

# therascreen® BRAF RGQ PCR Kit Kullanım Kılavuzu



Versiyon 2

**IVD**

in vitro diyagnostik kullanım için

Rotor-Gene® Q MDx araçlarıyla kullanım için



**REF**

870211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALMANYA

R2

**MAT**

1072802TR



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN, her türlü biyolojik örnek içeriğinin izolasyonunu ve deteksiyonununa olanak tanıyan, yenilikçi örnek ve tahlil teknolojilerinde lider bir sağlayıcıdır. Bizim gelişmiş, üstün kaliteli ürünlerimiz ve servislerimiz örnekten sonuca kadar başarıyı garanti ederler.

### QIAGEN şunlarda standartları belirler:

- DNA, RNA ve proteinlerin purifikasyonu
- Nükleik asit ve protein tahlilleri
- microRNA araştırmaları ve RNAi
- Örnek ve tahlil teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz sizlerin önemli ve göze çarpan başarılar kazanmanıza olanak sağlamaktır. Daha fazla bilgi için [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesini ziyaret ediniz.

# İçindekiler

<b>KULLANIM AMACI</b>	5
<b>Özet ve Açıklama</b>	5
<b>İşlem Prensipleri</b>	6
Tahliller	7
Kontroller	7
<b>Sağlanan Materyaller</b>	9
Kit içeriği	9
<b>Gereken ancak Sağlanmayan Materyaller</b>	9
<b>Uyarılar ve Önlemler</b>	11
Güvenlik bilgisi	11
Genel önlemler	11
<b>Ayırıcı Depolama ve İşleme</b>	12
<b>Numunelerle Çalışma ve Depolama</b>	12
<b>Prosedür</b>	13
DNA ekstraksiyonu ve preparasyonu	13
Protokol: Numune değerlendirme	14
Protokol: BRAF mutasyon tespiti	26
<b>Sonuçların Yorumlanması(Otomatik)</b>	38
Sorun giderme kılavuzu	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<i>therascreen</i> BRAF Tahlil Paketi bayrakları	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>Kalite Kontrol</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>Kısıtlamalar</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>Performans Karakteristikleri</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Boş limiti (LOB), çalışma ve cutoff değerleri	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Doğruluk: Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma	39
İşleme dahil edilen DNA'nın $\Delta C_T$ değerleri üzerindeki etkisi	39
Çapraz-reaktivite	40
Saptama limiti (LOD) değerleri	41

---

Melaninin kit performansı üzerindeki etkisi	41
Tekrarlanabilirlik	42
Çoğaltılabilirlik	42
<b>Semboller</b>	<b>44</b>
<b>Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol</b>	<b>45</b>
<b>Genel bilgiler</b>	<b>45</b>
Protokol: Isı profili oluşturmak	46
<b>Prosedür (Manuel)</b>	<b>58</b>
Protokol: Numune değerlendirme (manuel)	58
Protokol: BRAF mutasyon tespiti (manuel)	59
Protokol: theрасreen BRAF PCR RGQ Kurulumu	60
<b>Sonuçların Yorumlanması(Manuel)</b>	<b>65</b>
Yazılım analiz ayarları	65
Numune değerlendirme veri analizi	66
BRAF mutasyon tespiti veri analizi	67
<b>Ek - II Therascreen BRAF Tahlil Paketinin Kurulumu</b>	<b>74</b>
Prosedür (indirme)	74
Prosedür (CD)	74
<b>İletişim Bilgileri</b>	<b>76</b>
<b>Sipariş Bilgisi</b>	<b>77</b>

## KULLANIM AMACI

Therascreen BRAF RGQ PCR Kiti, BRAF geninde bulunan beş somatik mutasyondun tespiti için bir in vitro diyagnostik testtir ve mutasyon durumunun kalitatif bir değerlendirmesini sağlar. DNA, formalin-sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) tümör dokusundan ekstrakte edilecek ve Rotor-Gene Q MDx cihazlarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak test edilecektir. Therascreen BRAF RGQ PCR Kiti doktorlara, vemurafenib gibi BRAF hedefli terapilerden yararlanabilecek kanser hastalarını tanımlamalarında yardımcı olmayı amaçlar.

**Tablo 1. Mutasyonlar ve COSMIC IDs listesi\***

Mutasyon	Baz değişim	COSMIC ID
V600E	GTG>GAG	476
V600E kompleks	GTG>GAA	475
V600D	GTG>GAT	473
V600K	GTG>AAG	474
V600R	GTG>AGG	477

\* COSMIC ID'ler Catalog of Somatic Mutations in Cancer' den alınmıştır (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

## Özet ve Açıklama

therascreen BRAF RGQ PCR Kit, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ya da Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak BRAF geninde bulunan beş somatik mutasyonun tespiti için kullanıma hazır bir kittir.

ARMS® (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi) ve Scorpions® teknolojilerini kullanarak, therascreen BRAF RGQ PCR Kit BRAF onkojeninin 600 kodonundaki aşağıdaki mutasyonların wild-type genomik DNA arka planına karşı tespit edilmesini mümkün kılar.

- V600E
- V600E kompleks (V600Ec)
- V600D
- V600K
- V600R

Kullanılan yöntemler oldukça selektiftir ve toplam DNA varlığının miktarına bağlı olarak wild-type genomik DNA arka planındaki düşük bir yüzdedeki

mutantın tespitine imkan tanır. Bu seçicilik ve algılama limitleri boya-terminatör sekanslama gibi teknolojilerden üstündür.

## İşlem Prensibi

therascreen BRAF RGQ PCR Kit gerçek zamanlı PCR'deki mutasyonların tespiti için iki teknolojiyi kullanır — ARMS ve Scorpions.

### ARMS

Alel –ya da mutasyon –spesifik amplifikasyon ARMS kullanılarak başarılır. Taq DNA polimeraz (Taq) bir PCR primerinin 3' uzundaki uyumlu ve uyumsuz olanı ayırt etmekte etkindir. Mutasyona uğramış spesifik sekanslar, sekansların çoğunluğunun mutasyon taşımadığı numunelerde bile seçici olarak amplifiye edilirler. Primer tamamen uyumlu olduğunda, amplifikasyon tam etkinlikte gerçekleşir. 3' baz uyuşmadığında, yalnızca düşük seviyede geri planlı amplifikasyon oluşur.

### Scorpions

Amplifikasyonun tespiti Scorpions kullanılarak gerçekleştirilir. Scorpion'lar kovalent olarak floresanlı olarak etiketlenmiş bir proba bağlı bir PCR primeri içeren çift fonksiyonlu moleküllerdir. Bu prop içindeki florofor bir söndürücü ile bağlantılıdır, ayrıca floresanı azaltan bir probun içine yerleşmiştir. PCR sırasında prop ampikona bağlandığında, florofor ve söndürücü ayrılırlar. Bu reaksiyon tüpündeki floresanda ölçülebilir bir artışa yol açar.

### Kit formatı

therascreen BRAF RGQ PCR Kit içerisinde beş tahlil sağlanır.

- Bir kontrol tahlili (Control Reaction Mix; CTRL)
- Dört mutasyon tahlili (mutant reaksiyon karışımları; V600E/Ec, V600D, V600K, V600R)

V600E/Ec tahlil hem V600E hem de V600Ec mutasyonlarını tespit eder ancak bunlar arasında bir ayırım yapmaz.

Tüm reaksiyon karışımları dublektir ve FAM™ olarak etiketlenmiş hedefleri ve HEX™ olarak etiketlenmiş bir dahili kontrolü tespit etmek için ayıraçlar içerir. Dahili kontrol tahlili yanlış negatif sonuçlara yol açabilecek inhibitörlerin varlığını kontrol eder.

## Tahliller

therascreen BRAF RGQ PCR Kit iki aşamalı bir prosedür içerir. İlk aşamada, kontrol tahlili numune içindeki amplifiye edilebilir toplam BRAF DNA değerlendirmesi için gerçekleştirilir. İkinci aşamada, hem mutasyon hem de kontrol tahlilleri mutant DNA'nın varlığı ya da yokluğunu belirlemek için yapılır.

### Kontrol tahlili

FAM olarak etiketlenmiş kontrol tahlili bir numune içindeki amplifiye edilebilir toplam BRAF DNA değerlendirmesi için kullanılır. Kontrol tahlili BRAF geninin ekson 3 bölgesini amplifiye eder. Primerler ve Scorpion probu bilinen herhangi bir BRAF polimorfizmini bağımsız olarak amplifiye etmek üzere tasarlanmıştır.

### Mutasyon tahlilleri

Her bir mutasyon tahlili wild-type DNA ile spesifik bir mutant DNA arasındaki ayırım için bir FAM-etiketli Scorpion ile bir ARMS primeri içerir.

## Kontroller

Not: Deneysel çalışmaların tümü pozitif ve negatif kontroller içermelidirler.

### Pozitif kontrol

Her bir çalışma 1-5 tüpleri içinde pozitif bir kontrol içermelidir. therascreen BRAF RGQ PCR Kit pozitif kontrol reaksiyonunda şablon olarak kullanılmak üzere BRAF Positive Control (PC) içerir. Pozitif kontrol sonuçları kitin beyan edilen kabul kriterleri içine performans gösterdiğini garanti etmek üzere değerlendirileceklerdir.

### Negatif kontrol

Her bir çalışma 9-13 tüpleri içinde negatif bir kontrol ("no template control") bulundurmalıdır. therascreen BRAF RGQ PCR Kit şablon olmayan kontrol için "template" olarak kullanılmak üzere Water for NTC (NTC) içerir. Şablon olmayan kontrol çalışma sırasında herhangi bir potansiyel kontaminasyonu değerlendirmek ve dahili kontrol reaksiyonunun performansını değerlendirmek için kullanılır.

### Dahili kontrol reaksiyon değerlendirmesi

Her bir reaksiyon karışımı hedef reaksiyona ilave olarak bir dahili kontrol içerir. Bir başarısızlık ya yanlış bir sonuca neden olabilecek inhibitörlerin varlığını ya da o tüp için bir operatör ayarı hatasının gerçekleşmiş olduğunu gösterir. Eğer dahili kontrol PCR inhibisyonu nedeniyle başarısız olursa, numunenin seyreltilmesi inhibitörlerin etkisini azaltabilir ancak bunun aynı zamanda hedef DNA'yı da seyrelteceği not edilmelidir. Kit içerisine bir tüp Numune Seyreltme

---

Suyu (Dil) dahil edilmiştir. Numunelerin seyreltilmesi bu kit içerisinde dahil edilen Numune Seyreltme suyu (Dil) ile yapılmalıdır.

### **Numune değerlendirme**

Numune içindeki toplam amplifiye edilebilir BRAF DNA değerlendirmesi için theascreen BRAF RGQ PCR Kit ile birlikte verilen Control Reaction Mix (CTRL) kullanılması şiddetle önerilir. Kontrol tahlili BRAF geninin ekzon

3'ünün bir bölgesini amplifiye eder. Numunelerin yalnızca pozitif kontrol olarak BRAF Positive Control (PC) ve şablon olmayan kontrol olarak Water for NTC (NTC) kullanan kontrol tahlili ile hazırlanması önerilir.

Not: DNA değerlendirmesi PCR'ye bağlı olmalıdır ve absorban değerine dayanan miktar belirlemesinden ayrılabilir. Değerlendirmenin kalitesini ve theascreen BRAF RGQ PCR Kit ile analiz öncesinde numune içindeki DNA miktarını garanti etmek için ilave Control Reaction Mix (CTRL) sağlanır.



# Sağlanan Materyaller

## Kit içeriği

<b>therascreen BRAF RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Katalog no.</b>			<b>870211</b>
<b>Reaksiyon sayısı</b>			<b>24</b>
Kontrol reaksiyon karışımı	Kırmızı	1 CTRL	2 x 720 µl
V600E/Ec Reaksiyon karışımı	Mor	2 V600E/Ec	720 µl
V600D Reaksiyon karışımı	Turuncu	3 V600D	720 µl
V600K Reaksiyon karışımı	Pembe	4 V600K	720 µl
V600R Reaksiyon karışımı	Yeşil	5 V600R	720 µl
BRAF Pozitif kontrol	Bej	PC	250 µl
Taq DNA polimerazı	Nane yeşili	Taq	2 x 80 µl
NTC suyu	Beyaz	NTC	1.9 ml
Numune seyreltmesi suyu	Beyaz	Dil.	1.9 ml
therascreen <i>BRAF RGQ PCR Kit Kullanım Kılavuzu</i> (İngilizce)			1

## Gereken ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar ceketi giyin, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlükler takın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinde mevcut uygun güvenlik veri sayfalarına (SDSs) bakınız.

### Ayrıçlar

- DNA Ekstraksiyon kiti (“DNAekstraksiyonu ve preparasyonu”, sayfa 13ü inceleyiniz)
- Ksilen
- Etanol (96–%100)\*\*

\* Metanol veya metiletilketon gibi bileşenler içeren denatüre alkol kullanmayınız.

## Tüketilebilirler

- 1.5 ml ya da 2 ml mikro santrifüj tüpleri (liziz aşamaları için)
- 1.5 ml mikro santrifüj tüpleri (elüsyon aşamaları için) (Brinkmann [Safe-Lock, kat. no. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat. no. 0030 120.086] ya da Sarstedt [Safety Cap, kat. no. 72.690] dan temin edilebilir) \*
- Özel pipetler\* †(ayarlanabilir) numune preparasyonu için
- Özel pipetler\* ‡(ayarlanabilir) PCR master karışım preparasyonu için
- Özel pipetler\* ‡(ayarlanabilir) şablon DNA dağıtımı için
- Filtreli steril pipet uçları (çapraz kontaminasyondan kaçınmak için, aerosol bariyerli pipet uçları öneririz)

## Ekipman

- Termomikser, ısıtıcılı orbital inkübatör, ısıtma bloğu ya da 90°C'de inkübasyon yapabilen su banyosu\*‡
- 2 ml reaksiyon ‡tüpleri için rotorlu tezgah üstü santrifüj\*
- Vorteks‡
- Floresan kanallı Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM‡± Cycling Green ve Cycling Yellow için (sırasıyla FAM ve HEX tespiti için)
- Otomatik mutasyon tespiti için kurulmuş BRAF tahlil paketi Rotor-Gene Q yazılımı versiyon 2.3 (sürüm 3.1.1) ("Ek - II Therascreen BRAF Tahlil Paketinin Kurulumu", sayfa 74)  
**Not:** Rotor-Gene Q yazılımı, manuel mutasyon tespiti için BRAF tahlil paketi olmadan da kullanılabilir. "Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol", sayfa45yi inceleyiniz.
- 0.1 ml şerit tüpler ve kapakları, 72-yuvalı rotor ile kullanım için (QIAGEN, kat. no. 981103 veya 981106)
- Master karışımların hazırlanması için steril mikrosantrifüj tüpleri
- Yükleme Bloğu 72 x 0.1 ml tüp, tek-kanal pipetli manuel reaksiyon yüklenmesi için alüminyum blok (QIAGEN, kat. no. 9018901)

\*Bu tedarikçilerin tam bir listesi değildir.

†Araçların kontrol edildiğinden ve üreticinin tavsiyelerine göre ayarlandığından emin olunuz.

‡Bazı ülkelerde, uygulanabilirse Mayıs 2011 veya daha sonrası üretim tarihli Rotor-Gene Q 5plex HRM aracı kullanılabilir. Üretim tarihi, aracın arkasındaki seri numarasından öğrenilebilir. Seri numarası "aayynnn" formatındadır ve "aa" üretim ayını rakamlarla, "yy" üretim yılının son iki rakamını ve "nnn" eşsiz araç tanımlayıcısını belirtir.

# Uyarılar ve Önlemler

in vitro diyagnostik kullanım için

## Güvenlik bilgisi

Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun laboratuvar ceketi giyin, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlükler takın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinde mevcut uygun güvenlik veri sayfalarına (SDSs) bakınız. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşeni için GVSleri bulabileceğiniz, inceleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) adresinde uygun ve kompakt PDF formatlarında bulunmaktadır.

## Genel önlemler

Kullanıcı her zaman aşağıdaki hususlara dikkat etmelidir.

- Pozitif materyalleri (numuneler ve pozitif kontroller) tüm diğer ayıraçlardan ayrı olarak depolayın ve ekstrakte edin ve bunları reaksiyon karışımlarına özel olarak ayrılmış bir alanda ilave edin.
- PCRLarın sentetik kontrol materyali ile kontamine olmamasına dikkat ediniz. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması ve DNA şablonunun ilave edilmesinde ayrı, özel pipetler kullanılmasını öneririz. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması ve dağıtılması ve şablon ilavesi ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. PCR çalışmasının tamamlanmasından sonra Rotor-Gene Q tüpleri açılmamalıdır. Bu PCR sonrası ürünler ile laboratuvar kontaminasyonunu önlemek içindir.
- theascreen BRAF RGQ PCR Kit ayıraçları optimal olarak seyreltilmişlerdir. Ayıraçların daha fazla seyreltilmelerini önermeyiz zira bu performans kaybına neden olabilir. 25 µl'den daha az volümde reaksiyon kullanımını önermeyiz zira bu yanlış negatif riskini artıracaktır.
- theascreen BRAF RGQ PCR Kit içindeki ayıraçların tamamı optimal performans için özel olarak formüle edilirler. theascreen BRAF RGQ PCR Kit içinde sağlanan ayıraçların tümü yalnızca aynı theascreen BRAF RGQ PCR Kit içindeki diğer ayıraçlar ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmışlardır. Eğer optimal performans korunmak isteniyorsa kit içindeki ayıraçların yerine başkaları kullanılmamalıdır.
- Yalnızca kit içinde sağlanan Taq DNA polimeraz (Taq) kullanın. Taq DNA polimerazı aynı ya da diğer türdeki kitlerdeki ile ya da diğer tedarikçilerden sağlanan Taq DNA polimeraz ile değiştirmeyin.

## Ayıraç Depolama ve İşleme

therascreen BRAF RGQ PCR Kit kuru buz üzerinde sevk edilir ve teslim alındığında hala donmuş olmalıdır. Eğer therascreen BRAF RGQ PCR Kit teslim alındığında donmamış ise, nakliye sırasında dış paketi açılmış ise ya da

sevkiyat bir paketleme notu, kullanım kılavuzu ya da ayıraçlar içermiyorsa, lütfen QIAGEN Teknik Servis Departmanlarından birisi ile veya yerel distribütörler ile iletişime geçiniz (arka kapağa bakın ya da [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sayfasını ziyaret edin).

therascreen BRAF RGQ PCR Kit teslim alınmasının ardından derhal sabit ısı bir dondurucuda  $-15$  ila  $-30^{\circ}\text{C}$  arasında depolanmalı ve güneş ışığından korunmalıdır - Scorpions (tüm floresanla etiketlenmiş molekülleriyle birlikte) florışıldama bozulması ve dolayısıyla performans kaybından kaçınmak adına ışıktan korunmalıdır.

Belirtilen depolama koşulları altında orijinal paketi içinde depolandığında, kit etiketi üzerine belirtilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Tekrarlanan dondurma ve çözme işleminden kaçınılmalıdır. Maksimum 6 donma-çözme döngüsü sınırı aşılmamalıdır.

## Numunelerle Çalışma ve Depolama

Not:Numunelerin tümü potansiyel olarak enfeksiyonlu materyaller olarak muamele görmelidir.

Numune materyalleri formalin-sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) dokulardan ekstrakte edilmiş insan genomik DNA'sı olmalıdır. Numunelerin kalitesini korumak için numuneler standart patolojik yöntemlere göre nakledilmelidirler.

Tümör numuneleri homojen değildir ve bir tümör numunesinden alınan veriler aynı tümörün diğer bölümlerinden alınanlar ile konkordant olmayabilirler. Tümör numuneleri aynı zamanda tümör olmayan dokular da içerebilirler. Tümör olmayan dokudan alınan DNA'nın therascreen BRAF RGQ PCR Kit tarafından tespit edilen mutasyonları içermesi beklenmeyecektir.

## Prosedür

### DNAekstraksiyonu ve preparasyonu

*Therascreen* BRAF RGQ PCR Kitinin performans özellikleri, QIAamp FFPE doku kiti (QIAGEN, kat. no. 56404) ile ekstrakte edilen DNA kullanılarak oluşturulmuştur. Eğer QIAamp FFPE doku kitini kullanıyorsanız, DNA ekstraksiyonunu el kitapçığı içerisindeki talimatlara uygun şekilde aşağıdakileri dikkate alarak uygulayınız:

- FFPE bölümlerini cam slaytlar üzerinde toplayın.
- Doku bölümlerinin etrafındaki fazla parafini yeni, steril bir bisturi kullanarak kazıyın.
- Doku bölümlerini ekstrakte edilecek her bir numune için yeni bir bisturi kullanarak mikrosantrifüj içine sıyırın.
- Arıtılmış genomik DNA 120–200 µl Buffer ATE içinde elüte edilmelidir. (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit içinde sağlanmaktadır). DNA'yı –15 ila –30°C arasında depolayın.

DNA değerlendirmesi *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit ile birlikte sağlanan Control Reaction Mix (CTRL)'e dayanmalıdır ve absorban değerlerine dayanan miktar belirlemesinden ayrılabilir. *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit ile analiz öncesinde numuneler içindeki DNA'nın kalitesinin değerlendirilmesini ve miktar belirlemesini sağlamak için ilave Control Reaction Mix (CTRL) sağlanır.

Not:Analiz için yeterli DNA sağlamak için, öncelikle minimum iki FFPE slaytın birlikte ekstrakte edilmesi ve kontrol tahlili ile değerlendirilmesi önerilir. Eğer PCR için yetersiz DNA elde edilirse, daha fazla slayt ekstrakte edilir.

Not:Analiz için yeterli DNA sağlamak için, FFPE bölümlerinin minimum 5 µm kalınlıkta olması gerekir.

*therascreen* BRAF RGQ PCR Kit içindeki tüm tahliller kısa PCR ürünleri üretirler. Ancak, *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit fazla şekilde parçalanmış DNA ile çalışmayacaktır.

## Protokol: Numune değerlendirme

Bu protokol, numunelerde BRAF CE Numune Değerlendirmesi Kapalı Şablon (Tahlil Paketi) kullanılarak, otomatik numune değerlendirme için toplam amplifiye edilebilir DNA'yı tahlil etmek adına kullanılır.

Not: Manuel numune tahlili için "Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol", sayfa45yi inceleyiniz.

### Başlamadan önceki önemli hususlar

- İşleme başlamadan önce lütfen "Genel önlemler", sayfa 11ü okuyunuz.
- İşleme başlamadan önce Rotor-Gene Q hakkında bilgi sahibi olmak için kendinize zaman ayırın. Cihazın kullanım kılavuzuna bakın.
- Enzimi inaktive edeceğinden Taq DNA polimeraz ya da Taq DNA polimeraz içeren her türlü karışımı vortekslemeyin.
- Taq DNA polimerazı (Taq), ucun fazla enzim ile kaplanmasından kaçınmak için pipet ucunu sıvı yüzeyin tam altına dikkatlice yerleştirmek suretiyle pipetleyin.
- Mevcut Control Reaction Mix (CTRL) kullanılarak 24 numune değerlendirilebilir.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Rotor-Gene Q aracının ilk kullanımından önce therascreen BRAF Tahlil Paketi yazılımının yüklü olduğundan emin olunuz ("Ek - II Therascreen BRAF Tahlil Paketinin Kurulumu", sayfa 74)
- Her bir kullanımdan önce, tüm ayıraçların en az 1 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25°C) eritilmiş olması, 10 defa ters çevrilerek karıştırılması ve tüpün altında kalan içeriği toplamak adına kısaca santrifüjlenmesi gerekmektedir.
- Her bir kullanım öncesinde Taq DNA polimerazın (Taq) oda sıcaklığında (15–25°C) olduğundan emin olun. Enzimi tüpün tabanına toplamak için tüpü kısaca santrifüjleyin.

