

2016 gegužė

# „*therascreen*<sup>®</sup> RAS Extension Pyro<sup>®</sup> Kit“ vadovas



1 versija

**IVD**

Skirta *in vitro* diagnostikai

Mutacijoms aptikti žmogaus KRAS onkogeno 3 ir 4 egzonuose ir žmogaus NRAS onkogeno 2, 3 ir 4 egzonuose

**CE**

**REF**

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
VOKIETIJA

R2 **MAT**

1085873LT



# Turinys

Numatytoji paskirtis .....	5
Santrauka ir paaiškinimas .....	5
Procedūros principas.....	7
<b>Kontrolinės medžiagos</b> .....	8
Pateikiamos medžiagos.....	9
<b>Rinkinio turinys</b> .....	9
Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos .....	11
Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	13
<b>Bendrosios atsargumo priemonės</b> .....	14
Reagentų laikymas ir naudojimas.....	14
Mėginių rinkimas, paruošimas tyrimui ir laikymas.....	15
Procedūra.....	17
<b>DNR išskyrimas</b> .....	17
1 protokolą: „PyroMark Q24“ sistemos procedūros sąranka.....	17
2 protokolą: PGR naudojant su „ <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit“ pateikiamus PGR reagentus .....	20
3 protokolą: PGR produktų imobilizavimas „Streptavidin Sepharose High Performance“ rutuliukuose .....	23
4 protokolą: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema .....	25
5 protokolą: „PyroMark Q24“ tyrimas.....	29
6 protokolą: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė .....	31
Rezultatų aiškinimas.....	35

---

Tipiniai rezultatai .....	40
Trikčių šalinimo vadovas .....	43
Kokybės kontrolė .....	45
Apribojimai .....	45
Efektyvumo charakteristikos .....	46
Tuštumo riba ir aptikimo riba .....	46
Mutacijos GGT >TGT ir GGT > GTT NRAS 13 kodone .....	48
Tiesiškumas .....	49
Tikslumas .....	50
Diagnostinis įvertinimas .....	53
Literatūra .....	57
Simboliai .....	58
Kontaktinė informacija .....	59
A priedas: „ <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas .....	60
B priedas: atliekų konteinerio ir lovelių ištuštinimas .....	66
Užsakymo informacija .....	68

# Numatytoji paskirtis

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ yra *in vitro* diagnostinis testas, paremtas „Pyrosequencing®“ technologija, skirtas kiekybiniam mutacijų aptikimui žmogaus KRAS onkogeno 59, 61, 117 ir 146 kodonuose ir žmogaus NRAS onkogeno 12, 13, 59, 61, 117 ir 146 kodonuose, naudojant DNR, išskirtą iš formalinu fiksuoto parafine esančio (FFPE) metastazavusio kolorektalinio vėžio (metastatic colorectal cancer, mCRC) žmogaus audinio.

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ padeda nustatyti mCRC sergančius pacientus, kuriems gali padėti anti-EGFR gydymas, pvz. cetuksimabas arba panitumumabas (1).

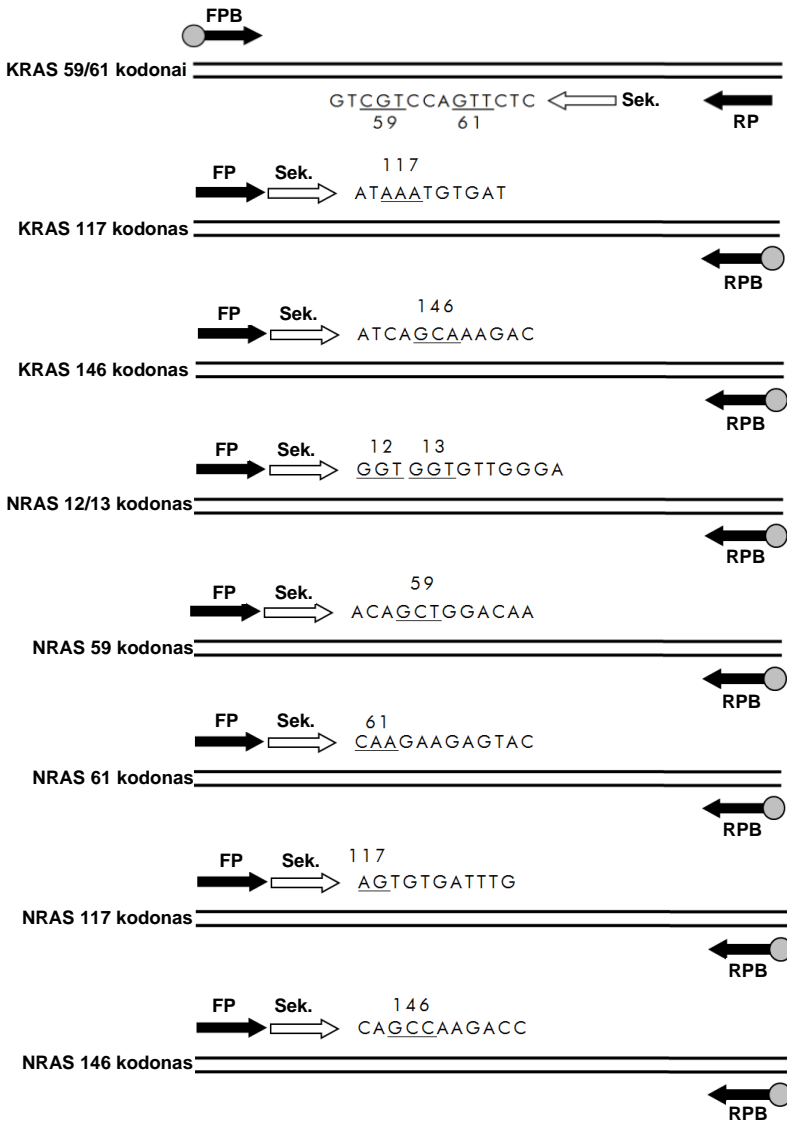
„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ skirtas naudoti tik su „PyroMark Q24“ sistema. „PyroMark Q24“ sistemos sudaro:

- „PyroMark Q24“ instrumentas arba „PyroMark Q24 MDx“ instrumentas.
- „PyroMark Q24 Vacuum Workstation“ arba „PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation“.
- „PyroMark Q24 Software“ (2.0 versija) arba „PyroMark Q24 MDx Software“ (2.0 versija).

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ turi naudoti tik specialistai, pvz., technikai ir gydytojai, išmokyti atlikti *in vitro* diagnostikos procedūras, naudoti molekulinės biologijos metodus ir dirbti „PyroMark Q24“ sistema.

## Santrauka ir paaiškinimas

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ naudojamas žmogaus KRAS geno 3 ir 4 egzonų ir žmogaus NRAS geno 2, 3, ir 4 egzonų mutacijų kiekybiniams matavimams. Rinkinį sudaro aštuoni tyrimai (1 pav).



1 pav. „therascreen RAS Extension Pyro Kit“ tyrimai.

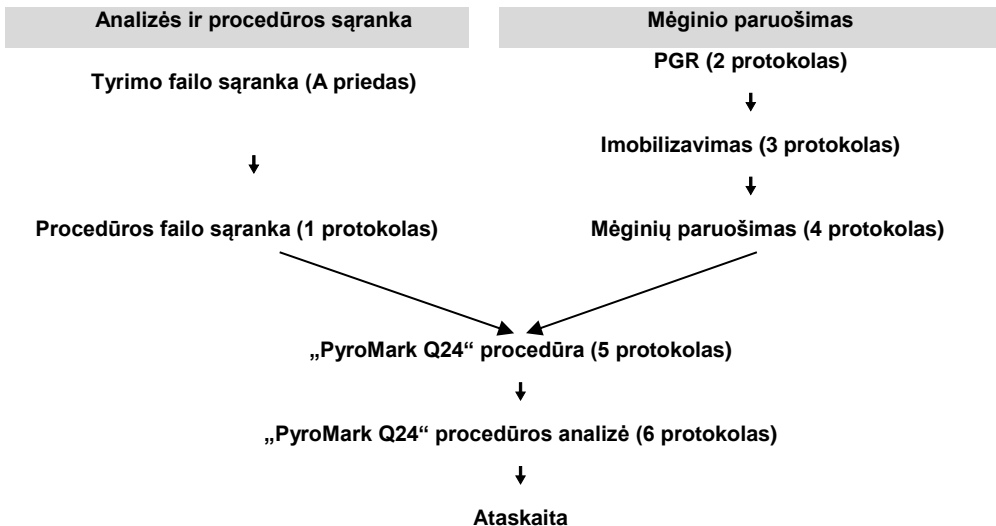
---

Šie aštuoni regionai amplifikuojami atskirai naudojant PGR ir atliekama sekoskaita apibrėžtame regione. Apimamuose regionuose esančios mutacijos nulems skirtingus raštus „Pyrogram®“ kreivėje, kuriuos galima atskirti nuo kreivių, gautų su laukinio tipo mėginiais. Mutacijos, kurias galima analizuoti su „PyroMark® Q24 Software“, yra išvardytos 15 lentelė (A priedas: „therascreen RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas). KRAS 117 ir 146 kodonų bei NRAS 12/13, 59, 61, 117 ir 146 kodonų tyrimų sekoskaita atliekama tiesiogine kryptimi, o KRAS 59/61 kodono tyrimo sekoskaita atliekama atgaline kryptimi. Gaminį sudaro kiekvieno tyrimo PGR pradmenų mišinys ir sekoskaitos pradmuo. Pradmenys pateikiami tirpale, kiekviename buteliuke yra 24 µl pradmens ar pradmenų mišinio.

## Procedūros principas

2 pav. (kitame psl.) iliustruojama tyrimo procedūros darbo eiga. Atlikus PGR, pradmenys naudojami nusitaikant į dominančią sritį, o amplifikacijos produktai imobilizuojami „Streptavidin Sepharose® High Performance“ rutuliukuose. Paruošiama vienos gijos DNR ir atitinkami sekoskaitos pradmenys prisijungia prie DNR. Tada mėginiai analizuojami „PyroMark Q24“, naudojant tyrimo sąrankos failus ir procedūros failą.

„Sequence to Analyze“ (analizuotina seka) gali būti sureguliuota įvairioms mutacijoms aptikti po procedūros (žr. „6 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė“ 31 psl. ir „A priedas: „therascreen RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas“ 60 psl.).



2 pav. „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ procedūros darbo eiga.

## Kontrolinės medžiagos

Į rinkinį įtraukta nemetilinta kontrolinė DNR kaip teigiama PGR ir sekoskaitos reakcijų kontrolinė medžiaga. Šios kontrolinės DNR genotipas yra laukinio tipo regionuose, kurių sekoskaita atlikta šiuo rinkiniu. Į kiekvieną „Pyrosequencing“ procedūros tyrimą įtraukite kontrolinės DNR mėginį. Tai būtina norint tinkamai aiškinti rezultatus ir nustatyti žemo lygio mutacijas (žr. „6 protokolai: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė“ 31 psl.).

Be to, į kiekvieną bent vieno tyrimo PGR sąranką turi būti įtraukta neigiama kontrolinė medžiaga (be DNR matricos).



# Pateikiamos medžiagos

## Rinkinio turinys

1/2 dėžutė

<b>„therascreen RAS Extension Pyro Kit“</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalogo nr.</b>	<b>971590</b>
<b>Paruošimų skaičius</b>	<b>24</b>
Seq Primer KRAS 59/61 (sekoskaitos pradmuo KRAS 59/61)	24 µl
Seq Primer KRAS 117 (sekoskaitos pradmuo KRAS 117)	24 µl
Seq Primer KRAS 146 (sekoskaitos pradmuo KRAS 146)	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13 (sekoskaitos pradmuo NRAS 12/13)	24 µl
Seq Primer NRAS 59 (sekoskaitos pradmuo NRAS 59)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (sekoskaitos pradmuo NRAS 61)	24 µl
Seq Primer NRAS 117 (sekoskaitos pradmuo NRAS 117)	24 µl
Seq Primer NRAS 146 (sekoskaitos pradmuo NRAS 146)	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61 (PGR pradmuo KRAS 59/61)	24 µl
PCR Primer KRAS 117 (PGR pradmuo KRAS 117)	24 µl
PCR Primer KRAS 146 (PGR pradmuo KRAS 146)	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13 (PGR pradmuo NRAS 12/13)	24 µl
PCR Primer NRAS 59 (PGR pradmuo NRAS 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (PGR pradmuo NRAS 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (PGR pradmuo NRAS 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (PGR pradmuo NRAS 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	6 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (nemetilinta kontrolinė DNR, 10 ng/µl)	3 x 100 µl

## 2/2 dėžutė

<b>Buferiniai tirpalai ir reagentai</b>	<b>Tūris</b>
PyroMark Binding Buffer	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (fermentų mišinys)	2 buteliukai
Substrate Mixture (substrato mišinys)	2 buteliukai
dATP $\alpha$ S	2 x 1180 $\mu$ l
dCTP	2 x 1180 $\mu$ l
dGTP	2 x 1180 $\mu$ l
dTTP	2 x 1180 $\mu$ l
therascreen <i>RAS Extension Pyro Kit Handbook</i> („therascreen <i>RAS Extension Pyro Kit</i> “ vadovas) (anglų k.)	1 vnt.

