl .

- 4. Užsandarinkite PGR plokštelę su lipnia juoste.**

Įsitikinkite, kad skystis neištekės iš vieno šulinėlio į kitą.

- 5. 5-10 minučių sukuriuokite PGR plokštelę kambario temperatūroje (15–25°C) 1400 apsukų/min. greičiu.**

Šiame etape nedelsdami pereikite prie „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, Fehler! Textmarke nicht definiert. psl.

4 protokolą: Mėginių paruošimas prieš Pyrosequencing analizę su PyroMark Q24

Šis protokolą yra skirtas vienos vijos DNR paruošimui ir sekvenavimo pradmens hibridizacijai prie šablono, prieš atliekant Pyrosequencing analizę su PyroMark Q24.

Svarbūs patarimai prieš pradędant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su sekvenavimo pradmenimis, juos trumpai nucentrifuguokite, kad surinktumėte turinį mėgintuvėlių dugne.
- Sulašinkite 2 skirtingus sekvenavimo pradmenis pagal tą patį pavyzdį, kaip nurodyta plokštelės procedūros nustatyme (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, 14 psl.), priklausomai nuo analizės srities (*KIT 9* egzozas arba *PDGFRA 18* egzozas).
- Po įkaitintinimo iki 80°C, nesutrumpinkite mėginių aušinimo laiko.
- Palyginti su ankstesne *therascreen GIST RapidScreen Pyro* rinkinio vadovo versija (2011 metų liepos mėnesio 1 versija, 18 veiksmas), darbo eiga buvo truputį modifikuota. Po įkaitintinimo iki 80°C, nesutrumpinkite mėginių aušinimo laiko.
- Reguliariai atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta *PyroMark Q24* vadove, ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta.

Procedūra

1. **Atskieskite pakankamą kiekį kiekvieno sekvenavimo pradmens, Seq Primer KIT 9 egzono ir Seq Primer PDGFRA 18 egzono su PyroMark Annealing Buffer, kaip parodyta Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..**

Paruoškite didesnę skiesto sekvenavimo pradmens kiekį negu reikia visam mėginių, su kuriais bus atliekamas sekvenavimas, skaičiui (mėginių skaičiui + vieną papildomą).

Neatskieskite ir nelaikykite sekvenavimo pradmens daugiau, nei reikia.

8 lentelė. Sekvenavimo pradmenų pavyzdinis skiedimas

Komponentas	Kiekis/mėginys	Kiekis 9 + 1 reakcijoms
PyroMark Annealing Buffer	24.2 µl	242 µl
Seq Primer KIT 9 egzonas ar Seq Primer PDGFRA 18 egzonas	0.8 µl	8 µl
Visas kiekis	25 µl	250 µl

- Įlašinkite 25 µl skiesto sekvenavimo pradmens į kiekvieną PyroMark Q24 Plate šulinėlį, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, 14 psl.).

Laikykite vieną iš PyroMark Q24 Plate Holders (tiekiamų su PyroMark Q24 Vacuum Workstation) kambario temperatūroje (15–25°C) ir naudokite kaip atramą, ruošdami ir perkeldami plokštelę.

- Ijunkite PyroMark Q24 Vacuum Workstation vakuuminę pompą.
- Uždėkite PGR plokštelę iš 3 protokolo ir PyroMark Q24 Plate ant vakuuminės darbo vietos (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).

Patikrinkite PGR plokštelę ir įsitikinkite, kad tirpale yra Sepharose rutuliukų. Įsitikinkite, kad plokštelė įdėta ta pačia orientacija, kaip ir supilstant mėginius.



3 pav. PGR plokštelės ir PyroMark Q24 Plate padėjimas ant vakuuminės darbo vietos.

5. Įleiskite vakuumą į įrankį, įjungdami vakuumą.
6. **Atsargiai nuleiskite filtravimo zondus į PGR, kad užfiksuotumėte rutuliukus su imobilizuotu šablonu. Laikykite zondus vietoje 15 sekundžių. Keldami vakuuminį įrankį, būkite labai atsargūs.**
Sefarozės rutuliukai greitai nusėda. Rutuliukus reikia surinkti iš karto po sukuriavimo. Jeigu nuo plokštelės sukuriavimo praėjo daugiau kaip 1 minutė, prieš surinkdami rutuliukus, dar 1 minutę pasukuriuokite.
Patikrinkite PGR plokštelę, ar vakuuminis įrankis pilnai paėmė visus mėginius.
7. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su 40 ml 70% etanolio (3 pav.) (1 lovelis; Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.**
8. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su 40 ml Denaturation Solution (2 lovelis; Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.**
9. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su 50 ml Wash Buffer (3 lovelis; Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). 10 sekundžių plaukite filtravimo zondus.**
10. **5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyn ir atgal, daugiau kaip 90° vertikaliai, kad ištuštintumėte skystį iš filtravimo zondų (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).**



4 pav. Daugiau kaip 90° vertikaliai pakelto vakuuminio įrankio pavaizdavimas.

11. Kol vakuuminis įrankis laikomas virš PyroMark Q24 Plate, išjunkite vakuuminį jungtuką ant įrankio (Off).
12. Išleiskite rutuliukus į PyroMark Q24 Plate, nuleisdami filtravimo zondus į skiestą sekvenavimo pradmenį ir švelniai judindami įrankį iš vienos pusės į kitą.
Pasirūpinkite, kad nepažeistumėte PyroMark Q24 Plate paviršiaus, subraižant jį su filtravimo zondais.
13. Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su labai švariu vandeniu (4 lovelis; Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) ir kratykite 10 sekundžių.
14. Išplaukite filtravimo zondus, nuleisdami juos į labai švarų vandenį (5 lovelis; Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) ir naudodami vakuumą. Praplaukite zondus su 70 ml labai švaraus vandens.
15. 5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyn ir atgal, daugiau kaip 90° vertikaliai, kad ištuštintumėte skystį iš filtravimo zondų (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).
16. Uždarykite vakuuminį jungtuką ant įrankio (Off) ir patalpinkite vakuuminį įrankį Parking padėtyje (P).
17. Išjunkite vakuuminę pompą.
Darbo dienos pabaigoje reikia išpilti skysčio atliekas ir likusius tirpalus bei patikrinti PyroMark Q24 Vacuum Workstation, ar joje nėra dulkių ir skysčio likučių (žr. „B priedas: “, 51 psl.
18. 2 minutes kaitinkite PyroMark Q24 Plate su mėginiais 80°C, naudodami iš anksto įšildytą PyroMark Q24 Plate Holder.
19. Nuimkite PyroMark Q24 Plate nuo karšto plokštelės laikiklio ir patalpinkite ant antro PyroMark Q24 Plate Holder, kuris buvo laikomas kambario temperatūroje (15-25°C), kad mėginiai 10-15 minučių būtų aušinami kambario temperatūroje.
20. Pereikite tiesiai prie „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, Fehler! Textmarke nicht definiert. psl.

5 protokolas: Procedūra su PyroMark Q24

Šiame protokole aprašytas PyroMark Gold Q24 reagentų paruošimas ir sudėjimas į PyroMark Q24 Cartridge bei procedūros su PyroMark Q24 pradžia ir pabaiga. Detalesnį aprašymą, kaip nustatyti procedūrą, rasite *PyroMark Q24 vadove*.

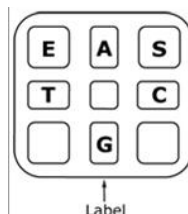
Svarbūs punktai prieš pradėdant

- Iki procedūrinės informacijos ataskaitoje, kurią rasite meniu „Tools“ per procedūros nustatymą (žr. „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.), pateikta informacija apie tam tikrai procedūrai reikalingų nukleotidų, fermento ir substrato buferio kieki.
- Į kasetę sudėkite vienkartinius antgalius be hidrofobinių filtrų, kad užtikrintumėte tikslų kasetės funkcionavimą

Procedūra

1. **Ištirpinkite šaltyje išdžiovinto fermento ir substrato mišinius kiekvieną atskirai 620 µl vandens (H₂O, tiekiamas).**
2. **Išmaišykite, švelniai sukijuojant buteliuką.**
Nesūkuriuokite!
Norėdami įsitikinti, kad mišinys pilnai ištirpo, 5-10 minučių palaikykite jį kambario temperatūroje (15-25°C). Prieš pripildydami PyroMark Q24 Cartridge, įsitinkinkite, kad tirpalas nėra drumstas. Jeigu reagentų tuoj pat nepanaudosite, patalpinkite reagentų buteliukus ant ledo arba šaldytuve.
3. **Leiskite reagentams ir PyroMark Q24 Cartridge pasiekti aplinkos temperatūrą (20–25°C).**
4. **Patalpinkite PyroMark Q24 kasetę, atsukę etiketę į save.**
5. **Sudėkite į PyroMark Q24 Cartridge atitinkamus nukleotidų, fermento ir substrato mišinius, kaip parodyta Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**

Įsitinkinkite, kad iš pipetės neperkelsite į kasetę oro burbuliukų.