### Prosedür

- 1. Kontrol reaksiyon karışımı (CTRL), Şablonsuz kontrol suyu (NTC) ve Pozitif kontrol (PC)'ü oda sıcaklığında (15–25°C) minimum 1 saat süreyle tamamen çözdürün. Ayıraçlar çözüldüğünde, tuzların lokal konsantrasyonlarından kaçınmak için her bir tüpü 10 kez baş aşağı çevirmek suretiyle bunları karıştırın ve daha sonra içeriğin tüpün tabanında toplanmasını sağlamak için kısaca santrifüjleyin.**
- 2. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.'de verilen volümlere göre yeterli master karışımı (Kontrol Reaksiyon**

**karışımı[CTRL] artı DNA numuneleri için Taq DNA polimeraz [Taq]), bir pozitif kontrol reaksiyonu ve bir şablon olmayan kontrol reaksiyonu hazırlayın. PCR hazırlığı için yeterli fazlalık sağlamak üzere 1 ekstra numune için ayıraç ilave edin.**

**Master karışım numune hariç PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.**

**Tablo 2. Kontrol tahlil master karışımının preparasyonu \***

<b>Bileşen</b>	<b>Volüm</b>
Kontrol reaksiyon karışımı (CTRL)	19.5 µl x (n+1)*
<i>Taq</i> DNA polimerazı (Taq)	0.5 µl x (n+1)*
<b>Toplam volüm</b>	<b>20.0 µl/reaksiyon</b>

\* n = Reaksiyon sayısı (numuneler + kontroller). PCR hazırlığı için yeterli fazlalık sağlamak üzere 1 ekstra numune (n+1) için ayıraç ilave edin. n değeri 26'nın üzerinde olmamalıdır (24 numune artı 2 kontrol).

- 3. Aşağı ve yukarı 10 kez pipetlemek suretiyle master karışımı tamamen karıştırın. Uygun sayıdaki şerit tüpü Şekil1'deki yerleşim düzenine göre yükleme bloğuna yerleştirin. Derhal 20 µl master karışımı her bir PCR şerit tüpüne ilave edin.**

Kapaklar gerekinceye kadar plastik kaplar içinde kalmalıdır. Numune değerlendirme için, kontrol tahlil master karışımı bir pozitif kontrol haznesine, bir negatif kontrol haznesine ila ve edilmeli ve her bir numune için bir hazne olmalıdır.

Tahlil									
Kontrol	1 (PC)	9	17	25	-	-	-	-	-
Kontrol	2 (NTC)	10	18	26	-	-	-	-	-
Kontrol	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Kontrol	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Kontrol	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Kontrol	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Kontrol	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Kontrol	8	16	24	-	-	-	-	-	-

**Şekil1. Yükleme bloğundaki numune değerlendirme tahlilleri yerleşim düzeni.** Sayılar yükleme bloğundaki pozisyonları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

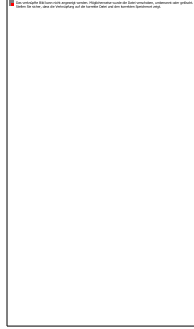
- Derhal 5 µl Şablonsuz Kontrol suyunu (NTC)'yi şablonsuz kontrol tüpüne (2 nolu PRC tüpü) ekleyin ve tüpün kapağını kapatın. Her bir numuneden 5 µl'ü numune tüplerine (PCR tüp numaraları 3-36) ekleyin ve tüplerin kapağını kapatın. 5 µl BRAF Pozitif Kontrolü(PC) pozitif kontrol tüpüne (PCR tüp no. 1) ekleyin ve tüpün kapağını kapatın.

Tüplerin Rotor-Gene Q MDx cihazlarının içine yerleştirilme yönünü göstermek için tüp kapaklarını işaretleyin.

- Tüm PCR tüpleri kapaklandıktan sonra, tüm tüplere numune ilave edilmiş olduğundan emin olmak için numune tüp dolum seviyelerini görsel olarak kontrol edin.
- Numuneleri ve reaksiyon karışımlarını karıştırmak için tüm PCR tüplerini evirtin (4 kez).
- PCR şerit tüpleri 72-hazneli rotorun uygun pozisyonlarını yerleştirin (Şekil 1).  
Eğer rotor tamamen dolu değilse, rotor üzerindeki tüm boş pozisyonlar kapaklı, boş tüpler ile doldurulmalıdır.
- Derhal 72-hazneli rotoru Rotor-Gene Q MDx cihazına yerleştirin. Çalışma sırasında tüpleri güvenceye almak için kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q cihaz aksesuarı) rotorun üzerine yerleştirilmiş olduğundan emin olun.

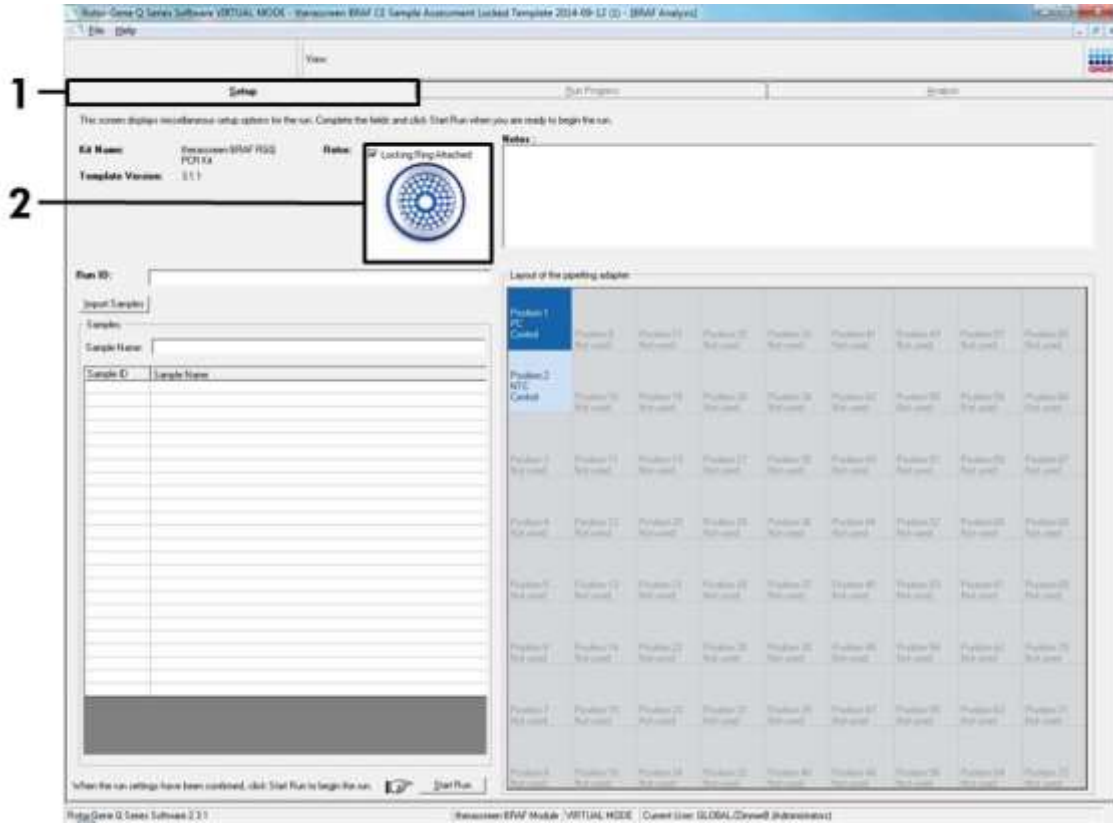


9. Rotor-Gene Q serisi yazılımını, Rotor-Gene Q MDx aracının bağlı bulunduğu laptopın masaüstünde bulunan “therascreen BRAF CE Numune Değerlendirme Kilitli Şablon” simgesine çift tıklayarak çalıştırınız (Şekil2yi inceleyiniz).



Şekil2. “therascreen BRAF CE Numune değerlendirme kilitli şablon” simgesi.

10. “Yükle” sekmesi varsayılan olarak çıkacaktır (Şekil3). Kilitleme halkasının düzgünce bağlı olduğundan emin olunuz ve “Kilitleme Halkası Bağlı” kutucuğunu işaretleyiniz. Rotor-Gene Q aracının kapağını kapatınız.



Şekil3. “Yükle” sekmesi (1) ve “Kilitleme Halkası Bağlı” kutucuğu (2).

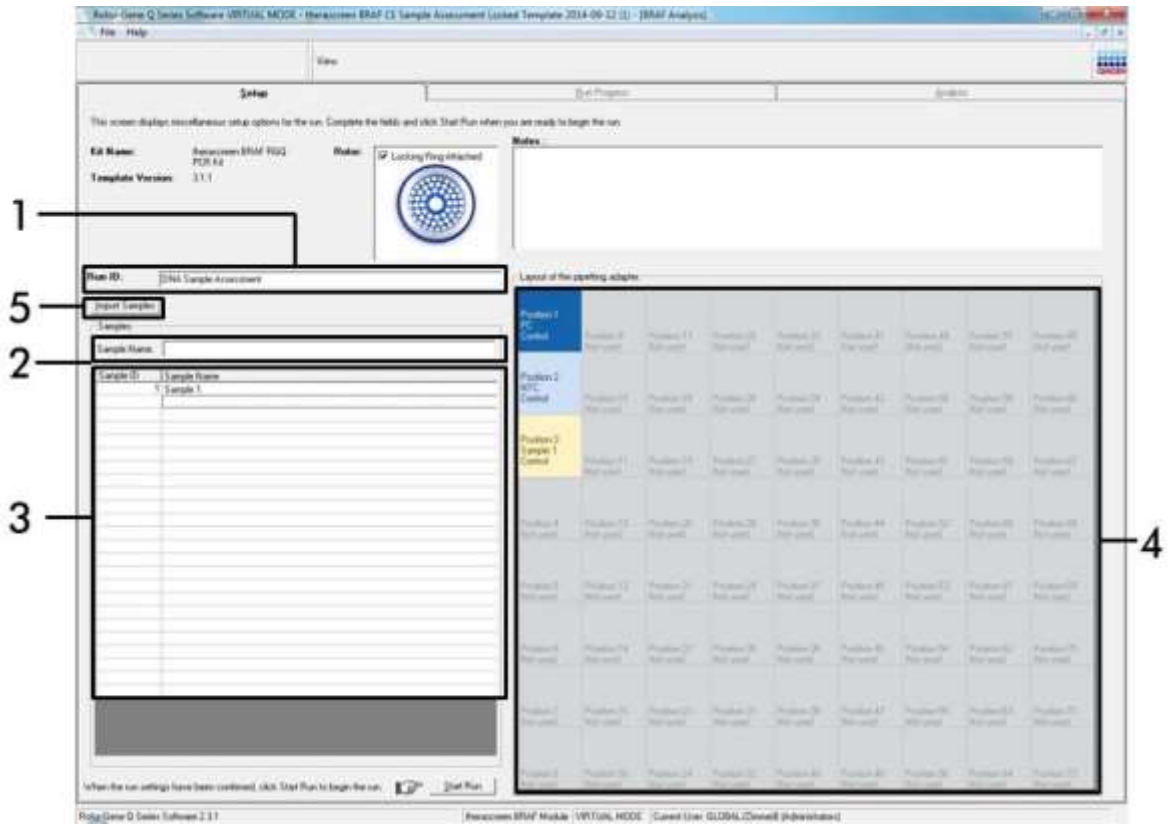
11.

“Yürütme ID” kısmını yerel isimlendirme konvansiyonunuza uygun şekilde doldurunuz. “Numune adı” kısmını yerel isimlendirme konvansiyonunuza göre doldurunuz ve Giriş (Enter) tuşuna basınız. Bu işlem numune adını aşağıdaki numune listesine ekleyecek ve numuneye bir “Numune ID”si verecektir (1,2,3, vs.). Bunlara ek olarak, sağdaki “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli numune adını içermesi adına güncellenecektir (Şekil4).

Not: Alternatif bir yol olarak \*.smp (Rotor-Gene Q numune dosyası) veya \*.csv (virgülle ayrılmış değerler) formatında depolanmış numune isimleri “Numuneleri dışa aktar” butonuyla dışa aktarılabilir. Numune isimleri bu yöntemi kullanarak otomatik olarak yerleştirilecektir.

Not: “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli içerisinde, numune adı ekinin bir renk değişimiyle vurgulanıp vurgulanmadığını ve numune adının numune pozisyonunda olup olmadığını kontrol ediniz (Şekil4).

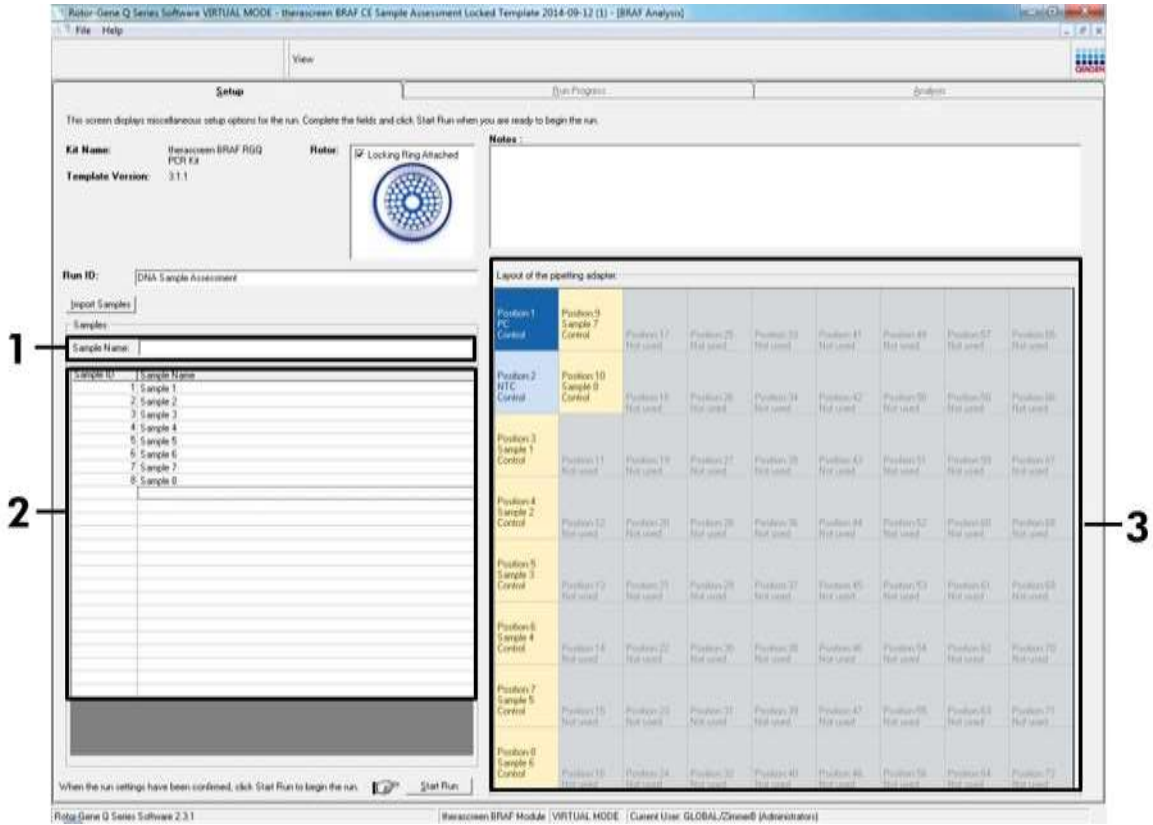
Not: 8 karakterden fazla olan numune isimleri “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli içerisinde tam olarak gösterilmeyebilir.



Şekil4. “Yürütme ID” si ve “Numune adı”nın girilmesi.(1 = “Yürütme IDsi” kayıt alanı, 2 = “Numune adı” kayıt alanı, 3 = Numune listesi, 4 = “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli, 5 = “Numuneyi dışa aktar” butonu).

## 12. Eklenen tüm numunelerin adını girebilmek adına adım 11 i tekrarlayınız. (Şekil5).

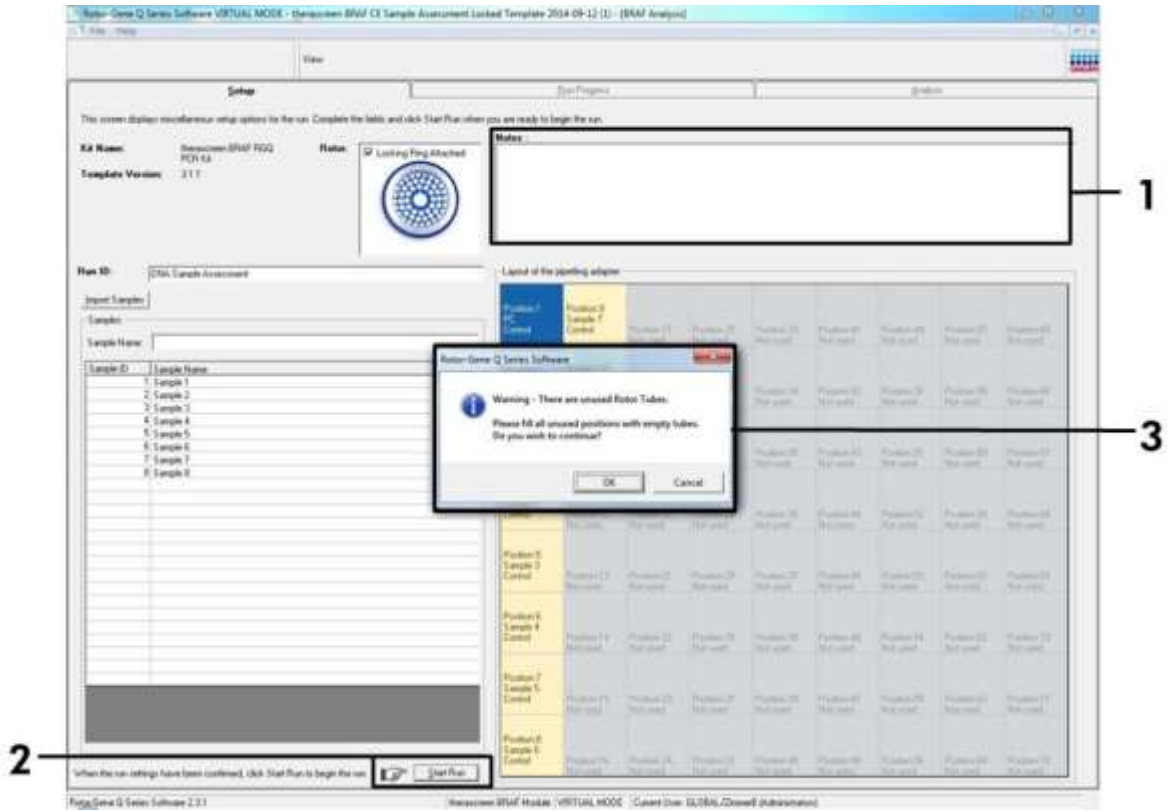
Not: Numune adını düzenlemek için, numune listesindeki “Numune adı” sekmesine tıklayınız ve seçilen numunenin “Numune adı” kayıt alanı bölümünde görünmesini bekleyiniz. “Numune adı” kısmını yerel isimlendirme konvansiyonunuza göre doldurunuz ve güncellemek için Giriş (Enter) tuşuna basınız.



Şekil5. “Numune adı” kayıt alanına ek numune isimleri girmek. (1 = “Numune adı” kayıt alanı, 2 = Numune listesi, 3 = “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli).

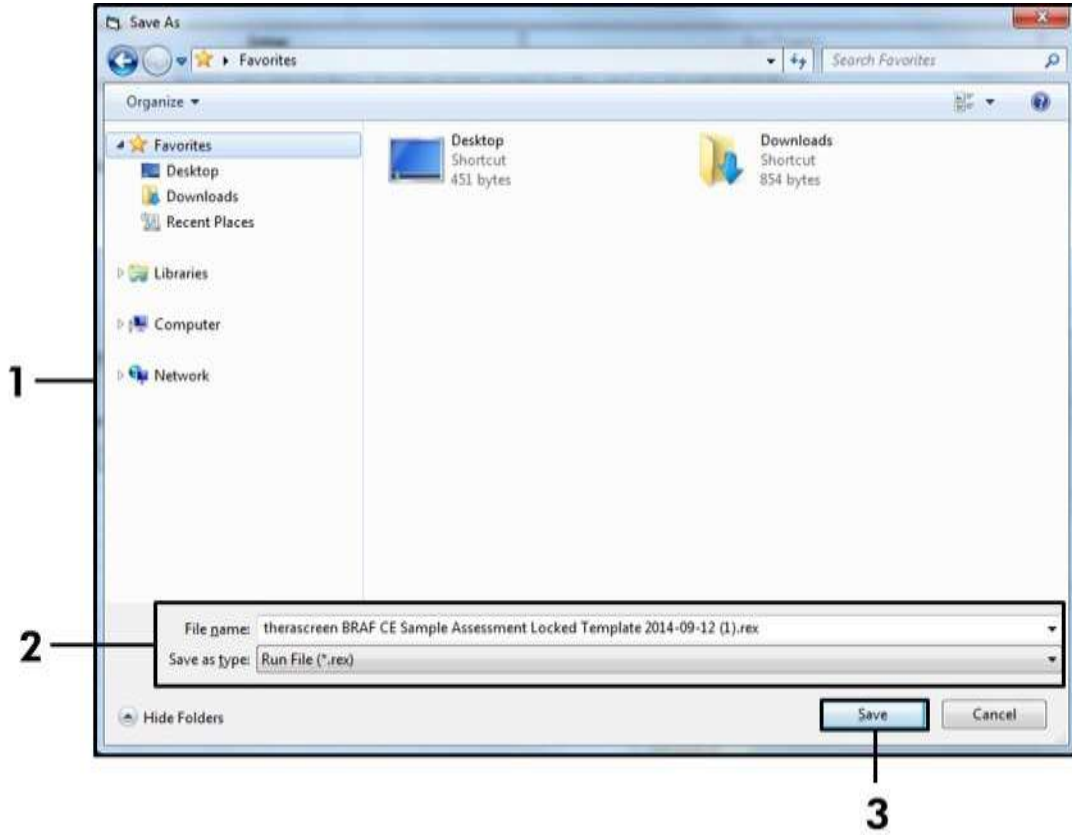
**13. Tüm numune isimleri girildikten sonra, doğruluklarını kontrol ediniz. Herhangi bir ek bilgi gerekiyorsa “Notlar” kayıt alanına giriniz ve “Yürütmeyi başlat” butonuna tıklayınız (Şekil6).**

Not: Herhangi bir rotor pozisyonunun kullanılmadığı durumlarda, rotor üzerindeki tüm kullanılmayan pozisyonların kapaklı, boş tüplerle doldurulmuş olması gerektiğini hatırlatmak adına bir “Uyarı” belirecektir (Şekil6). Tüm rotor pozisyonlarının kapaklı, boş tüplerle doldurulduğundan emin olduktan sonra ilerlemek için “OK” butonuna basınız.



**Şekil6. “Notlar” kayıt alanı (1), “Yürütmeyi başlat” butonu (2) ve kullanılmayan rotor pozisyonları “Uyarı”sı (3).**

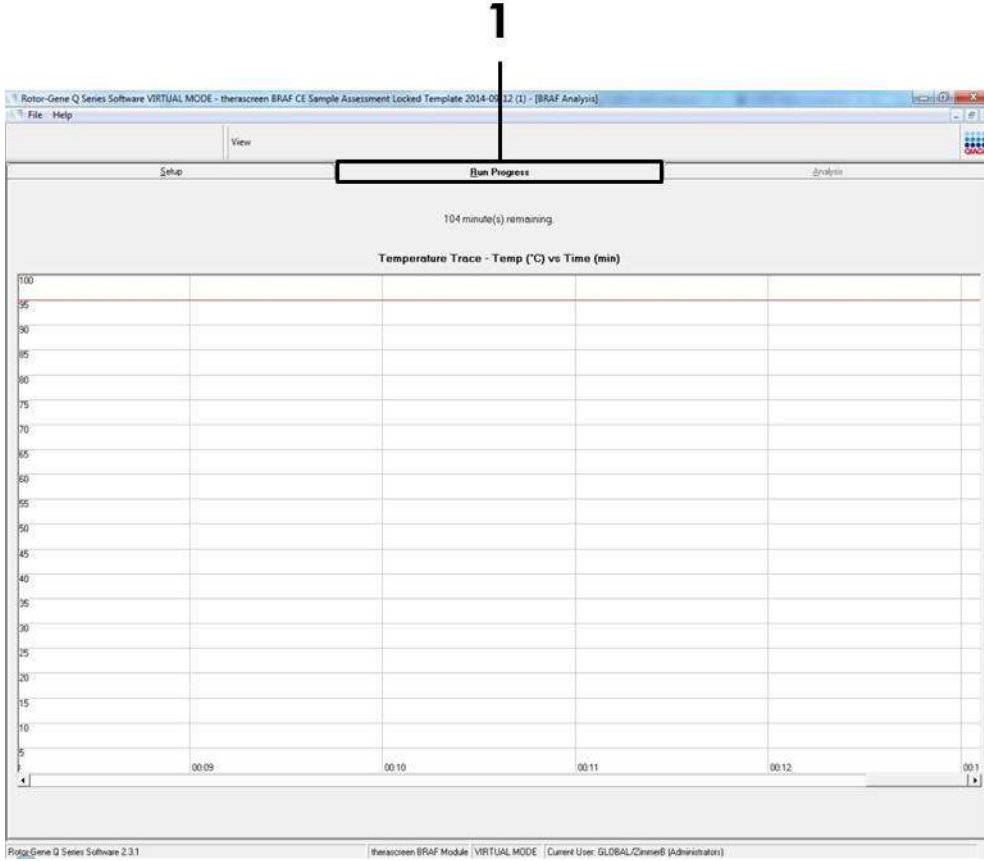
14. "Farklı Kaydet" penceresi belirecektir. Uygun bir dosya adı seçip PCR işlemini \*.rex yürütme dosyası olarak seçilen konuma kaydediniz ve "Kaydet" butonuna basınız (Şekil7).