\* Yra natrio hidroksido.

# Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

## Reagentai

- DNR išskyrimo rinkinys (žr. „DNR išskyrimas“, 17 psl.)
- „Streptavidin Sepharose High Performance“ („GE Healthcare“, kat. nr. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- Labai išgrynintas vanduo („Milli-Q®“ 18,2 MΩ x cm arba atitinkamas)

**Pastaba.** Rinkinyje pateikiama pakankamai vandens PGR, DNR imobilizuoti, fermentų mišiniui ir substrato mišiniui ištirpdyti; labai išgryninto vandens papildomai reikia „PyroMark Wash Buffer“ (10x) atskiesti.

- Etanolis (70 %)\*

## Reikmenys

- Sterilūs pipečių antgaliai (su PGR sąrankos filtrais)
- 24 šulinėlių PGR plokštelės (žr. „Rekomenduojamos 24 šulinėlių plokštelės“ 13 psl.)
- Lipni folija
- „PyroMark Q24 Plate“ (kat. nr. 979301)†
- „PyroMark Q24 Cartridge“ (kat. nr. 979302)†

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

† Pažymėta CE-IVD, atitinka ES direktyvą 98/79/EB. Visi kiti išvardyti produktai nėra pažymėti CE-IVD remiantis ES direktyva 98/79/EB.

## Įranga

- Pipetės (reguliuojamos)\*
  - Stalinė mikrocentrifuga‡
  - Šiluminio ciklo prietaisas‡ ir atitinkami PGR mėgintuvėliai
  - „PyroMark Q24 MDx“ arba „PyroMark Q24“ (kat. Nr. 9001513 arba 9001514)‡
  - „PyroMark Q24 MDx“ arba „PyroMark Q24 Vacuum Workstation“ (kat. nr. 9001515, 9001516, 9001518 arba 9001519)‡
- Plokštelių maišytuvai‡ rutuliukams imobilizuoti (žr. „
- Rekomenduojami plokštelių maišytuvai“ 12 psl.)
  - Kaitinimo blokas‡, galintis pasiekti 80 °C temperatūrą

## Rekomenduojami plokštelių maišytuvai

1 lentelė nurodyti orbitiniai plokštelių maišytuvai yra rekomenduojami naudoti su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“.

1 lentelė. Su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ rekomenduojami naudoti plokštelių maišytuvai

Gamintojas	Produktas	Katalogo nr.
Eppendorf	ThermoMixer® C (pagrindinis įrenginys)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

\* Užtikrinkite, kad instrumentai būtų patikrinti ir sukalibruoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

## Rekomenduojamos 24 šulinėlių plokštelės

2 lentelė nurodytos 24 šulinėlių plokštelės yra rekomenduojamos naudoti su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“.

2 lentelė. 24 šulinėlių plokštelės, rekomenduojamos naudoti su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“

Gamintojas	Produktas	Katalogo nr.
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24-well	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

## Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta *in vitro* diagnostikai

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS). Juos patogiu ir kompaktišku PDF formatu rasite interneto svetainėje [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Čia galite rasti, perskaityti ir išsispausdinti kiekvieno QIAGEN® rinkinio ir rinkinio komponento SDS.

## Bendrosios atsargumo priemonės

Visada atkreipkite dėmesį į toliau aprašytus dalykus.

- Šio produkto komponentų užtenka 24 reakcijoms atlikti kiekviename tyrime.
- Naudokite sterilius pipečių antgalius (su filtrais PGR nustatyti).
- Teigiamas medžiagas (pavyzdžiui, teigiamas kontrolines medžiagas ir amplikonus) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Prieš pradėdami tyrimą visus komponentus gerai atšildykite kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Atšildę sumaišykite komponentus (pakartotinai įsiurbdami ir lašindami pipete arba naudodami impulsinę sūkurinę maišyklę) ir trumpai centrifuguokite.
- Mutacijų būsenos negalima vertinti remiantis nesėkmingais rezultatais.

## Reagentų laikymas ir naudojimas

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ pateikiamas dviejose dėžutėse. „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ (dėžutė 1/2) pristatomas užšaldytas sausame lede. „PyroMark PCR Master Mix“, „CoralLoad Concentrate“, metilinta kontrolinė DNR ir visi pradmenys pristatyti turi būti laikomi nuo –15 iki –25 °C temperatūroje.

„Pyro“ buferiniai tirpalai ir reagentai (dėžutė 2/2), kurie apima buferinius tirpalus, fermentų mišinį, substrato mišinį, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP ir dTTP („Pyrosequencing“ analizės reagentus), pristatomi šaltose pakuotėse. Šie komponentai pristatyti turi būti laikomi 2–8 °C. Kad nesumažėtų aktyvumas, fermentų mišinį ir substrato mišinį patariama laikyti pateikiamuose buteliukuose.

Atkurti fermentų ir substrato mišiniai yra stabilūs bent 10 dienų laikant 2–8 °C temperatūroje. Atkurtus fermentų ir substrato mišinius galima užšaldyti ir laikyti jų buteliukuose nuo –15 iki –25 °C temperatūroje. Užšaldytus reagentus galima užšaldyti ir atšildyti ne daugiau kaip šešis kartus.

**Pastaba.** Nukleotidų šaldyti negalima.

Laikant šiomis sąlygomis, „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ rinkinys išlieka stabilus iki rinkinio galiojimo datos.

## Mėginių rinkimas, paruošimas tyrimui ir laikymas

**Pastaba.** Su visais mėginiais turi būti elgiamasi kaip su potencialiai užkrečiama medžiaga.

Mėginių medžiaga turi būti žmogaus genomine DNR, išskirta iš FFPE audinio. Mėginius būtina transportuoti pagal standartinį patologinį metodą, kad būtų užtikrinta mėginių kokybė.

Auglio mėginiai yra heterogeniški, o auglio mėginio duomenys gali neatitikti kitų to paties auglio dalių mėginių duomenų. Auglio mėginiuose taip pat gali būti ne auglio audinių. Ne auglio audinio DNR neturi mutacijų, aptinkamų naudojant „*therascreen* RAS Extension Pyro“ rinkinį.

### Audinių mėginių paruošimas

**Pastaba.** Naudokite sausus skalpelius. Neatlikite šio veiksmo laminarinio srauto arba traukos spintoje.

- Nugrandykite auglio audinį nuo atpjovų į pažymėtus mikrocentrifugos mėgintuvėlius, kiekvienam mėginiui naudodami naują skalpelį.

## Audinių mėginių paruošimas DNR išskirti

- Naudodami įprastas medžiagas ir metodus, užfiksuokite audinio mėginį 10 % neutraliu buferiniu skysčiu atskiestame formaline (neutral buffered formalin, NBF), tada audinio mėginį įdėkite į parafiną. Nuo parafino bloko mikrotomu atpjaukite 5 µm atpjovų seką ir uždėkite ant objektinių stiklelių.
- Patyręs asmuo (pvz., patologas) turi įvertinti hematoksilinu ir eozinu (H&E) nudažytą auglio ląstelių atpjovą ir nustatyti plotą. Pažymėkite nudažytą objektinį stiklį, kad atskirtumėte auglį nuo įprasto audinio. DNR išskirti naudokite sekos atpjovas.
- Atpjovas, kurių >20 % ploto užima auglio ląstelės, naudokite be makrodisekcijos (žr. kitą punktą).
- Nuo atpjovų, kurių <20 % ploto užima auglio ląstelės, atskirkite vieną ar kelias atpjovas. Išmeskite ne auglio audinį.
- Jei atpjovos plotas <4 mm<sup>2</sup>, apdorokite dvi ar daugiau atpjovų, kad padidintumėte bendrą auglio plotą bent iki 4 mm<sup>2</sup> (taikoma tiek mėginiams be makrodisekcijos, tiek su ja). Išmeskite ne auglio audinį.
- Parafino perteklių nuo audinio pašalinkite naudodami naują sterilų skalpelį.

## Laikymas

FFPE blokus ir objektinius stiklelius laikykite kambario temperatūroje. Prieš pradėdami išskirti DNR, objektinius stiklelius galima laikyti kambario temperatūroje iki 4 savaičių.

Prieš naudojimą išskirta genomine DNR gali būti laikoma 2–8 °C temperatūroje 1 savaitę, tada nuo –15 iki –25 °C temperatūroje iki 8 savaičių.



# Procedūra

## DNR išskyrimas

3 lentelė parodytas „QIAGEN“ rinkinys yra rekomenduojamas nurodytų žmonių mėginių tipų DNR gryninti, taip pat naudoti su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“. Norėdami naudotis rinkiniu, vykdykite DNR gryninimo instrukcijas, pateikiamas atitinkamo rinkinio vadove.

**3 lentelė. DNR gryninimo rinkinys, rekomenduojamas naudoti su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“**

Mėginio tipas	Nukleorūgšties išskyrimo rinkinys	Katalogo numeris (QIAGEN)
Parafine esantis audinys	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

## 1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos procedūros sąranka

### Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Sukurkite tyrimo sąranką, kaip aprašyta „A priedas: „*therascreen* RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas“, 60 psl. Tai reikia nustatyti tik vieną kartą prieš pradėdant pirmą „RAS Extension Pyro“ tyrimą.
- Stenkitės nedėti mėginių su intensyviu signalu šalia šulinėlių, kuriuose yra kontrolė be matricos, ir šulinėlių, iš kurių tikimasi silpno signalo. Dėl to gali būti sumaišyti šulinėlių signalai, signalas iš vieno šulinėlio aptinkamas gretimame šulinėlyje.

## Procedūra


1. Įrankių juostoje spustelėkite .

Sukuriamas naujas procedūros failas.

2. Įveskite procedūros parametrus (žr. „Procedūros parametrai“, 19 psl.)
3. Nustatykite plokštelę, pridėdami tyrimų visiems aštuoniems „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ tyrimams prie šulinėlių, atitinkančių analizuojamus mėginius.

**Pastaba.** Į kiekvieną bent vieno tyrimo PGR sąranką turi būti įtrauktas neigiamas kontrolinis mėginys (be DNR matricos).

**Pastaba.** Į kiekvieną „Pyrosequencing“ procedūros tyrimą įtraukite mėginį su nemetilinta kontroline DNR kaip laukinio tipo kontroline medžiaga (žr. „2 pav“, 8 psl.).

4. Kai procedūra nustatyta ir parengta paleisti „PyroMark Q24“ sistemoje, išspausdinkite fermentų mišinio, substrato mišinio ir nukleotidų reikiamų tūrių sąrašą ir plokštelės sąranką. Meniu „Tools“ (Įrankiai) pasirinkite „Pre Run Information“ (išankstinės procedūros informacija). Pasirodžius ataskaitai, spustelėkite .
5. Uždarykite procedūros failą ir naudodami „Windows® Explorer“ nukopijuokite į USB atmintinę (pateikiamą su sistema).

**Pastaba.** Išspausdintą išankstinės procedūros informaciją galima naudoti kaip sąrankos pavyzdį (žr. „3 protokolai: PGR produktų imobilizavimas „Streptavidin Sepharose High Performance“ rutuliukuose“, 23 psl.).

**Pastaba.** Informacijos apie plokštelės tyrimą „PyroMark Q24“ sistemoje rasite „5 protokolai: „PyroMark Q24“ tyrimas“, 29 psl.

## Procedūros parametrai

- **„Run name“ (procedūros pavadinimas):** procedūros pavadinimas suteikiamas įrašant failą. Pervardijus failą, pakeičiamas ir procedūros pavadinimas.
- **„Instrument method“ (instrumento metodas):** pasirinkite instrumento metodą pagal procedūroje naudojamą kasetę, žr. su produktais pateikiamas instrukcijas.
- **„Plate ID“ (plokštelės ID, pasirenkama):** įveskite „PyroMark Q24 Plate“ ID.
- **„Bar code“ (brūkšninis kodas, pasirenkama):** įveskite plokštelės brūkšninio kodo numerį arba, jei turite prie kompiuterio prijungtą brūkšninių kodų skaitytuvą, pelės žymiklį perkeltkite į teksto lauką „Barcode“ (brūkšninis kodas) ir nuskaitykite brūkšninį kodą.
- **„Kit and Reagent ID“ (rinkinio ir reagento ID, pasirenkama):** įveskite naudojamo „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ partijos numerį. Partijos numerį galima rasti ant gaminio etiketės.  
**Pastaba.** Rekomenduojame įvesti abu partijos numerius, kad būtų galima stebėti, ar nekyla nenumatytų „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ problemų.
- **„Run note“ (procedūros pastaba, pasirenkama):** įveskite pastabą apie procedūros turinį ir tikslą.

