

therascreen[®] NRAS Pyro[®] Kit Kézikönyv



1. Kiadás



In vitro diagnosztikai használatra




971530



1061828EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

R3  1061828EN



QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN, élvonalbeli termékkörrel rendelkezik az innovatív minta- és vizsgálati technológiák területén, lehetővé téve bármilyen minta biológiai tartalmának izolálását és kimutatását. Korszerű, magas színvonalú termékeink és szolgáltatásaink biztosítják a sikert a mintától az eredményig.

A QIAGEN irányadó az alábbi területeken:

- DNS, RNS és fehérje tisztítás
- Nukleinsav és fehérje vizsgálatok
- mikro RNS kutatás és RNSi
- Minta- és vizsgálati technológiák automatizálása

Küldetésünk, hogy Ön kimagasló sikereket és tudományos áttöréseket érjen el. További információkért, látogasson el honlapunkra: www.qiagen.com.

Tartalom

Rendeltetésszerű felhasználás	5
Összefoglalás és magyarázat	5
A folyamat alapjai	6
Kontrollok	7
Biztosított anyagok	8
A kit tartalma	8
Szükséges, de nem biztosított anyagok	10
Ajánlott plate mixerek	11
Figyelmeztetések és óvintézkedések	11
Biztonsági információk	11
Általános óvintézkedések	12
Reagensek tárolása és kezelése	13
A minta kezelése és tárolás	13
A folyamat	14
DNS izolálás	14
1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása	15
2. Protokoll: PCR a therascreen NRAS Pyro Kit-hez mellékelt PCR reagensekkel	17
3. Protokoll: A PCR termék kötése Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökhöz	20
4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt	22
5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása	26
6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése	28
Az eredmények értékelése	30
Hibaelhárítási útmutató	34
Minőségellenőrzés	36
Korlátozások	36
Az üres minta határértéke és a detektálás határa	37
9. Táblázat. LOB és LOD értékek meghatározzák a specifikus mutációt	38
Linearitás	39
Precízió	39
Diagnosztikai értékelés	40

Referenciák	41
Szimbólumok	42
Kontaktinformáció	43
A Melléklet: <i>therascreen</i> NRAS Pyro vizsgálat beállításai	44
B Melléklet: A szeméttároló és a szemetes tartályok kiürítése	47
Megrendelési Információk	48

Rendeltetészerű felhasználás

A *therascreen* NRAS Pyro Kit egy piro szekvenálási (Pyrosequencing[®]) technológián alapuló in-vitro nukleinsavszekvenencia detektáló teszt, amely képes kvantitatívan kimutatni a humán szövetminta genomi DNS-éből az NRAS gén 12-es, 13-as és 61-es kodonját érintő mutációkat.

A *therascreen* NRAS Pyro Kit által a klinikusok olyan információhoz juthatnak, amivel, nagyobb valószínűséggel ki tudják választani azokat a rákbetegeket, akiknél hatásos lehet az anti-EGFR terápia. In-vitro diagnosztikai használatra.

Csak a PyroMark[®] Q24 rendszeren használható. A PyroMark Q24 rendszer az alábbiakat tartalmazza:

- PyroMark Q24 készülék és PyroMark Q24 MDx készülék.
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation és PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- PyroMark Q24 szoftver (2.0) és PyroMark Q24 MDx szoftver (2.0).

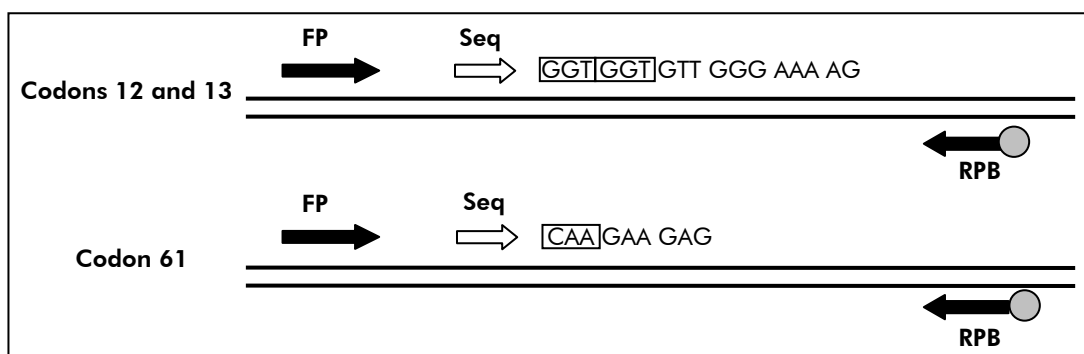
A termék olyan szakemberek, például technikusok és orvosok számára ajánlott, akik képzettséggel rendelkeznek az in-vitro diagnosztikai folyamatokban, a molekuláris biológiai technikákban és a PyroMark Q24 rendszer használatában.