Şekil7. Yürütme dosyasını kaydetmek. (1 = "Farklı Kaydet" penceresi, 2 = "Dosya Adı" ve "Tür olarak kaydet" alanları, 3 = "Kaydet" butonu).

## 15. PCR işlemi başlayacaktır.

Not: Yürütme başladığında, ısı işaretini ve kalan yürütme zamanını göstermek adına otomatik olarak “Yürütme ilerlemesi” sekmesi açılacaktır (Şekil8).



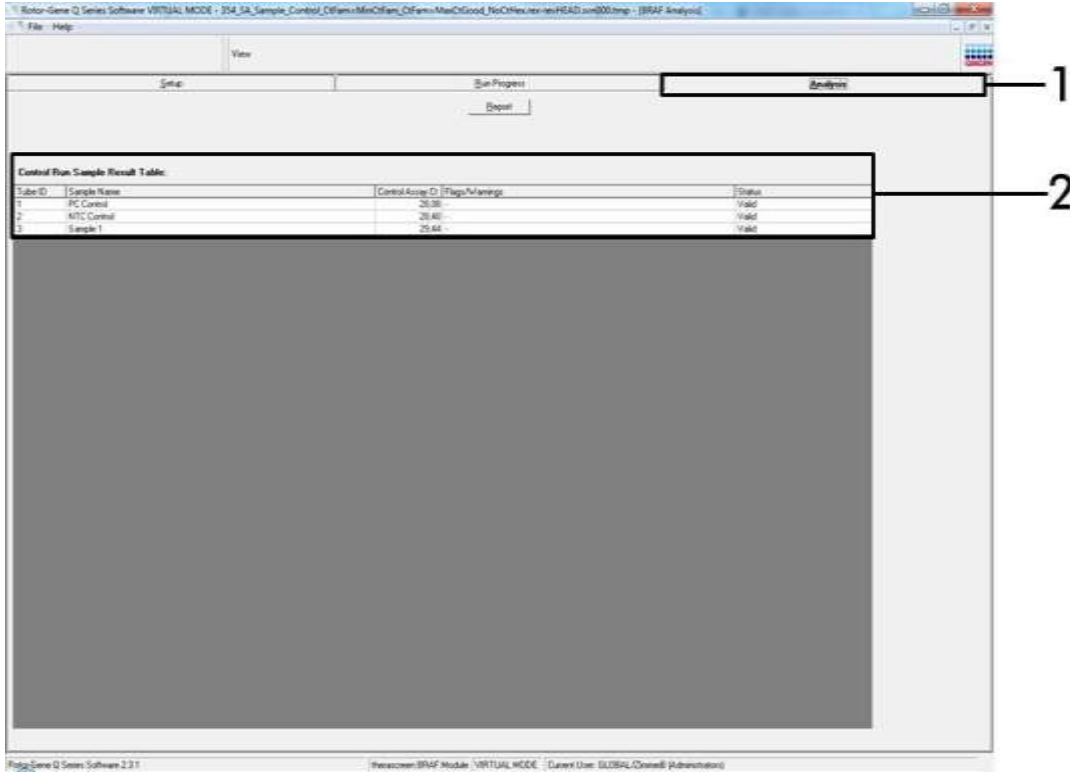
Şekil8. “Yürütme ilerlemesi” sekmesi.

**16. Yürütme işlemi bittikten sonra, “Analiz” sekmesi otomatik olarak açılacaktır.**

Not: Eğer “Analiz” sekmesi açılmaz ise, “Analiz” sekmesine tıklayınız (Şekil9).

Not: Hesaplama yönteminin bir açıklaması sayfa 44 içerisinde “

Sonuçların Yorumlanması” bölümünde sunulmuştur.



Şekil9. “Analiz” sekmesi ve sonuçların raporlanması. (1 = “Analiz” sekmesi, 2 = “Numune sonuç tablosu”).

### 17. Kontrol sonuçları aşağıdaki gibi “Numune KK Sonuç Tablosu” içerisinde raporlanacaktır (Şekil9).

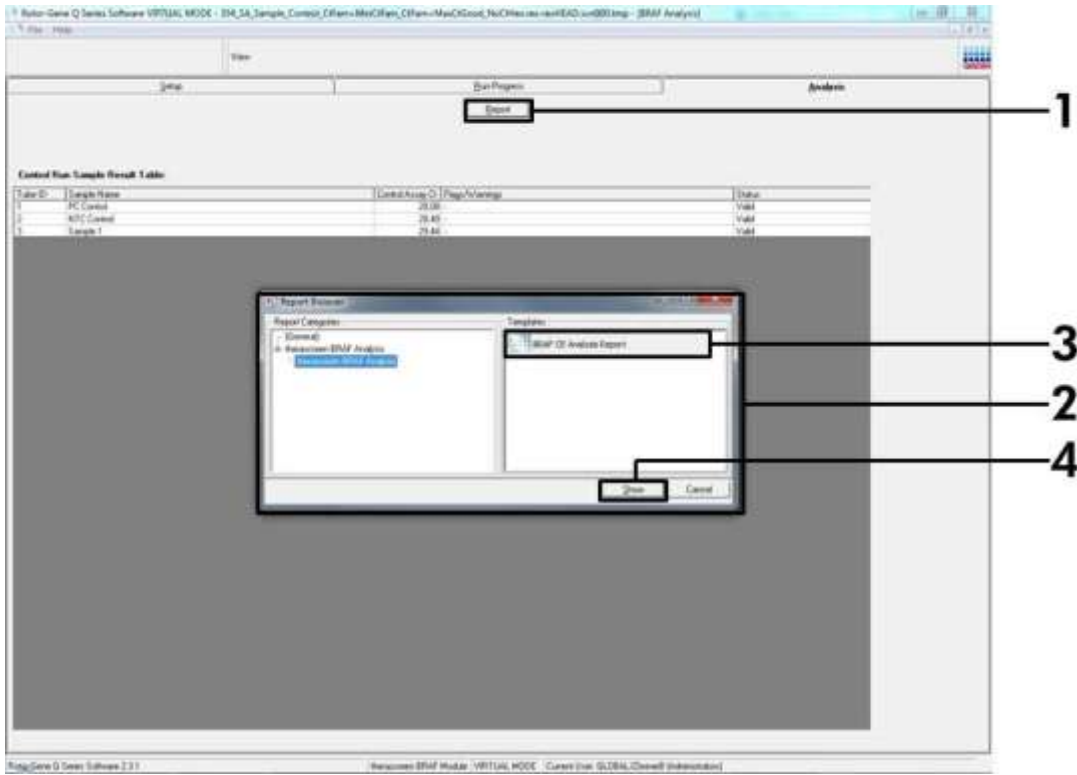
- Yürütme kontrolleri (PC ve NTC, sırasıyla tüp pozisyonları 1 ve 2).Eğer sonuçlar kabul edilebilir aralıktadır ise, her biri “Geçerli” olarak görülecektir, aksi halde “Geçersiz” sonucu belirir.
- Numune kontrol reaksiyonu  $C_T > 32.00$  “Geçersiz” olarak görülecektir.DNA miktarı, mutasyon analizi için yeterli değildir. Numuneyi tekrar test ediniz. Eğer DNA miktarı hala yetersiz ise, mevcut olduğu durumlarda daha fazla tümör dokusu ekstrakte ediniz (bkz. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden., Fehler! Textmarke nicht definiert.**
- Numune kontrol reaksiyonu  $C_T < 21.95$  “Geçersiz” olarak görülecektir.DNA konsantrasyonu mutasyon analizi için fazla yüksektir. Nükleazsız seyreltme su ile (Dil.) seyreltiniz ve tekrar test ediniz.  $C_T$  21.95–32.00 ye seyreltiniz. A 1:1 seyreltme işlemi  $C_T$  değerini yaklaşık 1.0 a yükseltir.
- Numune kontrol reaksiyonu  $C_T$  21.95–32.00 ( $21.95 \leq \text{Kontrol } C_T \leq 32.00$ ) “Geçerli” olarak görülecektir.DNA konsantrasyonu mutasyon analizi için yeterlidir.



Not: Eğer re-ekstraksiyon veya seyreltme gerekirse, kontrol reaksiyonunu DNA konsantrasyonunun kullanıma uygunluğunu onaylamak adına tekrar ediniz.

**18. Rapor dosyaları “Rapor” butonuna basılarak üretilebilir. “Rapor Tarayıcısı” penceresi açılacaktır. “Şablonlar” altında “BRAf CE Analiz Raporu”nu seçiniz ve “Göster” butonuna basınız. (Şekil10).**

Not: Raporlar, her raporun üst sol köşesinde bulunan “Farklı Kaydet” butonuyla alternatif bir konuma kaydedilebilir.



**Şekil10. “BRAf CE Analiz Raporu”nu seçmek. (1 = “Rapor” butonu, 2 = “Rapor Tarayıcısı”, 3 = “BRAf CE Analiz Raporu”, 4 = “Göster” butonu).**

## Protokol: BRAF mutasyon tespiti

Bu protokol BRAF mutasyonlarının tespiti içindir. Eğer numunelerden biri numune değerlendirmesini geçerse, BRAF mutasyon tahlili kullanılarak otomatik bir yazılımla test edilebilir.

**Not:** Manuel mutasyon tespiti için “Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol”, Sayfa45 inceleyiniz.

### Başlamadan önceki önemli hususlar

- İşleme başlamadan önce lütfen “Genel önlemler”, sayfa 11ü okuyunuz.
- İşleme başlamadan önce Rotor-Gene Q hakkında bilgi sahibi olmak için kendinize zaman ayırın. Cihazın kullanım kılavuzuna bakın.
- Enzimi inaktive edeceğinden Taq DNA polimeraz ya da Taq DNA polimeraz içeren her türlü karışımı vortekslemeyin.
- thescreen BRAF RGQ PCR Kitin etkin kullanımı için, numuneler 6'dan daha az olmamak üzere gruplar halinde gruplanmalıdır. Daha küçük grup sayısı thescreen BRAF RGQ PCR Kit ile daha az numunenin test edilebileceği anlamına gelecektir
- Taq DNA polimerazı (Taq), ucun fazla enzim ile kaplanmasından kaçınmak için pipet ucunu sıvı yüzeyin tam altına dikkatlice yerleştirmek suretiyle pipetleyin.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Rotor-Gene Q aracının ilk kullanımından önce thescreen BRAF Tahlil Paketi yazılımının yüklü olduğundan emin olunuz (“Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol”, sayfa 45)
- Her bir kullanımdan önce, tüm ayıraçların en az 1 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25°C) eritilmiş olması, 10 defa ters çevrilerek karıştırılması ve tüpün altında kalan içeriği toplamak adına kısaca santrifüjlenmesi gerekmektedir.
- Her bir kullanım öncesinde Taq DNA polimerazın (Taq) oda sıcaklığında (15–25°C) olduğundan emin olun. Enzimi tüpün tabanına toplamak için tüpü kısaca santrifüjleyin.

### Prosedür

- 1. Reaksiyon karışımını (CTRL), Şablonsuz kontrol suyu (NTC) ve BRAF Pozitif kontrol (PC)'ü oda sıcaklığında (15–25°C) minimum 1 saat süreyle tamamen çözdürün. Ayıraçlar çözüldüğünde, tuzların lokal konsantrasyonlarından kaçınmak için her bir tüpü 10 kez baş aşağı çevirmek suretiyle bunları karıştırın ve daha sonra içeriğin tüpün tabanında toplanmasını sağlamak için kısaca santrifüjleyin.**

2. **Tablo 3’de verilen volümlere göre yeterli master karışımı (Reaksiyon karışımı[CTRL] artı DNA numuneleri için Taq DNA polimeraz [Taq]), bir pozitif kontrol reaksiyonu ve bir şablon olmayan kontrol reaksiyonu hazırlayın. PCR hazırlığı için yeterli fazlalık sağlamak üzere 1 ekstra numune için ayıraç ilave edin.**

Master karışım, numune hariç PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

**Tablo 3.Kontrol tahlil master karışımının preparasyonu \***

<b>Tahlil</b>	<b>Reaksiyon Karışımı Volümü</b>	<b>Taq DNA polimerazı (Taq) Volümü</b>
Kontrol	19.5 µl x (n+1)	0.5 µl x (n+1)
V600E/Ec	19.5 µl x (n+1)	0.5 µl x (n+1)
V600D	19.5 µl x (n+1)	0.5 µl x (n+1)
V600K	19.5 µl x (n+1)	0.5 µl x (n+1)
V600R	19.5 µl x (n+1)	0.5 µl x (n+1)

\* n = Reaksiyon sayısı (numuneler + kontroller). PCR hazırlığı için yeterli fazlalık sağlamak üzere 1 ekstra numune (n+1) için ayıraç ilave edin.

3. **Aşağı ve yukarı 10 kez pipetlemek suretiyle master karışımı tamamen karıştırın. Uygun sayıdaki şerit tüpü Şekil11’deki yerleşim düzenine göre yükleme bloğuna yerleştirin. Derhal 20 µl master karışımı her bir PCR şerit tüpüne (tedarik edilmez) ilave edin.**

Kapaklar gerekinceye kadar plastik kaplar içinde kalmalıdır.

Tahlil	Kontroller		Numune numarası						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	1	9	17	25	33	41	49	57	65
V600E/Ec	2	10	18	26	34	42	50	58	66
V600D	3	11	19	27	35	43	51	59	67
V600K	4	12	20	28	36	44	52	60	68
V600R	5	13	21	29	37	45	53	61	69
-	6	14	22	30	38	46	54	62	70
-	7	15	23	31	39	47	55	63	71
-	8	16	24	32	40	48	56	64	72

Şekil11. Yükleme bloğundaki kontrol ve mutasyon tahlilleri yerleşim düzeni. Sayılar yükleme bloğundaki pozisyonları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

- Derhal 5 µl Şablonsuz Kontrol suyunu (NTC)'yi şablonsuz kontrol PCR şerit tüpüne (9-13 nolu PRC tüpü) ekleyin ve tüpün kapağını kapatın. Her bir numuneden 5 µl'ü numune tüplerine (PCR tüp numaraları 17-21, 25-29, 33-37, 41-45, 49-53, 57-61 ve 65-69) ekleyin ve tüplerin kapağını kapatın.

5 µl BRAF Pozitif Kontrolü(PC) pozitif kontrol tüplerine (PCR tüp no. 1-5) ekleyin ve tüplerin kapağını kapatın. Her DNA numunesi kontrol ve tüm mutasyon tahlilleri ile test edilmelidir.

Tüplerin Rotor-Gene Q MDx cihazlarının içine yerleştirilme yönünü göstermek için tüp kapaklarını işaretleyin.

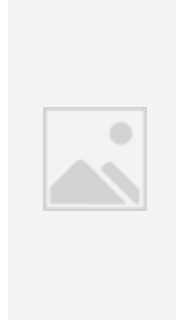
- Tüm PCR tüpleri kapaklandıktan sonra, tüm tüplere numune ilave edilmiş olduğundan emin olmak için numune tüp doluluk seviyelerini görsel olarak kontrol edin.
- Numuneleri ve reaksiyon karışımlarını karıştırmak için tüm PCR tüplerini evirtin (4 kez).
- PCR şerit tüpleri 72-hazneli rotorun uygun pozisyonlarını yerleştirin (Şekil11).

Her bir PCR işlemine en fazla 7 numune eklenebilir. Eğer rotor tamamen dolu değilse, rotor üzerindeki tüm boş pozisyonlar kapaklı, boş tüpler ile doldurulmalıdır.

- Derhal 72-hazneli rotoru Rotor-Gene Q MDx cihazına yerleştirin. Çalışma sırasında tüpleri güvenceye almak için kilitleme halkasının

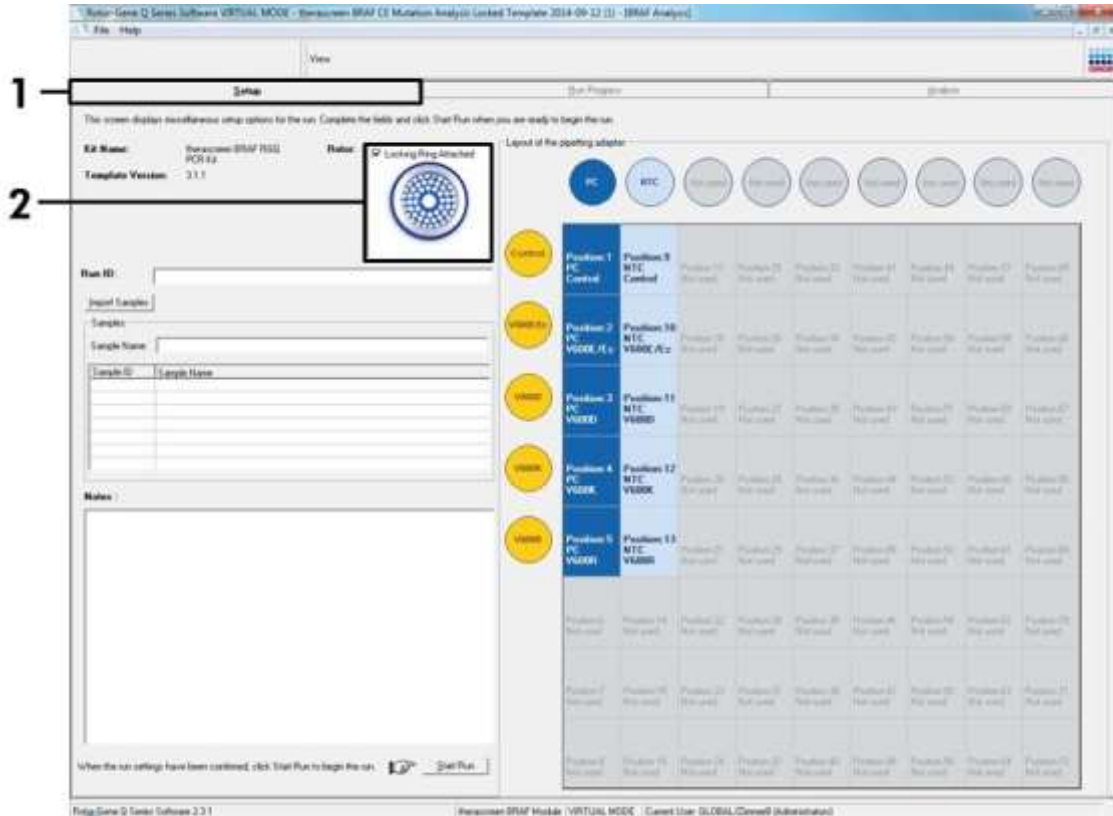
(Rotor-Gene Q cihaz aksesuarı) rotorun üzerine yerleştirilmiş olduğundan emin olun.

9. Rotor-Gene Q serisi yazılımını, Rotor-Gene Q MDx aracının bağlı bulunduğu laptopın masaüstünde bulunan “therascreen BRAF CE Mutasyon Analizi Kilitli Şablon” simgesine çift tıklayarak çalıştırınız (Şekil12yi inceleyiniz).



Şekil12. “therascreen BRAF CE Mutasyon analizi kilitli şablon” simgesi.

10. “Yükle” sekmesi varsayılan olarak çıkacaktır (Şekil13). Kilitleme halkasının düzgünce bağlı olduğundan emin olunuz ve “Kilitleme Halkası Bağlı” kutucuğunu işaretleyiniz. Rotor-Gene Q aracının kapağını kapatınız.



Şekil13. “Yükle” sekmesi (1) ve “Kilitleme Halkası Bağlı” kutucuğu (2).

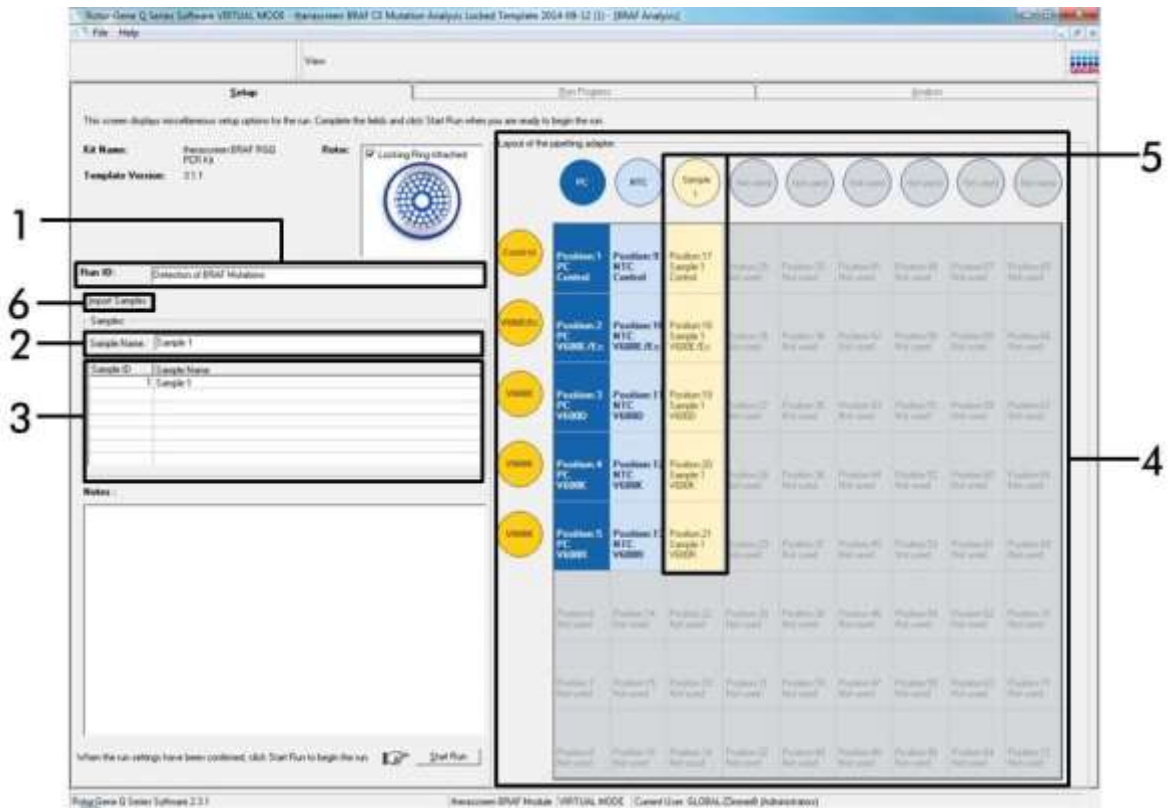
11. “Yürütme ID” kısmını yerel isimlendirme konvansiyonunuza uygun şekilde doldurunuz. “Numune adı” kısmını yerel isimlendirme konvansiyonunuza göre doldurunuz ve Giriş (Enter) tuşuna basınız. Bu işlem numune adını aşağıdaki numune listesine ekleyecek ve numuneye bir “Numune ID”si verecektir (1,2,3, vs.). Bunlara ek olarak, sağdaki “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli numune adını içermesi adına güncellenecektir (Şekil14).

Not: Alternatif bir yol olarak \*.smp (Rotor-Gene Q numune dosyası) veya \*.csv (virgülle ayrılmış değerler) formatında depolanmış numune isimleri “Numuneleri dışa aktar” butonuyla dışa aktarılabilir. Numune isimleri bu yöntemi kullanarak otomatik olarak yerleştirilecektir.

Not: “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli içerisinde, numune adı ekinin bir renk değişimiyle vurgulanıp vurgulanmadığını ve numune halkasının altındaki sütundaki tüm tahlillerin vurgulanmış olup olmadığını kontrol ediniz (Şekil14).

Not: En fazla 7 numune eklenebilir. Numune ID leri (numune halkarı içerisindeki) otomatik olarak 1-7 arası atanacaktır.