5 pav. PyroMark Q24 Cartridge pavaizdavimas iš viršaus.

Anotacijos atitinka etiketę ant reagentų buteliukų. Įlašinkite fermento mišinį (E), substrato mišinį (S) ir nukleotidus (A, T, C, G) pagal kiekio informaciją, pateiktą Pre Run informacijos ataskaitoje, kurią rasite meniu „Tools“ per procedūros nustatymą.

6. Atidarykite kasetės vožtuvą ir įdėkite pripildytą reagento kasetę, atsukę etiketę į išorę. Pilnai įstumkite kasetę ir stumkite žemyn.
7. Įsitikinkite, kad matosi linija kasetės priekyje, ir uždarykite vožtuvą.
8. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir patalpinkite plokštelę ant kaitinimo bloko.
9. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.
10. Įdėkite USB atmintinę (su procedūros failu) į USB jungtį instrumento priekyje.
Neišimkite USB atmintinės, kol nesibaigs procedūra.
11. Pagrindiniame meniu pasirinkite „Run“ (naudodami ekrano mygtukus ▲ ir ▼) ir spauskite „OK“.
12. Pasirinkite procedūros failą, naudodami ekrano mygtukus ▲ ir ▼ .
Norėdami pamatyti aplanko turinį, pasirinkite aplanką ir spauskite „Select“.
Norėdami grįžti į ankstesnį vaizdą, spauskite „Back“.
13. Pasirinkę procedūros failą, spauskite „Select“ ir pradėkite procedūrą.
14. Kai baigsite procedūrą ir instrumentas patvirtins, kad procedūros failas išsaugotas USB atmintinėje, spauskite „Close“.
15. Išimkite USB atmintinę.
16. Atidarykite instrumento dangtį.
17. Atidarykite kasetės vožtuvą ir išimkite reagento kasetę, keldami ją aukštyn ir traukdami lauk.
18. Uždarykite vožtuvą.
19. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir nuimkite plokštelę nuo kaitinimo bloko.
20. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.
21. Išmeskite plokštelę ir išvalykite kasetę, kaip aprašyta su kasete tiekiamo produkto lapo instrukcijose.
22. Išanalizuokite procedūrą pagal „6 protokolą: PyroMark Q24“, 29 psl.

6 protokolas: PyroMark Q24 procedūros analizė

Šiame protokole aprašyta baigtinės GIST RapidScreen procedūros mutacijos analizė naudojant PyroMark Q24 Software.

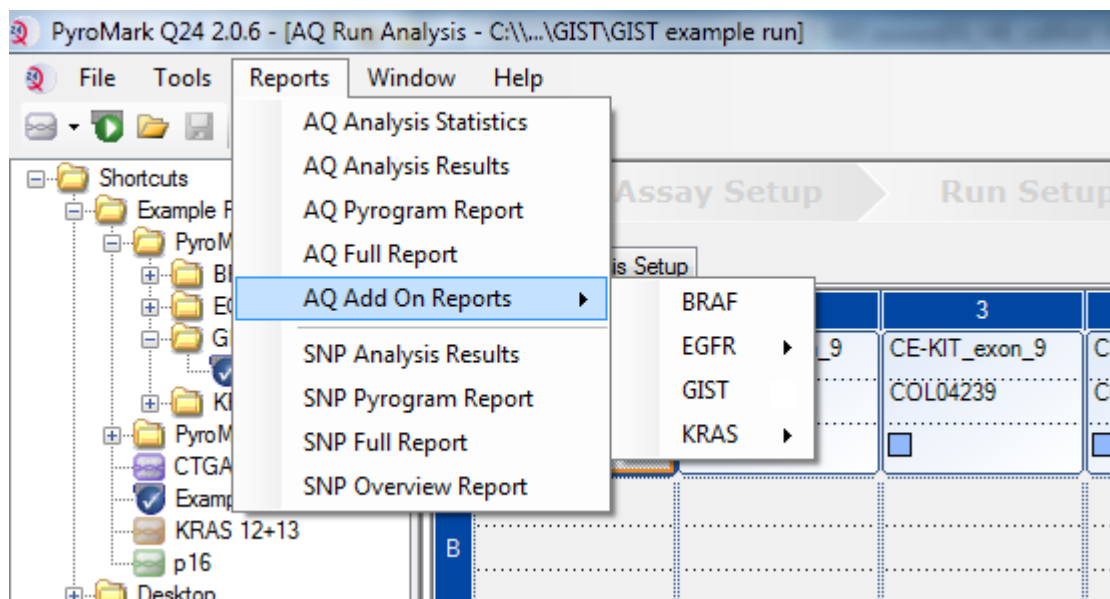
Procedūra

1. Įdėkite USB atmintinę su apdorotu procedūros failu į kompiuterio USB jungtį.
2. Perkelkite procedūros failą iš USB atmintinės į norimą kompiuterio vietą, naudodami Windows Explorer.
3. Atidarykite procedūros failą PyroMark Q24 Software AQ režimu, meniu „File“ pasirinkdami „Open“ arba trumpųjų šaukinių naršyklėje du kartus spusteldami failą (🔍).
4. Yra 2 procedūros analizavimo būdai. Jeigu naudojate GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą, eikite į 5 veiksmą. Jeigu naudojate AQ analizės integralą į PyroMark Q24, eikite į 6 veiksmą.

Pastaba: Mes primygtinai rekomenduojame rezultatų interpretavimui naudoti GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą. GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą galite gauti el. paštu pyro.plugin@qiagen.com. Ši ataskaita užtikrins, kad automatiniams visų mutacijų aptikimui bus naudojamos atitinkamos AR vertės (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) ir įvairios „Sequences to Analyze“.

Pastaba: Dvi kompleksinės mutacijos *PDGFRA* 18 egzone (2526_2538>G ir 2524_2526 GAC>TAT) negali būti analizuojamos taikant AQ analizę su PyroMark Q24 Software. Mes rekomenduojame naudoti GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą *PDGFRA* 18 egzono kompleksinių mutacijų analizei.

5. Naudodami GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą ataskaitos generavimui, meniu iš „Reports“ pasirinkite “AQ Add On Reports/GIST” (žr. 6 pav.).



6 pav. GIST RapidScreen Plug-in Report meniu.

Šulinėliai bus automatiškai išanalizuoti su visomis galimomis mutacijomis, kurių AR nurodytos Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.. Rezultatai bus pateikti apžvalginėje lentelėje (7 pav.), o po jų seks detalūs rezultatai, į kuriuos įeina pirogramos ir analizės kokybė.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

7 pav. GIST RapidScreen įjungiamo ataskaita

6. AQ analizės naudojimas:
Norėdami analizuoti procedūrą ir gauti rezultatų apžvalgą, spustelkite vieną iš mygtukų **Analyze**.



Analizuoti visus šulinėlius.



Analizuoti pasirinktą šulinėlį.

Analizės rezultatai (alelių dažniai) ir kokybės vertinimas parodomi virš kintamojo padėties Pyrogram[®] įrašė. Daugiau detalių, kaip analizuoti procedūrą, rasite *PyroMark Q24 vadove*.

Norėdami generuoti ataskaitą, meniu iš „Reports“ pasirinkite „AQ Full Report“ ar „AQ Analysis Results“.