Összefoglalás és magyarázat

A *therascreen* NRAS Pyro Kit a humán NRAS gén 12-es, 13-as és 61-es kodonját érintő mutációk kvantitatív mérésére használható.

A kit két kétféle vizsgálatot biztosít (1. Ábra): az egyik detektálja a mutációkat a 12-es és 13-as kodonok esetében, a másik detektálja a mutációkat a 61-es kodon esetében

A két régió külön-külön kerül amplifikálásra a PCR során és ezután történik a meghatározott területek szekvenálása. A meghatározott pozíciók körüli szekvenciák normalizálási és referencia csúcsként szolgálnak a minőségi és mennyiségi értékeléséhez.



1. Ábra. Az NRAS assay illusztrációja. A szekvencia a vad típusú minta analizált szekvenciáját jelöli. FP: Forward PCR primerek; RPB: Reverse PCR primerek (a B jelöli a biotinilációt); Seq: Szekvenáló primerek.

A szekvenálás mindkét vizsgálat során forward irányba történik

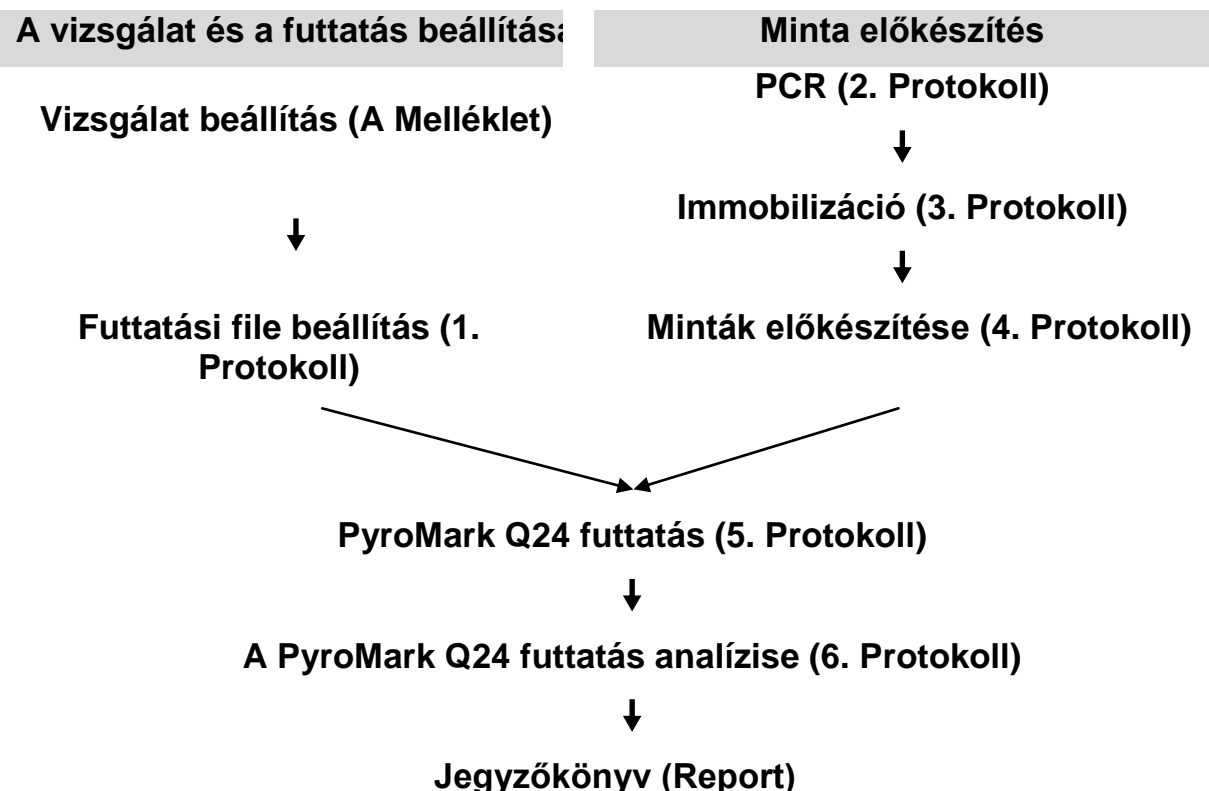
A termék minden vizsgálatához tartalmaz egy PCR primer mixet és egy szekvenáló primert. A primerek oldat formájában kerülnek szállításra. Minden fiola 24 µl primert vagy primer mix-et tartalmaz.