## Tyrimo failų pridėjimas

Norėdami prie šulinėlio pridėti tyrimą, galite atlikti vieną iš šių veiksmų:

- Dešiniuoju pelės mygtuku spustelėkite šulinėlį ir iš kontekstinio meniu pasirinkite „Load Assay“ (įkelti tyrimą).
- Nuorodų meniu pasirinkite tyrimą, spustelėkite ir nuvilkite jį prie šulinėlio.

Šulinėlis nuspalvintas spalva, atitinkančia į šulinėlį įkeltą tyrimą.

## Mėginių ID ir pastabų įvedimas

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

Norėdami redaguoti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite langelį (bus pažymėtas dabartinis turinys) arba dukart jį spustelėkite.

## 2 protokolai: PGR naudojant su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ pateikiamus PGR reagentus

Šis protokolai skirtas aštuonių atskirų regionų PGR amplifikacijai žmogaus KRAS geno 3 ir 4 egzonuose ir žmogaus NRAS geno 2, 3 ir 4 egzonuose, naudojant „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“.

### Svarbi informacija prieš pradėdant

- „PyroMark PCR Master Mix“ esančiai „HotStarTaq®“ DNR polimerazei būtinas 15 minučių aktyvinimo 95 °C temperatūroje veikimas.
- Visus reakcijos mišinius nustatykite srityje, atskirtoje nuo tos, kurioje gryninama DNR, į PGR pridėdama matrica, atliekama PGR produkto analizė arba ruošiami mėginiai prieš „Pyrosequencing“ analizę.
- Kad būtų išvengta kryžminio užterštumo, naudokite vienkartinius antgalius su hidrofobiniais filtrais.

### Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su PGR pradmenimis, trumpai centrifuguokite, kad būtų surinktas turinys nuo mėgintuvėlių dugno.
- Jei reikia, nustatykite, kad kontrolinės ir mėginio DNR koncentracija būtų 0,4–2 ng/μl.

## Procedūra

1. Atšildykite visus reikalingus komponentus (4 lentelė).  
Prieš naudodami gerai išmaišykite.
2. Paruoškite kiekvieno PGR pradmens rinkinio reakcijos mišinį, kaip nurodyta 4 lentelė.  
Reakcijos mišinyje paprastai būna visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.  
Reakcijos mišinio paruoškite daugiau nei iš viso reikia visiems PGR tyrimams atlikti.

4 lentelė. Kiekvieno PGR pradmens mišinio reakcijos mišinio paruošimas

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 59/61 arba	
PCR Primer KRAS 117 arba	
PCR Primer KRAS 146 arba	
PCR Primer NRAS 12/13 arba	
PCR Primer NRAS 59 arba	1
PCR Primer NRAS 61 arba	
PCR Primer NRAS 117 arba	
PCR Primer NRAS 146	
Vanduo (H <sub>2</sub> O, pateikiamas)	4
<b>Bendras tūris</b>	<b>20</b>

3. Reakcijos mišinį gerai sumaišykite ir paskirstykite po 20 μl į kiekvieną PGR mėgintuvėlį.  
PGR mėgintuvėlių nereikia laikyti lede, nes „HotStarTaq“ DNR polimerazė kambario temperatūroje yra neaktyvi.
4. Į atskirus PGR mėgintuvėlius pridėkite 5 μl DNR matricos (2–10 ng genomines DNR) (5 lentelė) ir gerai sumaišykite.

**Pastaba.** Į kiekvieną bent vieno tyrimo PGR sąranką turi būti įtrauktas neigiamas kontrolinis mėginys (be DNR matricos).

**Pastaba.** Į kiekvieną „Pyrosequencing“ procedūros tyrimą įtraukite mėginį su nemetilinta kontroline DNR, kaip laukinio tipo kontroline medžiaga (žr. „Kontrolinės medžiagos“, 8 psl.).

#### 5 lentelė. PGR paruošimas

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
Reakcijos mišinys	20
Mėginio DNR	5
<b>Bendras tūris</b>	<b>25</b>

5. Užprogramuokite šiluminio ciklo prietaisą pagal gamintojo nurodymus naudodami 6 lentelė pateiktas sąlygas.

#### 6 lentelė. Optimizuotas ciklų protokolas

	Laikas	Temperatūra	Komentariai
<b>Pradinis aktyvinimo veiksmas:</b>	15 min.	95 °C	„HotStarTaq“ DNR polimerazė suaktyvinama atliekant šį kaitinimo veiksmą
<b>3 veiksmų ciklai:</b>			
Denatūracija	20 s	95 °C	
Prisijungimas	30 s	53 °C	
Išplėtimas	20 s	72 °C	
Ciklų skaičius	42	–	
<b>Galutinis išplėtimas:</b>	5 min.	72 °C	

6. Įdėkite PGR mėgintuvėlius į šiluminio ciklo prietaisą ir pradėkite ciklų programą.
7. Po amplifikacijos pereikite prie „
8. 3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas „Streptavidin Sepharose High Performance“ rutuliukuose“, 23 psl.  
PGR mėginius galima sandėliuoti 2–8 °C iki 3 dienų.

### 3 protokolai: PGR produktų imobilizavimas „Streptavidin Sepharose High Performance“ rutuliukuose

Šis protokolas skirtas DNR matricai imobilizuoti „Streptavidin Sepharose High Performance“ prieš analizuojant „PyroMark Q24“ sistema.

Prieš pradėdami atliekami veiksmai

- Prieš pradėdami palaukite, kol visi reikalingi reagentai ir tirpalai atšils iki kambario temperatūros (15–25 °C).
- Įjunkite „PyroMark Q24“ mažiausiai 30 minučių prieš procedūros pradžią. Maitinimo jungiklis yra instrumento galinėje dalyje.
- Padėkite vieną „PyroMark Q24 Plate“ laikiklį ant pašildyto kaitinimo bloko 80 °C. Palikite antrą „PyroMark Q24 Plate“ laikiklį kambario temperatūroje (15–25 °C).
- „PyroMark Wash Buffer“ pateikiamas kaip 10x koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą atskieskite, kad gautųsi 1x darbinis tirpalas, į 25 ml 10x „PyroMark Wash Buffer“ įpildami 225 ml labai išgryninto vandens (galutinis tūris – 250 ml).

**Pastaba.** 1x „PyroMark Wash Buffer“ darbinis tirpalas 2–8 °C temperatūroje yra stabilus iki nurodytos galiojimo pabaigos datos.

- Parenkite „PyroMark Q24 Vacuum Workstation“ mėginiui paruošti, kaip aprašyta „PyroMark Q24“ naudotojo vadove (*PyroMark Q24 User Manual*).

Procedūra

1. Atsargiai papurtykite buteliuką su „Streptavidin Sepharose High Performance“, kol tirpalas taps vientisas.
2. Paruoškite DNR imobilizavimo pagrindinio mišinio reakcijos mišinį, kaip nurodyta 7 lentelė.

Paruoškite didesnę tūrį, nei reikia bendram reakcijų skaičiui atlikti (reakcijų skaičius + vienas papildomas).

**7 lentelė. DNR imobilizavimo pagrindinis mišinys**

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
PyroMark Binding Buffer	40
Vanduo (H <sub>2</sub> O, pateikiamas)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
<b>Bendras tūris</b>	<b>70</b>

3. Pridėkite 70 μl pagrindinio mišinio į 24 šulinėlių PGR plokštelės šulinėlius, kaip iš anksto nustatyta procedūros sąrankoje (žr. „1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos procedūros sąranka“, 17 psl.).  
„Sepharose“ rutuliukai greitai nusėda. Užtikrinkite pagrindinio mišinio homogeniškumą, dažnai maišydami pipete arba naudodami impulsinę sūkurinę maišyklę.  
Necentrifuguokite pagrindinio mišinio.
4. Į kiekvieną šulinėlį, kuriame yra pagrindinio mišinio, pridėkite 10 μl biotiniujuoto PGR produkto iš 2 protokolo, kaip iš anksto nustatyta procedūros sąrankoje (žr. „2 protokolas: PGR naudojant su „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ pateikiamus PGR reagentus“, 20 psl.).  
Pridėjus pagrindinio mišinio ir PGR produkto bendras vieno šulinėlio tūris turi būti 80 μl.
5. Užsandarinkite PGR plokštelę lipnia folija.  
Užtikrinkite, kad tarp šulinėlių nebūtų nuotėkio.
6. Plakite PGR plokštelę kambario temperatūroje (15–25 °C) 5–10 minučių 1 400 apsis./min. greičiu.  
Šio veiksmo metu iš karto pereikite prie „4 protokolas: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema“, 25 psl.



---

## 4 protokolą: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema

Šis protokolą skirtas vienos gijos DNR paruošti ir sekoskaitos pradmenims prisijungti prie matricos prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema.

### Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su sekoskaitos pradmenimis, trumpai centrifuguokite, kad būtų surinktas turinys nuo mėgintuvėlių dugno.
- Atsižvelgdami į analizės regioną, pridėkite skirtingus sekoskaitos pradmenis pagal modelį, kuris plokštei iš anksto nustatytas procedūros sąrankoje (žr. „1 protokolą: „PyroMark Q24“ sistemos procedūros sąranka“, 17 psl.).
- Reguliariai tikrinkite filtravimo zondų veikimą, kaip aprašyta „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadove, ir, jei reikia, pakeiskite filtravimo zondus.

### Procedūra

1. Pakankamą kiekį kiekvieno sekoskaitos pradmens atskieskite „PyroMark Annealing Buffer“, kaip parodyta 8 lentelė.

Atskiesto sekoskaitos pradmens paruoškite daugiau, nei reikia bendro mėginių skaičiaus sekoskaitai atlikti (mėginių skaičius ir vienas papildomas).

Neatskieskite ir nesandėliuokite daugiau sekoskaitos pradmens, nei reikia.

**8 lentelė. Sekoskaitos pradmenų skiedimo pavyzdys**

<b>Komponentas</b>	<b>Tūris / mėginys (µl)</b>	<b>Tūris 9 +1 reakcijai (µl)</b>
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Seq Primer KRAS 59/61 <b>arba</b>		
Seq Primer KRAS 117 <b>arba</b>		
Seq Primer KRAS 146 <b>arba</b>		
Seq Primer NRAS 12/13 <b>arba</b>	0,8	8
Seq Primer NRAS 59 <b>arba</b>		
Seq Primer NRAS 61 <b>arba</b>		
Seq Primer NRAS 117 <b>arba</b>		
Seq Primer NRAS 146		
<b>Bendras tūris</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

2. Į kiekvieną „PyroMark Q24 Plate“ šulinėlį pridėkite 25 µl atskiesto sekoskaitos pradmens, kaip nurodyta procedūros sąrankoje (žr. „1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos procedūros sąranka“, 17 psl.).

Vieną „PyroMark Q24 Plate“ laikiklių (pateikiamą su „PyroMark Q24 Vacuum Workstation“) laikykite kambario temperatūroje (15–25 °C) ir naudokite kaip atramą ruošdami ir perkeldami plokštelę.

3. Įjunkite „PyroMark Q24 Vacuum Workstation“ vakuuminį siurblij.

4. PGR plokštelę iš 3 protokolo ir „PyroMark Q24 Plate“ padėkite ant vakuuminės darbo stoties (3 pav).

Patikrinkite PGR plokštelę ir įsitinkite, kad „Sepharose“ rutuliukai yra tirpale.

Įsitinkite, kad PGR plokštelės padėtis yra tokia pati, kaip įdedant mėginius.



3 pav. PGR plokštelės ir „PyroMark Q24 Plate“ dėjimas į vakuuminę darbo stotį.

5. Įjungę vakuumą, įrankyje sukurkite vakuumą.
6. Lėtai nuleiskite vakuomo įrankio filtravimo zondus į PGR plokštelę, kad būtų sukaupti rutuliukai su imobilizuota matrica. Laikykite zondus vietoje maždaug 15 sekundžių. Vakuuminį įrankį kelkite atsargiai.

**Pastaba.** „Sepharose“ rutuliukai greitai nusėda. Rutuliukų kaupimas turi vykti iš karto suplakus. Jei suplakus plokštelę praėjo daugiau nei 1 minutė, dar kartą plakite plokštelę 1 minutę ir tik tada kaupkite rutuliukus.

Patikrinkite PGR plokštelę, ar visi mėginiai buvo paimti vakuuminiu įrankiu.

7. Vakuuminį įrankį perkelkite į lovelį, kuriame yra 40 ml 70 % etanolio (**1 lovelis; 3 pav**). Filtravimo zondus skalaukite 5 sekundes.
8. Vakuuminį įrankį perkelkite į lovelį, kuriame yra 40 ml denatūracijos tirpalo (**2 lovelis; 3 pav**). Filtravimo zondus skalaukite 5 sekundes.
9. Įrankį perkelkite į lovelį, kuriame yra 50 ml „Wash Buffer“ (**3 lovelis; 3 pav**). Filtravimo zondus skalaukite 10 sekundžių.

10. 5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyr ir atgal, viršydami 90° vertikalių kampą, kad nuo filtravimo zondų nubėgtų skystis (4 pav).



4 pav. Vakuuminio įrankio, pakelto didesniu nei 90° vertikaliu kampu, iliustracija.