Pastaba: Jeigu norite gauti patikimus rezultatus, mes rekomenduojame, kad vienos viršūnės aukštis viršytų 30 RLU. Tyrimo nustatyme nustatykite 30 RLU kaip „reikiamą tinkamos kokybės viršūnės aukštį“ (žr. „A priedas: *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimų nustatymas“ ir *PyroMark Q24 vadovą*).

Pastaba: AQ Analysis rezultatų ataskaita turi būti naudojama alelių kiekio nustatymo dokumentavimui ir interpretavimui. Pirogramoje pateikiami skaičiai suapvalinami ir nerodo tikslaus kiekio nustatymo.

Pastaba: Pirogramą visada reikia palyginti su histograma, ir jūs galite ją pamatyti spustelėję dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Išmatuotos viršūnės turi derėti prie histogramos juostų aukščio.

Mėginių be aptiktos mutacijos su standartu „Sequence to analyze“ ar „Check“ ar „Failed“ kokybės vertinimu peranalizavimas

Standartinė „Sequence to Analyze“, kaip nurodyta Analysis Setup, analizuoja 6 bp dubliavimą *KIT 9* egzone ir dažniausią taškinę mutaciją (GAC>GTC) *PDGFRA* 18 egzono 842 kodone (žr. A priedą, 47 psl.). Jeigu mėginyje yra ne tokia dažna mutacija *PDGFRA* 18 egzone, „Sequence to Analyze“ galima keisti ir išanalizuoti šios mutacijos mutacinę būseną, kaip aprašyta A priede.

Dvi kompleksinės mutacijos *PDGFRA* 18 egzone (2526_2538>G ir 2524_2526 GAC>TAT) negali būti analizuojamos taikant AQ analizę su PyroMark Q24 Software. Mes rekomenduojame naudoti GIST RapidScreen įjungiamą ataskaitą *PDGFRA* 18 egzono kompleksinių mutacijų analizei.

Mes primygtinai rekomenduojame peranalizuoti visus mėginius, kuriuose neaptikote mutacijos su standartinė „Sequence to Analyze“, bei tokius mėginius, kuriems pateiktas kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ arba kurių viršūnės neatitinka histogramos juostų aukščio. Kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ gali rodyti retą mutaciją, kuriai netinka standartinė „Sequence to Analyze“, todėl atsiranda netikėtų atskaitinių viršūnių.

Norėdami peranalizuoti ir nusitaikyti į ne tokias dažnas mutacijas, eikite į „Analysis Setup“ ir pakeiskite „Sequence to Analyze“ į variantus, aprašytus A priede, ar kitų retų ar netikėtų mutacijų variantuose. Spustelkite „Apply“ ir po to „To All“, kai atsiras langas „Apply Analysis Setup“.

Atnaujintus mutacijų dažnius žmogaus *KIT/PDGFRA* rasite Sanger Instituto internetiniame puslapyje www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Pastaba: Pakeitę „Sequence to Analyze“, įsitinkite, kad vienos viršūnės aukščio riba nustatyta 30 RLU.

Pastaba: Sekvenuojamoje srityje gali būti papildomų retų ar netikėtų mutacijų ir jas galima išanalizuoti naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“ atsižvelgiant į netikėtas mutacijas.

Pastaba: Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir to negalima paaiškinti retomis ar netikėtomis mutacijomis, toks rezultatas nėra pagrindas spręsti apie mutacinę būklę. Rekomenduojama iš naujo išanalizuoti mėginį.

Rezultatų interpretavimas

Analizės rezultatų interpretavimas ir žemo lygio mutacijų aptikimas

Primygtinai rekomenduojama palyginimui ir kaip foninių lygių kontrolę į kiekvieną procedūrą įtraukti nedematūruotą kontrolinę DNR. Išmatuotas kontrolinio mėginio dažnis turi būti žemesnis ar lygus tuščios vietos ribai (TVR). Nustatant mutacijos buvimą, galima naudoti vadovuose pateiktas AR ir TVR vertes. Šios vertės buvo gautos naudojant plazmidų mišinius su laukinio tipo ar atitinkama mutavusia seka.

Po analizės su PyroMark Q24 Software ar Plug-In ataskaitomis galimi 3 rezultatai.

- Mutacijos dažnis $< AR$: Mutacija neaptikta.
- Mutacijos dažnis $> AR + 3\%$ vnt.: Mutacija.
- Mutacijos dažnis $\geq AR$ ir $\leq AR + 3\%$ vnt.: Potenciali žemo lygio mutacija
Pastaba: Jeigu naudojate GIST RapidScreen Plug-In Report (žr. „6 protokolas: PyroMark Q24“, 5 veiksmas, 29 psl.) ir taip nutiktų, bus pateiktas perspėjimas.

Intervalas nuo TVR iki TVR + 3% vnt. leidžia jautriai aptikti žemo lygio mutacijas optimaliomis sąlygomis. Išmatuotas didesnis nei TVR kontrolinio mėginio dažnis rodo, kad tos procedūros fono lygis yra aukštesnis nei įprastinis, kas gali paveikti alelių kiekio nustatymą, ypač žemos mutacijos lygiams. Todėl būtina atidžiai įvertinti rezultatus su perspėjimu „potential low-level mutation“.

Mėginiai, kuriuose pranešama potenciali žemo lygio mutacija, turi būti laikomi teigiamais mutacijos atžvilgiu tik tokiu atveju, jeigu ji patvirtinama peranalizuojant juos dviem egzemplioriais kartu su mėginiu su nedematūruota kontroline DNR. Abiejų dublikatų rezultatas turi rodyti tą pačią mutaciją su vertėmis $\geq AR$, o kontrolinis mėginys turi būti pranešamas kaip „No mutation detected“. Priešingu atveju mėginys bus laikomas tokiu, kuriame „mutacija neaptikta“.

Padidintą mutacijos foną galima aptikti palyginus vadove išvardintas TVR vertes su matavimais, gautais su nedematūruota kontroline DNR. Mėginius su pranešama potencialia žemo lygio mutacija galima vertinti kaip „Mutation not detected“ be pasikartojimo, jeigu išmatuotas nedematūruotos kontrolinės DNR dažnis yra aukštesnis negu vadove nurodyta atitinkamos mutacijos TVR vertė. Todėl su pakartotinėmis potencialiomis žemo lygio mutacijomis galimi 3 skirtingi scenarijai.

1. **Matavimo dažnis su nedentūruota kontroline DNR >TVR šiai mutacijai: Mėginį galima vertinti kaip „Mutation not detected“ be pasikartojimo.**
2. **Rezultatas neatkuriamas dublikatu su tuo pačiu rezultatu: Vertinkite mėginį kaip „Mutation not detected“.**
3. **Atkuriamas dublikatu su tuo pačiu rezultatu ir laukinio tipo mėginiu <TVR atitinkamai mutacijai: Aptikta mutacija.**

Pastaba: Pirograma turi būti visada palyginama su histograma, kurią pamatysite spustelėję dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Išmatuotos viršūnės turi derėti prie histogramos juostų aukščio. Reikia ištirti pirogramas, ar neatsirado netikėtų viršūnių. Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir negali būti paaiškintos retomis ar netikėtomis mutacijomis, rekomenduojama peranalizuoti mėginį. Nepavykęs rezultatas nėra pagrindas spręsti apie mutacinę būklę. Tam, kad mutacija būtų galiojanti, viršūnės aukščio pokytis visada siejamas su atitinkamu kitos viršūnės aukščio pokyčiu. Vienos viršūnės aukščio pokyčio nereikia vertinti kaip mutacijos nuorodos.

Pastaba: Rezultatų interpretavimui rekomenduojama naudoti GIST RapidScreen Plug-in Report. Tam, kad išsamiau ištirtumėte mėginius su pranešama potencialia žemo lygio mutacija, mes rekomenduojama papildomai išanalizuoti mėginį rankiniu būdu su taikomąja programine įranga (pvz., kontrolinio mėginio mutacijos dažnio palyginimui).

Pastaba: Priimant sprendimą dėl vėžiu sergančių pacientų gydymo, negalima remtis vien *KIT 9* egzono ir *PDGFRA 18* egzono mutacijos būseną.