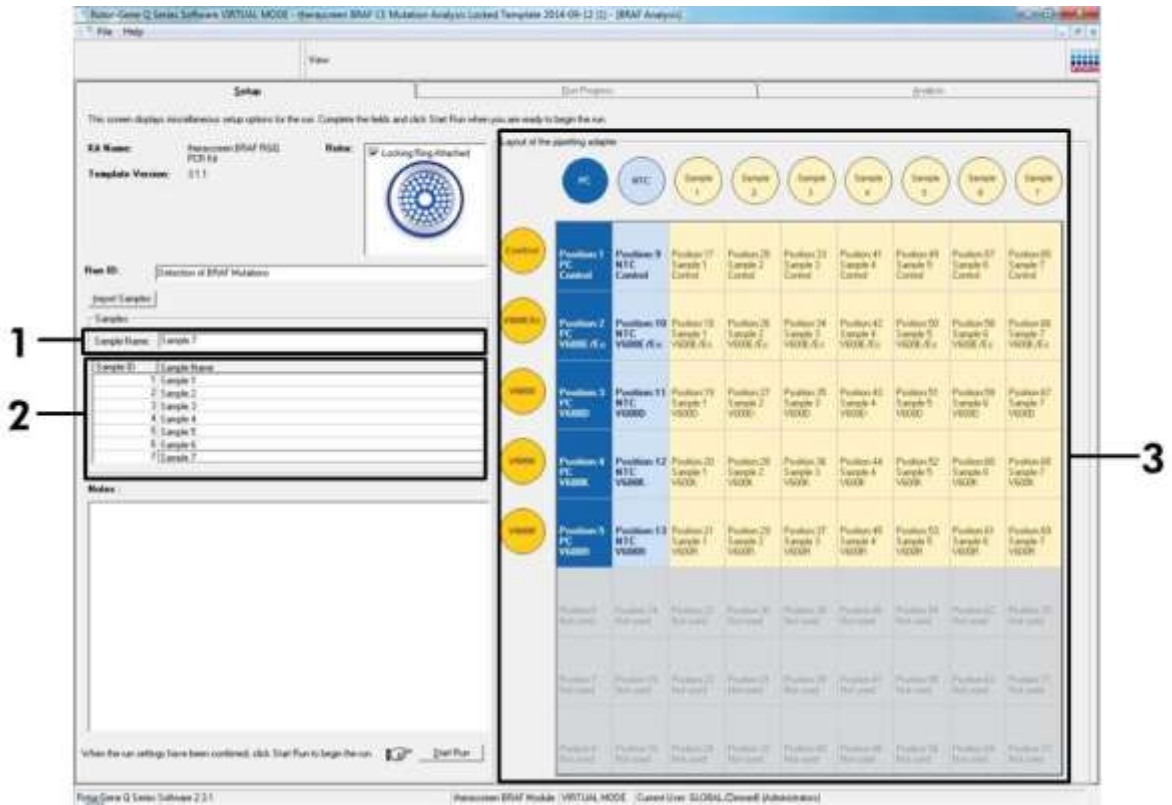
Not: 8 karakterden fazla olan numune isimleri “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli içerisinde tam olarak gösterilmeyebilir.



Şekil14. “Yürütme ID” si ve “Numune adı”nın girilmesi. (1 = “Yürütme IDsi” kayıt alanı, 2 = “Numune adı” kayıt alanı, 3 = Numune listesi, 4 = “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli, 5 = Vurgulanan numune halkası ve panelin altında 5 numune sütunu 6 = “Numuneyi dışa aktar” butonu).

**12. Eklenen tüm numunelerin adını girebilmek adına adım 11 i tekrarlayınız. (Şekil15).**

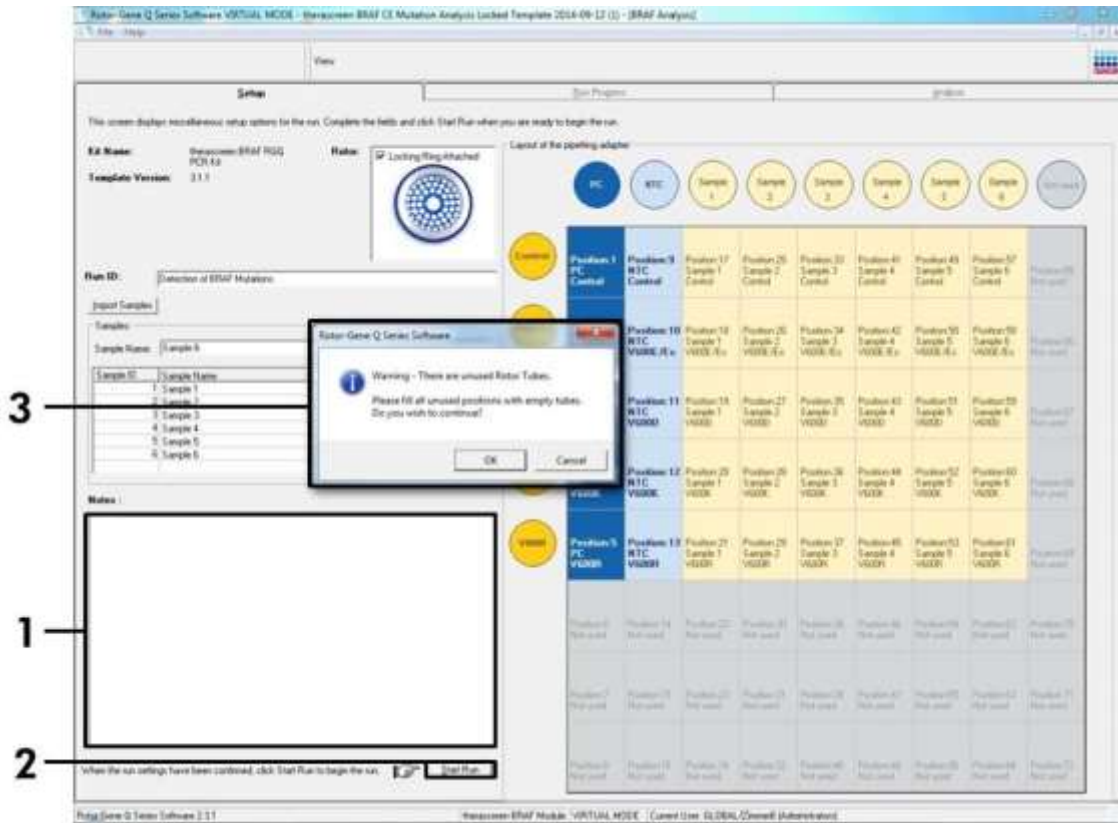
Not: Numune adını düzenlemek için, numune listesindeki “Numune adı” sekmesine tıklayınız ve seçilen numunenin “Numune adı” kayıt alanı bölümünde görünmesini bekleyiniz. “Numune adı” kısmını yerel isimlendirme konvansiyonunuza göre doldurunuz ve güncellemek için Giriş (Enter) tuşuna basınız.



**Şekil15. “Numune adı” kayıt alanına ek numune isimleri girmek. (1 = “Numune adı” kayıt alanı, 2 = Numune listesi, 3 = “Pipetleme adaptörü düzeni” paneli).**

**13. Tüm numune isimleri girildikten sonra, doğruluklarını kontrol ediniz. Herhangi bir ek bilgi gerekiyorsa “Notlar” kayıt alanına giriniz ve “Yürütmeyi başlat” butonuna tıklayınız (Şekil16).**

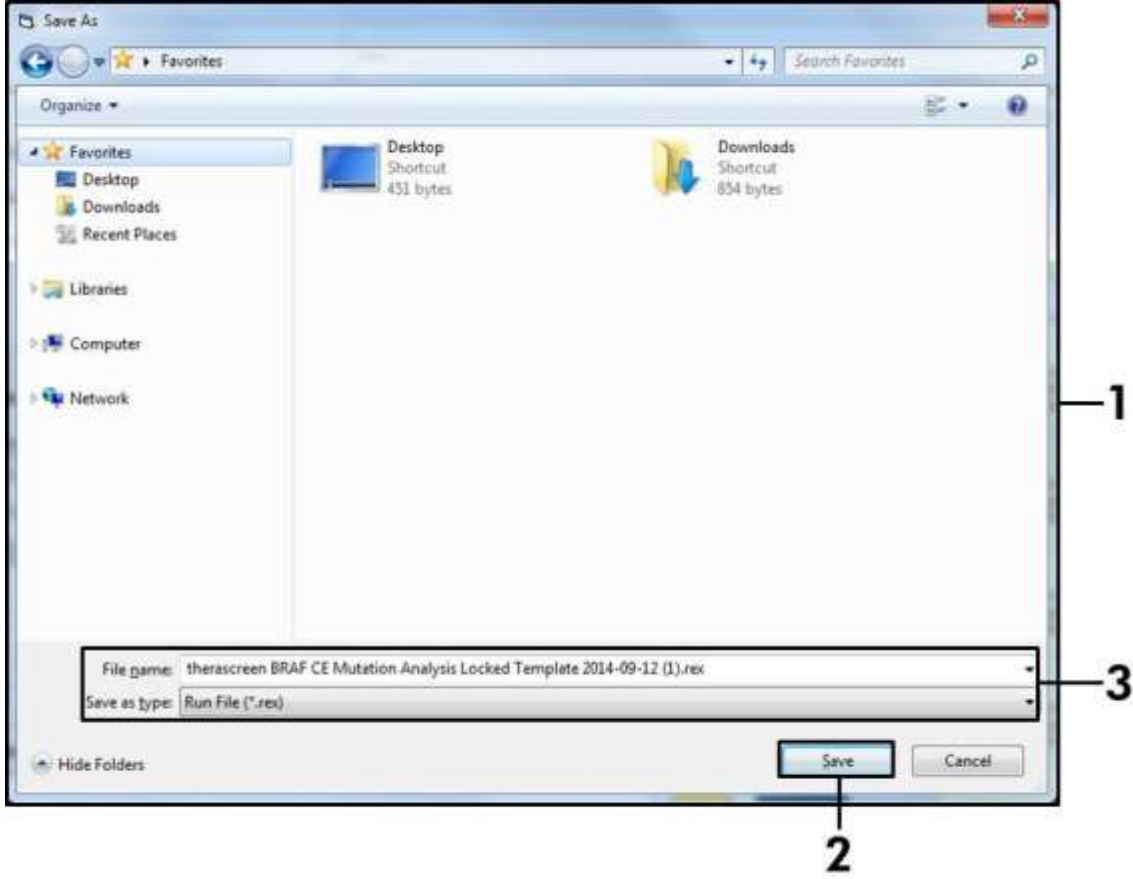
Not: Herhangi bir rotor pozisyonunun kullanılmadığı durumlarda, rotor üzerindeki tüm kullanılmayan pozisyonların kapaklı, boş tüplerle doldurulmuş olması gerektiğini hatırlatmak adına bir “Uyarı” belirecektir (Şekil16). Tüm rotor pozisyonlarının kapaklı, boş tüplerle doldurulduğundan emin olduktan sonra ilerlemek için “OK” butonuna basınız.



**Şekil16. “Notlar” kayıt alanı (1), “Yürütmeyi başlat” butonu (2) ve kullanılmayan rotor pozisyonları “Uyarı”sı (3).**



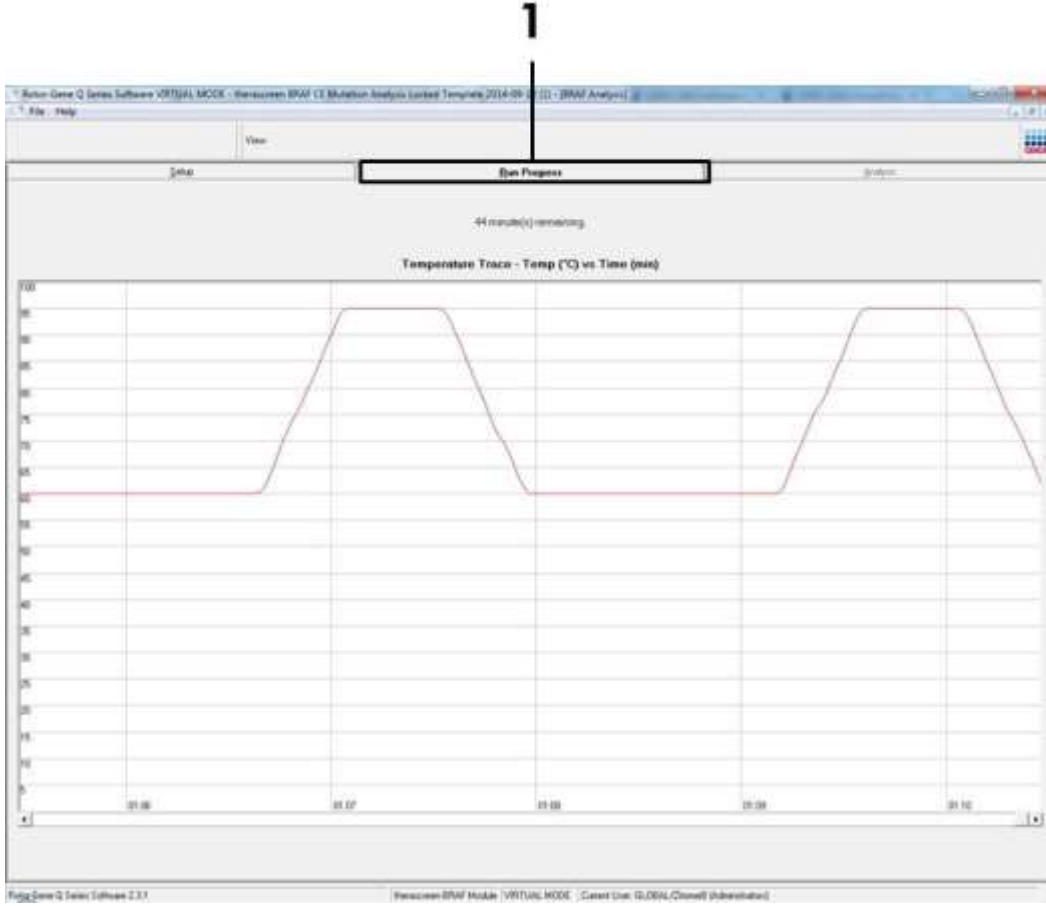
14. "Farklı Kaydet" penceresi belirecektir. Uygun bir dosya adı seçip PCR işlemini \*.rex yürütme dosyası olarak seçilen konuma kaydediniz. (Şekil17).



**Şekil17. Yürütme dosyasını kaydetmek.** (1 = "Farklı Kaydet" penceresi, 2 = "Dosya Adı" ve "Tür olarak kaydet" alanları, 3 = "Kaydet" butonu).

## 15. PCR işlemi başlayacaktır.

Not: Yürütme başladığında, ısı işaretini ve kalan yürütme zamanını göstermek adına otomatik olarak “Yürütme ilerlemesi” sekmesi açılacaktır (Şekil18).



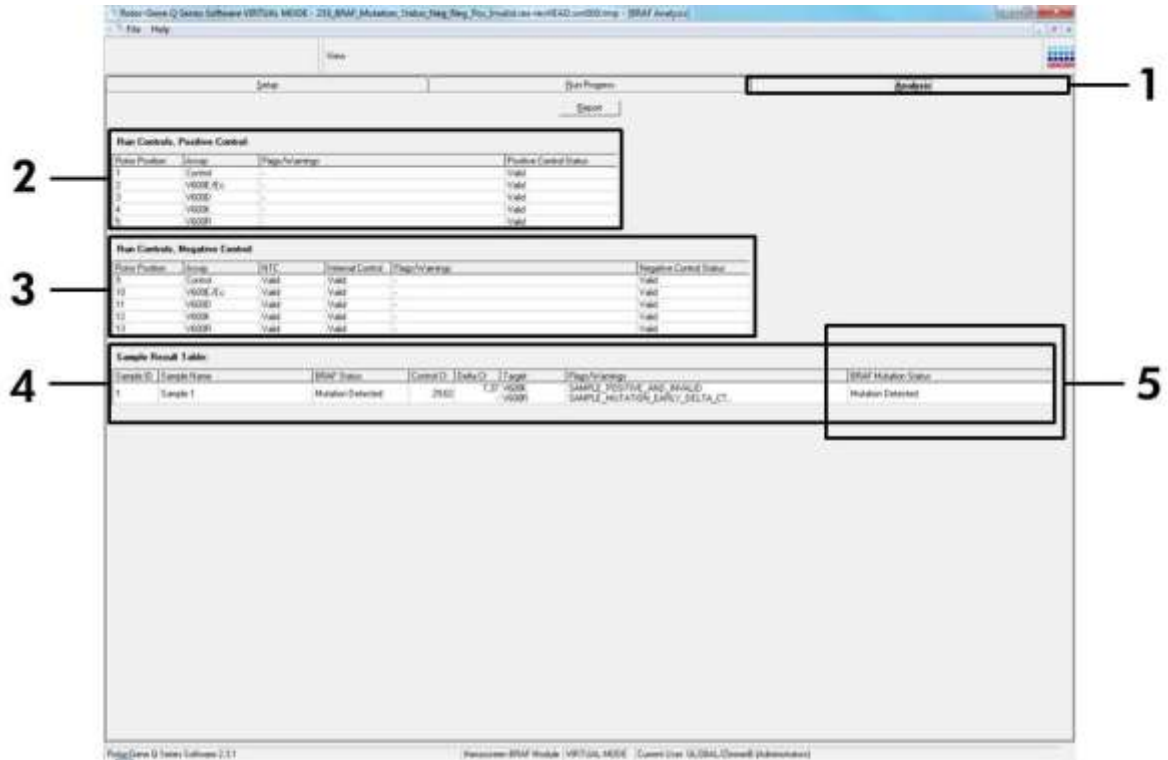
Şekil18. “Yürütme ilerlemesi” sekmesi.

**16. Yürütme işlemi bittikten sonra, “Analiz” sekmesi otomatik olarak açılacaktır.**

Not: Eğer “Analiz” sekmesi açılmaz ise, “Analiz” sekmesine tıklayınız (Şekil19).

Not: Hesaplama yönteminin bir açıklaması sayfa 44 içerisinde “

Sonuçların Yorumlanması” bölümünde sunulmuştur.

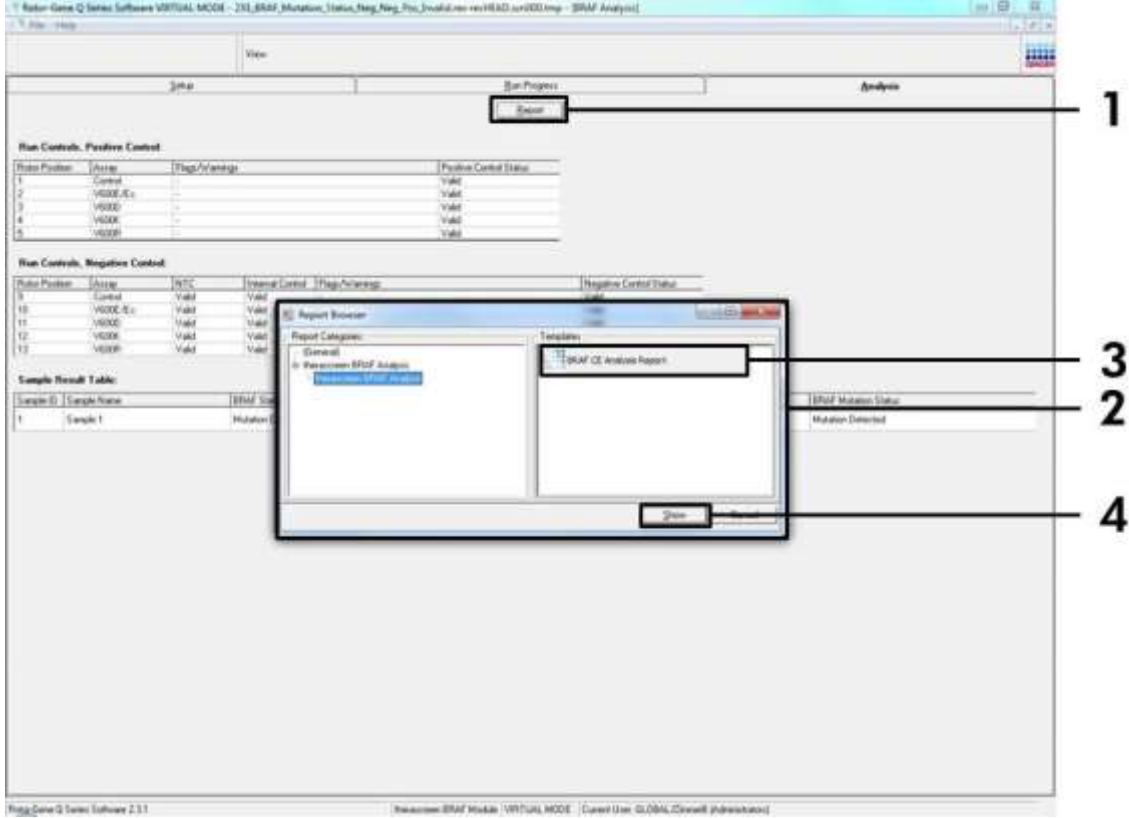


**Şekil19. “Analiz” sekmesi ve sonuçların raporlanması.** (1 = “Analiz” sekmesi, 2 = “Yürütme işlemi kontrolleri, pozitif kontroller” paneli, 3 = “Yürütme işlemi kontrolleri, negatif kontroller” paneli, 4 = “Numune sonuç tablosu”, 5 = “Mutasyon Statüsü” paneli).

### 17. Tahlil sonuçları aşağıdaki gibi raporlanacaktır (Şekil19):

- “Yürütme işlemi kontrolleri, Pozitif kontrol” paneliEğer sonuçlar kabul edilebilir aralıkta ise, “Pozitif Kontrol Statüsü” “Geçerli” olarak görülecektir, aksi halde “Geçersiz” sonucu belirir.
- “Yürütme işlemi kontrolleri, Negatif kontrol” paneliEğer hem “NTC” hem de “Dahili Kontrol” sonuçları kabul edilebilir aralıkta ise, “Negatif Kontrol Statüsü” “Geçerli” olarak görülecektir, aksi halde “Geçersiz” sonucu belirir.
- “Numune Sonuç Tablosu” paneli.Mutasyon Pozitif numuneleri için belirli mutasyonlar “BRAF Mutasyon Statüsü” sütunu altında raporlanacaktır.

18. Rapor dosyaları “Rapor” butonuna basılarak üretilebilir. “Rapor Tarayıcısı” penceresi açılacaktır. “Şablonlar” altında “BRAF CE Analiz Raporu”nu seçiniz ve “Göster” butonuna basınız. (Şekil20).  
Not: Raporlar, her raporun üst sol köşesinde bulunan “Farklı Kaydet” butonuyla alternatif bir konuma kaydedilebilir.



Şekil20. “BRAF CE Analiz Raporu”nu seçmek. (1 = “Rapor” butonu, 2 = “Rapor Tarayıcısı” paneli, 3 = “BRAF CE Analiz Raporu”, 4 = “Göster” butonu).

## Sonuçların Yorumlanması(Otomatik)

Analiz ve mutasyon duyuruları, yürütme işlemi tamamlandıktan sonra thescreen BRAF Tahlil Paketi tarafından otomatik olarak yapılır. Aşağıdaki bilgiler thescreen BRAF Tahlil Paketinin analiz ve mutasyon duyurularını nasıl yaptığını açıklamaktadır.

**Not:** Manuel analiz için “Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol”, sayfa45yi inceleyiniz.

Özel bir reaksiyonun floresansının eşik değerini kestiği PCR döngüleri  $C_T$  değeri olarak tanımlanır.  $C_T$  değerleri, işleme dahil edilen belirli DNA'nın miktarını belirtir. Düşük  $C_T$  değerleri, işleme dahil edilen DNA miktarının yüksekliğini belirtirken yüksek  $C_T$  değerleri işleme dahil edilen DNA miktarının düşüklüğünü gösterir.  $C_T$  değeri olan reaksiyonlar pozitif amplifikasyon olarak sınıflandırılır.

Rotor-Gene Q yazılımı, herhangi iki kayıt altına alınan değer arasına floresan sinyalleri dahil eder. Bu nedenle  $C_T$  değerleri 0-40 arasında herhangi bir gerçek sayı olabilir (tam sayılarla sınırlı değildir).

*Therascreen* BRAF RGQ PCR Kiti için, Yeşil ve Sarı kanalların eşik değerleri sırasıyla 0.15 ve 0.05 relatif floresan birimi olarak ayarlanmıştır. Bu değerler *thescreen* BRAF Tahlil Paketinde otomatik olarak yapılandırılmıştır.

Yürütme işlemi kontrolleri (pozitif kontrol, NTC ve dahili kontroller),  $C_T$  değerlerinin karşılandığını ve reaksiyonların doğru bir şekilde yapıldığını garanti altına almak adına değerlendirilir.