11. Kol vakuuminis įrankis laikomas virš „PyroMark Q24 Plate“, išjunkite vakuumą.

12. Nuleidę filtravimo zondus į atskiestą sekoskaitos pradmenį ir lengvai judindami vakuuminį įrankį į šonus, išleiskite rutuliukus į „PyroMark Q24 Plate“.

**Pastaba.** Būkite atsargūs, kad filtravimo zondais nesubraižytumėte „PyroMark Q24 Plate“ paviršiaus.

13. Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su labai išgrynintu vandeniu (**4 lovelis**; **3 pav**) ir 10 sekundžių skalaukite vakuuminį įrankį.

14. Filtravimo zondus nuplaukite panardinę juos į labai išgryninto vandens lovelį (**5 lovelis**; **3 pav**) ir naudokite vakuumą. Nuskalaukite zondus 70 ml labai išgryninto vandens.

15. 5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyr ir atgal, viršydami 90° vertikalių kampą, kad nuo filtravimo zondų nubėgtų skystis (4 pav).

16. Išjunkite vakuumą ir padėkite įrankį į laikymo (P) padėtį.

17. Išjunkite vakuumo siurbį.

**Pastaba.** Darbo dienos pabaigoje skysčių atliekas ir tirpalų likučius reikia išmesti ir patikrinti, ar „PyroMark Q24 Vacuum Workstation“ nėra dulkių ir išsiliejimų. Žr.

„B priedas: atliekų konteinerio ir lovelių ištuštinimas“, 66 psl.

18. „PyroMark Q24 Plate“ su mėginiais 2 min. pakaitinkite 80 °C temperatūroje naudodami pašildytą „PyroMark Q24 Plate“ laikiklį.

19. Išimkite „PyroMark Q24 Plate“ iš karšto plokštelės laikiklio ir padėkite ant antro „PyroMark Q24 Plate“ laikiklio, kuris buvo laikomas kambario temperatūroje (15–25 °C), kad mėginiai 10–15 min. auštų iki kambario temperatūros.

Iš karto pereikite prie „5 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimas“, 29 psl.

## 5 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimas

Šiame protokole aprašomas „PyroMark Gold Q24“ reagentų paruošimas ir įkėlimas į „PyroMark Q24 Cartridge“, procedūros „PyroMark Q24“ pradėjimas ir užbaigimas. Išsamų aprašą, kaip nustatyti procedūrą, rasite „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadove.

### Svarbi informacija prieš pradėdant

- Išankstinės procedūros informacijos ataskaitoje, kurią galima rasti meniu „Tools“ (įrankiai) procedūros sąrankos dalyje (žr. „1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos procedūros sąranka“, 17 psl.), pateikiama informacija apie nukleotidų, fermentų ir substrato buferinio tirpalo tūrį, reikalingą konkrečiai procedūrai atlikti.
- Įdėkite kasetę su vienkartiniais antgaliais (be hidrofobinių filtrų), norėdami užtikrinti tinkamą kasetės veikimą.

### Procedūra

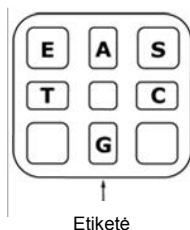
1. Atskirai ištirpinkite sausai užšaldytų fermentų mišinį ir substrato mišinį 620 µl vandens (H<sub>2</sub>O, pateikiama).
2. Sumaišykite, lengvai pasukinėdami buteliuką.

**Pastaba.** Nevartykite!

Norėdami įsitikinti, kad mišinys visiškai ištirpęs, palikite mišinį kambario temperatūroje (15–25 °C) 5–10 min. Įsitinkite, kad tirpalas nėra sudrumstas, prieš užpildydami „PyroMark Q24 Cartridge“. Jei reagentai nebus naudojami iš karto, laikykite juos sausame lede arba šaldytuve.

3. Palaukite, kol reagentai ir „PyroMark Q24 Cartridge“ atšils iki kambario temperatūros (20–25 °C).
4. „PyroMark Q24 Cartridge“ įdėkite taip, kad etiketė būtų nukreipta į jus.
5. Įkelkite į „PyroMark Q24 Cartridge“ atitinkamą nukleotidų, fermentų ir substrato mišinio tūrį, kaip nurodyta 5 pav.

Užtikrinkite, kad į kasetę iš pipetės nepatektų oro burbuliukų.



**5 pav. „PyroMark Q24 Cartridge“ iliustracija, vaizdas iš viršaus.** Komentarai atitinka reagentų buteliukų etiketes. Pridėkite fermentų mišinio (E), substrato mišinio (S) ir nukleotidų (A, T, C, G) pagal tūrio informaciją, pateiktą išankstinės procedūros informacijos ataskaitoje, kurią galima rasti meniu „Tools“ (rankiai) procedūros sąrankos dalyje.

6. Atidarykite kasetės sklendę ir įdėkite užpildytą reagentų kasetę, kad etiketė būtų nukreipta į išorę. Visiškai įstūmę kasetę, stumkite ją žemyn.
7. Įsitinkite, kad kasetės priekyje matyti linija, ir uždarykite sklendę.
8. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir padėkite plokštelę ant kaitinimo bloko.
9. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.
10. Įterpkite USB atmintinę (su procedūros failu) į instrumento priekyje esančią USB jungtį. Neištraukite USB atmintinės, kol nesibaigs procedūra.

11. Pagrindiniame meniu pasirinkite „Run“ (procedūra) (naudodami ▲ ir ▼ ekrano mygtukus) ir paspauskite „OK“ (gerai).
12. Naudodami ▲ ir ▼ ekrano mygtukus pasirinkite procedūros failą.  
Norėdami peržiūrėti aplanko turinį, pasirinkite aplanką ir paspauskite „Select“ (pasirinkti). Norėdami grįžti į ankstesnį rodinį, paspauskite „Back“ (atgal).
13. Pasirinkę procedūros failą, paspauskite „Select“ (pasirinkti), kad būtų pradėtas tyrimas.
14. Kai procedūra bus baigta ir instrumentas patvirtins, kad procedūros failas išsaugotas USB atmintinėje, paspauskite „Close“ (uždaryti).
15. Ištraukite USB atmintinę.
16. Atidarykite instrumento dangtį.
17. Atidarykite kasetės sklendę ir keldami į viršų reagentų kasetę ją ištraukite.
18. Uždarykite sklendę.
19. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir išimkite plokštelę iš kaitinimo bloko.
20. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.
21. Išmeskite plokštelę ir išvalykite kasetę, kaip nurodyta su kasete pateikiamoje produkto instrukcijoje.
22. Išanalizuokite procedūrą, kaip nurodyta „6 protokolais: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė“, 31 psl.

## 6 protokolais: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė

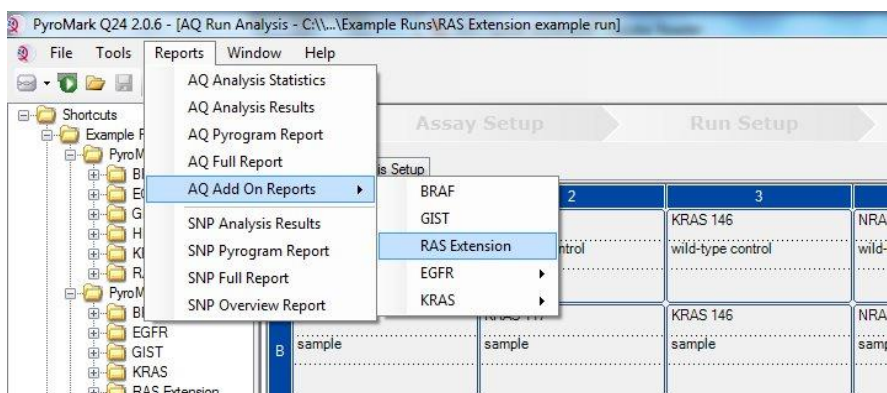
Šiame protokole aprašoma užbaigtos „*therascreen* RAS Extension Pyro“ procedūros mutacijų analizė naudojant „PyroMark Q24 Software“.

### Procedūra

1. Įstatykite USB atmintinę su apdorotu procedūros failu į kompiuterio USB jungtį.
2. Naudodami „Windows Explorer“ perkeltkite procedūros failą iš USB atmintinės į norimą vietą kompiuteryje.

3. Meniu „File“ (failas) pasirinkę „Open“ (atidaryti) arba dukart spustelėję failą (🔍) nuorodų naršyklėje, atidarykite procedūros failą „PyroMark Q24 Software“ AQ režimu.
4. Naudodami „RAS Extension Plug-In Report“ priedo ataskaitai kurti, meniu pasirinkite „Reports“ (ataskaitos) ir „AQ Add On Reports/RAS Extension“ (AQ priedo ataskaitos / RAS išplėtimas) (6 pav).

**Pastaba.** KRAS 61 kodono mutacijas reikia papildomai analizuoti KRAS priedu meniu pasirenkant „Reports“ (ataskaitos), tada pasirenkant „AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61“ (AQ priedo ataskaitos / KRAS / 61 kodonas) .



6 pav. Meniu „RAS Extension Plug-In Report“.

Automatiškai analizuojami visų mutacijų, kurių LOD nurodyta 9 lentelė, 38 psl., šulinėliai. Rezultatai bus pateikti apžvalginėje lentelėje (7 pav), po kuria pateikiami išsamūs „Pyrogram“ kreivių ir analizės kokybės rezultatai.



## Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	NTC	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. „RAS Extension Plug-In Report“.

#### 5. Jei naudojama AQ analizė:

**Norėdami analizuoti procedūrą ir gauti rezultatų apžvalgą, spustelėkite vieną iš mygtukų „Analyze“ (analizuoti).**



Analizuoti visus šulinėlius.

Analizuoti pasirinktą šulinėlį.

Analizės rezultatai (alelių dažniai) ir kokybės vertinimas rodomas virš kintamojo padėties „Pyrogram“ kreivėje. Daugiau informacijos, kaip analizuoti procedūrą, rasite „PyroMark Q24“ naudotojo vadove.

**Norėdami sugeneruoti ataskaitą, meniu „Reports“ (ataskaitos) pasirinkite „AQ Full Report“ (išsami AQ ataskaita) arba „AQ Analysis Results“ (AQ analizės rezultatai).**

**Pastaba.** Kad būtų gauti patikimi rezultatai, rekomenduojame naudoti atskiras viršūnes virš 30 RLU. Tyrimo sąrankoje nustatykite 30 RLU kaip „required peak height for passed quality“ (viršūnės aukščio riba – būtinas viršūnės aukštis, kad būtų tinkama kokybė) ir įsitikinkite, kad A viršūnės mažinimo koeficientas NRAS 61 kodono analizei nustatytas kaip 0,86 (žr. „A priedas: „*therascreen* RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas“, 60 psl., ir „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadovą).

Ataskaita „AQ Analysis Results“ (AQ analizės rezultatai) turi būti naudojama alelių kiekybiniam vertinimui dokumentuoti ir aiškinti. „Pyrogram“ kreivėje pateikti skaičiai yra suapvalinti ir nerodo tikslaus kiekybinio vertinimo.

**Pastaba.** „Pyrogram“ kreivė visada turi būti lyginama su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Išmatuotos viršūnės turi atitikti histogramos stulpelių aukštį. Taip pat žr. „Rezultatų aiškinimas“, 35 psl.

**Mėginių, kuriuose neaptikta mutacijų naudojant standartinę „Sequence to analyze“ (analizuotiną seką) ar gautas kokybinio vertinimo rezultatas „Check“ (patikrinkite) arba „Failed“ (nepavyko), pakartotinė analizė.**

Standartinė „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka), kaip apibrėžta „Analysis Setup“ (analizės sąrankoje) apima dažniausias taškų mutacijas „*therascreen* RAS Extension Pyro“ tyrimuose.

Primygtinai rekomenduojame rankiniu būdu pakartotinai išanalizuoti visus mėginius, kuriuose neaptikta mutacijų naudojant standartinę „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką) ar gautas kokybinio vertinimo rezultatas „Check“ (patikrinkite) arba „Failed“ (nepavyko). Kokybės įvertinimai „Check“ (patikrinkite) ir „Failed“ (nepavyko) gali reikšti mutaciją, kurios neapima standartinė „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka), todėl gaunamos nenumatytos nuorodinės viršūnės.

Norėdami pakartotinai išanalizuoti ir aptikti kitas mutacijas, eikite į „Analysis Setup“ (analizės sąranką) ir parinktyje „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka) pasirinkite A priede 16 lentelė ir 17 lentelė aprašytus variantus arba kitų retų ar nenumatytų mutacijų variantus. Spustelėkite „Apply“ (taikyti), tada pasirodžius langui „Apply Analysis Setup“ (taikyti analizės sąranką) spustelėkite „To All“ (visiems).

Atnaujintus žmogaus KRAS ir NRAS genų mutacijų dažnius internete pateikia Sangerio institutas [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Pastaba.** Pakeitę „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka), įsitinkite, kad atskiros viršūnės aukščio riba nustatyta ties 30 RLU ir įsitinkite, kad A viršūnės mažinimo koeficientas NRAS 61 kodono analizei nustatytas kaip 0,86 (žr. „A priedas: „*therascreen* RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas“, 60 psl.).