9 lentelė. Tam tikroms mutacijoms nustatytos AR ir TVR

Nukleino rūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	TVR (% vnt.)	AR (% vnt.)	COSMIC ID* (v58)
KIT 9 egzonas				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1.9	4.9	1326
PDGFRA 18 egzonas				
2525A>T	D842V	0.6	3.6	736
2524G>T	D842Y [†]	0.6	3.6	12396
2524_2535 del12 arba [‡]	D842_H845del arba [‡]	2.2	5.2	737
2526_2537 del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538 del12	I843_D846del [†]	3.0	6.0	12400
2528_2539 del12	I843_S847>T	4.2	7.2	12407
2530_2541 del12	M844_S847del	3.2	6.2	12402
2524_2532 del9	D842_M844del	1.5	4.5	12401
2524_2526 delGAC	D842del	0.9	3.9	12406
2526_2538 >G [§]	D842_D846>E	0.3	3.3	12408
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [†]	0.9	3.9	12397

* Somatinių vėžio mutacijų katalogas, kurį rasite Sanger instituto tinklalapyje www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

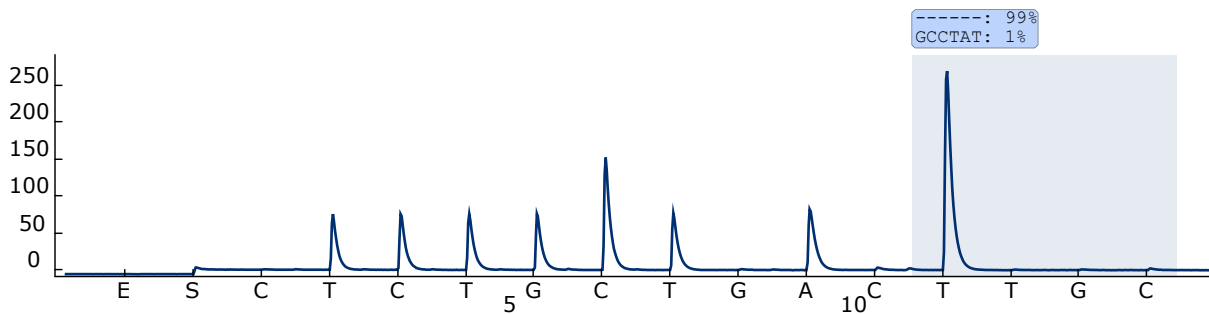
[†] Mutacijos 2524G>T ir 2524_2526 GAC>TAT ir 2526_2537 del12 ir 2527_2538 del12 atitinkamai sukelia tokį pat aminorūgščių pokytį.

[‡] Mutacijos 2524_2535del12 ir 2526_2537del12 atitinkamai sukelia tokį pat nukleino rūgščių pokytį.

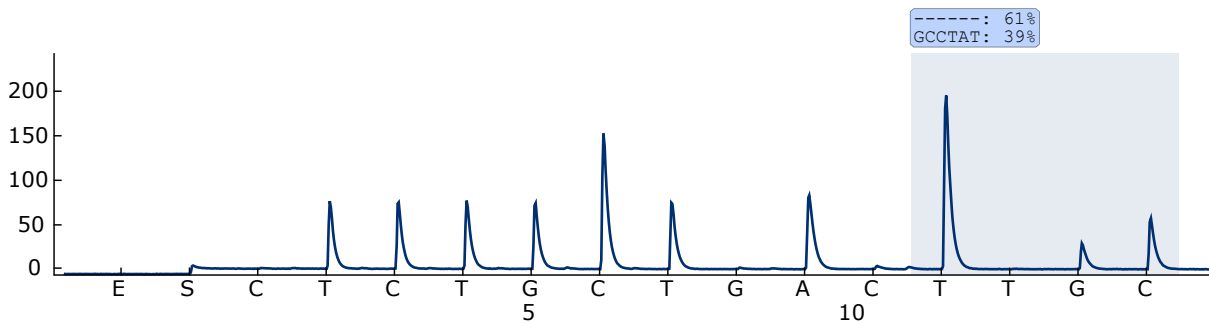
[§] Mutacijos 2526_2538 >G ir 2524_2526GAC>TAT negalima analizuoti AQ režimu su PyroMark Q24 Software.

Pavyzdiniai rezultatai

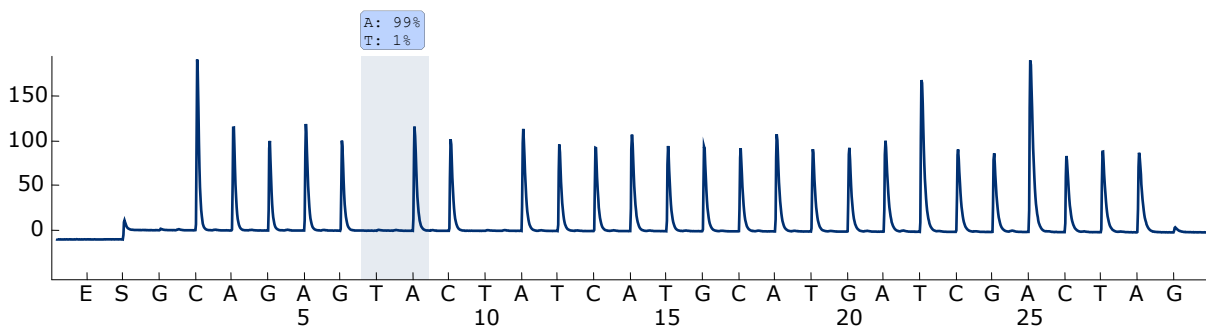
Pavyzdiniai pirogramų rezultatai parodyti Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. – Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.



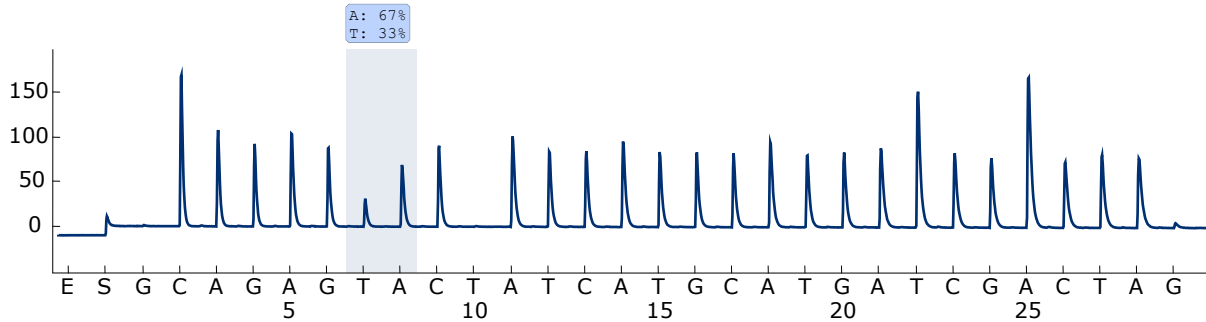
8 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu su *KIT* 9 egzonu su “Sequence to Analyze” *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*, nukreipta į 6 bp dubliavimą po 503 kodono.



9 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginį su GCCTAT dubliavimu po 503 kodono *KIT* 9 egzone su “Sequence to Analyze” *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.



10 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu *PDGFRA* 18 egzone su “Sequence to Analyze” *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT*, nukreipta į mutaciją GAC>GTC 842 kodone (2525 nukleotide).



11 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginį su GAC>GTC mutacija 842 kodone (2525 nukleotide) PDGFRA 18 egzone su “Sequence to Analyze” CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas sprendžiant bet kokias išskylančias problemas. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro puslapyje „Dažnai užduodami klausimai“

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninės pagalbos mokslininkams visada malonu atsakyti į bet kokius jūsų užduodamus klausimus apie šio vadovo informaciją ir protokolus arba mėginių ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją rasite užpakaliniame viršelyje arba apsilankę www.qiagen.com).

Bendrą instrumento trikčių šalinimą rasite *PyroMark Q24 vadove*.