A folyamat alapjai

Az alábbi munkafolyamat a vizsgálat menetét vázolja. A 12-es/13-as és 61-es kodonokra vonatkozó, célzott PCR után az ampliconok megkötődnek a Streptavidin Sepharose® High Performance gyöngyökön. A PCR termék egyszálúsítása után a szekvenáló primerek kapcsolódása következik (annealing). A mintákat ezután a PyroMark Q24 rendszeren analizáljuk egy futtatási-beállítás file és egy futtatási file használatával. A ritka mutációk detektálásához a "Sequence to Analyze" módosítható a futások után (lásd "6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése", 28. oldal).

Megjegyzés: A munkafolyamat kissé módosult a thescreen *NRAS Pyro Kit Kézikönyv* R1 revíziójához képest (lásd "4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt", 22. oldal).

A thescreen NRAS Pyro munkafolyamat



Kontrollok

A kit tartalmaz egy metilálatlan kontroll DNS-t, mint pozitív kontrollt a PCR-hez és a szekvenáló reakciókhoz. Ez a kontroll DNS „vad” genotípussal rendelkezik a kit által vizsgált szekvenálási területeken, így biztosítja az eredmények megfelelő értelmezését, valamint az alacsony szintű mutációk azonosítását (lásd “Az eredmények értékelése”, 30. oldal). Minden piroszekvenálási futás alkalmával, vizsgálat típusonként egy metilálatlan kontroll DNS minta futtatása szükséges.

Továbbá, negatív kontrollt (DNS nélküli) is kell tartalmaznia legalább egy vizsgálatnak minden PCR összemérés alkalmával.


Biztosított anyagok

A kit tartalma

therascreen NRAS Pyro Kit (1/2-es doboz)

<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	(24)
Kat. szám	971530
Reakciók száma	24
Seq Primer NRAS 12/13	24 µl
Seq Primer NRAS 61	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13	24 µl
PCR Primer NRAS 61	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate (koncentrátum), 10x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1.9 ml
Unmethylated (metilálatlan) Control DNA, 10 ng/µl	100 µl

therascreen pufferek és reagensek (2/2-es doboz)

therascreen pufferek és reagensek		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 vial
Substrate Mixture		1 vial
dATP \square S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Kézikönyv		1

* Nátrium-hidroxidot tartalmaz.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

A kémiai anyagokkal használata során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi ruházatot, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkért olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS), amelyek a termék forgalmazójától szerezhetők be.

- DNS izoláló kit (lásd “DNS izolálás”, 14. oldal)
 - Pipetták (állítható)*
 - Steril pipetta hegyek (szűrővel a PCR összeméréshez)
 - Asztali mikrocentrifuga*
 - PCR készülék* és hozzáillő PCR csövek
 - Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat. szám 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
 - PyroMark Q24 (kat. szám 9001513 vagy 9001514)*[†]
 - PyroMark Q24 Software (kat. szám 9019063 vagy 9019062)[†]
 - PyroMark Q24 Plate (kat. szám 979301)[†]
 - PyroMark Q24 Cartridge (kat. szám 979302)[†]
 - PyroMark Q24 Vacuum Workstation (kat. szám 9001515 és 9001517)*[†]
 - Plate mixer* a gyöngyökön történő immobilizáláshoz
 - Fűthető blokk * mely képes 80°C-t biztosítani
 - 24 férőhelyes PCR plate vagy strip-ek
 - Strip kupakok
 - Nagytisztaságú víz (Milli-Q[®] 18.2 MΩ x cm vagy ennek megfelelő).
- Megjegyzés:** A kitben lévő víz elegendő a PCR-hez, a DNS megkötéshez, az enzim mix és szubsztrát mix feloldásához; a további nagytisztaságú víz a Pyromark mosó puffer, 10x-es hígításához szükséges.
- Ethanol (70%)[‡]

* Bizonyosodjon meg arról, hogy a gyártó javaslatainak megfelelően történt a készülék ellenőrzése és kalibrálása.