**Pastaba.** Regione, kurio sekoskaita atlikta, gali būti papildomų retų arba netikėtų mutacijų ir jas galima analizuoti naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka), atsižvelgiant į netikėtas mutacijas.

**Pastaba.** Jei išmatuotos viršūnės neatitinka histogramos stulpelių aukščio ir to negalima paaiškinti retomis ar nenumatytomis mutacijomis, rezultatu negalima remtis vertinant mutacijos būseną. Rekomenduojama pakartotinai ištirti mėginį.

## Rezultatų aiškinimas

### Analizės rezultatų aiškinimas ir žemo lygio mutacijų aptikimas

Į kiekvieną „Pyrosequencing“ procedūros tyrimą įtraukite kontrolinės DNR mėginį. Tai būtina norint tinkamai aiškinti rezultatus ir nustatyti žemo lygio mutacijas, taip pat fono lygių kontrolei. Išmatuotas kontrolinių mėginio dažnis turi būti mažesnis arba lygus tuštumo ribai (limit of blank, LOB). Vadove nurodytos LOB (tuštumo ribos) ir LOD (aptikimo ribos) reikšmės gali būti naudojamos nustatant mutacijos buvimą. Šias reikšmes galima gauti naudojant plazmidžių mišinius su laukinio tipo arba susijusia mutavusia seka.

Po analizės su „PyroMark Q24 Software“ arba „Plug-In Reports“, galimi trys rezultatai. LOD duomenų ieškokite 9 lentelė.

- Mutacijos dažnis < LOD: Mutacijų neaptikta
- Mutacijos dažnis > LOD + 3 % vienetų: mutacija
- Mutacijos dažnis  $\geq$  LOD ir  $\leq$  LOD + 3 % vienetų: galimai žemo lygio mutacija

**Pastaba.** Jei toks rezultatas gaunamas naudojant „RAS Extension Plug-In Report“ (žr. „6 protokolais: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė“ 5 veiksma, 31 psl.), rodomas įspėjimas.

Diapazonas nuo LOD iki LOD + 3 % vienetų užtikrina jautrumą aptinkant žemo lygio mutacijas optimaliomis sąlygomis. Jei nemetilintame kontroliniame mėginyje išmatuotas dažnis viršija LOB, tai rodo didesnę nei įprastai foninį lygį atitinkamoje procedūroje, kuris gali turėti įtakos alelių kiekybiniam vertinimui, ypač esant žemo lygio mutacijoms. Todėl rezultatai su perspėjimu „Potential low level mutation“ (galimai žemo lygio mutacija) turi būti vertinami atidžiai.

Mėginiai, kuriuose nustatoma galima žemo lygio mutacija, turi būti laikomi turinčiais mutaciją tik jei tai patvirtinama pakartotinai ištyrus kartu su nemetilinta kontroline DNR. Abiejų kopijų rezultatas turėtų rodyti tą pačią mutaciją su reikšmėmis  $\geq$  LOD, o kontrolinis mėginys turi rodyti „No mutation detected“ (mutacija neaptikta). Kitaip mėginys turi būti vertinamas kaip „No mutation detected“ (mutacija neaptikta).

Padidėjusį mutacijos foną galima aptikti lyginant vadove nurodytas LOB reikšmes su matavimu, gautu su nemetilinta kontroline DNR. Mėginiai su galimai žemo lygio mutacija gali būti vertinami kaip „Mutation not detected“ (mutacija neaptikta) be pakartojimo, jei nemetilintos kontrolinės DNR išmatuotas dažnis viršija susijusios mutacijos LOB reikšmę, nurodytą vadove. Todėl galimų žemo lygio mutacijų atveju galimi trys skirtingi scenarijai.

1. Matavimo dažnis su nemetilinta kontroline medžiaga DNR >LOB šiai mutacijai: Mėginį galima vertinti kaip „Mutation not detected“ (mutacija neaptikta) be pakartojimo.
2. Kopijoje nepakartotas toks pat rezultatas: vertinti mėginį kaip „Mutation not detected“ (mutacija neaptikta).
3. Toks pat rezultatas pakartotas su kopija ir nemetilinta kontroline DNR <LOB susijusiai mutacijai: mutacija aptikta.

**Pastaba.** „Pyrogram“ kreivė visada turi būti lyginama su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Išmatuotos viršūnės turi atitikti histogramos stulpelių aukštį. Reikia patikrinti, ar „Pyrogram“ kreivėje nėra nenumatytų viršūnių. Jei išmatuotos viršūnės neatitinka histogramos stulpelių aukščio ir to negalima paaiškinti retomis arba netikėtomis mutacijomis, rekomenduojama pakartotinai iširti mėginį. Mutacijų būsenos negalima vertinti remiantis nesėkmingu rezultatu. Tinkamos mutacijos atveju, viršūnės aukščio pokytis visada susijęs su atitinkamu kitos viršūnės pokyčiu. Atskiros viršūnės aukščio pokytis negali būti vertinamas kaip mutacijos požymis.

**Pastaba.** Aiškinant rezultatus rekomenduojama naudoti „RAS Extension Plug-in Report“. Norint nuodugniau iširti mėginius, kuriuose gali būti žemo lygio mutacija, rekomenduojame papildomai išanalizuoti mėginį rankiniu būdu, naudojant programinę įrangą (pvz., mutacijų dažniui kontroliniame mėginyje palyginti).

**Pastaba.** Vėžiu sergančių pacientų gydymas negali būti paremtas vien tik KRAS ir NRAS mutacijų būsenomis.

9 lentelė. Nustatytos konkrečių mutacijų LOB ir LOD

Nukleorūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	LOB (% vienetai)	LOD (% vienetai)	COSMIC ID* (V70)
<b>KRAS 59 kodonas (GCA)</b>				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
176C>G	A59G	0,5	3,5	28518
<b>KRAS 61 kodonas (CAA)</b>				
183A>C	Q61H	0,8	2,8	554
182A>T	Q61L	1,2	3,1	553
182A>G	Q61R	1,6	3,5	552
183A>T	Q61H	0,7	2,6	555
181C>G	Q61E	1,2	3,1	550
<b>KRAS 117 kodonas (AAA)</b>				
351A>C	K117N	1,0	4,0	19940
351A>T	K117N	3,6	7,1	28519
<b>KRAS 146 kodonas (GCA)</b>				
436G>A	A146T	2,7	6,6	19404
436G>C	A146P	1,8	4,8	19905
437C>T	A146V	2,1	5,1	19900
<b>NRAS 12 kodonas (GGT)</b>				
34G>A	G12S	1,4	3,4	563
34G>T	G12C	0,6	2,5	562
34G>C	G12R	0,4	2,4	561
35G>A	G12D	1,8	3,8	564
35G>T	G12V	3,8	8,8	566
35G>C	G12A	0,5	2,5	565
<b>NRAS 13 kodonas (GGT)</b>				
37G>A	G13S	1,2	3,2	571
37G>T	G13C	1,2	3,2 (4) <sup>†</sup>	570
37G>C	G13R	0,3	2,3	569
38G>A	G13D	0,8	2,8	573
38G>T	G13V	0,0	2 (5) <sup>†</sup>	574
38G>C	G13A	0,8	2,8	575
<b>NRAS 59 kodonas (GCT)</b>				
175G>A	A59T	3,8	6,9	578

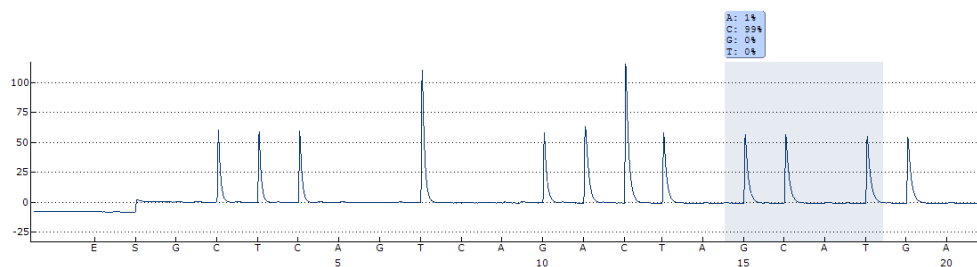
Nukleorūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	LOB (% vienetai)	LOD (% vienetai)	COSMIC ID* (V70)
176C>G	A59G	0,0	3,0	–
<b>NRAS 61 kodonas (CAA)</b>				
181C>A	Q61K	4,1	6,7	580
182A>G	Q61R	0,8	2,2	584
182A>T	Q61L	0,7	2,1	583
183A>T	Q61H	0,4	1,8	585
183A>C	Q61H	5,4	8,0	586
183A>G	Q61Q	2,1	5,8	587
<b>NRAS 117 kodonas (AAG)</b>				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
<b>NRAS 146 kodonas (GCC)</b>				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

\* Iš „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo), kurį galima rasti Sangerio instituto svetainėje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

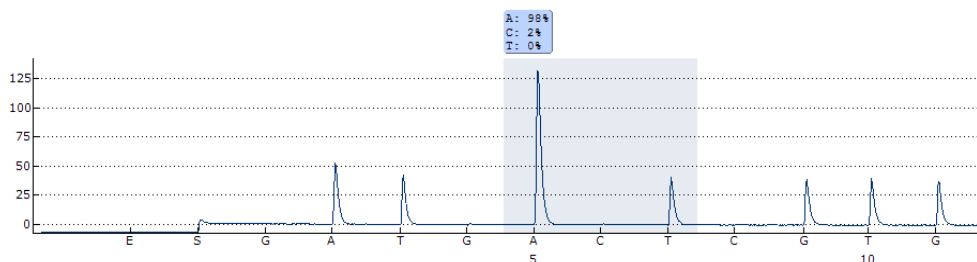
† Žemiausias mutacijos lygis mėginio rezultatuose, kai matuojamas dažnis  $\geq$ LOD.

## Tipiniai rezultatai

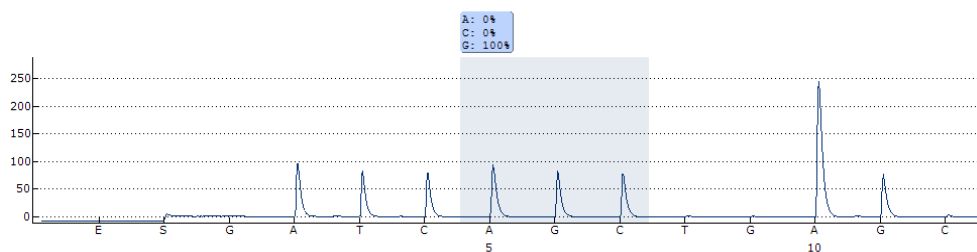
Tipiniai „Pyrogram“ rezultatai pateikiami 8 – 15 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu NRAS 117 tyrimu.



8 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu KRAS 59/61 tyrimu.

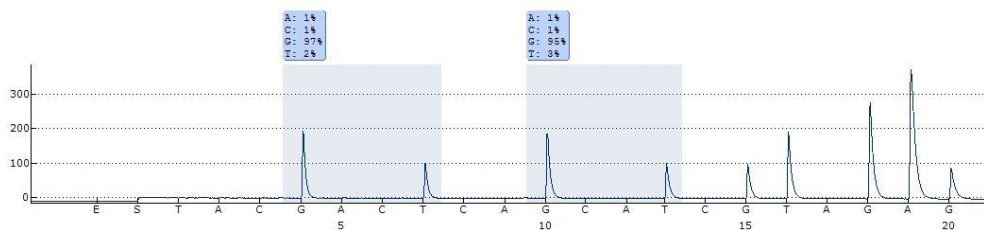


9 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu KRAS 117 tyrimu.

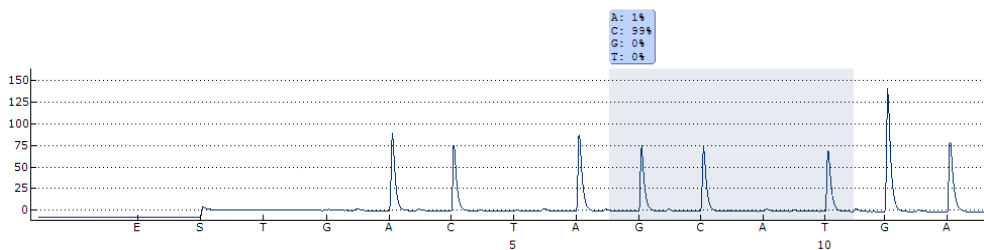


10 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu KRAS 146 tyrimu.