Komentarai ir pasiūlymai

Signalai nešabloninėje kontrolėje (neigiamoje kontrolėje)

- | | |
|-----------------------------|---|
| a) Trikdžiai tarp šulinėlių | Signalas iš vieno šulinėlio aptinkamas gretimuose šulinėliuose. Stenkitės nedėti mėginių su aukšto intensyvumo signalu šalia šulinėlių be šabloninės kontrolės. |
| b) PGR užteršimas | Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais. Tokias medžiagas kaip mėginiai, kontrolės ir amplikonai laikykite ir išimkite atskirai nuo PGR reagentų. |

Silpna ar netikėta seka

Žemos kokybės
genominė DNR

Žemos kokybės genominė DNR gali sugadinti PGR. Analizuokite PGR mėginius, taikydami elektroforezės techniką (pvz., QIAxcel[®] System arba agarozės gelio elektroforezę).

Komentarai ir pasiūlymai

Rezultatas „Check“ ar „failed“

- a) Žemas viršūnės aukštis
- Esant apdorojimo klaidoms per PGR nustatymą ar mėginių paruošimą prieš Pirosekvenavimą, gali susiformuoti žemos viršūnės.
- Svarbu pilnai paimti mėginius su vakuuminiu įrankiu. Pasistenkite lėtai nuleisti vakuuminį įrankį į mėginius ir sekite, kad imobilizavimui naudojamų PGR plokštelės ar juostelių geometrija leistų pilnai paimti mėginius.
- Reguliariai atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta *PyroMark Q24 vadove*, ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta
- Jeigu atsiranda perspėjimas „Check“, atidžiai palyginkite pirogramą su histograma, kuri pasirodys spustelėjus dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Jeigu išmatuotos viršūnės dera prie histogramos juostų aukščio, rezultatas yra tinkamas vertinti. Priešingu atveju rekomenduojama peranalizuoti mėginį.
- b) „Sequence to Analyze“ neaptikta mutacija
- Tyrimo nustatyme pritaikykite „Sequence to Analyze“ (žr. „A priedą: *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimų nustatymas“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.) ir peranalizuokite procedūrą.
- c) Netikėta reta mutacija
- Kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ gali atsirasti dėl netikėtos viršūnių struktūros. Tai gali rodyti netikėtą mutaciją, kurios neišanalizuoja esama analizuojama seka. Šiuos mėginius reiktų analizuoti atsižvelgiant į netikėtas mutacijas, naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“.
- d) Aukšto viršūnės aukščio nukrypimo perspėjimas per paskirstymą
- Pirogramą reikia atidžiai palyginti su histograma, kuri atsiras spustelėjus dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir negali būti paaiškinamos retomis mutacijomis, rekomenduojama peranalizuoti mėginį.

Aukštas fonas

- a) Neteisingas nukleotidų laikymas
- Laikykite nukleotidus 2-8°C. Jeigu laikysite nuo -15 iki -25°C, gali padidėti fonas.

Komentarai ir pasiūlymai

- b) Trumpas mėginių aušinimo laikas prieš Pyrosequencing analizę 10-15 minučių laikykite mėginius ant PyroMark Q24 Plate Holder kambario temperatūroje. Netrumpinkite aušinimo laiko.
- c) Kasetės užteršimas Kruopščiai išvalykite kasetę, kaip aprašyta produkto lape. Laikykite kasetę saugomą nuo šviesos ir dulkių.

Nėra signalų teigiamoje kontrolėje (nedenatūruotoje kontrolinėje DNR)

- a) Fermento ar substrato mišinio nepakanka visiems šulinėliams Įsitikinkite, kad pripildėte PyroMark Q24 Cartridge, kaip nurodyta meniu „Tools“ „Pre Run Information“.
- b) Reagentai neteisingai laikomi ar skiesti Paruoškite *therascreen* pagal instrukcijas, aprašytas „Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.“, **Fehler! Textmarke nicht definiert.** psl.
- c) PGR ar mėginio ruošimo klaida Apdorojimo klaidos per PGR supilstymą, PGR ciklerio programavimą ar mėginių paruošimą prieš Pyrosequencing gali įtakoti signalų nebuvimą. Atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta *PyroMark Q24 vadove*, ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta. Pakartokite PGR ir Pyrosequencing analizę.

Kokybės kontrolė

Pagal QIAGEN ISO sertifikuotą kokybės valdymo sistemą kiekviena *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinio partija yra testuojama pagal iš anksto nustatytas specifikacijas, kad būtų užtikrinta pastovi produkto kokybė.

Apribojimai

Bet kokie generuojami rezultatai turi būti interpretuojami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

Norint gauti optimalius PGR rezultatus, būtina griežtai laikytis vadovo nurodymų. Reikia atkreipti dėmesį į galiojimo datas, išspausdintas ant dėžutės ir visų komponentų etikečių. Nenaudokite komponentų, kurių galiojimo laikas pasibaigęs.

Veikimo charakteristikos

Tuščios vietos riba ir aptikimo riba

Tuščios vietos riba (TVR) ir aptikimo riba (AR) buvo nustatytos daugeliui mutacijų, naudojant plazmidžių mišinius (10 lentelė). TVR ir AR buvo nustatytos pagal Klinikinių ir laboratorinių standartų instituto (CLSI) EP17-A potvarkio „Aptikimo ribų ir kiekio apskaičiavimo ribų nustatymo protokolas; patvirtintas potvarkis“ rekomendacijas. α - ir β klaidos (atitinkamai klaidingi teigiami ir klaidingi neigiami rezultatai) buvo nustatytos iki 5%. Kai kurių retų *PDGFRA* 18 egzono AR buvo nustatytos pridėdant 3 tuščių matavimų standartinius nuokrypius prie TVR vertės. AR vertės buvo nustatytos bent 3 % vienetais aukščiau TVR vertės.

TVR vertės reiškia išmatuotą dažnį, gautą su laukinio tipo mėginiu. AR vertės reiškia žemiausią signalą (išmatuotą dažnį), kurį galima traktuoti kaip teigiamą tam tikros mutacijos atžvilgiu.

10 lentelė. Tam tikroms mutacijoms nustatytos TVR ir AR

Nukleino rūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	TVR (% vnt.)	AR (% vnt.)	COSMIC ID* (v58)
<i>KIT</i> 9 egzonas				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1.9	4.9	1326
<i>PDGFRA</i> 18 egzonas				
2525A>T	D842V	0.6	3.6	736
2524G>T	D842Y [†]	0.6	3.6	12396
2524_2535 del12 arba [‡]	D842_H845del arba [‡]	2.2	5.2	737 arba [‡]
2526_2537 del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538 del12	I843_D846del [†]	3.0	5.0	12400
2528_2539 del12	I843_S847>T	4.2	7.2	12407
2530_2541 del12	M844_S847del	3.2	6.2 [§]	12402
2524_2532 del9	D842_M844del	1.5	4.5	12401
2524_2526 delGAC	D842del	0.9	3.9 [§]	12406
2526_2538 >G [¶]	D842_D846>E	0.3	3.3 [§]	12408
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [†]	0.9	3.9 [§]	12397

* Somatinių vėžio mutacijų katalogas, kurį rasite Sanger instituto tinklalapyje www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Mutacijos 2524G>T ir 2524_2526 GAC>TAT ir 2526_2537 del12 ir 2527_2538 del12 atitinkamai sukelia tokį pat aminorūgščių pokytį.

‡ Mutacijos 2524_2535del12 ir 2526_2537del12 atitinkamai sukelia tokį pat nukleino rūgščių pokytį.