Numune  $\Delta C_T$  değerleri her bir mutasyon tahlili için aşağıdaki denklemi kullanarak hesaplanır:

$$\Delta C_T = [\text{Mutasyon Tahlil } C_T \text{ değeri}] - [\text{Kontrol tahlili } C_T \text{ değeri}]$$

Numuneler, eğer o tahlil için belirlenmiş  $\Delta C_T$  kesim değerinden düşük veya ona eş bir  $\Delta C_T$  değeri veriyorlarsa mutasyon pozitif olarak sınıflandırılırlar. Bu değer üstünde ise, numune thescreen BRAF RGQ PCR Kit tarafından saptanamayacak kadar az yüzdede mutasyon içeriyor (tahlillerin sınırının ötesinde) veya numune “Mutasyon Saptanmadı” olarak raporlanacak olan mutasyon negatif olabilir.

Mutasyon reaksiyonlarındaki hiçbir amplifikasyon “Mutasyon Saptanmadı” olarak değerlendirilmez. Arkaplan amplifikasyonundan hesaplanan  $\Delta C_T$  değerlerinin  $\Delta C_T$  kesim değerinden daha yüksek olması beklenir ve numune “Mutasyon Saptanmadı” olarak sınıflandırılır.

Tahlil sonuçları, “Mutasyon Saptandı”, “Mutasyon Saptanmadı”, “Geçersiz” veya eğer yürütme kontrolü yapılamaz ise “Yürütme kontrolü yapılamadı” olarak görüntülenir. Mutasyon-pozitif numuneler için, belirli mutasyonlar sayfa 40 içerisindeki “Tablo6. Numune mutasyon statülerini adlandırılması”ne bakın, sayfa 39).

## Doğruluk: Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma

Çalışma, iki-yönlü Sanger sekanslama ile ilişkili *therascreen* BRAF RGQ PCR Kitin mutasyon statüsündeki konkordansı gösterdi. Bu çalışmada, 128 FFPE numunesi CLSI EP12-A2 Yönlendirmesi (2008)'den anlaşma/anlaşmazlığın istatistiksel ölçümleri kullanılarak test edildi. FFPE numunelerinin 102'si için hem *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit hem de iki-yönlü Sanger sekanslama için geçerli sonuçlar alındı. Numune mutasyon durumu çağrılarının iki-yönlü Sanger sekanslama ile *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit arasında konkordant olmayan mutasyon durumlarını teyit için Pyrosequencing® kullanıldı.

Tablo 4 *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit ile sekanslama arasındaki anlaşma analizini göstermektedir.

**Tablo 4. Anlaşma analizi**

	Anlaşma ölçümü	Sıklık (%)
Skor	Genel anlaşma	96.08
	Pozitif anlaşma	100.00
	Negatif anlaşma	95.29

Negatif anlaşma frekansı *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit ile sekanslama ve V600E/Ec mutasyon pozitif tarafından wild-type olarak adlandırılan 6 numunenin mutasyon tespiti nedeniyledir. Bu Scorpions ve ARMS teknolojilerinin artan hassasiyetleri nedeniyledir.

## İşleme dahil edilen DNA'nın $\Delta C_T$ değerleri üzerindeki etkisi

*therascreen* BRAF RGQ PCR Kit kullanarak mutasyon durumunun belirlenmesi üzerindeki işleme dahil edilen toplam DNA seviyelerinin etkisi Test Cut Off Doğrulama ve Çalışma Aralığı çalışmasının bir parçası olarak değerlendirildi. Bu, *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit tarafından oluşturulan mutasyon çağrılarının çalışma aralığı boyunca farklı DNA girdi seviyelerinde tutarlı olduğunu doğrulamak içindi.

Wild-type DNA arka planında yüksek, orta ve düşük yüzdeli mutasyon içeren mutasyon standartları (sırasıyla %100, %50 ve 3 x LOD %) yüksek, orta ve düşük DNA girdi seviyelerinde hazırlandı. Bu nedenle, her bir mutasyon tahlili için toplam 9 mutasyon standardı test edildi. Tüm tahlillerin sonuçları Tablo5 içerisinde gösterilmiştir.

Her bir çift DNA girdi seviyesi arasındaki ortalama  $\Delta C_T$  değerindeki tahmini farklar lineer regresyon analizinden tahmin edildiği gibi, tamamı  $\pm 1$  CT içinde idiler. 4 mutasyon tahlilinin tümü yüksek, orta ve düşük DNA girdi seviyelerinde denk olarak kabul edildiler.

**Tablo5. İşleme dahil edilen DNA seviyeleri arasındaki tahmin edilen farklar**

Tahlil	Parametre (DNA giriş seviyesi)	Tahmini Fark ( $\Delta$ CT)	%95 güven aralığı (düşük, yüksek)
V600E (E)	Yüksek - Orta	0,56	0.22, 0.90
V600E (E)	Düşük - Orta	0.01	-0.33, 0.35
V600E (Ec)	Yüksek - Orta	0.48	0.12, 0.84
V600E (Ec)	Düşük - Orta	0.26	-0.10, 0.62
V600D	Yüksek - Orta	-0.32	-0.58, -0.06
V600D	Düşük - Orta	-0.43	-0.69, -0.17
V600K	Yüksek - Orta	0,10	-0.10, 0.30
V600K	Düşük - Orta	-0,33	-0.53, -0.13
V600R	Yüksek - Orta	-0,12	-0.28, 0.04
V600R	Düşük - Orta	-0.62	-0.78, -0.46

## Çapraz-reaktivite

Yüksek giriş DNA standartları yüksek mutasyon içeriği (%100) ile her bir tahlilin potansiyel çapraz reaksiyonunu değerlendirmek üzere test edildi. Çapraz reaksiyon sonuçları Tablo6'de gösterildiği şekilde mutasyon durumu mantık tablosunun derlemesine imkan sağlamıştır. BRAF CE Tahlil Paketi mutasyon statüsünü belirlemek adına çapraz-reaktivite mantığı kullanır.

**Tablo6. Numune mutasyon statülerini adlandırılması**

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutasyon statüsü
Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	V600E veya V600Ec pozitif
Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	V600Ec veya V600K pozitif
Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	V600D pozitif
Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	V600D pozitif



Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	V600K pozitif
Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	V600R pozitif

## Saptama limiti (LOD) değerleri

therascreen BRAF RGQ PCR Kit ile ilişkili 4 mutasyon-spesifik reaksiyonun her birinin LOD'unu belirlemek için bir çalışma gerçekleştirildi. Bu çalışmada, LOD, test sonuularının %95'inde mutasyon-pozitif sonuular veren bir mutant örneğindeki wild-type arka planı içindeki en düşük mutan DNA miktarı olarak belirlendi ( $C_{95}$ ).

Her bir tahlile LOD belirlemek için, farklı orandaki mutasyon standartları orta girdi DNA konsantrasyonunda hazırlandı ve therascreen BRAF RGQ PCR Kit ile test edildi. Her bir tahlil için LOD lojistik regresyon ile hesaplandı. Her bir tahlilin LOD'unu doğrulamak için, belirlenen LOD'da mutasyon standartları hazırlandı. Altmış kopya test edildi ve pozitif test oranı doğrulandı.

Ortalama girdi DNA konsantrasyonu için doğrulanmış LOD Tablo 9 da verilmiştir. Yüksek girdi DNA konsantrasyonlarında, LOD değerlerinin Tablo7'de belirtilen değerlerden daha düşük olması beklenir.

**Tablo7. Her bir mutasyon tahlili için (orta girdi) LOD değerleri**

Tahlil (mutasyon)*	Orta girdi DNA'da LOD $C_{95}$ (Wild-type DNA'daki mutant DNA yüzdesi)
V600E (E)	1.82%
V600E (Ec)	4,31%
V600D	3,19%
V600K	4,34%
V600R	4,85%

\* V600E tahlili için algılama limiti hem V600E hem de V600Ec mutasyonları için hesaplandı.

## Melaninin kit performansı üzerindeki etkisi

Bu çalışmanın amacı, melanom numunelerde bulunan bilinen bir PCR inhibitörü olan melaninin therascreen BRAF RGQ PCR Kit üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Bu çalışma bir dizi konsantrasyon boyunca (0-250 ng/reaksiyon) therascreen BRAF RGQ PCR Kit ile test öncesinde DNA numuneleri içerisine doğrudan melanin serpmek ve  $\Delta CT$  değerleri üzerindeki etkilerini ve test numunelerinin mutasyon durumlarını değerlendirmek suretiyle gerçekleştirildi.

Sonuçlar düşük melanin konsantrasyonunun  $\Delta$ CT üzerinde bir etkisinin olmadığını ve düşük seviyedeki melanin konsantrasyonunda  $\Delta$ CT üzerinde minimal etkisinin olduğunu gösterdi. Bu nedenle, düşük ve orta konsantrasyon seviyelerindeki melanin tahlilin mutasyonu tespit etme yeteneğini etkilemedi. 180 ng/reaksiyonda dahili kontrol inhibitörün varlığını göstererek başarısız oldu ve böylece mutasyon çağırma öncesinde inhibitörlerin tespitinin etkinleştirilmesi etkilenmektedir.

Normal kullanımda karşılaştırılması beklenen melanin konsantrasyonları theascreen BRAF RGQ PCR Kitin mutasyon-pozitif ve mutasyon negatif numuneler arasında ayırım yapma yeteneğini etkilemez.

Sonuçların bir özeti Tablo 8a görülmektedir.

**Tablo 8. Her bir tahlilde test edilen melanin miktarı**

Melanin konsantrasyonu (ng/reaksiyon)	$\Delta$ CT deki değişim	Dahili kontrol durumu (geçti/kaldı)
0	0	Geçer
60	0.20	Geçer
100	0.61	Geçer
150	-1.21	Geçer
180	-2.15	Geçmez

## Tekrarlanabilirlik

Operatörü, günü, plaka düzenini ve cihazı değiştirerek hem çalışma içerisinde hem de çalışmalar arasında tahlilin doğruluğunu belirlemek için bir matris çalışması tasarımı uygulandı. Mutasyon tahlilleri için 3 x LOD luk düşük DNA girdi seviyesinde tekrarlanabilirlik görüldü. Ayrıca, kendi spesifik mutasyon standartları ile test edildiklerinde mutasyon-pozitif çağrılarının yüzdesi değerlendirildi. Her bir mutasyon tahlili, %100 pozitif mutasyon çağırısı verdi.

Hassasiyet değerleri Tablo 9de verilmektedir.

## Çoğaltılabilirlik

3 laboratuvar (alanların)da, theascreen BRAF RGQ PCR Kitin 3 lotu ile (her bir alanda 2), her bir alanda 2 operatör kullanarak, her bir alanda 2 cihazda, birbirini takip eden 4 gün üzerinden standartları test etmek suretiyle tahlilin çoğaltılabilirliğini değerlendirmek üzere bir matris çalışması tasarımı uygulandı. Mutasyon tahlili için düşük seviyedeki mutasyonda (3 x LOD) çoğaltılabilirlik ve kontrol tahlili için düşük girdi wild-type gösterildi. Her bir

tahlil için hassasiyet 3 alanın tümünde, %95 hassasiyet tahminleri ile birlikte hesaplandı (Tablo 10.).

**Tablo 9. Tekrarlanabilirlik hassasiyet tahminleri**

Tahlil	Hassasiyet (çalışmalar arası)	%95 güven aralığı (düşük, yüksek)	Hassasiyet (Çalışma içi)	%95 güven aralığı (düşük, yüksek)
Kontrol	0.30	0.25, 0.39	0.16	0.13, 0.20
V600E (E)	0.74	0.61, 0.94	0.57	0.46, 0.74
V600E (Ec)	0.79	0.64, 1.01	0.76	0.62, 0.99
V600D	0.47	0.38, 0.60	0.46	0.38, 0.60
V600K	0.37	0.31, 0.48	0.37	0.30, 0.49
V600R	0.44	0.36, 0.56	0.44	0.36, 0.58

**Tablo 10. Çoğaltılabilirlik hassasiyet tahminleri**

Tahlil	Kesinlik	%95 güven aralığı (düşük, yüksek)
Kontrol	0,54	0,42, 0,76
V600E (E)	0,87	0,67, 1,22
V600E (Ec)	0,86	0,66, 1,21
V600D	0,80	0,62, 1,14
V600K	0,61	0,47, 0,86
V600R	0.63	0,49, 0,89

## Semboller



24 reaksiyon için yeterli ayıraç içerir



Son kullanma tarihi



In vitro diyagnostik tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Bileşenler



İçerir



Numara



Global Ticaret Eşya Numarası



Sıcaklık sınırlamaları



Üretici:



Kullanım kılavuzuna başvurun



Gün ışığından uzak tutun



Dikkat

## **Ek I: Therascreen BRAF RGQ PCR Kit Manuel Protokol**

Bu bölüm therascreen BRAF RGQ PCR Kitin, açık modda (örn. BRAF tahlil paketi kullanılmadan) RGQ yazılımı sürüm 2.3 ile nasıl kullanılacağı konusunu açıklamaktadır.

### **Genel bilgiler**

- Gereken materyallerin listesi için, sayfa 9u inceleyiniz.
- Numune preparasyonu ve numune düzeni için şu bölümleri inceleyiniz “Protokol: Numune değerlendirme”, sayfa 14, ve “Protokol: BRAF mutasyon tespiti”, sayfa 26.

## Protokol: Isı profili oluşturmak

Başlamadan önce, BRAF analizi için bir ısı profili oluşturunuz. Döngüleme parametreleri Numune değerlendirme ve Mutasyon değerlendirme için aynıdır.

### Prosedür

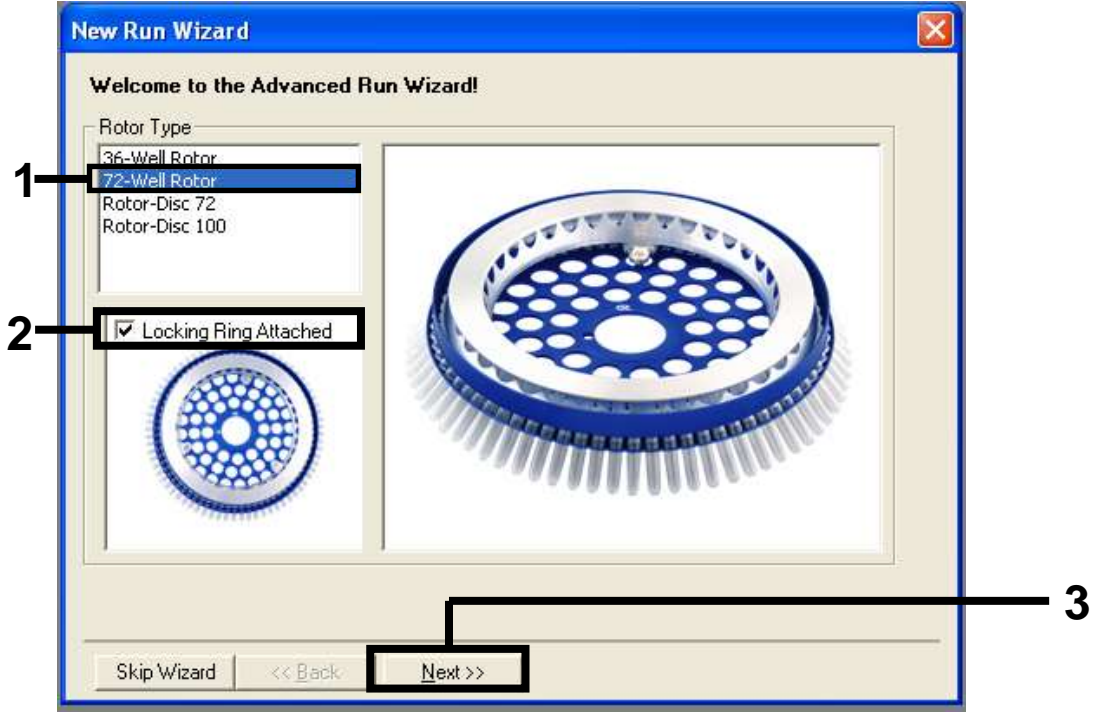
Kısacası, döngüleme parametreleri aşağıdaki gibidir:

**Tablo 11. Döngüleme parametreleri**

Döngül er	Isı	Zaman	Veri Edinme
1	95 °C	15 dakika	Yok
40	95 °C	30 saniye	Yok
	60 °C	60 saniye	Yeşil ve sarı

1. Rotor-Gene Q MDx aracının bağlı bulunduğu laptopın masaüstünde bulunan Rotor-Gene Q Serisi Yazılımı 2.3 yazılım simgesine tıklayınız.
2. Yeni bir şablon oluşturmak için, "Empty Run"a tıklayınız ve sonrasında "New Run Wizard"a girebilmek için "New"e tıklayınız.

3. Rotor türü olarak 72-yuvalı rotoru seçiniz. Kilitleme halkasının düzgünce bağlı olduğundan emin olunuz ve “Kilitleme Halkası Bağlı” kutucuğunu işaretleyiniz. “Next” tuşuna tıklayınız (
4. Şekil21).



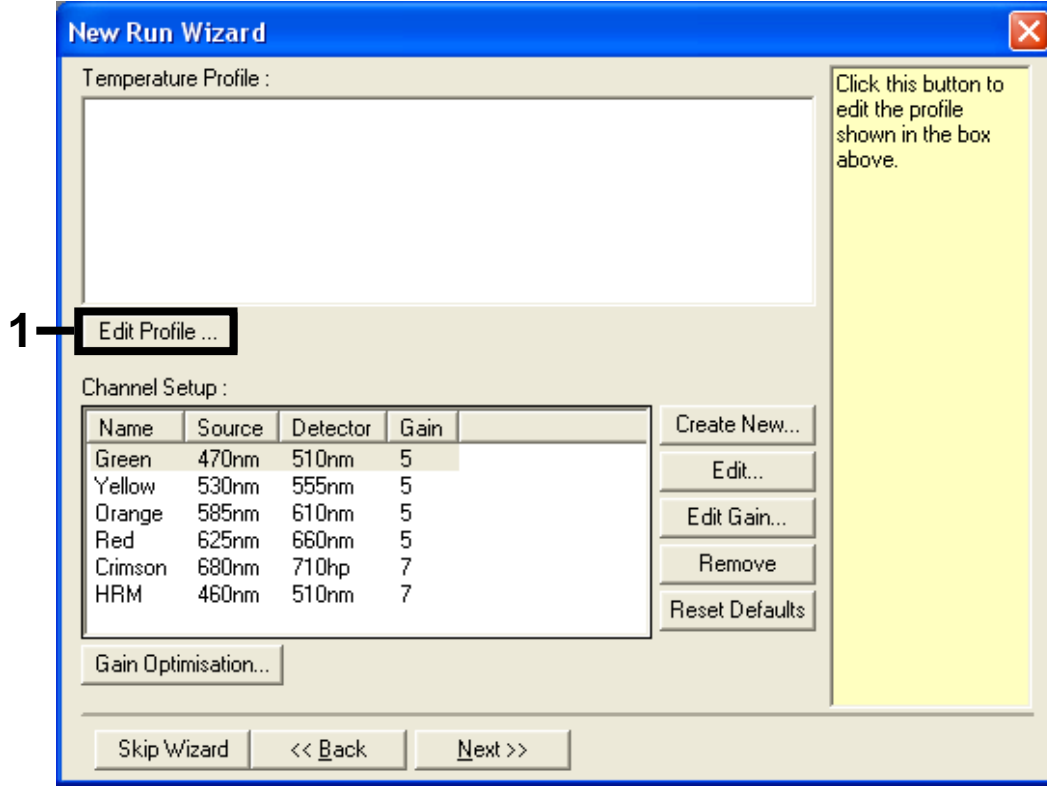
**Şekil21. “New Run Wizard” penceresi.** (1 = Rotor türü, 2 = Kilitleme halkası bağlandı kutucuğu, 3 = İleri butonu).

5. Operatör adını giriniz. Herhangi bir notunuz varsa ekleyiniz ve reaksiyon volümünü 25 olarak giriniz. Numune düzeninin 1, 2, 3... olarak devam ettiğinden emin olunuz. “Next” tuşuna tıklayınız (
6. Şekil22).

**Şekil22. Operatör adının ve reaksiyon volümlerinin girilmesi.** (1 = Operatör penceresi, 2 = Notlar penceresi, 3 = Reaksiyon volümü penceresi, 4 = Numune düzeni alanı, 5 = İleri butonu).

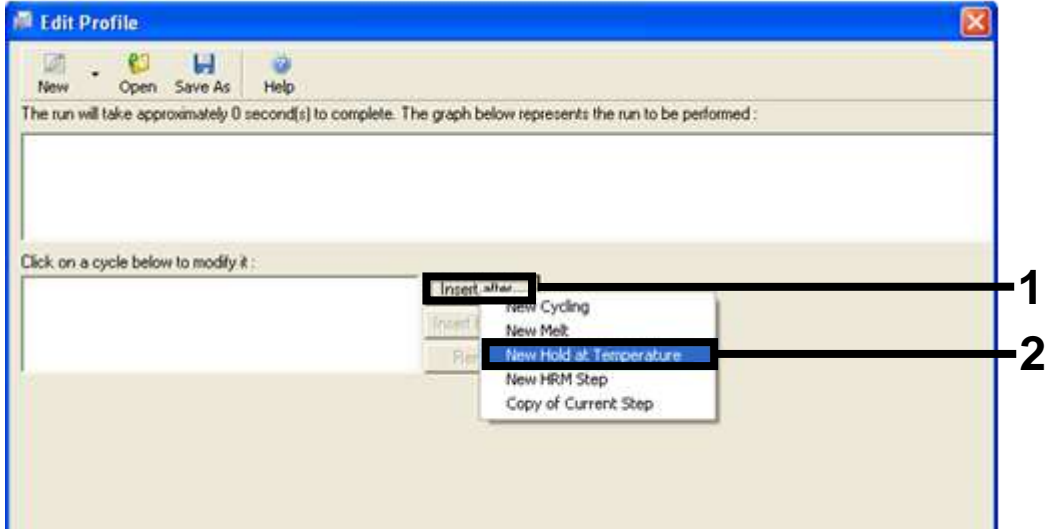


7. “Yeni Yürütme Sihirbazı” diyalog kutusunda “Profili Düzenle” butonuna tıklayınız (
8. Şekil23) ve aşağıdaki adımlara göre yürütme parametrelerini kontrol ediniz.



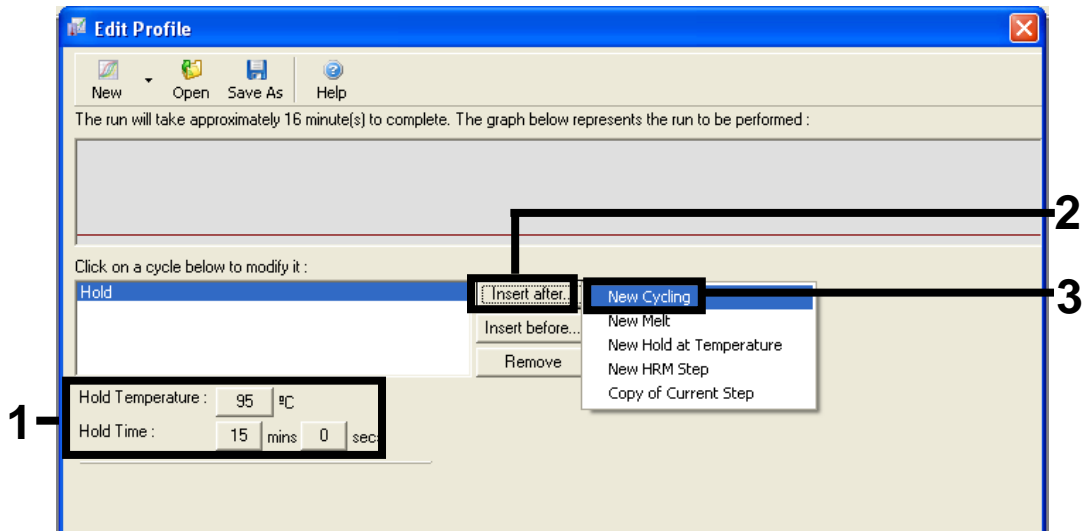
Şekil23. Profili düzenlemek (1).

9. “Sonra ekle” butonuna tıklayınız ve Yeni Tutum Isısını seçiniz ( 10. Şekil24).