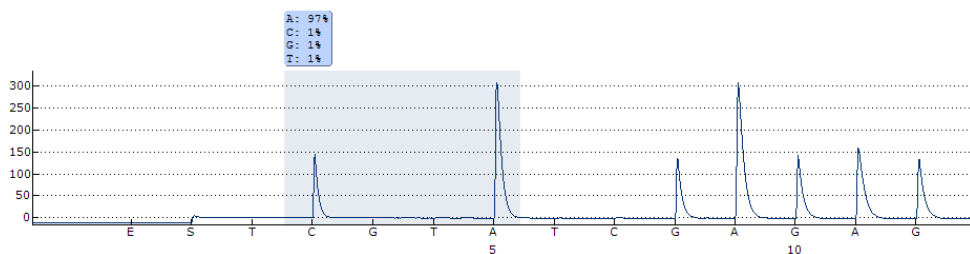




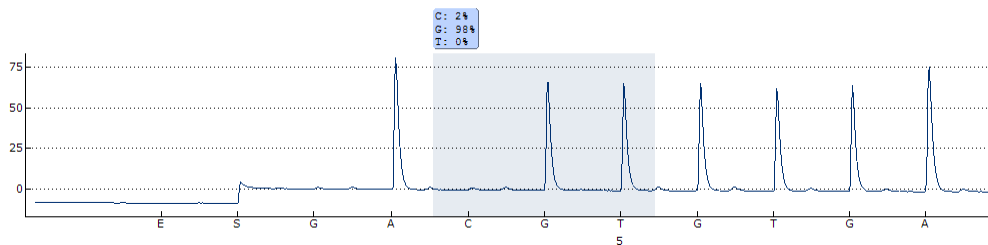
11 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu NRAS 12/13 tyrimu.



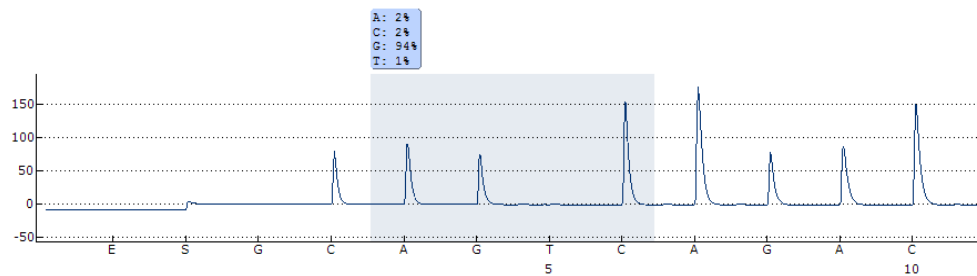
12 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu NRAS 59 tyrimu.



13 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu NRAS 61 tyrimu.



14 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu NRAS 117 tyrimu.



15 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu NRAS 146 tyrimu.

# Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus apie šiame vadove ir protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją žr. galiniame viršelyje arba apsilankykite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Pastabos ir pasiūlymai

### Rezultatas „Check“ (patikrinkite) arba „Failed“ (nepavyko)

- |  |  |
|--|--|
| a) Mažas viršūnės aukštis  | <p>Mažos viršūnės gali būti dėl PGR nustatymo klaidų apdorojimo arba mėginių ruošimo prieš „Pyrosequencing“.</p> <p>Svarbu, kad vakuominiu įrankiu mėginiai būtų visiškai surinkti. Vakuuminį įrankį stenkitės lėtai nuleisti į mėginius ir pasirūpinkite, kad imobilizavimo PGR plokštelės ar juostelių geometrinė forma leistų visiškai surinkti mėginius.</p> <p>Reguliariai tikrinkite filtravimo zondų veikimą, kaip aprašyta „<i>PyroMark Q24</i>“ naudotojo vadove, ir pakeiskite filtravimo zondus, kai nurodoma.</p> <p>Jei yra įspėjimas „Check“ (patikrinkite), atidžiai palyginkite „Pyrogram“ kreivę su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Jei išmatuotos viršūnės atitinka histogramos stulpelių aukštį, rezultatas yra tinkamas. Kitu atveju rekomenduojame pakartotinai iširti mėginį.</p> |
| b) Mutacija neapibrėžta parinktyje „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka) | <p>Pakoreguokite „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką) tyrimo sąrankoje (žr. „A priedas: „<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas“, 60 psl.) ir iš naujo atlikite procedūrą. Mutacijas, kurių neapima „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka), galima aptikti modelio simuliacijoje įrankiu.</p>  |
| c) Nenumatyta mutacija   | <p>Kokybės vertinimo rezultatus „Check“ (patikrinkite) arba „Failed“ (nepavyko) gali sukelti nenumatytas viršūnių modelis. Tai gali rodyti nenumatytą mutaciją, neišanalizuotą pagal pateiktą „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką). Šiuos mėginius reikia išanalizuoti naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką), atsižvelgiant į nenumatytas mutacijas. Mutacijas, kurių neapima „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka), galima aptikti modelio simuliacijoje įrankiu.</p>   |
| d) Didelio viršūnės aukščio nuokrypio įspėjimas dėl paskirstymo              | <p>„Pyrogram“ kreivė turi būti atidžiai palyginta su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Jei išmatuotos viršūnės neatitinka histogramos stulpelių aukščio ir to negalima paaiškinti retomis mutacijomis, rekomenduojame pakartotinai iširti mėginį.</p>   |

## Pastabos ir pasiūlymai

---

### Didelis fonas

- |   |  |
|---|--|
| a) Netinkamai laikomi nukleotidai                                 | Nukleotidus laikykite 2–8 °C temperatūroje. Laikant nuo –15 iki –25 °C gali padidėti fonas.                                      |
| b) Trumpas mėginių aušinimo laikas prieš „Pyrosequencing“ analizę | Mėginius „PyroMark Q24 Plate“ laikiklyje 10–15 minučių laikykite kambario temperatūroje. Netrumpinkite aušinimo laiko.           |
| c) Užteršta kasetė  | Kruopščiai išvalykite kasetę, kaip aprašyta produkto instrukcijoje. Kasetę laikykite vietoje, apsaugotoje nuo šviesos ir dulkių. |

### Nėra teigiamos kontrolinės medžiagos (nemetilintos kontrolinės DNR) signalų

- |  |   |
|--|---|
| a) Fermentų ir substrato mišinio nepakanka visiems šulinėliams | Įsitikinkite, kad „PyroMark Q24“ kasetė pripildyta, kaip nurodyta meniu „Tools“ (įrankiai) dalyje „Pre Run Information“ (išankstinės procedūros informacija). |
| b) Reagentai laikomi arba atskiesti netinkamai                 | Reagentus paruoškite, kaip nurodyta instrukcijose, pateiktose „Reagentų laikymas ir naudojimas“ 14 psl. ir „5 protokolais: „PyroMark Q24“ tyrimas“ 29 psl.    |
| c) PGR ar mėginių paruošimo klaida                             | Kruopščiai išvalykite kasetę, kaip aprašyta produkto instrukcijoje. Kasetę laikykite vietoje, apsaugotoje nuo šviesos ir dulkių.                              |

---

# Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

## Apribojimai

Testas skirtas 37 mutacijoms KRAS arba NRAS genuose aptikti. Mėginiuose, kurių pateiktas rezultatas buvo „No Mutation Detected“ (mutacijų neaptikta), gali būti KRAS arba NRAS mutacijų, kurių tyrimas neaptinka.

Mutacijų aptikimas priklauso nuo mėginio vientisumo ir mėginyje esančio amplifikuotinos DNR kiekio.

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ naudojamas procedūrai, kuriai naudojama polimerazės grandinės reakcija (PGR). Kaip ir atliekant visas PGR procedūras, mėginiai gali būti užteršti išoriniais DNR šaltiniais tyrimo aplinkoje arba teigiamos kontrolinės medžiagos DNR. Būkite atsargūs, kad neužterštumėte mėginių ir reakcijų mišinių reagentų.

Visi sugeneruoti diagnostikos rezultatai turi būti aiškinami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

Naudotojas atsako už sistemos efektyvumo tikrinimą, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima QIAGEN efektyvumo tyrimai.

---

# Efektyvumo charakteristikos

## Tuštumo riba ir aptikimo riba

Mutacijų tuštumo riba (LOB) ir aptikimo riba (limit of detection, LOD) buvo nustatyta naudojant plazmidžių mišinius (10 lentelė). LOB ir LOD buvo nustatytos pagal rekomendacijas, pateiktas Klinikinių ir laboratorijos standartų instituto (CLSI) dokumente EP17 A2 „Aptikimo ribų nustatymo ir kiekybinio įvertinimo ribų protokolas; patvirtinta rekomendacija“.  $\alpha$  ir  $\beta$  klaidos (atitinkamai klaidingai neigiama ir klaidingai teigiama) buvo nustatytos kaip 5 %. LOB reikšmės nurodo išmatuotą dažnį, gauta naudojant laukinio tipo mėginį. LOD reikšmės nurodo silpniausią signalą (išmatuotą dažnį), kurį galima laikyti teigiamu vertinant atitinkamą mutaciją.

10 lentelė. Nustatytos konkrečių mutacijų LOB ir LOD

Nukleorūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	LOB (% vienetai)	LOD (% vienetai)	COSMIC ID* (V70)
<b>KRAS 59 kodonas (GCA)</b>				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
176C>G	A59G	0,5	3,5	28518
<b>KRAS 61 kodonas (CAA)</b>				
183A>C	Q61H	0,8	2,8	554
182A>T	Q61L	1,2	3,1	553
182A>G	Q61R	1,6	3,5	552
183A>T	Q61H	0,7	2,6	555
181C>G	Q61E	1,2	3,1	550
<b>KRAS 117 kodonas (AAA)</b>				
351A>C	K117N	1,0	4,0	19940
351A>T	K117N	3,6	7,1	28519
<b>KRAS 146 kodonas (GCA)</b>				
436G>A	A146T	2,7	6,6	19404
436G>C	A146P	1,8	4,8	19905
437C>T	A146V	2,1	5,1	19900
<b>NRAS 12 kodonas (GGT)</b>				
34G>A	G12S	1,4	3,4	563
34G>T	G12C	0,6	2,5	562
34G>C	G12R	0,4	2,4	561
35G>A	G12D	1,8	3,8	564
35G>T	G12V	3,8	8,8	566
35G>C	G12A	0,5	2,5	565
<b>NRAS 13 kodonas (GGT)</b>				
37G>A	G13S	1,2	3,2	571
37G>T	G13C	1,2	3,2 (4) <sup>†</sup>	570
37G>C	G13R	0,3	2,3	569
38G>A	G13D	0,8	2,8	573
38G>T	G13V	0,0	2 (5) <sup>†</sup>	574
38G>C	G13A	0,8	2,8	575
<b>NRAS 59 kodonas (GCT)</b>				
175G>A	A59T	3,8	6,9	578

Nukleorūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	LOB (% vienetai)	LOD (% vienetai)	COSMIC ID* (V70)
176C>G	A59G	0,0	3,0	–
<b>NRAS 61 kodonas (CAA)</b>				
181C>A	Q61K	4,1	6,7	580
182A>G	Q61R	0,8	2,2	584
182A>T	Q61L	0,7	2,1	583
183A>T	Q61H	0,4	1,8	585
183A>C	Q61H	5,4	8,0	586
183A>G	Q61Q	2,1	5,8	587
<b>NRAS 117 kodonas (AAG)</b>				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
<b>NRAS 146 kodonas (GCC)</b>				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

\* Iš „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo), kurį galima rasti Sangerio instituto svetainėje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

† Žemiausias mutacijos lygis mėginio rezultatuose, kai matuojamas dažnis  $\geq$ LOD.

## Mutacijos GGT >TGT ir GGT > GTT NRAS 13 kodone

Šių mutacijų atveju, tuštieji matavimai dažniausiai buvo 0 procentinių vienetų, todėl skirstinys nebuvo Gauso. Todėl LOD buvo nustatyta naudojant kitą metodą, atsižvelgiant į CLSI gairėje EP17-A pateiktas rekomendacijas. Silpniausias signalas, nurodantis mutacijos buvimą, (LOD) šiose vietose buvo nustatytas kaip 2 procentinių vienetų virš atitinkamos pradinio taško lygio, kaip apibrėžia 95-as tuščiojo matavimo procentilis. Analizuojant mėginį su 9 lentelėje lauztiniuose skliaustuose nurodytu mutacijos lygiu, 95 % rezultatų (n = 72) pateikė signalą, kurį galima laikyti teigiamu ( $\geq$ LOD). LOB / LOD ieškokite 10 lentelė.



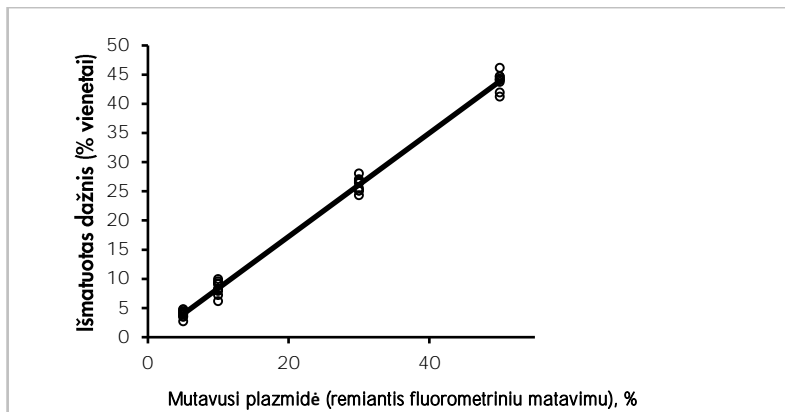
**Pastaba.** PGR ir „Pyrosequencing“ pradmenys NRAS 12, 13 ir 61 kodonams be pakeitimų paimami iš „*therascreen* NRAS Pyro Kit“ (kat. nr. 971530). Šių NRAS kodonų efektyvumo duomenys nepakinta.