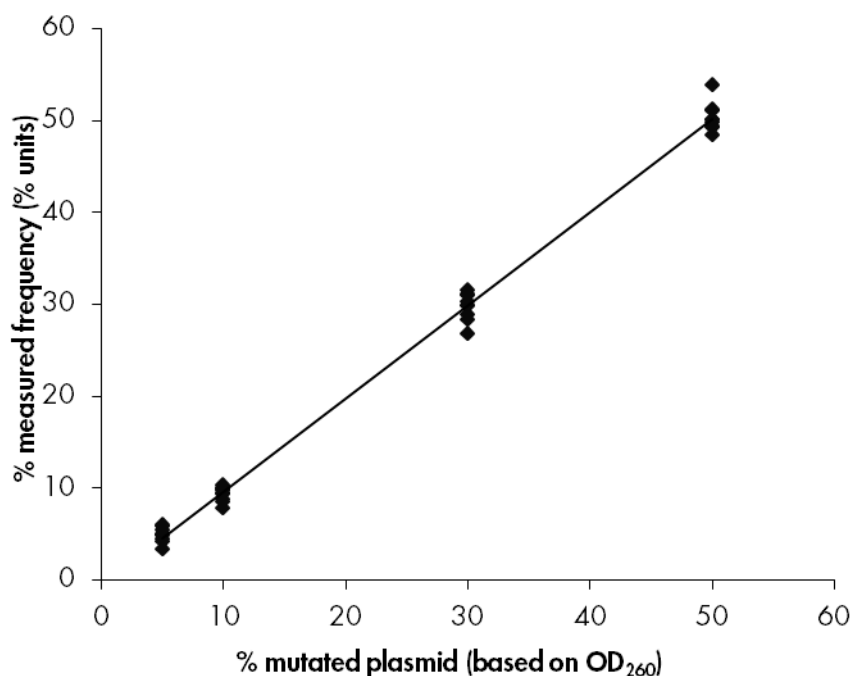
§ Mutacijos 2526_2538 >G ir 2524_2526GAC>TAT negalima analizuoti AQ režimu su PyroMark Q24 Software.

Linijškumas

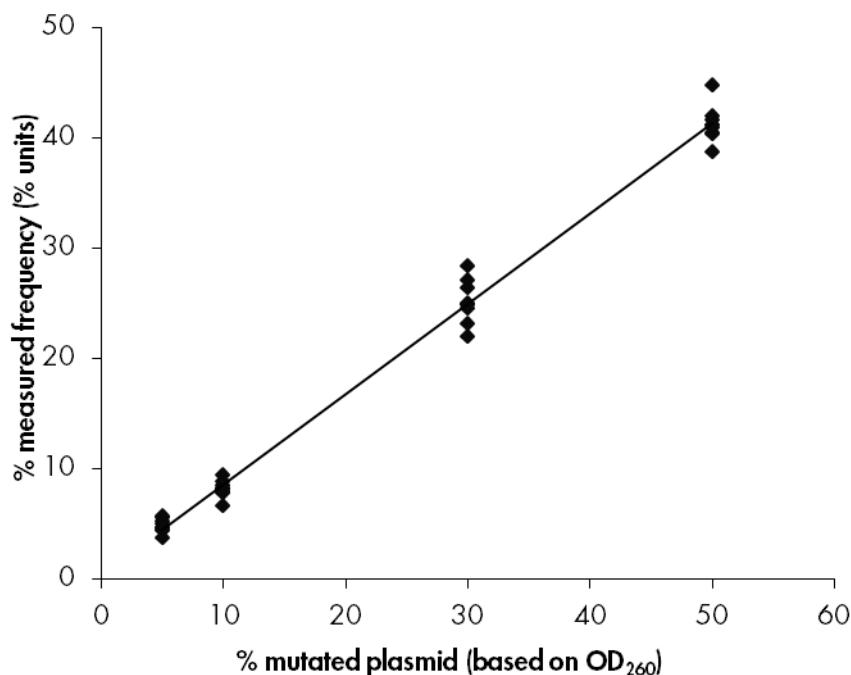
Linijškumas buvo nustatytas naudojant plazmidžių mišinius su laukinio tipo ar mutacine seka 1509_1510insGCCTAT dubliavimui *KIT* 9 egzone ir 2525A>T mutacijai *PDGFRA* 18 egzone. Plazmidės buvo sumaišytos tokiomis proporcijomis, kad būtų gauti 4 mutacijų lygiai (5, 10, 30 ir 50%). Kiekvienas mišinys buvo analizuojamas su 3 skirtingomis *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinio partijomis, atliekant 3 Pyrosequencing procedūras, į kurių kiekvieną įėjo 3 kartotiniai.

Rezultatai (kiekvieno mutacijos lygio n=9) buvo analizuojami pagal CLSI potvarkį EP6-A „Kiekybinio matavimo procedūrų linijškumo įvertinimas: statistinis metodas; patvirtintas potvarkis“ naudojant Analyse-it® Software v.2.21 ir yra parodyti 12 bei 13 pav.

Rezultatai buvo linijiniai ir įėjo į leistiną 5 % vnt. nelinijškumą testuojamame 5-50 % mutacijos lygio intervale.



12 pav. Dubliavimo 1509_1510insGCCTAT linijškumas *KIT* 9 egzone.



13 pav. Mutacijos 2525A>T linijiškumas *PDGFRA* 18 egzone.

Preciziškumas

Preciziškumo duomenys leidžia nustatyti visą tyrimų kintamumą ir jis buvo gautas 3 skirtingais lygiais, analizuojant aukščiau minėtus plazmidžių mišinius, kiekvieną su 3 kartotinais.

Atkartojimas (tyrimo metu ir naudojant kelias partijas) buvo apskaičiuotas pagal linijiškumo nustatymo duomenis (per tris procedūras tą pačią dieną, naudojant kintamas *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinio partijas). Tarpinis preciziškumas (kintamumas laboratorijoje) buvo nustatytas per 3 procedūras vienoje laboratorijoje, atliekamas 3 skirtingomis dienomis įvairių operatorių, su įvairiais PyroMark Q24 sistemomis bei *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinio partijomis. Atkuriamumas (kintamumas keliose laboratorijose) buvo apskaičiuotas per dvi procedūras, kurių kiekviena buvo atliekama vidinėje ir išorinėje laboratorijoje ir naudojant kintamas *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinio partijas.

Preciziškumo vertė išreiškiama kaip išmatuoto mutacijos dažnio standartinis nukrypimas % vnt. (11 lentelė). 1509_1510insGCCTAT dubliavimo atkartojimas, tarpinis preciziškumas ir atkuriamumas *KIT* 9 egzone atitinkamai buvo 0.8–1.6, 0.5–1.5 ir 0.7–1.9 % vnt. testuojamame 5 - 50% mutacijos lygio intervale. Mutacijos 2525A>T atkartojimas, tarpinis preciziškumas ir atkuriamumas *PDGFRA* 18 egzone atitinkamai buvo 0.6–1.9, 0.6–3.7 ir 0.5–2.4 % vnt. testuojamame 5 - 50% mutacijos lygio intervale.

11 lentelė. Dubliavimo 1509_1510insGCCTAT preciziškumas *KIT 9* egzone*

% mutavusi plazmidė†	Atkartojimas		Tarpinis preciziškumas		Atkuriamumas	
	Vidurkis	SN	Vidurkis		Vidurkis	SN
5	4.9	0.8	4.6	0.5	4.6	0.7
10	9.3	0.8	9.3	1.2	9.3	0.9
30	29.7	1.5	29.2	1.2	29.2	1.7
50	50.3	1.6	50.2	1.5	49.7	1.9

* Visos vertės pateiktos % vnt. SN: standartinis nukrypimas (n=9).

† Remiantis OD₂₆₀ matavimu.

11 lentelė. Mutacijos 2525A>T preciziškumas *PDGFRA 18* egzone‡

% mutavusi plazmidė†	Atkartojimas		Tarpinis preciziškumas		Atkuriamumas	
	Vidurkis	SN	Vidurkis		Vidurkis	SN
5	4.8	0.6	4.8	0.6	5.0	0.5
10	8.2	0.8	7.7	0.7	8.8	1.0
30	25.1	1.9	23.6	3.4	26.6	1.4
50	41.2	1.6	40.5	3.7	43.3	2.4

* Visos vertės pateiktos % vnt. SN: standartinis nukrypimas (n=9).

† Remiantis OD₂₆₀ matavimu.

Diagnostinis vertinimas

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinys buvo įvertintas, lyginant jį su Sanger sekvenavimu. DNR buvo išskirta iš 100 paimtų iš odos, formaline fiksuotų ir į parafiną įterptų (FFPE) GIST auglių mėginių, ir išanalizuota dėl *KIT 9* egzono bei *PDGFRA 18* egzono mutacijų.

DNR buvo išskirta naudojant QIAamp DNA FFPE Tissue rinkinį. Pirosekvenavimo analizė buvo atlikta naudojant *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkinį su PyroMark Q24 sistema, o Sanger sekvenavimas buvo atliktas naudojant Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Iš 100 analizuotų mėginių su visais pavyko nustatyti *KIT 9* egzono (13 pav.) bei *PDGFRA 18* egzono (14 pav.) mutacinę būseną, taikant abu metodus.