[†] CE-IVD jelölésű a 98/79/EC EU-s előírásnak megfelelően. Minden más termék a listában a 98/79/EC EU-s előírás alapján nem CE-IVD jelölésű.

[‡] Ne használjon denaturált alkoholt, mely más olyan anyagokat tartalmaz, mint a metanol és metiletilketon.

Ajánlott plate mixerek

Az 1. Táblázatban feltüntetett plate mixerek ajánlottak a *therascreen* NRAS Pyro Kit használatához.

1. Táblázat. Plate mixerek, melyeket a *therascreen* NRAS Pyro Kit használatához ajánlottak

Gyártó	Termék	Kat. szám
Eppendorf	Thermomixer comfort (alap készülék)	5355 000.011
	Thermoblock MTP-hez	5363 000.012
	Adapter plate 96 x 0.2ml-es PCR csövek mikrotiter plate-ek blokkjaiba illesztéséhez	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In Vitro Diagnosztikai használathoz

Biztonsági információk

A kémiai anyagokkal használata során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi ruházatot, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkért, kérjük, olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS). Ezek online elérhetőek praktikus és tömör PDF formátumban a www.qiagen.com/safety oldalon, ahol megtalálható, olvasható és kinyomtatható az SDS az egyes QIAGEN kitekre és kit komponensekre vonatkozóan.

Az alábbi figyelmeztető („H”) és óvintézkedésre vonatkozó („P”) mondatok vonatkoznak a(z) *therascreen* NRAS Pyro Kit termék összetevőire.

PyroMark Denaturation Solution



Figyelem! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Fémekre korrozív hatású lehet. A kiömlött anyagot fel kell itatni a körülvevő anyagok károsodásának megelőzése érdekében. Az eredeti edényben tartandó. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

PyroMark Enzyme Mixture



Tartalmaz: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Veszély! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

PyroMark Substrate Mixture



Tartalmaz: acetic acid. Figyelem! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

Általános óvintézkedések

A felhasználónak mindig figyelmet kell fordítania az alábbiakra.

- Szigorúan meg kell felelni a felhasználói kézikönyv előírásainak a megfelelő eredményért. A reagensek hígítása, másként, mint ahogy azt a kézikönyv írja, nem ajánlott és a teljesítmény csökkenését eredményezi.
- A munkafolyamat kissé módosult (lásd "4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt", 22. oldal) a theascreen *NRAS Pyro Kit Kézikönyv* R1 revíziójához viszonyítva.
- Ezen termék komponensei elegendőek 24 reakció elkészítéséhez, akár 5 független futtatásban.
- Használjon steril pipetta hegyeket szűrővel (a PCR összeállításához).
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok, és amplikonok) minden más reagensetől különállóan tárolja, illetve nyissa fel és ezeket egy különálló helységben adja hozzá a reakció keverékhez.
- Olvassa fel az összes komponenst szobahőmérsékleten (15-25°C) a vizsgálat előtt.
- Amikor felolvadt, keverje össze a komponenseket (fel-le pipettázással, vagy vortex-el) és röviden centrifugálja le.
- A sikertelen eredmények nem hivatottak a mutációs státusz megítélésére.

Reagensek tárolása és kezelése

A *therascreen* NRAS Pyro Kit-szállítása 2 dobozban történik. A *therascreen* NRAS Pyro Kit (1/2-es doboz) szállítása szárazjégen történik. A PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Koncentrátum, metilálatlan kontroll DNS és primerek tárolása -30 és -15°C között kell, hogy történjen megérkezésük után.

A *therascreen* pufferek és reagensek (2/2-es doboz) tartalma: *therascreen* pufferek, enzim mix, szubsztrát mix, dATP α S, dCTP, dGTP és dTTP (a Pyroszekvenálási analízishez szükséges reagensek); szállításuk jégakkumulátorral történik. Ezen komponenseket 2-8°C-on kell tárolni megérkezésük után. Az aktivitásbeli veszteség minimalizálása érdekében, ajánlott mind az enzim mixet, mind a szubsztrát mixet a mellékelt fiolákban tárolni.