## Tiesiškumas

Tiesiškumas buvo nustatytas naudojant plazmidžių mišinius su laukinio tipo arba mutacijos 176C>G KRAS 59 kodone, 351A>T KRAS 117 kodone, 436G>C KRAS 146 kodone, 34G>A NRAS 12 kodone, 37G>A NRAS 13 kodone, 175G>A NRAS 59 kodone, 182A>G NRAS 61 kodone, 351G>C NRAS 117 kodone ir 437C>T NRAS 146 kodone mutavusią seką. Plazmidės buvo sumaišytos tokiomis proporcijomis, kad būtų gauti keturi mutacijų lygiai (5, 10, 30 ir 50 %). Kiekvienas mišinys išanalizuotas naudojant tris skirtingas „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ partijas atlikus „Pyrosequencing“ procedūras ir po 3 kiekvienos jų pakartojimus.

Rezultatai (kiekvieno mutacijos lygio n = 9) išanalizuoti atsižvelgiant į CLSI rekomendaciją EP6-A2 „Kiekybinio matavimo procedūrų tiesiškumo įvertinimas: statistinis požiūris; patvirtinta rekomendacija“ naudojant „Analyse-it® Software“ versiją v2.21. Šie rezultatai pateikti 16 pav.

Tirtame 5–50 % intervale mutacijų lygių rezultatai buvo tiesiniai su leidžiamu 5 % vienetų netiesiškumu. Panašūs rezultatai buvo gauti su visomis apimamomis mutacijomis KRAS 59, 117, 146 kodonuose ir NRAS 12, 13, 59, 61, 117 ir 146 kodonuose.



16 pav. Mutacijos 176C>G KRAS 59 kodone tiesiškumas.

Panašūs rezultatai buvo gauti su visomis apimamomis mutacijomis KRAS 59, 117, 146 kodonuose ir NRAS 12, 13, 59, 61, 117 ir 146 kodonuose.

## Tikslumas

Naudojant tikslumo duomenis galima nustatyti bendrą tyrimų kintamumą. Šie duomenys gauti trimis skirtingai lygiais analizuojant anksčiau minėtus plazmidžių mišinius ir po tris jų pakartojimus.

Pakartojamumas (tyrimo viduje ir tarp įvairių partijų) apskaičiuotas remiantis tiesiškumo nustatymo duomenimis (vieną dieną buvo atliktos trys procedūros naudojant įvairias „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ partijas). Vidutinis tikslumas (kintamumas vienoje laboratorijoje) buvo nustatytas atlikus tris procedūras vienoje laboratorijoje per tris skirtingas dienas. Procedūras atliko skirtingi operatoriai, naudojantys „PyroMark Q24“ instrumentus, taip pat daug „*therascreen* RAS Extension Pyro Kits“. Atkuriamumas (kintamumas tarp laboratorijų) buvo apskaičiuotas atlikus dvi procedūras dvi nepriklausomose laboratorijose ir naudojant įvairias „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ partijas.

Tikslumo apskaičiavimas išreikštas kaip išmatuotų mutacijų dažnio standartinis nuokrypis % vienetais (11 lentelė).

11 lentelė. Mutacijų tikslumas\*

% mutavusi plazmidė†	Pakartojamumas		Vidutinis tikslumas		Atkuriamumas	
	Vidurkis	SD	Vidurkis	SD	Vidurkis	SD
<b>176C&gt;G KRAS 59 kodone</b>						
5	4,0	0,7	3,8	0,6	4,2	1,1
10	8,4	1,2	8,5	1,0	8,4	1,4
30	26,1	1,2	26,3	1,1	26,8	1,2
50	43,9	1,5	44,0	0,7	43,7	1,3
<b>351A&gt;T KRAS 117 kodone</b>						
5	5,5	1,6	5,5	2,2	7,1	2,0
10	11,0	1,7	10,8	1,4	12,5	2,9
30	30,6	1,7	30,6	2,0	31,9	2,7
50	52,8	2,0	53,5	1,3	54,5	1,6
<b>436G&gt;C KRAS 146 kodone</b>						
5	4,2	0,6	4,1	0,5	3,7	1,2
10	9,6	0,9	9,1	0,9	8,6	1,3
30	29,0	0,9	28,8	1,0	28,1	1,1
50	47,5	1,5	46,8	0,7	45,6	1,9
<b>34G&gt;A NRAS 12 kodone†</b>						
5	7,5	1,2	7,3	1,0	6,7	1,3
10	14,6	1,3	13,5	1,1	13,7	1,3
30	37,8	1,9	37,9	1,5	36,1	2,9
50	59,8	1,7	60,4	2,0	57,5	3,1
<b>175G&gt;A NRAS 59 kodone</b>						
5	7,8	0,9	7,3	0,5	7,1	1,3
10	11,9	1,0	11,6	2,0	12,5	1,7
30	29,5	1,1	29,6	1,2	29,9	1,9
50	49,0	1,1	48,3	1,3	48,9	1,4
<b>182A&gt;G NRAS 61 kodone</b>						
5	6,4	0,9	6,8	0,7	7,2	1,0

% mutavusi plazmidė†	Pakartojamumas		Vidutinis tikslumas		Atkuriamumas	
	Vidurkis	SD	Vidurkis	SD	Vidurkis	SD
10	11,7	0,9	11,8	1,1	11,8	1,0
30	34,1	1,3	34,6	1,7	33,8	2,5
50	53,1	1,5	53,3	1,8	53,1	2,0
<b>351G&gt;C NRAS 117 kodone</b>						
5	4,9	0,2	5,0	0,3	4,5	0,8
10	9,4	0,4	10,3	1,5	9,4	0,5
30	28,7	0,9	28,8	0,7	28,3	1,3
50	48,5	0,4	48,8	0,6	48,8	0,6
<b>437C&gt;T NRAS 146 kodone</b>						
5	4,4	0,7	4,6	0,5	4,1	0,9
10	8,8	0,9	8,7	0,8	9,1	0,8
30	28,4	1,1	27,9	0,6	28,4	0,8
50	47,9	1,1	48,1	1,4	48,0	1,1

\* Visos reikšmės pateiktos % vienetais. SD: standartinis nuokrypis (pakartojamumo ir vidutinio tikslumo n = 9, atkuriamumo n = 12).

† Remiantis fluorimetriniu matavimu 34G>A NRAS 12 kodone, remiantis OD<sub>260</sub>.

## Diagnostinis įvertinimas

„*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ buvo įvertintas lyginant su Sangerio sekoskaita dviejuose atskiruose tyrimuose.

Pirmasis tyrimas buvo atliktas anksčiau, norint įvertinti „*therascreen* NRAS Pyro“ rinkinį, lyginant su Sangerio sekoskaita. DNR buvo išgauta iš 100 formalinu fiksuotų parafine esančių (FFPE) auglio mėginių iš kaulų čiulpų ir išanalizuota dėl mutacijų 12/13 kodonuose ir 61 kodone.

NRAS 12/13 ir 61 kodonus „*therascreen* NRAS Pyro kit“ apimantys tyrimai įeina į „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ be pakeitimų, parodyti rezultatai yra iš „*therascreen* NRAS Pyro Kit“ vertinimo.

Antrajame tyrime DNR buvo išgauta iš 110 formalinu fiksuotų parafine esančių (FFPE) mCRC auglio mėginių ir analizuota dėl mutacijų žmogaus KRAS geno 59, 61, 117 ir 146 kodonuose bei žmogaus NRAS geno 59, 117 ir 146 kodonuose. Žemo dažnio mutacijos buvo analizuotos naudojant plazmidžių DNR, kurioje buvo įterpta laukinio tipo FFPE DNR.

Abiejų tyrimų atveju DNR buvo išskirta naudojant „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“, tada analizuota tyrimais, kurie įeina į „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ su „PyroMark Q24“, „Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer“ atliko Sangerio sekoskaitą.

### NRAS 12, 13 ir 61 kodono vertinimas

Iš 100 mėginių, analizuotų Sangerio sekoskaita, mutacijos būseną buvo aptikta 97 mėginiuose abiejuose kodonuose – tiek 12/13, tiek 61. Keturiuose iš 100 mėginių buvo aptikta mutacija 12 arba 13 kodone, naudojant Sangerio sekoskaitą.

Dviejuose iš 100 mėginių mutacijos būsena buvo atkartota, naudojant „*therascreen* NRAS Pyro Kit“ ir mutacijų nustatyta nebuvo. Rezultatai parodyti 12 lentelė. 61 kodone mutacijų neaptikta.

Atmetus mėginius, kurių nepavyko išanalizuoti naudojant vieną arba abu metodus, „*therascreen* NRAS Pyro Kit“ ir Sangerio sekoskaitos rezultatų atitikimas 12/13 kodonų ir 61 kodono atveju buvo atitinkamai 98 % ir 100 % (žr. 12 lentelė).

12 lentelė. NRAS 12, 13 ir 61 analizuotų mėginių rezultatai

		Sangerio sekoskaita				Iš viso
		Mutacija 12/13 kodone	Mutacija 61 kodone	Laukinio tipo	Nežinoma	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutacija 12/13 kodone	2	–	–	–	2
	Mutacija 61 kodone	–	–	–	–	–
	Laukinio tipo	2	–	90	3	95
	Nežinoma	–	–	3	–	3
	Iš viso	4	–	93	3	100

KRAS 59, 61, 117, 146 kodonų ir NRAS 59, 117, 146 kodonų vertinimas

DNR buvo išgauta iš 110 formalinu fiksuotų parafine esančių (FFPE) mCRC auglio mėginių ir analizuota dėl mutacijų žmogaus KRAS geno 59, 61, 117 ir 146 kodonuose bei žmogaus NRAS geno 59, 117 ir 146 kodonuose. Dėl numatyto mažo kiekio klinikiniuose mėginiuose, visos „*therascreen* RAS Extension Kit“ apimamos mutacijos buvo išanalizuotos 56 papildomuose mėginiuose, naudojant plazmidžių DNR, įterptą į laukinio tipo FFPE DNR. Visas mutacijas aptiko „Pyro-“ ir Sangerio sekoskaita.

Iš 166 analizuotų mėginių bendrai atitinkantys rezultatai tarp „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ ir Sangerio sekoskaitos buvo nustatyti 137 mėginių (83 %).

Prieštaringi atvejai gali būti paaiškinami pagal kelis veiksnius.

Dėl aukšto fono 20 mėginių NRAS 59 Sangerio sekoskaitos analizė nepavyko.

Sangerio sekoskaita neaptiko mutacijų KRAS 59 ir KRAS 61 atitinkamai 1 ir 3 mėginiuose. Visų keturių mutacijų rezultatai buvo žemo dažnio, naudojant „Pyrosequencing“ (7,5–13,1 %). Tai galima paaiškinti mažesniu Sangerio sekoskaitos jautrumu (15–20 %), lyginant su „Pyrosequencing“ (5 %) (2). Visi kiti tinkami mėginiai buvo laukinio tipo abiems metodams

Vieną mėginį „Pyrosequencing“ įvertino kaip nežinomą dėl aptiktos dvigubos mutacijos (KRAS 59–61).

Keturiuose mėginiuose su įterpta plazmidžių DNR buvo aptikta papildoma A>G mutacija KRAS kodavimo sekos 350 padėtyje, kurios neapima „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“. Mutacijos buvo aptiktos rankinės analizės būdu.

13 lentelė. Išanalizuotų KRAS 59, 61, 117, 146 kodonų ir NRAS 59, 117, 146 kodonų mėginių rezultatai

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS <sup>a</sup>	NRAS <sup>b</sup>	wt	UK	Iš viso
„ <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit“	KRAS 59	8	–	–	–	–	–	1	9
	KRAS 61	–	6	–	–	–	2	1	9
	KRAS 117	–	–	4	–	–	–	–	4
	KRAS 146	–	–	–	3	4	–	–	7
	KRAS <sup>a</sup>	–	–	–	–	16	–	–	16
	NRAS <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	28	–	28
	wt	–	–	–	–	–	71	16	87
	UK	1	–	–	–	–	3	2	6
	<b>Iš viso</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>20</b>	<b>28</b>	<b>76</b>	<b>20</b>

UK: Nežinoma; wt: Laukinio tipo.

<sup>a</sup> KRAS įterpti mėginiai, kuriuose yra KRAS 117 ir 146 mutacijos.

<sup>b</sup> NRAS įterpti mėginiai su NRAS 59, 117 ir 146 mutacijomis.