13 lentelė. Analizuotų GIST auglių mėginių rezultatai *KIT 9* egzono atžvilgiu

<i>KIT 9</i> egzonas		Sanger sekvenavimas		
		Neaptikta mutacija	1509_1510insGCCTA T Y503_F504insAY	Viso
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit</i>	Neaptikta mutacija	92	0	92
	1509_1510insGCCTA T Y503_F504insAY	0	8	8
	Viso	92	8	100

14 lentelė. Analizuotų GIST auglių mėginių rezultatai *PDGFRA 18* egzono atžvilgiu

<i>PDGFRA 18</i> egzonas		Sanger sekvenavimas				
		WT	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	Viso
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit</i>	Neaptikta mutacija	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Viso	93	2	3	2	100

Pastaba: Atliekant visas procedūras, naudojamas veikimo charakteristikų nustatymui, signalas viršijo 30 RLU, kaip ir įprastai gaunant iš 10 ng DNR, išskirtos iš formaline fiksuoto ir į parafiną įterpto (FFPE) audinio.

Pyrosequencing duomenys buvo analizuojami naudojant GIST RapidScreen Plug-in Report.

Nuorodos

QIAGEN turi didelę, nuolat atnaujinamą internetinę mokslinių publikacijų, kuriose naudojami QIAGEN produktai, duomenų bazę. Išsamios paieškos galimybės leidžia jums rasti reikiamus straipsnius paprasčiausiai ieškant pagal raktažodžius arba specifikuojant programą, tyrimų sritį, pavadinimą ir t.t. Jeigu jums reikalingas visas nuorodų sąrašas, apsilankykite QIAGEN internetinėje nuorodinėje bazėje www.qiagen.com/RefDB/search.asp arba susisiekite su QIAGEN technine pagalba ar savo vietiniu platintoju.

Cituojamose nuorodos

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 23 (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* 28, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* 17 (Supplement 10), x280.

Simboliai

Šie simboliai gali būti nurodyti ant pakuotės ir etikečių:



<N>

Reagentų pakanka <N> testams



Galiojimo data



In vitro diagnostinis medicininis produktas



Katalogo numeris










Partijos numeris



Medžiagos numeris



Komponentai

	Turinys
	Numeris
	Pasaulinės prekybos produkto numeris
	Temperatūros apribojimai
	Gamintojas
	Perskaitykite naudojimo instrukcijas
	Atsargiai

Kontaktinė informacija

Jeigu jums reikalinga techninė pagalba ir daugiau informacijos, prašom kreiptis į mūsų techninės pagalbos centrą www.qiagen.com/Support arba skambinti į vieną iš QIAGEN techninės pagalbos skyrių ar vietiniams platintojams (žr. užpakalinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

A priedas: *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimų nustatymas

Jeigu yra instaliuotas GIST RapidScreen Plug-in Report, PyroMark Q24 programinės įrangos trumpųjų šaukinių naršyklėje, takelyje „Example Files/PyroMark Setups/GIST“ rasite apibūdintus *KIT 9* egzono ir *PDGFRA 18* egzono tyrimų nustatymus. Tolesnių veiksmų atlikti nereikia. GIST RapidScreen Plug-in Report galima gauti el. paštu pyro.plugin@qiagen.com.

Mes primygtinai rekomenduojame per rankinę analizę naudoti GIST RapidScreen Plug-in Report. Kompleksinių *PDGFRA 18* egzono mutacijų negalima įtraukti į „Sequence to Analyze“ rankiniu būdu, jas reikia analizuoti naudojant GIST RapidScreen Plug-in Report. Instaliavus įjungiamą ataskaitą ar kiekvieną kartą, kai biuro kompiuteryje instaliuojama ar atnaujinama nauja programinė įranga, reikia patikrinti, ar tinkamai veikia įjungiamą ataskaitą, kaip aprašyta GIST RapidScreen Plug-in greitajame vadove.

Jeigu GIST RapidScreen Plug-in Report nebuvo instaliuota, prieš pirmą kartą paleidžiant *therascreen* GIST RapidScreen Pyro tyrimą, reikia rankiniu būdu nustatyti tyrimo failus. Nustatykite tyrimą *KIT 9* egzonui ir *PDGFRA 18* egzonui, naudodami PyroMark Q24 Software, kaip aprašyta žemiau.

Procedūra

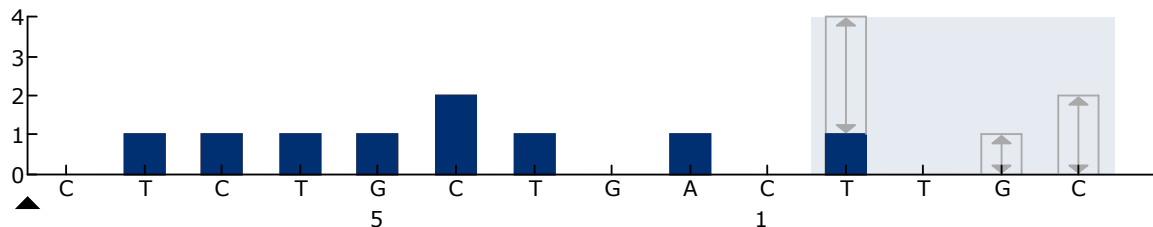
KIT 9 egzonas

A1. Įrankių juostoje spustelkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“.

A2. Rankiniu būdu įveskite šią „Dispensation Order“:
CTCTGCTGACTTGC

A3. „Sequence to Analyze“ išspausdinkite šią seką:
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTAA

Naudojant šią „Sequence to Analyze“, bus aptiktas 6 bp dubliavimas GCCTAT po 503 kodono *KIT 9* egzone.



14 pav. *KIT 9* egzono histograma su „Sequence to Analyze“ **TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTAA**, nukreipta į 6 bp dubliavimą po 503 kodono.

A4. Spustelkite stulpelį „Analysis Parameters“ ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ iki 30.

A5. Įrankių juostoje spustelkite  ir išsaugokite tyrimą kaip “KIT exon 9”.

PDGFRA 18 egzonas

A1. Įrankių juostoje spustelkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“.

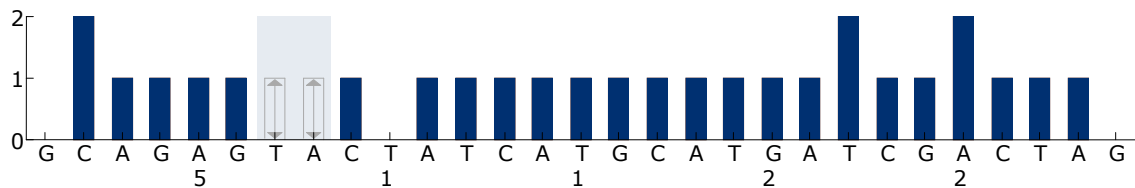
A2. Rankiniu būdu įveskite šią “Dispensation Order”:

GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG

A3. “Sequence to Analyze” išspausdinkite šią seką.

CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT

Naudojant šią “Sequence to Analyze”, bus aptikta dažniausia mutacija GAC>GTC PDGFRA 18 egzono 842 kodone (2525 nukleotide).



15 pav. PDGFRA 18 egzono histograma su “Sequence to Analyze” CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT, nukreipta į mutaciją GAC>GTC 842 kodone (2525 nukleotide).

„Sequence to Analyze“ galima pakeisti po procedūros, kad būtų galima analizuoti dėl mutacijų 2524 nukleotide (842 kodone) bei 9 delecijų ir kompleksinių mutacijų 842 – 847 kodonų srityje.

Norėdami patikrinti šių mutacijų buvimą, pakeiskite “Sequence to Analyze” pagal 15 lentelę.

Pastaba: Pespėjimo “Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations” per tyrimo nustatymą galima nepaisyti.

Pastaba: Įsitinkite, kad pavienės viršūnės aukščio riba nustatyta 30 RLU.

A4. Spustelkite stulpelį „Analysis Parameters“ ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ iki 30.

A5. Įrankių juostoje spustelkite  ir išsaugokite tyrimą kaip “PDGFRA exon 18”.