Az összeállított enzim és szubsztrát mixek legalább 10 napig stabilak 2-8°C-on. Az összeállított enzim és szubsztrát mixek lefagyaszthatóak és a fiolákban tárolhatók -30 és -15°C között. A lefagyasztott reagenseket nem lehet kitenni 3-nál több fagyasztási-kiolvasztási folyamatnak.

Megjegyzés: A nukleotidok nem fagyaszthatók.

A *therascreen* NRAS Pyro Kit a lejárat dátumig stabil marad, amennyiben a fenti kondícióknak megfelelően van tárolva.

A minta kezelése és tárolás

Minden mintát, mint potenciális fertőző anyagot kell kezelni.

A mintaanyag humán DNS, melyet vérből és formalin-fixált paraffinba-beágyazott (FFPE) mintákból vontak ki.

Heparin kezelés alatt álló emberekből származó minták nem használhatóak. Az olyan csövekben gyűjtött vérminták, melyek antikoagulánsként heparint tartalmaznak nem használhatóak. A heparin befolyásolja a PCR-t.

A folyamat

DNS izolálás

A rendszer teljesítménye az EZ1® DNA Tissue Kit és a QIAamp®DNA FFPE Tissue Kit-ek használatával lett megállapítva, amelyeket a formalinban-fixált paraffinba-ágyazott tumor mintákból történő humán DNS izolálásához használtak. A QIAamp DSP DNS Blood Mini Kit rendszer teljesítményének megállapítása egészséges donor vérminta felhasználásával történt, amelyet részben tumor sejtekkel spike-oltak.

A *therascreen* NRAS Pyro Kit-hez a 2. Táblázatban látható QIAGEN kitek ajánlottak DNS tisztításra a megjelölt humán mintatípusokból. Végezze el a DNS tisztítást, a kit kézikönyvében leírt utasításoknak megfelelően

2. Táblázat. DNS tisztító kitek, melyek ajánlottak a *therascreen* NRAS Pyro Kithoz

Mintatípus	Nukleinsav izoláló kit	Kat. szám (QIAGEN)
Paraffinba-ágyazott szövet	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Vér	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Kövesse a protokollt a paraffinba-ágyazott szövet használatakor. Az EZ1 DNA Tissue Kitet kombinálva kell használni az EZ1 Advanced készülékkel (kat. szám 9001410 vagy 9001411) és az EZ1 Advanced DNS Paraffin Section Kártyával (kat. szám 9018298), vagy az EZ1 Advanced XL készülékkel (kat. szám 9001492) és az EZ1 Advanced XL DNS Paraffin Section Kártyával (kat. szám 9018700), vagy a BioRobot® EZ1 készülékkel (kat. szám 9000705, többé nem elérhető) és az EZ1 DNS Paraffin Section Kártyával (kat. szám 9015862).

† CE-IVD jelölt termék, a 98/79/EC EU-s előírásnak megfelelően.

1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása



Kezdés előtti fontos szempontok

- Ha kell, a LOB megerősíthető egy vad-típusú mintával, a teljes plate-nyi eredményhez. Részleteket a CLSI Irányelv EP17-A „A detekciós limit meghatározása és a mennyiségi limit meghatározása protokoll; jóváhagyott útmutató”-ban találhat.

Kezdés előtti teendők

- Készítsen egy Assay Setup beállítást a 41. oldal, A Melléklete alapján. Ezt csak egyszer kell elvégezni, a *therascreen* NRAS Pyro vizsgálatok első futtatása előtt.

Procedúra

1. **Kattintson az  ikonra az eszköztárban.**
Egy új futási file-t kapunk.
2. **Írja be a futási paramétereket (lásd “Futtatási paraméterek”, 16. oldal).**
3. **Állítsa össze a plate-et, úgy hogy a 12/13 kodon és a 61-es kodon assay-eket hozzáadja a vizsgálandó mintáknak megfelelő well-ekhez.**
Megjegyzés: Egy negatív kontroll mintát (DNS minta nélkül) mellékeljen minden PCR összeméréskor legalább 1 vizsgálatban.
Megjegyzés: Mellékeljen egy metilátlan kontroll DNS-t minden egyes vizsgálatához, pyroszekvenálási futásonként (lásd “Kontrollok”, 7. oldal).
4. **Ha a futást összeállította és készen áll a ProMark Q24 futtatásra, nyomtasson egy listát az enzim keverék, szubsztrát keverék és nukleotidok kívánt mennyiségéről, illetve a plate beállításról.**
Válassza a „Tools” menüből a „Pre Run Information”-t, majd kattintson a  ikonra.
5. **Zárja be a futtatás file-t és másolja egy pendrive-ra (a rendszer tartozéka) Windows Explorer-t használva**
A nyomtatott Előfuttatási Információt, mintaként használhatja, az összeméréshez (lásd “ 3. Protokoll: A PCR termék kötése Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökhöz ”, 20. oldal).
A plate PyroMark Q24-en történő futtatásához, lásd “5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása ”, 26. oldal.