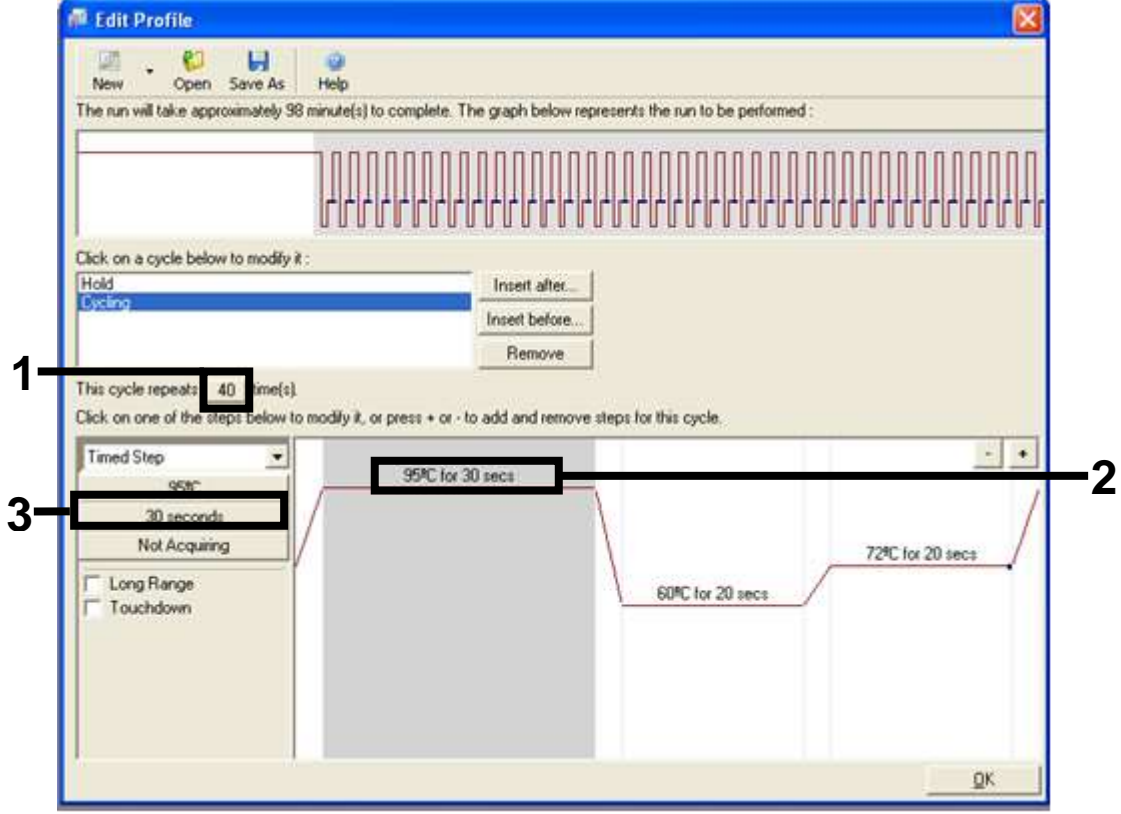
Şekil24. İlk inkübasyon adımını eklemek. (1 = Sonra ekle butonu, 2 = Yeni Tutum Isısı).

11. “Tutum Isısı”nı 95 °C ve “Tutum Süresini” 15 dakika 0 saniye olarak değiştiriniz. “Sonra ekle” butonuna tıklayınız ve Yeni Isı Düzenini seçiniz ( 12. Şekil25).



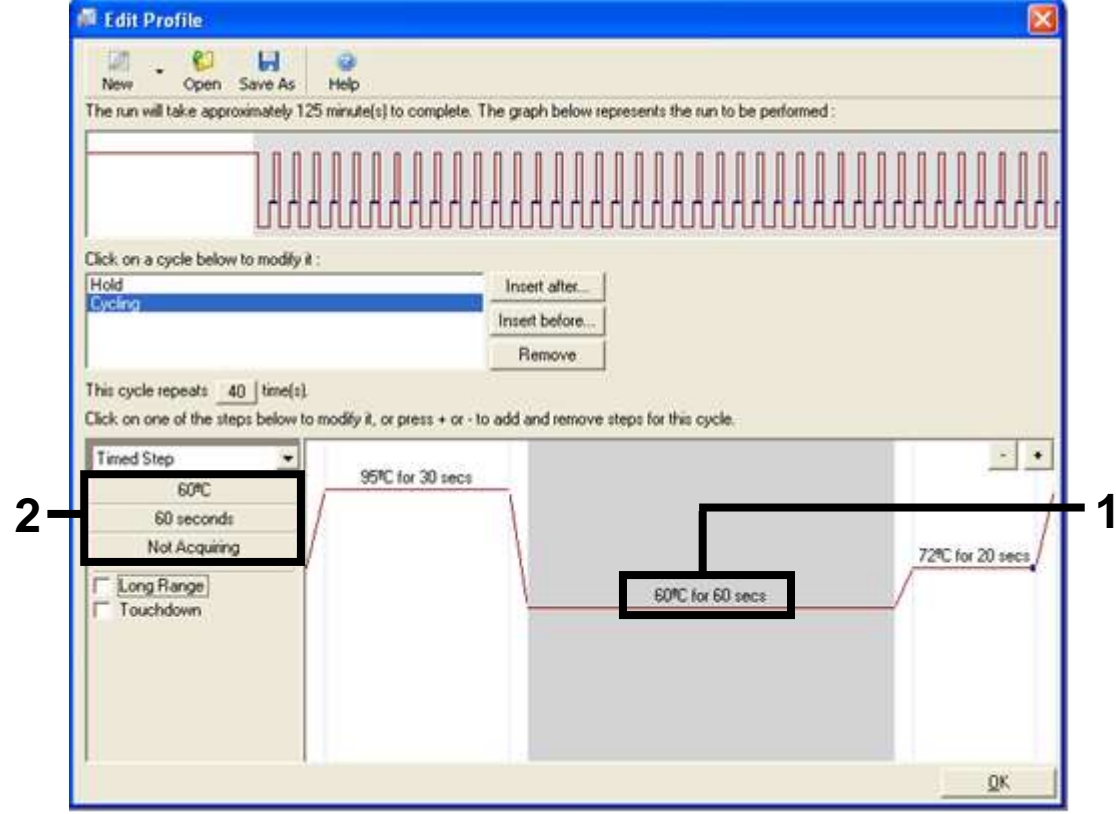
Şekil25. 95 °C de ilk inkübasyon adımı (1 = Tutum Isısı ve Tutum Süresi butonları, 2 = Sonra ekle butonu, 3 = Yeni döngüleme).

13. Döngü tekrarı sayısını 40 olarak değiştiriniz. İlk adımı seçiniz ve 30 saniye boyunca 95 °C ye ayarlayınız ( 14. Şekil26).



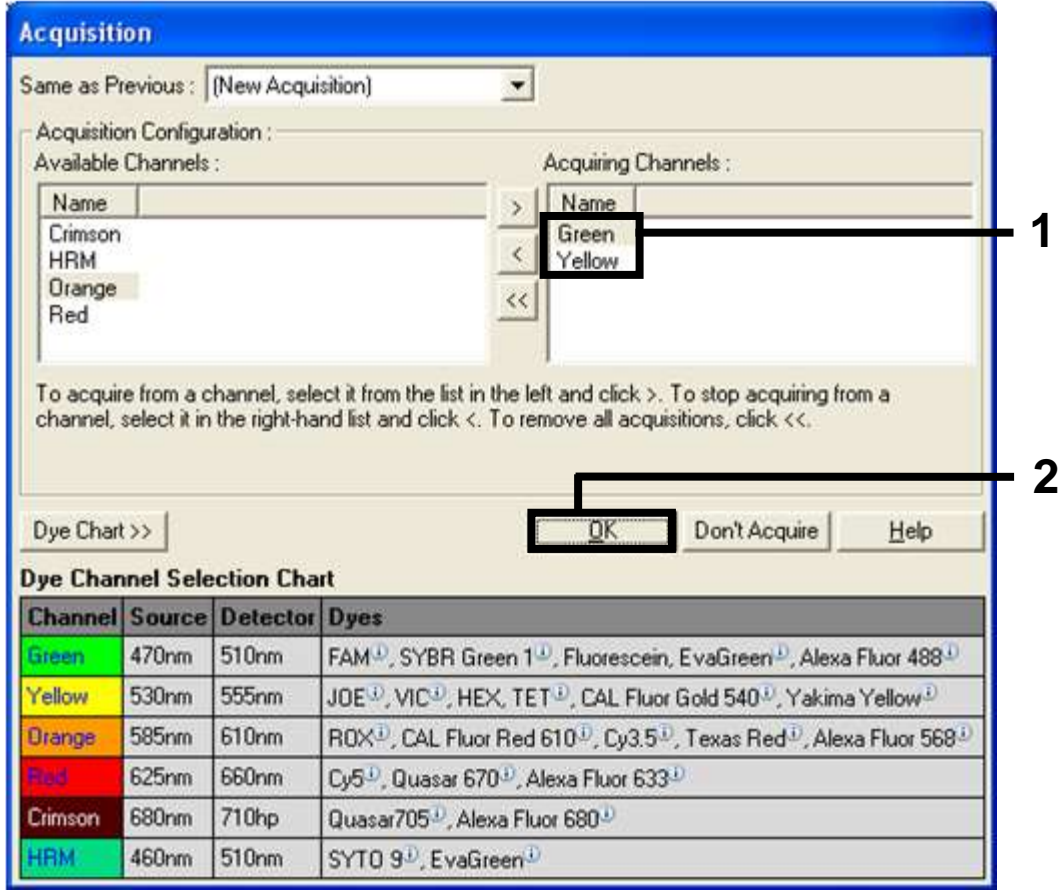
Şekil26. 95 °C de döngüleme adımı (1 = Döngü tekrarı kutucuğu, 2 = İlk adım ısı ayarı, 3 = İlk adım zaman ayarı).

15. İkinci adımın altını çiziniz ve 60 saniye boyunca 60 °C ye ayarlayınız. Bu adımda “Alım Yok” butonunu seçerek veri edinimine izin veriniz (16. Şekil27).



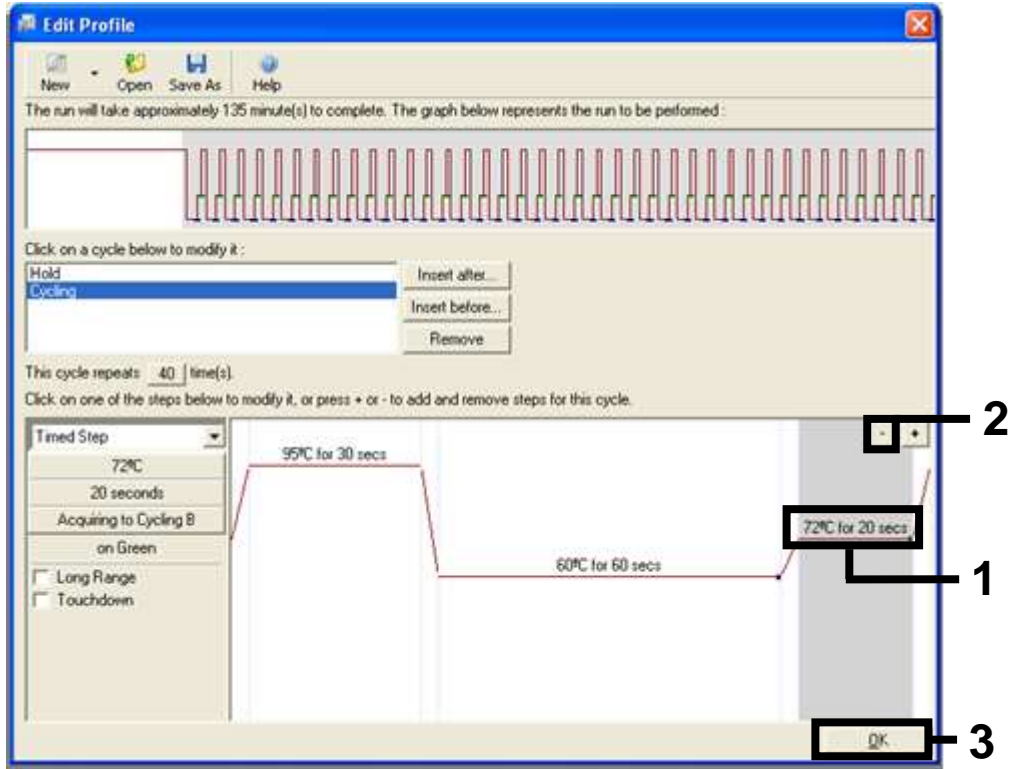
Şekil27. 60 °C de döngüleme adımı (1 = İkinci adım ısı ve zaman ayarı, 2 = “Alım Yok” butonu).

17. Bunları “Mevcut Kanallar” listesinden aktarmak için “>” butonunu seçerek Yeşil ve Sarıyı alım kanalları olarak seçiniz. “OK” a tıklayınız (
18. Şekil28).



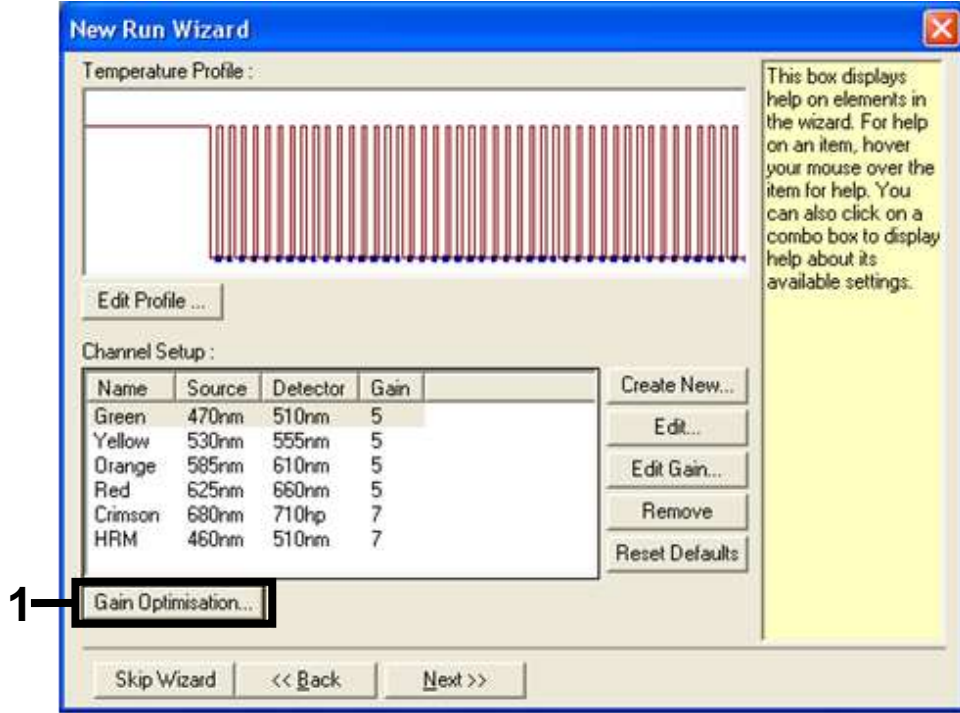
Şekil28. 60 °Clik döngüleme adımında alım (1 = Seçili kanallar, 2 = “OK” butonu).

19. Üçüncü adımın altını çiziniz ve “-“ butonuna basarak siliniz. “OK” a tıklayınız (
20. Şekil29).



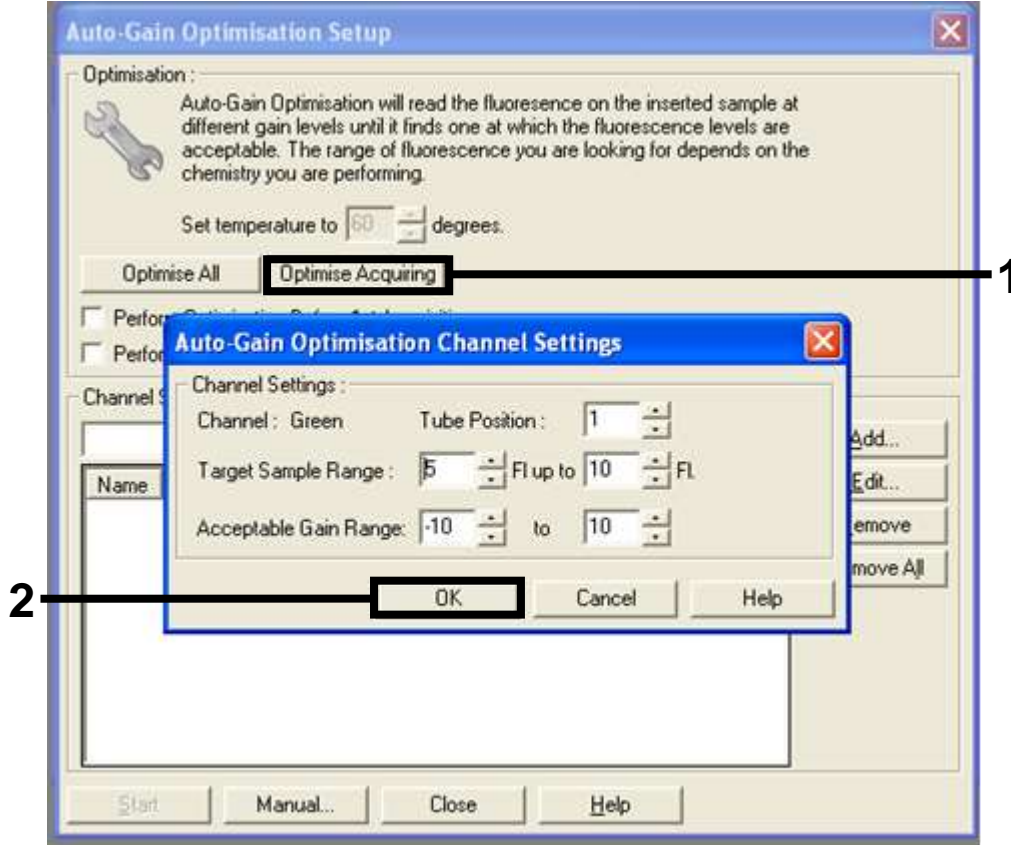
Şekil29. Uzatma adımının kaldırılması. (1 = Üçüncü adım, 2 = Silme butonu, 3 = “OK” butonu).

21. Bir sonraki diyalog kutusunda, “Optimizasyon AI” butonuna tıklayınız.  
(  
22. Şekil30).



Şekil30. Optimizasyon AI (1).

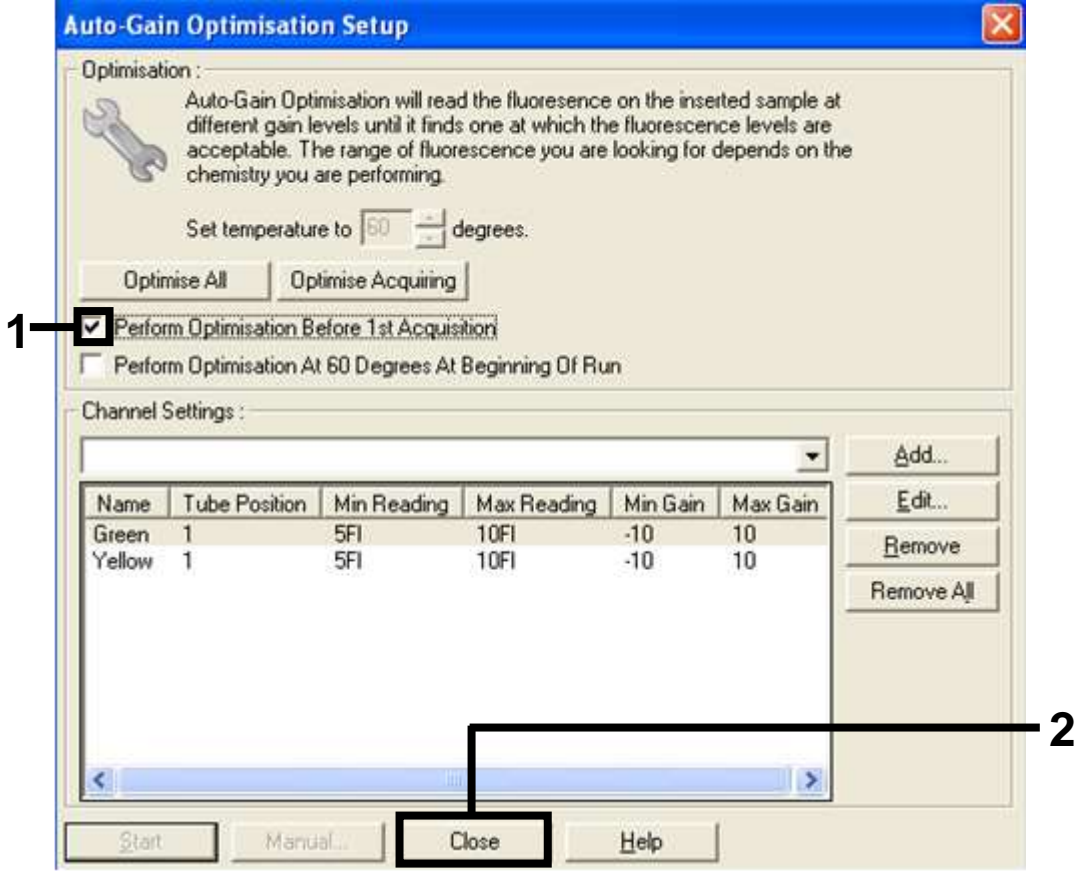
23. “Optimize Alımı” butonuna tıklayınız. Her bir kanal için kanal ayarları gösterilir. Her iki kanal için de “OK” a tıklayarak bu varsayılan değerleri kabul ediniz ( 24. Şekil31).



Şekil31. Yeşil kanal için oto-optimizasyon al. (1 = Optimize Alımı butonu, 2 = “OK” butonu).



25. “İlk Edinimden önce Optimizasyon Yap” kutucuğunu işaretleyiniz ve sihirbaza dönmek için “Kapat” butonuna tıklayınız.



Şekil32. Yeşil ve sarı kanalların seçimi. (1 = İlk Edinimden önce Optimizasyon Yap kutucuğu, 2 = Kapat butonu).

26. “Şablonu Kaydet”i seçerek şablonu uygun bir yere kaydetmek adına “İleri” ye tıklayınız.

---

## Prosedür (Manuel)

### Protokol: Numune değerlendirmesi (manuel)

Bu protokol numuneler içindeki toplam amplifiye edilebilir DNA değerlendirmesi için kullanılır ve BRAF mutasyon analizi öncesinden önce yapılmalıdır.

- Numuneleri şu bölümlerde tanımlandığı şekliyle hazırlayınız “Protokol: Numune değerlendirme” sayfa 14.
- Rotor-Gene Q MDx aracı üzerindeki PCR yürütmesini şu bölümlere göre kurunuz “Protokol: thescreen BRAF PCR RGQ Kurulumu” sayfa 60.
- Yürütme işlemleri tamamlandıktan sonra, verileri şu bölümlerde verilen talimatlara göre analiz ediniz “Numune değerlendirme veri analizi”, sayfa 66.

## **Protokol: BRAF mutasyon tespiti (manuel)**

Numune, numune değerlendirmesini geçtiğinde, BRAF mutasyonlarını tespit etmek adına test edilebilir.

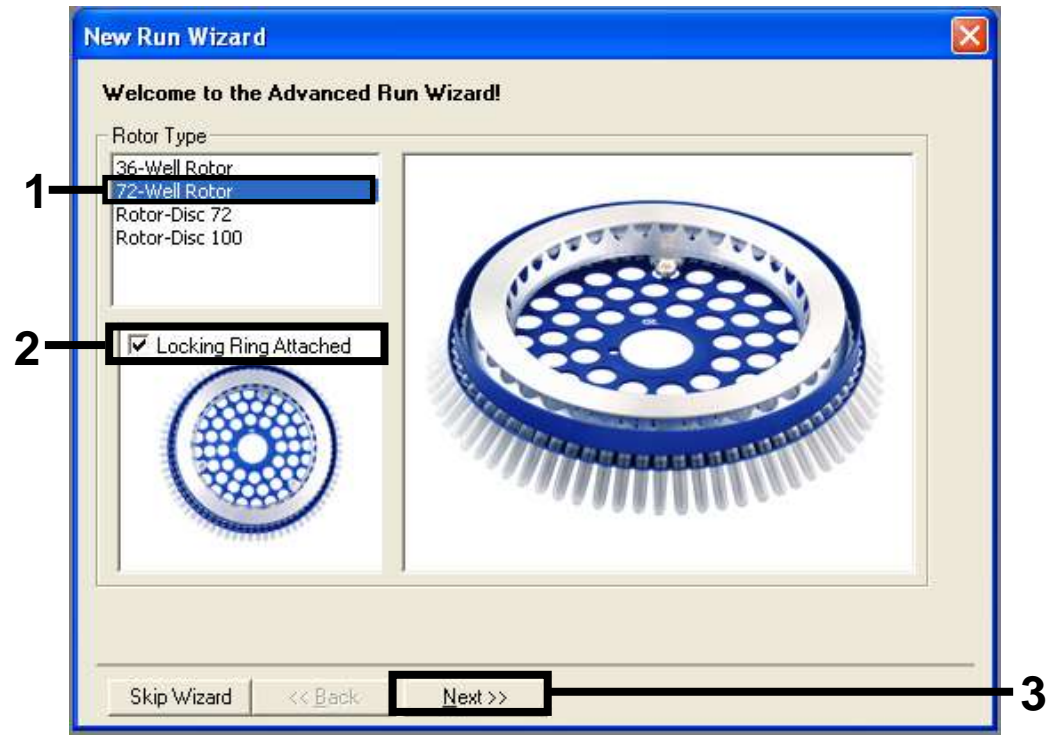
- Numuneleri şu bölümlerde tanımlandığı şekliyle hazırlayınız “Protokol: BRAF mutasyon tespiti”, sayfa 26.
- Rotor-Gene Q MDx aracı zerindeki PCR yürütmesini şu bölümlere göre kurunuz “Protokol: theascreen BRAF PCR RGQ Kurulumu” sayfa 60.
- Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, verileri şu bölümlerde verilen talimatlara göre analiz ediniz ”BRAF mutasyon tespiti veri analizi”, sayfa 67.