\* Viename mėginyje buvo aptikta KRAS 146 mutacija, tačiau gautas netinkamas NRAS 117 rezultatas.

Kiekvieno kodono tyrimo jautrumas ir specifiškumas nurodyti 14 lentelėje.

**14 lentelė. KRAS 59, 61, 117, 146 kodonų ir NRAS 59, 117, 146 kodonų tyrimų jautrumas ir specifiškumas**

	Jautrumas	Specifiškumas	Apimamos mutacijos
KRAS 59 mutacija	100%	99%	175G>A / 176C>G
KRAS 61 mutacija	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
KRAS 117 mutacija	100%	100%	351A>C / 351A>T
KRAS 146 mutacija	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
NRAS 59 mutacija	100%	100%	175G>A / 176C>G
NRAS 117 mutacija	100%	100%	351G>C / 351G>T
NRAS 146 mutacija	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T

**Pastaba.** Atliekant visus efektyvumo charakteristikų nustatymo tyrimus, signalas buvo virš 30 RLU, įprastai gautas iš 10 ng DNR, išskirtos iš formaline fiksuoto ir parafine esančio (FFPE) audinio. „Pyrosequencing“ duomenys buvo išanalizuoti, naudojant „RAS Extension Plug-in Report“ KRAS 59, 117, 146 kodonams ir NRAS 59, 117 ir 146 kodonams.

















---

## Literatūra

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023.
2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

# Simboliai

Ant pakuotės ir etikečių gali būti pateikti šie simboliai:

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
 $\Sigma$ <N>	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti
	Tinka naudoti iki
	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisas
	
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris
	Komponentai
	Sudėtyje yra
	Numeris
	Visuotinis prekės numeris
	Temperatūros apribojimai
	Gamintojas
	Žr. naudojimo instrukcijas

**Simbolis****Simbolio apibrėžimas**

---



Dėmesio

## Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, skambinkite tel. 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN techninės priežiūros skyrių ar vietinių pardavėjų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# A priedas: „*therascreen* RAS Extension Pyro“ tyrimų nustatymas

Jei įdiegta „RAS Extension Plug-in Report“, iš anksto nustatytos tyrimų sąrankos KRAS 59/61, 117 ir 146 kodonams bei NRAS 12/13, 59, 61, 117 ir 146 kodonams yra prieinamos „PyroMark Q24 Software“ nuorodų naršyklėje. Kelias – „Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension“. Šiuo atveju, toliau nurodytų veiksmų atlikti nereikia.


„RAS Extension Plug-in Report“ galima atsisiųsti iš susijusio katalogo puslapio, adresu **www.qiagen.com**, skirtuke „Product Resources“ (Produktų ištekliai), dalyje „Protocol Files“ (protokolų failai).

Primitytinai rekomenduojame naudoti „RAS Extension Plug-in Report“, užuot analizavus rankiniu būdu.

Įdiegus šį priedą arba kiekvieną kartą, kai kompiuteryje įdiegiama nauja programinė įranga ar ji atnaujinama, reikia patikrinti, ar tinkamai veikia priedas, kaip aprašyta „RAS Extension Plug-In“ trumpajame vadove.

Jei „RAS Extension Plug-in Report“ neįdiegta, prieš atliekant „*therascreen* RAS Extension Pyro“ tyrimą pirmą kartą reikia rankiniu būdu nustatyti procedūros failą. Nustatykite KRAS 59/61, 117 ir 146 kodonų bei NRAS 12, 13, 59, 61, 117 ir 146 kodonų tyrimą naudodami „PyroMark Q24 Software“, kaip aprašyta toliau.

## Procedūra

1. Įrankių juostoje spustelėkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“ (naujas AQ tyrimas).
2. 15 lentelė parodytos „Sequences to Analyze“ (analizuotinos sekos), analizuojamos visiems aštuoniems „RAS Extension Pyro“ tyrimams. Lauke „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka) įrašykite konkretaus tyrimo seką.

3. Po procedūros „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką) taip pat galima pakeisti, kad būtų analizuojamos mutacijos skirtingose padėtyse (žr. „6 protokolai: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė“, 31 psl.).


4. Norėdami patikrinti, ar yra mutacijų kituose nukleotiduose, „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką) pakeiskite pagal 15 lentelę. „Sequence to Analyze“ (analizuotinos sekos) keitimas galimas po procedūros (jei neužrakinta).

**Pastaba.** Būtinai nustatykite atskiros viršūnės aukščio ribą kaip 30 RLU. Be to, įsitikinkite, kad A viršūnės mažinimo koeficientas nustatytas ties 0,86 NRAS 61 kodono analizei.

5. Rankiniu būdu įveskite konkretaus tyrimo „Dispensation Order“ (paskirstymo tvarką) iš 15 lentelės.

**Pastaba.** Nenaudokite mygtuko „Generate Dispensation Order“ (generuoti paskirstymo tvarką). „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką) ir „Dispensation Order“ (paskirstymo tvarką) reikia įvesti ranka.

6. Spustelėkite skirtuką „Analysis Parameters“ (analizės parametrai) ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ (viršūnės aukščio riba – būtinas viršūnės aukštis, kad būtų tinkama kokybė:) iki 30.

7. Įrankių juostoje spustelėkite  ir išsaugokite tyrimą kaip „KRAS 59/61“, „KRAS 117“, „KRAS 146“, „NRAS 12/13“, „NRAS 59“, „NRAS 61“, „NRAS 117“ arba „NRAS 146“.

15 lentelė. „Assay Setup“ (tyrimo sąranka): „Sequence to analyze“ (analizuotina seka) ir „Dispensation order“ (paskirstymo tvarka) aštuoniems „*therascreen* RAS extension Pyro Kit“ tyrimams

„ <i>therascreen</i> RAS Extension“ tyrimas	„Sequence to analyze“ (analizuotina seka)	„Dispensation order“ (paskirstymo tvarka)
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATTT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

16 lentelė. Įprastos žmogaus KRAS geno mutacijos, aptiktos „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ su atitinkama „Sequence to analyze“ (analizuotina seka)

Nukleorūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	„Sequence to analyze“ (analizuotina seka)	Cosmic ID (V70)*
<b>KRAS 59 kodonas (GCA)</b>			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
<b>KRAS 61 kodonas (CAA)</b>			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
<b>KRAS 117 kodonas (AAA)</b>			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
<b>KRAS 146 kodonas (GCA)</b>			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

\* Iš „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo), kurį galima rasti Sangerio instituto svetainėje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

17 lentelė. Įprastos žmogaus NRAS geno mutacijos, aptiktos „*therascreen* RAS Extension Pyro Kit“ su atitinkama „Sequence to analyze“ (analizuotina seka)

Nukleorūgštis pakaitalas	Aminorūgštis pakaitalas	„Sequence to analyze“ (analizuotina seka)	Cosmic ID (V70)*
<b>NRAS 12 kodonas (GGT)</b>			
34G>A	G12S	NGTNGTGTTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	565
<b>NRAS 13 kodonas (GGT)</b>			
37G>A	G13S	NGTNGTGTTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	575
<b>NRAS 59 kodonas (GCT)</b>			
175G>A	A59T	ACAVCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	–
<b>NRAS 117 kodonas (AAG)</b>			
351G>C	K117N	ABTGTGATTT	–
351G>T	K117N	ABTGTGATTT	–
<b>NRAS 61 kodonas (CAA)</b>			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586



Nukleorūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	„Sequence to analyze“ (analizuotina seka)	Cosmic ID (V70)*
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
<b>NRAS 146 kodonas (GCC)</b>			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

\* Iš „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo), kurį galima rasti Sangerio instituto svetainėje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

## B priedas: atliekų konteinerio ir lovelių ištuštinimas



### ĮSPĖJIMAS

Pavojingos cheminės medžiagos

Denatūracijos tirpale, naudojamame vakuuminėje darbinėje stotyje, yra natrio hidroksido, kuris dirgina akis ir odą.

Visada mūvėkite apsaugines pirštines, dėvėkite apsauginius akinius ir laboratorinį apsiaustą.

Atsakingas asmuo (pvz., laboratorijos vadovas) turi imtis būtinų atsargumo priemonių, kad užtikrintų darbo vietos saugą ir apsaugotų instrumento operatorius nuo toksinių medžiagų (cheminių arba biologinių) pavojingų lygių poveikio, kaip nurodyta taikomuose saugos duomenų lapuose (SDS) arba OSHA\*, ACGIH† ar COSHH‡ dokumentuose.

Garų vėdinimas ir atliekų išmetimas turi būti atliekami atsižvelgiant į vietinius ir šalies sveikatos ir saugos reikalavimus ir teisės aktus.

\* OSHA: Profesinės saugos ir sveikatos administracija (angl. Occupational Safety and Health Administration) (Jungtinės Amerikos Valstijos).

† ACGIH: Amerikos vyriausybinių pramonės higienistų konferencija (angl. American Conference of Government Industrial Hygienists) (Jungtinės Amerikos Valstijos).

‡ COSHH: Pavojingų sveikatai medžiagų kontrolė (angl. Control of Substances Hazardous to Health) (Jungtinė Karalystė).

Užtikrinkite, kad būtų laikomasi šalies ir vietinių laboratorijos atliekų išmetimo aplinkos apsaugos reikalavimų.

## Svarbi informacija prieš pradėdant

- Šiam protokolui reikalingas labai išgrynintas vanduo.

## Procedūra

1. Įsitikinkite, kad vakuuminiame įrankyje nėra vakuumo. Įsitikinkite, kad išjungtas („Off“) vakuumo jungiklis ir išjungtas vakuumo siurblys.
2. Pašalinkite visą loveliuose likusį skystį.
3. Išskalaukite lovelius labai išgrynintu vandeniu arba, jei reikia, juos pakeiskite.
4. Ištuštinkite atliekų konteinerį.
5. Dangtelį galima nuimti neatjungus vamzdelių.

Jei reikia išvalyti vakuuminę darbo stotį (pvz., susikaupus dulkėms ar išsiliejus skysčių), vykdykite „PyroMark Q24“ naudotojo vadove pateiktus nurodymus.

# Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	24 reakcijoms: sekoskaitos pradmenys, PGR pradmenys, nemetilinta kontrolinė DNR, „PyroMark PCR Master Mix“, „CoralLoad Concentrate“, buferiniai tirpalai ir reagentai	971590
PyroMark Q24 MDx	24 mėginių lygiagrečiai atliekamos „Pyrosequencing“ analizės seka pagrįsta aptikimo platforma	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	„Vacuum Workstation“, lygiagrečiai paruošianti 24 mėginius nuo PGR produkto iki vienos gijos matricos	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Analizės programinė įranga	9019063
<b>Priedai</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 šulinėlių sekoskaitos reakcijos plokštelė	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Nukleotidų ir reagentų paskirstymo kasetės	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	„PyroMark Vacuum Workstation“ Q96 ir Q24 daugkartiniai filtravimo zondai	979010
PyroMark Control Oligo	Skirta sistemos diegimo patikrai	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Skirta sistemos efektyvumui tikrinti	979304

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
<b>Susiję produktai</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR preparatų: 50 „QIAamp MinElute® Columns“, „Proteinase K“, „Buffers“, „Collection Tubes“ (2 ml)	56404

Norėdami gauti naujausios informacijos apie licencijavimą ir atsakomybės už produktus apribojimus, žr. atitinkamą QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. QIAGEN rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pateikti svetainėje [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) arba galite jų paprašyti QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

---

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Prekių ženklai: „QIAGEN<sup>®</sup>“, „Sample to Insight<sup>®</sup>“, „QIAamp<sup>®</sup>“, „CoralLoad<sup>®</sup>“, „HotStarTaq<sup>®</sup>“, „MinElute<sup>®</sup>“, „Pyro<sup>®</sup>“, „Pyrogram<sup>®</sup>“, „PyroMark<sup>®</sup>“, „Pyrosequencing<sup>®</sup>“, „therascreen<sup>®</sup>“ („QIAGEN Group“); „Analyse-it<sup>®</sup>“ („Analyse-it Software Ltd“); „Applied Biosystems<sup>®</sup>“, „Variomag<sup>®</sup>“ („Thermo Fisher Scientific“); „Axygen<sup>®</sup>“ („Coming Inc.“); „FrameStar<sup>®</sup>“ („4titude Ltd“); „Milli-Q<sup>®</sup>“ („Merck Millipore Corporation“); „Sephacore<sup>®</sup>“ („GE Healthcare“); „SmartBlock™“; „ThermoMixer<sup>®</sup>“ („Eppendorf AG“); „Windows<sup>®</sup>“ („Microsoft Corporation“).

#### „therascreen RAS Extension Pyro Kit“ ribotosios licencijos sutartis

Naudodamas šį produktą pirkėjas ar naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). QIAGEN naudotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Jei aiškiai nenurodyta licencijose, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiekti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti anksčiau nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir turi atgauti visus tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Geg-2016 HB-1882-002 © QIAGEN, 2016. Visos teisės saugomos.

---

Užsakymas [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Techninė pagalba [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Svetainė [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)