15 lentelė. Bendros mutacijos, aptiktos su *therascreen* GIST RapidScreen Pyro rinkiniu naudojant skirtingas “Sequence to Analyze”

Nukleino rūgščių pokytis	Aminorūgščių pokytis	“Sequence to Analyze”
<i>KIT</i> 9 egzonas		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTAA*
<i>PDGFRA</i> 18 egzonas		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCTCGAACTAT
2524_2535 del12 arba [‡]	D842_H845del arba [‡]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2526_2537 del12	I843_D846del [†]	
2527_2538 del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539 del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541 del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532 del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCTCGAACTAT
2524_2526 delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCTCGAACTAT
2526_2538 >G	D842_D846>E	–§
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [†]	–§


* Standartinė “Sequence to Analyze”.

[†] Mutacijos 2524G>T ir 2524_2526 GAC>TAT ir 2526_2537 del12 ir 2527_2538 del12 atitinkamai sukelia tokį pat aminorūgščių pokytį.

[‡] Mutacijos 2524_2535del12 ir 2526_2537del12 atitinkamai sukelia tokį pat nukleino rūgščių pokytį.

[§] Mutacijos 2526_2538 >G ir 2524_2526GAC>TAT negalima analizuoti AQ režimu su PyroMark Q24 Software.

B priedas: Atliekų indo ir lovelių ištuštinimas

DĖMESIO 	Pavojingi chemikalai Su vakuumine darbo vieta naudojamame denatūravimo tirpale yra natrio hidroksido, kuris dirgina akis ir odą. Visada dėvėkite apsauginius akinius, pirštines ir laboratorinį chalata. Atsakingas asmuo (pvz., laboratorijos vadovas) turi imtis reikiamų priemonių ir užtikrinti, kad supanti darbinė aplinka būtų saugi, o instrumento naudotojui nepakenks pavojingi nuodingų (cheminių ar biologinių) medžiagų lygiai, kaip nurodyta atitinkamuose medžiagos saugumo duomenų lapuose (MSDS) arba OSHA*, ACGIH† ar COSHH‡ dokumentuose. Išvėdinti dūmus ir išmesti atliekas reikia laikantis visų nacionalinių, valstybinių ir vietinių sveikatos ir saugumo reikalavimų bei įstatymų.
---	--

* OSHA: Profesinio saugumo ir sveikatos administracija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

†ACGIH: Amerikos vyriausybės sveikatos higienistų konferencija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

‡COSHH: Sveikatai pavojingų substancijų kontrolė (Jungtinė Karalystė)

Būtinai laikykitės federalinių, valstybinių ir vietinių aplinkos reikalavimų, nustatytų laboratorinių atliekų išmetimui.

Svarbus patarimas prieš pradėdant

- Šiam protokolui reikalingas labai švarus vanduo.

Procedūra

- B1. Įsitikinkite, kad į vakuuminį įrankį netiekiamas vakuumas. Įsitikinkite, kad vakuumas uždarytas (į padėtį Off), o vakuuminė pompa išjungta.**
- B2. Išpilkite loveliuose likusius tirpalus.**
- B3. Išskalaukite lovelius su labai švariu vandeniu arba prireikus pakeiskite juos.**
- B4. Ištuštinkite atliekų indą.**
Kamštelį galima nuimti ir neatjungus vamzdelio.
- B5. Jeigu reikia išvalyti vakuuminę darbo vietą (pvz., esant dulkėms ar išsipylusiems likučiams), laikykitės instrukcijų, aprašytų PyroMark Q24 vadove.**

Užsakymų informacija

Produktas	Turinys	Katalogo Nr.
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro kit (24)	24 reakcijoms su PyroMark Q24 Systems: Seq Primers, PGR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PGR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATPaS, dCTP, dGTP, dTTP ir H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Sekos pagrindo aptikimo platforma, skirta Pyrosequencing su 24 lygiagrečiai apdorojamais mėginiais	9001513
PyroMark Q24	Sekos pagrindo aptikimo platforma, skirta Pyrosequencing su 24 lygiagrečiai apdorojamais mėginiais	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuomo darbo vieta (220 V), skirta 24 mėginių paruošimui lygiagrečiai iš PGR produkto į vienos vijos šabloną	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuomo darbo vieta, skirta 24 mėginių paruošimui lygiagrečiai iš PGR produkto į vienos vijos šabloną	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Analizavimo programinė įranga	9019063
PyroMark Q24 Software	Analizavimo programinė įranga	9019062
Priedai		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 šulinėlių sekvenavimo reakcijos plokštelė	979301

* Tik Jungtinėje Karalystėje

† Kitose pasaulio šalyse.

Produktas	Turinys	Katalogo Nr.
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kasetės nukleotidų ir reagentų paskirstymui	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Daugkartiniai PyroMark Vacuum Workstation Q96 ir Q24 filtravimo zondai	979010
PyroMark Control Oligo	Sistemos instaliavimo patikrai	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Sistemos veikimo patikrai	979304
Related products		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR išskyrimų: 50 QIAamp MinElute® Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 išskyrimams: Reagent Cartridges (Tissue), Disposable Filter-Tips, Disposable Tip-Holders, Sample Tubes (2 ml), Elution Tubes (1.5 ml), Buffer G2, Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 išskyrimų: QIAamp Mini Spin Columns, Buffers, Reagents, Tubes, VacConnectors	61104

Naujausią licencijavimo informaciją ir su produktais susijusius atsakomybės atsisakymus rasite atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove ar vartotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovus ir vartotojo vadovus rasite www.qiagen.com arba galite užsisakyti iš QIAGEN techninės pagalbos ar savo vietinio platintojo.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias.

Prekės ženklai: QIAGEN[®], QIAamp[®], QIAxcel[®], BioRobot[®], CoralLoad[®], EZ1[®], HotStarTaq[®], MinElute[®], Pyro[®], Pyrogram[®], PyroMark[®], Pyrosequencing[®] (QIAGEN Group); Analyse-it[®] (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems[®] (Life Technologies Corporation); FrameStar[®] (4titude Ltd.); Milli-Q[®] (Millipore Corporation); Sepharose[®] (GE Healthcare); Variomag[®] (Thermo Fisher Scientific arba jų filialai); Windows[®] (Microsoft Corporation).

therascreen GIST RapidScreen Pyro rinkinio ribotos atsakomybės sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia, kad *therascreen* BRAF Pyro rinkinio pirkėjas ar vartotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. Produktas gali būti naudojamas tik pagal su produktu tiekiamais protokolais ir šį vadovą ir tik su j šį rinkinį įeinančiais komponentais. Turėdami intelektualinę nuosavybę, QIAGEN neleidžia naudoti ar įdiegti j prie šio rinkinio pridamus komponentus kitų komponentų, kurie neįeina j šį rinkinį, kaip aprašyta su produktu tiekiamuose protokoluose, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos rasite www.qiagen.com. Kai kuriuos papildomus protokolus QIAGEN vartotojai parūpina QIAGEN vartotojams. Šių protokolų QIAGEN kruopščiai neištestavo ar neoptimizavo. QIAGEN nesuteikia garantijos, kad jie nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. QIAGEN nesuteikia jokios garantijos, kad šis rinkinys ir/ar jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisės, išskyrus aiškiai apibūdintą licenciją.
3. Šis rinkinys ir jo komponentai yra licencijuoti vienkartiniam naudojimui ir jų negalima naudoti pakartotinai, atnaujinti ar perparduoti.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų aiškių ar turimų omenyje licencijų, išskyrus aiškiai apibūdintąsias.
5. Rinkinio pirkėjas ir vartotojas sutinka neatlikti tokių veiksmų, kurie skatintų ar palengvintų aukščiau aprašytus draudžiamus veiksmus, ir neleisti jų atlikti kitiems. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotos atsakomybės sutarties draudimus bet kokiame teisme ir atgauti visas tyrimo bei teismo išlaidas, įskaitant mokesčius teisininkams, priverstinį ribotos atsakomybės sutarties vykdymą ir intelektualinės nuosavybės teises, susijusias su rinkiniu ir/ar jo komponentais.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013–2015 QIAGEN, visos teisės saugomos.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