Futtatási paraméterek

- Futtatási név: A futás elnevezése a file mentéskor kerül megadásra. A file átnevezésre is megváltozik a futás elnevezése.
- Műszer metódus: Válassza a cartridge-hoz megfelelő műszer metódust, amely a futtatáshoz használva lesz. Lásd a termékek mellékelt utasításában.
- Plate ID (azonosító): **Opcionális:** Adja meg a PyroMark Q24 Plate ID-ját.
- Vonalkód: **Opcionális:** Adjon meg egy vonalkód számot a plate-hez, vagy ha van egy vonalkód olvasó a computerhez csatlakoztatva, vigye az egér kurzort a „Barcode” szövegdobozra (klikkeljen a dobozra) és szkennelje be a vonalkódot.
- Kit és reagens ID: **Opcionális:** Adja meg a használni kívánt thescreen NRAS Pyro Kit lot. számát. A lot. szám a termék címkén található.
Megjegyzés: Ajánlott mind a reagens és a kit ID-jait megadni, hogy bármilyen a reagenst érintő problémát nyomon lehessen követni.
- Futtatási megjegyzés: **Opcionális:** Adjon meg egy jegyzetet a tartalomról vagy a futtatás céljáról.

Vizsgálati file-ok hozzáadása

Ha egy assay-t egy csőhöz szeretnénk rendelni, akkor vagy:

- Jobb-klikk a csőre és „Load Assay” kiválasztása a tartalom menüből.
- A shortcut browser-ben válassza ki az assay-t majd húzza át azt a csőhöz.

A cső szín-kódos, a betöltött vizsgálatnak megfelelően.

Adjon meg minta ID-eket és megjegyzéseket

Ahhoz, hogy megadon minta ID-eket vagy megjegyzéseket, válassza ki a cellát és írja be a szöveget.

Egy minta ID vagy egy megjegyzés szerkesztéséhez, vagy válassza ki a cellát (az aktuális tartalom ki lesz választva) vagy klikkeljen duplán a cellára.

2. Protokoll: PCR a therascreen NRAS Pyro Kit-hez mellékelt PCR reagensekkel

Ez a protokoll a 12-es és 13-as kodonot is tartalmazó régió, illetve a 61-es kodont tartalmazó régió PCR-es amplifikálásához szolgál a *therascreen* NRAS Pyro kit használatával.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A PyroMark Master Mix-ben található HotStarTaq[®] DNS polimeráz egy **15 percig** tartó aktivációs lépést igényel **95°C-on**.
- Állítsa össze az összes reakció mixet egy, a DNS izolálástól független helyen, adja a minta DNS-t a PCR-hez, elemezze a PCR terméket, vagy készítse elő a mintát piroszekvenálási analízist megelőzően.
- Használjon eldobható hegyeket, melyek hidrofóbikus szűrőket tartalmaznak a kereszt-szennyeződés minimalizálása érdekében.

Kezdés előtti teendők

- Mielőtt felnyitja a PCR primereket tartalmazó csöveket, röviden centrifugálja le azokat, hogy tartalmuk a cső aljára gyűljön.
- Állítsa a kontroll és minta DNS koncentrációját 0.4-2ng/μl-re, ha szükséges.

Procedúra

1. **Olvassa fel az összes szükséges komponenst (lásd 3. Táblázat).**
Jól keverje össze használat előtt.
2. **A 3. Táblázatban megadottak szerint készítsen egy reakció mixet minden egyes PCR primer szetthez.**

A reakció mix tartalmazza az összes komponenst, ami a PCR-hez szükséges, kivéve a mintát.

Készítsen olyan nagy mennyiségű reakció mixet, amely nagyobb, mint a végrehajtandó PCR vizsgálatok száma.