## Protokol: therascreen BRAF PCR RGQ Kurulumu

1. Rotor-Gene Q Serisi Yazılımını (2.3) ve uygun ısı profilini (.ret dosyası) açınız.

Isı profilinin nasıl oluşturulduğu ve yürütme parametrelerinin kontrolü hakkında talimatlar için, “Protokol: Isı profili oluşturmak” sayfa 46.

2. Doğru rotorun seçildiğinden emin olunuz ve kilitleme halkasının bağlı olduğunu onaylamak adına kutucuğu işaretleyiniz. “İleri”ye tıklayınız (Şekil33).



Şekil33. “Yeni Yürütme Sihirbazı” penceresi ve hoşgeldiniz ekranı. (1 = Rotor türü, 2 = Kilitleme halkası bağlı kutucuğu, 3 = İleri butonu).

4. Operatör adını giriniz. Herhangi bir not ekleyiniz, reaksiyon volümünün 25 e ayarlı olup olmadığını ve Numune Düzenin 1,2,3... şeklinde devam edip etmediğini kontrol ediniz. “İleri”ye tıklayınız (
5. Şekil34).

**New Run Wizard**

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

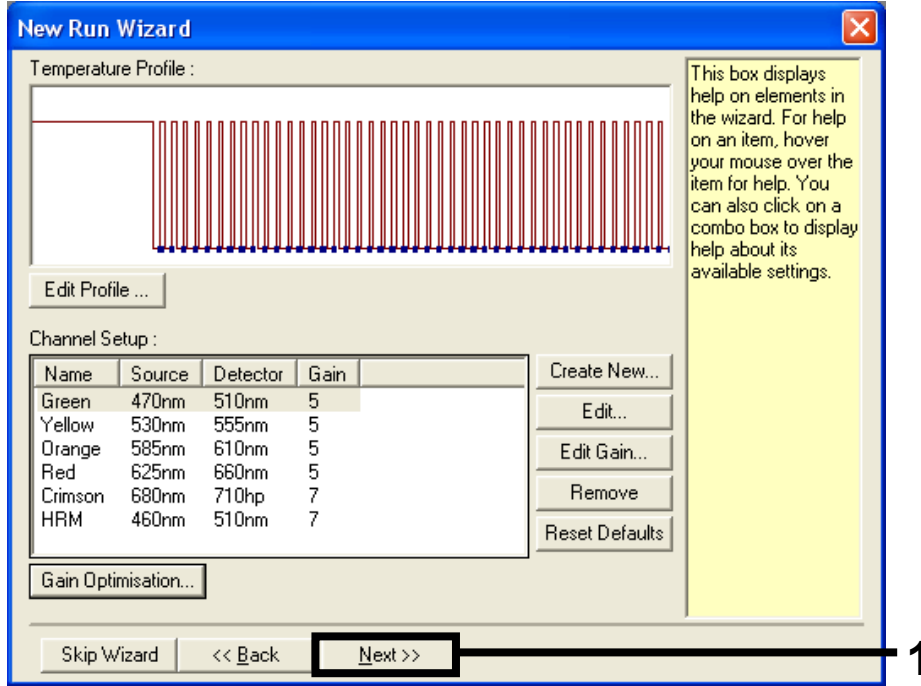
Sample Layout : 1, 2, 3...

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

Skip Wizard << Back Next >>

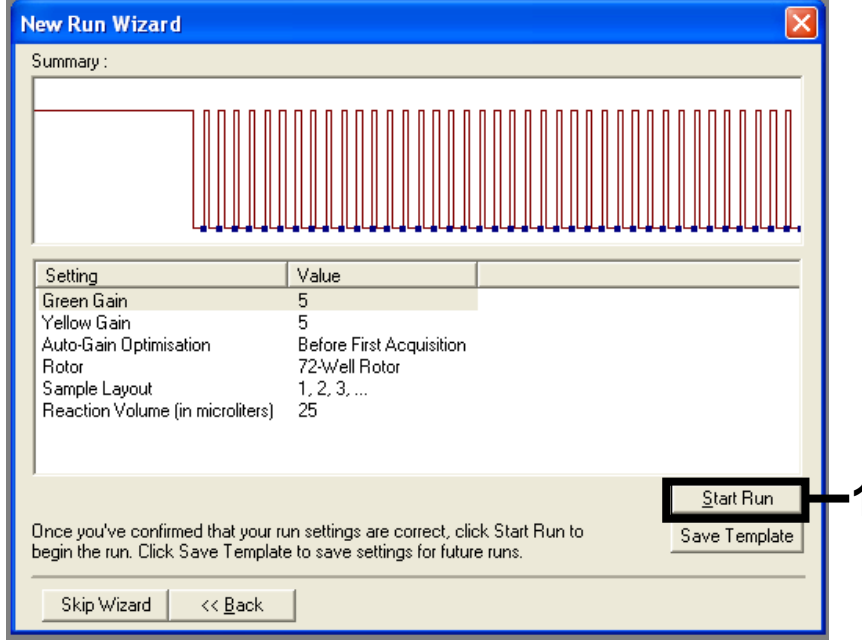
**Şekil34. “Yeni Yürütme Sihirbazı” ayarlama ekranı. ( 1 = Operatör ve Notlar alanı, 2 = Reaksiyon Volümü ve Numune Düzeni alanı, 3 = İleri butonu).**

6. Bir sonraki pencere ısı profilinin düzenlenmesine olanak sağlar. Isı profili yanda verilen protokolün talimatlarına göre oluşturulduğundan düzenlenmesi gerekmez "Protokol: Isı profili oluşturmak" sayfa 46. "İleri"ye tıklayınız (
7. Şekil35).



Şekil35. "Yeni Yürütme Sihirbazı" penceresi ve ısı düzenleme ekranı. (1 = İleri butonu).

8. Özeti kontrol ediniz ve yürütme dosyasını kaydetmek ve yürütmeyi başlatmak adına “Yürütmeyi Başlat” butonuna tıklayınız (
9. Şekil36).



Şekil36. “New Run Wizard” penceresi ve özet ekranı. (1 = Yürütmeyi Başlat butonu).

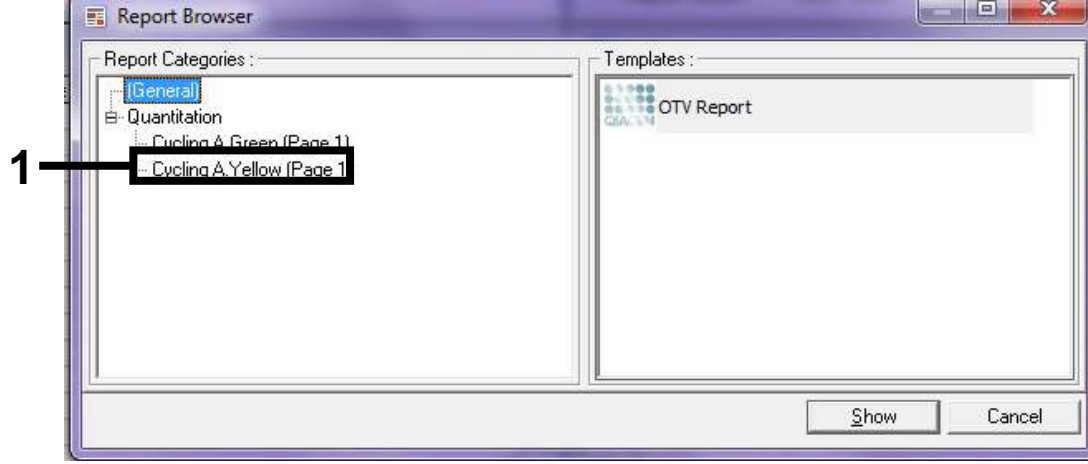
10. Yürütme işlemi başladıktan sonra, içerisine numune isimlerini girebileceğiniz veya “Bitir” e tıklayıp daha sonra yürütme işlemi sırasında veya yürütme bittikten sonra “Numune” butonunu seçerek girebileceğiniz bir pencere açılır.

“Bitir ve Numuneleri Kilitle” butonuna tıklamak daha sonra numune isimlerini düzenlemenizi engeller. Kullanıcı, numune isimlerini girerken doğru numune testinin ve analizinin kullanıldığından emin olmak adına çok dikkatli olmalıdır.

Not: Numuneleri isimlendirirken, boş yuvaların “İsim” sütunu boş bırakılmalıdır.

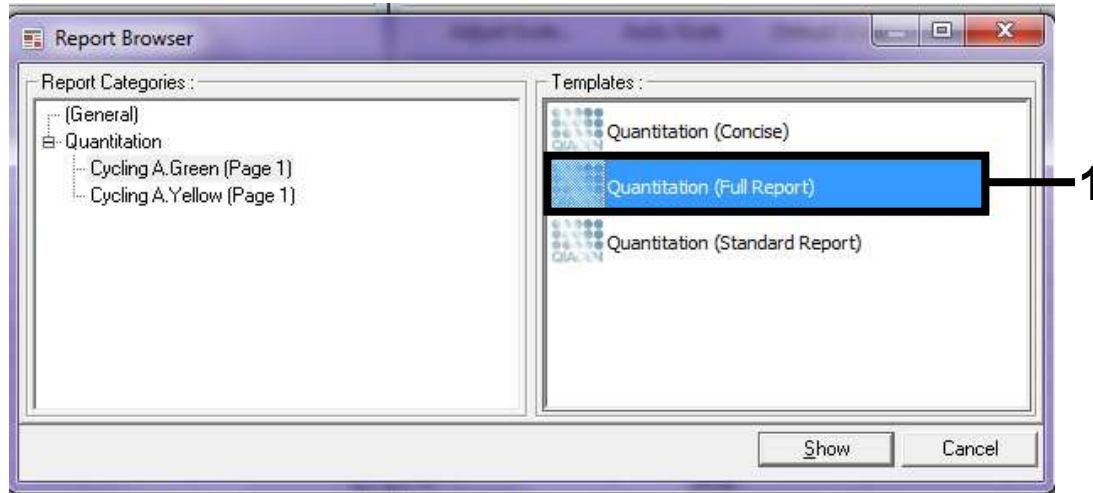
11. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, verileri şu bölümlere göre analiz ediniz “Numune değerlendirme veri analizi”, sayfa 66 veya ”BRAF mutasyon tespiti veri analizi”, sayfa PAGEREF \_Ref403601877 \h 86.
12. Eğer kantitasyon raporları gerekirse, Rotor-Gene Q yürütme dosyası araç çubuğundaki “Raporlar” simgesine tıklayınız.

13. Rapor tarayıcısında, “Rapor Kategorileri” altında “Döngüleme A Yeşil (sayfa 1)”e tıklayınız (
14. Şekil37).



Şekil37. Rapor tarayıcısı. (1 = “Döngüleme A. Yeşil (sayfa 1)” butonu).

15. “Şablonlar”ın altında “Kantitasyon (Tam Rapor)”u seçiniz (
16. Şekil38).



Şekil38. “Kantitasyon Raporu (Tam Rapor)” (1).

17. Raporu oluşturmak için “Göster”e tıklayınız.
18. Elektronik sürümünü kaydetmek için “Farklı Kaydet”e basınız.
19. “Döndüleme A Sarı (Sayfa 1)” için tekrarlayınız.



## Sonuçların Yorumlanması(Manuel)

Numune değerlendirmesi veya mutasyon analizi yürütmesi tamamlandıktan sonra, verileri aşağıdaki prosedüre göre analiz ediniz.

### Yazılım analiz ayarları

1. Rotor-Gene Q Serisi yazılımı 2.3 ü kullanarak uygun dosyayı açınız.
2. Yürütme işlemini yapmadan önce numunelerinizi isimlendirmediyse, “Numuneleri Düzenle”ye tıklayınız.
3. Numunelerinizin isimlerini “İsim” sütununa giriniz.  
Not: Boş bir yuvanın isim kısmını boş bırakınız.
4. “Analiz”e tıklayınız. Analiz sayfasında, Sarı kanalı görmek için “Döngüleme A. Sarı” ya tıklayınız.
5. “İsimlendirilmiştir”e tıklayınız.  
Not: Bu işlem boş yuvaların analizde yer almayacağını garanti eder.
6. “Dinamik Tüp”ü seçiniz.
7. “Doğru eğim”i seçiniz.
8. ”Linear ölçek”i seçiniz.
9. “Ayr Çıkart” seçiniz ve yukarıdaki kutucuğa değerleri 15.01 olarak (“Eğer çıkarma noktası döngüden önce hesaplanmışsa”) ve aşağıdaki kutucuğa 20.01 olarak (“sonrasında aşağıdaki döngüyü ve çıkarma noktasını kullanınız”) giriniz.
10. Eşiği 0.05 olarak ayarlayınız.
11. “Döngüleri şu değerden önce yok et”i 15 olarak ayarlayınız.
12. Sarı C<sub>T</sub> değerlerini kontrol ediniz.
13. Analiz sayfasında, Yeşil kanalı görmek için “Döngüleme A. Yeşil” e tıklayınız.
14. “İsimlendirilmiştir”i seçiniz.
15. “Dinamik Tüp”ü seçiniz.
16. “Doğru eğim”i seçiniz.
17. ”Linear ölçek”i seçiniz.
18. “Ayr Çıkart” seçiniz ve yukarıdaki kutucuğa değerleri 15.01 olarak (“Eğer çıkarma noktası döngüden önce hesaplanmışsa”) ve aşağıdaki kutucuğa 20.01 olarak (“sonrasında aşağıdaki döngüyü ve çıkarma noktasını kullanınız”) giriniz.
19. Eşiği 0.15 olarak ayarlayınız.
20. “Döngüleri şu değerden önce yok et”i 15 olarak ayarlayınız.
21. Yeşil C<sub>T</sub> değerlerini kontrol ediniz.

## Numune değerlendirme veri analizi

### Yürütme kontrol analizi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, verileri aşağıdaki gibi analiz ediniz.

- **Negatif Kontrol:**Şablonun kontamine olmadığından emin olmak için, şablonsuz kontrol yeşil (FAM) kanalında 40 dan düşük bir  $C_T$  değeri oluşturmamalıdır. Yürütme işleminin doğru kurulduğundan emin olmak için, şablonsuz kontrol sarı (HEX) kanalında 32.53-38.16 aralığında amplifikasyon göstermelidir. Belirlenen değerler bu değerlerin içerisinde ve onları içermektedir.
- **Pozitif kontrol:**BRAF Pozitif Kontrolü (PC), yeşil (FAM) kanalında 30.37-36.38 arası bir kontrol tahlili  $C_T$  değeri vermelidir. Belirlenen değerler bu değerlerin içerisinde ve onları içermektedir. Bu aralığın dışında bir değer bir tahlil kurulum problemi olduğunu ve bu nedenle yürütmenin başarısızlığını belirtir.

Bu iki yürütme kontrolünden birisi başarısız olursa numune verisi kullanılmamalıdır.

Her iki yürütme kontrolünün geçerli olması koşuluyla, her bir numune  $C_T$  değeri yeşil kanalda 21.95-32.00 aralığında olmalıdır. Numunenin bu aralığın dışında olduğu durumlar için aşağıdaki kılavuz sağlanmıştır.

### Numune analizi - kontrol tahlili

- **Numune kontrol tahlili  $C_T < 21.95$ :** 21.95 kontrol  $C_T$  li numuneler  $<$ , bu durum geçerlilik kazanmış tahlil aralığının alt ucunu belirttiğinden seyreltilmelidir. Düşük seviyede her bir mutasyonu saptamak adına, aşırı-konsantre edilmiş numuneler, çok fazla seyreltmenin  $C_T$  değerini 1 oranında artıracığı göz önüne alınarak üst aralığa denk gelecek şekilde seyreltilmelidir. Eğer numune 21.95 e yakın ise, sonucun numune testi yürütmesinden (BRAF mutasyon tespiti) alındığını kesinleştirmek adına seyreltme yapılması tavsiye edilir. Numuneler kit içerisinde sağlanan su ile seyreltilmelidir (Seyreltme Suyu [Dil.]).
- **Numune kontrol tahlili  $C_T > 32.00$ :** Yetersiz başlangıç DNA şablonu, tahlil için belirlenmiş cutoff değerlerindeki tüm mutasyonları saptamak adına görüleceği için numunenin re-ekstraksiyonu önerilir.

## BRAF mutasyon tespiti veri analizi

### Yürütme kontrol analizi

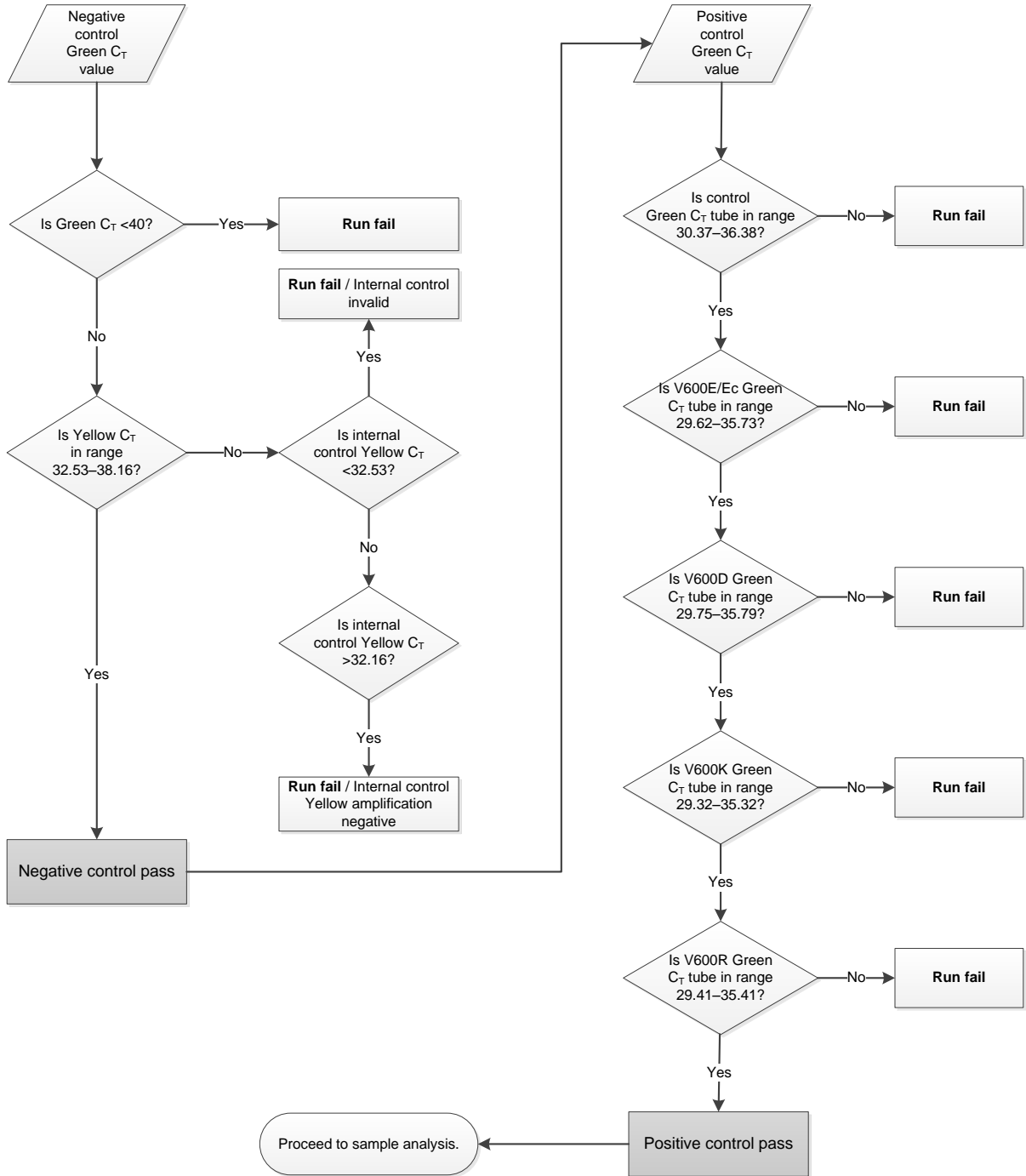
Şekil39 içerisindeki yürütme kontrolü analiz akış şemasını inceleyiniz.

- **Negatif Kontrol:** Şablonun kontamine olmadığından emin olmak için, şablonsuz kontrol yeşil (FAM) kanalında 40 dan düşük bir  $C_T$  değeri oluşturmamalıdır. Yürütme işleminin doğru kurulduğundan emin olmak için, şablonsuz kontrol sarı (HEX) kanalında 32.53-38.16 aralığında amplifikasyon göstermelidir. Belirlenen değerler bu değerlerin içerisinde ve onları içermektedir.
- **Pozitif kontrol:** BRAF Pozitif Kontrolü (PC), Tablo 12 içerisinde gösterildiği gibi yeşil kanaldaki her bir BRAF tahlili için bir  $C_T$  değeri vermelidir. Belirlenen değerler bu değerlerin içerisinde ve onları içermektedir. Bu aralığın dışında bir değer bir tahlil kurulum problemi olduğunu ve bu nedenle yürütmenin başarısızlığını belirtir.

Not: u iki yürütme kontrolünden birisi başarısız olursa numune verisi kullanılmamalıdır.

**Tablo 12. Reaksiyon kontrolleri için kabul edilebilir  $C_T$  aralığı**

Reaksiyon karışımı	Numune	Kanal	$C_T$ aralığı
Kontrol	PC	Yeşil	30.37–36.38
V600E/Ec	PC	Yeşil	29.62–35.73
V600D	PC	Yeşil	29.75–35.79
V600K	PC	Yeşil	29.32–35.32
V600R	PC	Yeşil	29.41–35.41



**Şekil39. Yürütme kontrol analizi akış şeması**

## Numune analizi - Numune kontrol Yeşil C<sub>T</sub> değeri

Şekil40 içerisindeki numune analizi akış şemasını inceleyiniz.

Kontrol tahlili için her iki yürütme kontrolünün geçerli olması koşuluyla, her bir kontrol C<sub>T</sub> değeri yeşil kanalda 21.95-32.00 aralığında olmalıdır.

Numunenin bu aralığın dışında olduğu durumlar için aşağıdaki kılavuz sağlanmıştır.

- **Numune kontrol tahlili C<sub>T</sub> <21.95:** 21.95 kontrol C<sub>T</sub> sine sahip numuneler < mutasyon tahlillerine aşırı yükleme yapacaktır ve bunlar seyreltilmelidir. Düşük seviyede her bir mutasyonu saptamak adına, aşırı-konsantre edilmiş numuneler, çok fazla seyreltmenin C<sub>T</sub> değerini 1 oranında artıracığı göz önüne alınarak üst aralığa denk gelecek şekilde seyreltilmelidir. Numuneler kit içerisinde sağlanan su ile seyreltilmelidir (Seyreltme Suyu [Dil.]).
- **Numune kontrol tahlili C<sub>T</sub> >32.00:** Yetersiz başlangıç DNA şablonu, tahlil için belirlenmiş cutoff değerlerindeki tüm mutasyonları saptamak adına görüleceği için numunenin re-ekstraksiyonu önerilir.

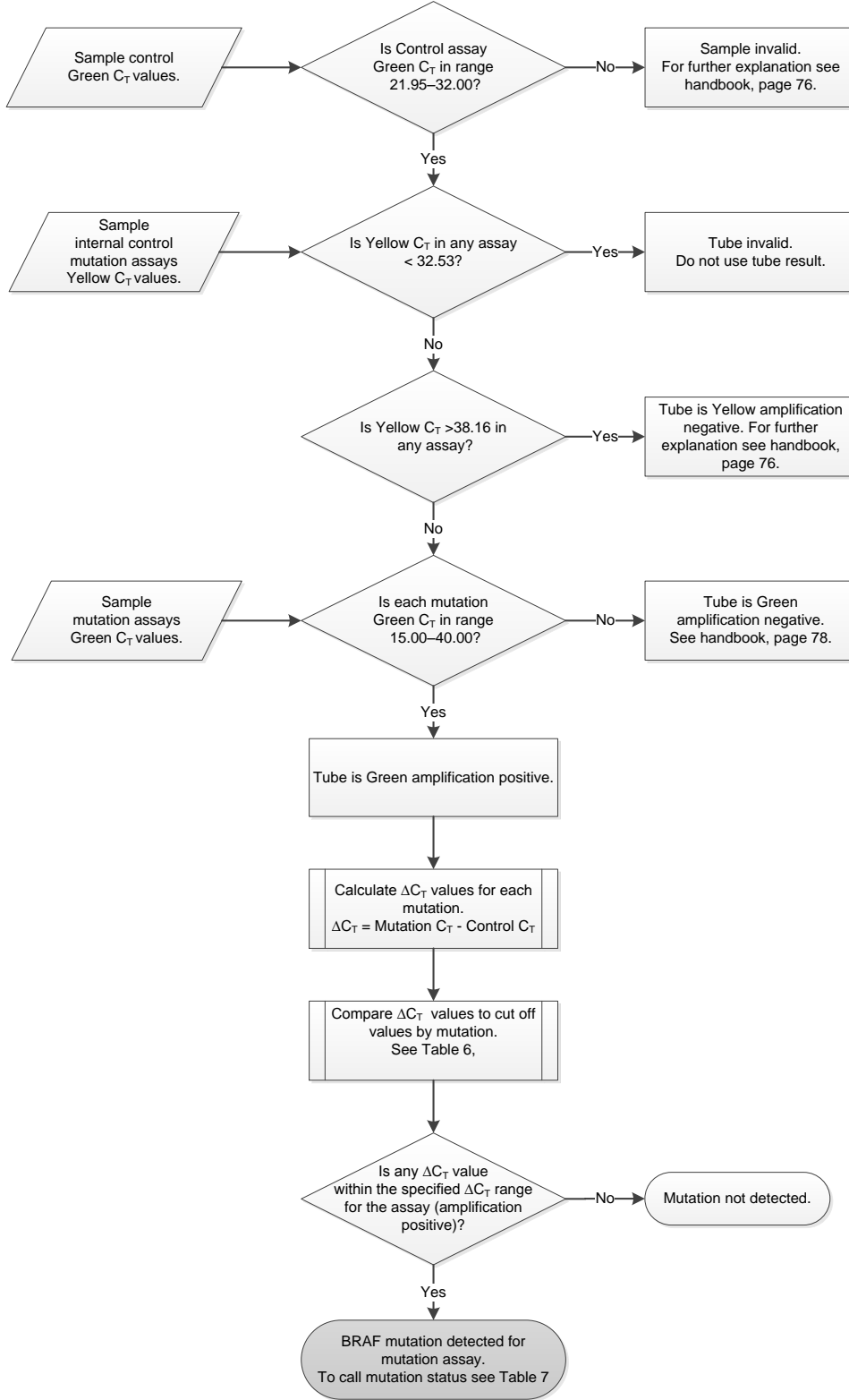
## Numune analizi - Numune dahili kontrol mutasyon tahlilleri Sarı C<sub>T</sub> değeri

Şekil40 içerisindeki numune analizi akış şemasını inceleyiniz.

Her bir numunenin yuvaları analiz edilmelidir. Her bir yuvanın dahili kontrol için Sarı kanalda HEX sinyali oluşturup oluşturmadığını kontrol ediniz. 3 muhtemel sonuç vardır.

- Eğer dahili kontrol C<sub>T</sub> belirlen aralığa düşüyorsa (32.53-38.16), Sarı amplifikasyon pozitif ve geçerlidir.
- Eğer dahili kontrol C<sub>T</sub> belirlenen aralığa düşüyorsa (>38.16), tüp Sarı amplifikasyon negatiftir. Eğer o tüp için Yeşil kanalda amplifikasyon var ise, Sarı amplifikasyon geçerlidir. Eğer o tüp için Yeşil kanalda amplifikasyon yok ise, Sarı amplifikasyon geçersizdir.
- Eğer dahili kontrol C<sub>T</sub> belirlenen aralığın altına düşüyorsa (<32.53), tüp geçersizdir.

Eğer dahili kontrol PCR inhibisyonu nedeniyle başarısız olursa, numunenin seyreltilmesi inhibitörlerin etkisini azaltabilir ancak bunun aynı zamanda hedef DNA'yı da seyrelteceği not edilmelidir. Kit içerisine bir tüp Numune Seyreltme Suyu (Dil) dahil edilmiştir.



**Şekil40. Numune analizi akış şeması.**

## Numune analizi - Numune mutasyon tahlilleri Yeşil C<sub>T</sub> değeri

4 reaksiyon karışımı içinde Yeşil değerler Tablo13 içerisinde verilen değerlere karşı kontrol edilmelidir.

**Tablo13. Kabul edilebilir numune mutasyon reaksiyon değerleri (Yeşil kanal)\***

Tahlil	Kabul edilebilir C <sub>T</sub> aralığı	ΔC <sub>T</sub> aralığı
V600E/Ec	15.00–40.00	≤7.0
V600D	15.00–40.00	≤6.9
V600K	15.00–40.00	≤6.0
V600R	15.00–40.00	≤7.0

\* Kabul edilebilir değerler bu değerler içerisinde ve gösterilen değerleri kapsamaktadır.

- Eğer Yeşil C<sub>T</sub> belirlenen aralığa düşüyorsa, FAM amplifikasyon pozitifdir.
- Eğer Yeşil C<sub>T</sub> belirlenen aralığın üzerinde ise veya amplifikasyon yok ise, Yeşil amplifikasyon negatiftir.

Mutasyon ve kontrol C<sub>T</sub> değerlerinin aynı numuneden olduğunu kesinleştirmek adına FAM amplifikasyon pozitif olan her bir mutasyon tüpü için ΔC<sub>T</sub> değerini aşağıdaki gibi hesaplayınız.

$$\Delta C_T = \text{mutasyon } C_T - \text{kontrol } C_T$$

Her bir tahlile doğru cutoff noktasının uygulandığını kesinleştirmek adına, söz konusu tahlil için cutoff pointi olan numunenin ΔC<sub>T</sub> değerini karşılaştırınız (Tablo13).

Cutoff noktası, wild-type DNA üzerinde mevcut olan ARMSın arka plan sinyalinin sebep oluyor olabileceği pozitif sinyalin üzerindeki noktadır. Eğer numunenin ΔC<sub>T</sub> değeri cutoff noktasından yüksekse, negatif veya kitin saptama sınırının üzerinde olarak sınıflandırılır.

Tüm numuneler için, her bir mutasyon reaksiyonuna mutasyon saptanmıştır; mutasyon saptanmamıştır veya aşağıdaki kriterler geçersizdir statüsü verilecektir;

### ■ Mutasyon saptanmıştır:

Yeşil amplifikasyon pozitif ve ΔC<sub>T</sub> cutoff değerinin altında veya ona denktir. Eğer birden fazla mutasyon saptanırsa, mutasyon statüsü Tablo14ya göre atanmalıdır.

■ **Mutasyon saptanmıştır:**

Yeşil amplifikasyon pozitif ve  $\Delta C_T$  cutoff değerinin üstündedir.

Yeşil amplifikasyon negatif ve Sarı (dahili kontrol) amplifikasyon pozitifdir.

■ **Geçersiz:**

Sarı (dahili kontrol) geçersizdir.

Yeşil amplifikasyon ve Sarı amplifikasyon negatifdir.

Daha fazla açıklama için, akış şemasını inceleyiniz (Şekil40). Eğer numune, tüp içerisinde Sarı amplifikasyon negatif fakat farklı bir tüp içerisinde Yeşil amplifikasyon pozitif ise, diğer tüp için “mutasyon saptanmıştır” sonucu geçerli sayılabilir fakat tanımlanan mutasyon güvenilir bir şekilde atanamaz.

Eğer numune, aynı tüp içerisinde Sarı amplifikasyon negatif ve Yeşil amplifikasyon pozitifse, “mutasyon saptanmıştır” sonucu geçerli sayılmalıdır.

Eğer tüp Sarı (dahili kontrol) geçersizse, o tüpün sonucu kullanılmamalıdır.

**Numune analizi - Numune mutasyon statüsü atamak**

Tüm mutasyon reaksiyon tüpleri değerlendirildikten sonra, numunenin mutasyon statüsü aşağıdaki gibi belirlenir.

- **Mutasyon saptanmıştır:** 4 mutasyondan reaksiyonundan biri veya birden fazlası pozitiftir. Eğer birden fazla mutasyon saptanırsa, mutasyon statüsü Tablo14ya göre atanmalıdır.

**Tablo14. Numune mutasyon statülerini adlandırılması**

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutasyon statüsü
Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	V600E veya V600Ec pozitif
Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	V600Ec veya V600K pozitif
Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	V600D pozitif
Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	V600D pozitif
Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	V600K pozitif
Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	V600R pozitif



- **Mutasyon saptanmamıştır:**4 mutasyonun hepsi de negatiftir.
- **Geçersiz:** Hiçbir mutasyon reaksiyonu pozitif değildir ve 1 veya daha fazla mutasyon geçersizdir.

Not: theascreen BRAF RGQ PCR Kitinin amacı, DNA numunesi içindeki BRAF geninde bulunan mutasyonları saptamaktır. Numune için BRAF mutasyonu saptanmıştır sonucu alındığında, yalnızca tek bir spesifik mutasyon raporlanmalıdır. Eğer birden fazla mutasyon saptanırsa, mutasyon statüsü Tablo14ya göre atanmalıdır.

Mutasyon reaksiyonları arasında bazı çapraz-reaktiviteler meydana gelmektedir. Örneğin, V600E/Ec tahlili eğer bir V600D mutasyonu olması halinde pozitif sonuç verebilir, V600E/Ec tahlili bir V600K mutasyonu olması halinde pozitif sonuç verebilir ve son olarak V600K tahlili bir V600E kompleks mutasyonu var olması halinde pozitif sonuç verebilir. Fakat, mutasyon statüsü Tablo14yı kullanarak belirginleştirilebilir.

Çapraz-reaktivitenin sebebi aynı sekans içerisindeki diğer mutasyonları saptamak için ilk olarak kullanılan ARMStir. İkinci mutasyon tahlili pozitif sonuç veriyorsa, bunun çapraz-reaktivite olma ihtimali yüksektir. Çok nadir olmalarına rağmen, çift mutantlar görülmüştür.

Bu nedenle, nadir durumlarda, Tablo14 içerisinde verilmeyen pozitif sonuç kombinasyonları elde edilebilir. Numune yine de BRAF mutasyonu saptandı olarak adlandırılır. Fakat, çapraz-reaktivite sebebiyle belirli mutasyonlar farkedilemez. Bu nedenle, numune yalnızca “mutasyon saptandı” olarak adlandırılmalıdır.

Eğer bir ya da daha fazla mutasyon reaksiyonu geçersiz fakat bir ya da daha fazlası pozitifse, numune ortada bir mutasyon var olduğundan BRAF mutasyonu saptanmıştır olarak adlandırılabilir. Fakat, raporlanan spesifik mutasyon kesin olmayabilir ve bir çapraz-reaktivitenin sonucu olabilir. Bu nedenle, numune yalnızca “mutasyon saptandı” olarak adlandırılmalıdır.

## Ek - II *Therascreen* BRAF Tahlil Paketinin Kurulumu

Artık *therascreen* BRAF RGQ PCR Kiti 72-yuvalı rotoru olan Rotor-Gene Q MDx ile kullanım için tasarlanmıştır. *Therascreen* BRAF Tahlil paketini *therascreen* BRAF RGQ PCR Kiti ürün sayfasında [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesinden indirebilirsiniz. İndirme bilgisi “Ek Protokoller” sekmesi altında “Ürün Kaynakları” içerisinde bulunabilir. Tahlil paketini ayrıca CD şeklinde de sipariş edebilirsiniz (QIAGEN, kat. no. 9023820).

Tahlil paketi “*therascreen* BRAF CE Numune Değerlendirmesi Kilitli Şablon”u ve “*therascreen* BRAF CE Mutasyon Analizi Kilitli Şablon”u içermektedir.

Not: *Therascreen* BRAF Tahlil Paketi yalnızca Rotor-Gene Q Yazılım versiyonu 2.3 ile uyumludur. *Therascreen* BRAF Tahlil Paketinin yüklenmesine geçmeden önce Rotor-Gene Q yazılımının doğru sürümünün yüklü olduğundan emin olunuz. Eğer Rotor-Gene Q MDx aracınız eski bir yazılım sürümüyle teslim edildiye, Rotor-Gene Q MDx ürün sayfası olan [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) dan kolaylıkla 2.3 sürümüne güncelleyebilirsiniz. Yeni yazılım “İşletim Yazılımı” sekmesi altında “Ürün Kaynakları” içerisinde bulunabilir.

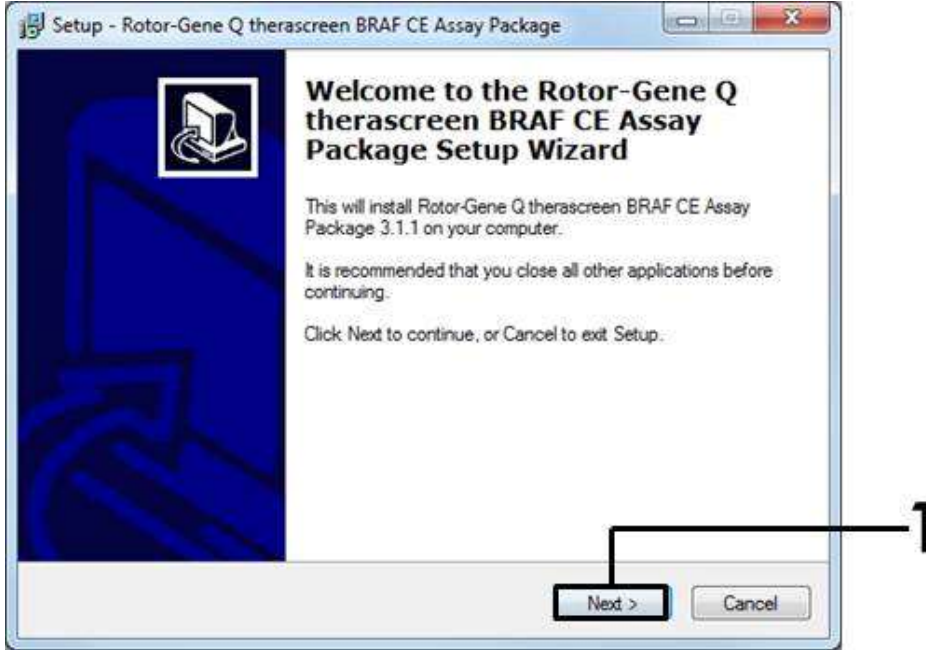
### Prosedür (indirme)

1. *Therascreen* BRAF RGQ Tahlil Paketi CE yi ilgili BRAF RGQ PCR Kiti ürünü sayfası olan [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) dan indirin.
2. İndirilen zip-dosyasının, dosyaya çift-tıklayarak açınız ve arşiv içerisindeki dosyaları çıkarınız.
3. Çıkarılan dosya *therascreen\_BRAF\_Assay\_Package\_3.1.1.exe* ye çift tıklayarak yükleme işlemini başlatınız.

### Prosedür (CD)

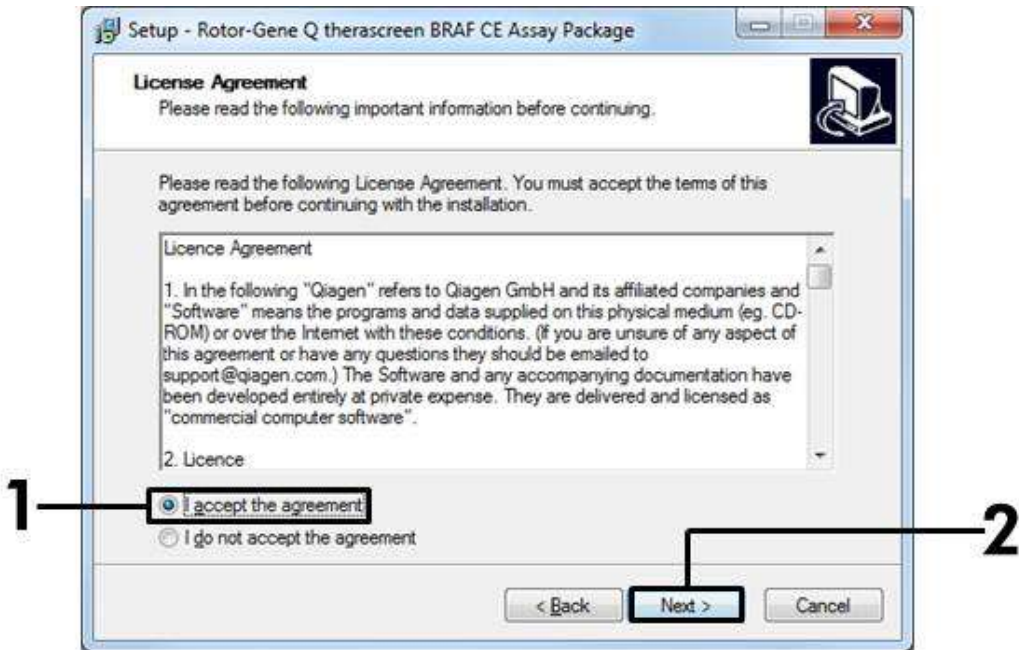
1. Ayrı bir şekilde mevcut olan *therascreen* BRAF RGQ Tahlil Paketi CE CD sini QIAGEN den sipariş ediniz (QIAGEN, kat. no. 9023820).
2. CD yi, Rotor-Gene Q aracının bağlı bulunduğu laptopun CD sürücüsüne takınız.
3. Eğer CD oto-yükleme yaparsa *therascreen\_BRAF\_Assay\_Package\_3.1.1.exe* dosyasına çift tıklayarak yükleme işlemini başlatınız veya alternatif olarak bağlı laptopın dosya tarayıcısını kullanarak bu yürütülebilir dosyanın yerini saptayınız.

4. Yükleme sihirbazı belirecektir. Devam etmek için “İleri”ye tıklayınız (Şekil41).



Şekil41. “Yükleme” penceresi. (1 = İleri butonu).

5. “Lisans Anlaşması” diyalog kutusundaki Lisans Anlaşmasını okuyunuz ve “Anlaşmayı kabul ediyorum” u tıklayarak anlaşmayı kabul ediniz. Devam etmek için “İleri”ye tıklayınız (Şekil42).



Şekil42. “Lisans Anlaşması” diyalog kutusu. (1 = Kabul et butonu, 2 = İleri butonu).

6. Bu tamamlandığında şablon kurulumu otomatik olarak başlayacak ve son bir “Kurulum” diyalog kutusu görülecektir. Kurulum sihirbazından çıkmak için “Bitir” e tıklayınız (Şekil43).



Şekil43. Yükleme sihirbazının tamamlanması. (1 = Bitir butonu).

7. Bilgisayarı yeniden başlatınız. “thetascreen BRAF CE Numune Değerlendirmesi Kilitli Şablon” ve “thetascreen BRAF CE Mutasyon Analizi Kilitli Şablon”a ulaşım için masaüstünde otomatik olarak iki kısayol olarak belirecektir.

## İletişim Bilgileri

Teknik yardım ve daha fazla bilgi için, lütfen [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) sayfasındaki Technical Support Center’e bakın, 00800-22-44-6000 numarasını arayın QIAGEN Teknik Servis Departmanlarını veya yerel distribütörlerinizden birisini arayın (arka kapağa bakın ya da [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sayfasını ziyaret edin).

## Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: Kontrol tahlili, 4 mutasyon tahlili, Pozitif kontrol, Taq DNA polimeraz, Şablonsuz Kontrol suyu ve Numune Seyreltisi için Su	870211
<b>Rotor-Gene Q ve diğer aksesuarlar</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) High Resolution Melt analizör artı HRM kanalı, laptop bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1-yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Sistemi	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) High Resolution Melt analizör artı HRM kanalı, laptop bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1-yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002033
<i>therascreen</i> BRAF Tahlil paketi CD si	Therascreen BRAF CE Numune Değerlendirmesi Kilitli Şablon ve <i>therascreen</i> BRAF CE Mutasyon Analizi Kilitli Şablonu içeren CD.	9023820
Yükleme Bloğu 72 x 0.1 ml Tüpleri	Tek-kanal pipetli manuel reaksiyon yüklenmesi için 72 x 0.1 ml tüplerde alüminyum blok	9018901
Şerit tüpler ve kapakları, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 250 şeritli 4 tüp ve kapak	981103
Şerit tüpler ve kapakları, 0.1 ml (2500)	10,000 reaksiyon için 10 x 250 şeritli 4 tüp ve kapak	981106
<b>QIAamp DNA FFPE Doku Kiti —Parafine gömülü genomik DNA purifikasyonu için</b>		
QIAamp DNA FFPE Doku Kiti (50)	50 DNA preps için: 50 QIAamp MinElute® Sütunu, Protenaz K, Tamponlar, Koleksiyon Tüpleri (2 ml)	56404

---

Güncel lisanslama bilgileri ve ürüne özel feragatnameler için, ilgili QIAGEN kit el kitabına ya da kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesinde mevcuttur ya da QIAGEN Teknik Servislerinizden ya da yerel distribütörünüzden talep edilebilir.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.





Markalar: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreer*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

Endometriyöz Oluşumu Riskinin Belirlenmesinde Kullanım için Değildir

Sınırlı Lisans Anlaşması

Bu ürünün kullanılması, *therascreen* BRAF RGQ PCR KRAS Kit ürünlerini satın alan kişinin ya da kullanıcının aşağıdaki koşullarda bir anlaşması anlamına gelir.

1. *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit yalnızca *therascreen* BRAF RGQ PCR KRAS Kit Kullanım Kılavuzu'na göre ve yalnızca Kit içinde içerilen bileşenlerle birlikte kullanım içindir. QIAGEN kendisinin her hangi bir fikri hakları altında bu Kitin içeriğindeki bileşenlerin Kit içerisinde içerilmeyen her türlü komponentler ile birlikte kullanımı için bir lisans sunmaz, *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit Kullanım Kılavuzu'nda tanımlanmış olanlar bu hususların dışındadır ve ilave protokoller [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesinde mevcuttur.
2. Açıkça ifade edilen lisansların dışında QIAGEN bu Kitin ve/veya onun kullanımının üçüncü kişilerin haklarının çiğnenmeyeceğini garanti vermez.
3. Bu *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit ve komponentleri bir kez kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve yeniden satılamaz.
4. QIAGEN belirli bir biçimde açıkça belirtilenler dışındaki diğer lisansları açıkça ya da ima yoluyla onaylamaz.
5. Kitin satın alıcısı ya da kullanıcısı başka bir kişinin yukarıda yasaklanan her hangi bir kuralın hafifletilmesi yönünde bir adım atmasına izin vermemek konusunda anlaşılır. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Anlaşmasının yasaklarını herhangi bir Mahkemede uygulatabilir ve avukat ücreti dahil bu Sınırlı Lisans Anlaşması ya da Kit ve/veya bunun komponentleriyle ilgili tüm araştırma ve Mahkeme masraflarını talep edecektir.

Güncel lisanslama koşulları için, see [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sayfasına bakın.

HB-1273-005 © 2016 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

**www.qiagen.com**

**Avustralya** #techservice-au@qiagen.com

**Avusturya** #techservice-at@qiagen.com

**Belçika** #techservice-bnl@qiagen.com

**Brezilya** #suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Kanada** #techservice-ca@qiagen.com

**Çin** #techservice-cn@qiagen.com

**Danimarka** #techservice-nordic@qiagen.com

**Finlandiya** #techservice-nordic@qiagen.com

**Fransa** #techservice-fr@qiagen.com

**Almanya** #techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** #techservice-hk@qiagen.com

**Hindistan** #techservice-india@qiagen.com

**İrlanda** #techservice-uk@qiagen.com

**İtalya** #techservice-it@qiagen.com

**Japonya** #techservice-jp@qiagen.com

**Kore (Güney)** #techservice-kr@qiagen.com

**Lüksemburg** #techservice-bnl@qiagen.com

**Meksika** #techservice-mx@qiagen.com

**Hollanda** #techservice-bnl@qiagen.com

**Norveç** #techservice-nordic@qiagen.com

**Singapur** #techservice-sg@qiagen.com

**İsveç** #techservice-nordic@qiagen.com

**İsviçre** #techservice-ch@qiagen.com

**Birleşik Krallık** #techservice-uk@qiagen.com

**ABD** #techservice-us@qiagen.com