3. Táblázat. A reakció mix elkészítése az egyes PCR primer mixekkel

Összetétel	Térfogat/reakció (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer NRAS 12/13 vagy PCR Primer NRAS 61	1.0
Víz (H ₂ O, tartozék)	4.0
Össztérfogat	20.0

3. Keverje össze a reakció mixet és osszon 20µl-t minden egyes PCR csőbe.

Nem szükséges a PCR csöveket jégben tartani, mert a HotStarTaq DNS polimeráz inaktív szobahőmérsékleten.

4. Adjon hozzá 5µl minta DNS-t (2-10 ng genomikus DNS) az egyes PCR csövekhez (lásd: 4. Táblázat) és jól keverje össze.

Megjegyzés: Egy negatív kontrollt (DNS nélküli) is kell tartalmaznia legalább egy vizsgálatnak minden PCR összemérés alkalmával.

Megjegyzés: Használjon egy metilálatlan kontroll DNS mintát minden egyes piroszekvenális futtatásban (lásd "Kontrollok", 7. oldal).

4. Táblázat. PCR készítés

Összetétel	Térfogat/reakció (µl)
Reakció mix	20
Minta DNS	5
Össztérfogat	25

5. Programozza be a PCR készüléket a gyártó előírásainak megfelelően, az 5. Táblázatban vázolt kondíciókat használva.

5. Táblázat. Optimalizált PCR protokoll

			Megjegyzések
Kezdeti aktivációs lépés:	15 perc	95°C	A HotStarTaq DNS polimeráz aktiválódik ezzel a fűtési lépéssel.
3-lépéses ciklusok:			
Denaturáció	20 másodperc	95°C	
Feltapadás	30 másodperc	53°C	
Láncépítés	20 másodperc	72°C	
Ciklusok száma	42		
Végső extenzió:	5 perc	72°C	

6. Helyezze a PCR csöveket a PCR készülékbe és indítsa el a programot.
7. Az amplifikáció után, folytassa a “ 3. Protokoll: A PCR termék kötése Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökhöz ”, 20. oldal.

3. Protokoll: A PCR termék kötése Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökhöz

Ez a protokoll írja le a PyroMark Q24 analízis előtti templát DNS kikötését Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) segítségével.

Kezdés előtti fontos szempontok

- Tegyük lehetővé, hogy az összes szükséges reagens és oldat felvegye a szobahőmérsékletet (15-25 C°) mielőtt dolgozni kezdünk velük.

Procedúra

1. Óvatosan rázza fel a Streptavidin Sepharose High Performance üvegét, amíg homogén oldatot nem kap.
2. Készítsen master mix-et a DNS kivonáshoz a 6. Táblázatnak megfelelően. Készítsen 10%-val több mennyiséget, mint ami az összes reakcióhoz kell.

6. Táblázat. Master mix a DNS kikötéséhez

Összetétel	Térfogat/minta (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Víz (H ₂ O, tartozék)	28
Össztérfogat	70

3. Mérjen 70 µl master mix-et a 24 férőhelyes PCR plate vagy a strip csöveibe, amelyet előzőleg megadhat a futási beállításoknál (lásd “ 1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal).
4. Adjon a 2. Protokoll alapján készített biotinilált PCR termékből 10 µl-t a master mix-et tartalmazó csövekbe, amelyeket megadott a futási beállításoknál (lásd “2. Protokoll: PCR a thetascreen NRAS Pyro Kit-hez mellékelt PCR reagensekkel”, 17. oldal).

A teljes térfogatnak 80 µl-nek kell lennie a master mix és a PCR termék bemérése után.

5. Zárja le a PCR plate-et (vagy a strip-et) strip sapkával.
Győződjön meg róla, hogy a csövek között nincs szivárgás.

6. Mozgassa a PCR plate-et 5-10 percig szobahőmérsékleten (15-25 C°) 1400 rpm-vel.

Ezalatt készítse elő a PyroMark Q24 Vacuum Workstation-t a mintatisztításhoz, a *PyroMark Q24 User Manual* alapján.

7. Közvetlenül folytassa ezzel “4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt”, 22. oldal.

Megjegyzés: A szefaróz gyöngyök gyorsan ülepednek. A gyöngyök kivételének közvetlenül a mozgatót követően kell megtörténnie.

Ha több mint 1 perc telik el a plate vagy a strip mozgatót követően, akkor újra 1 percig mozgatni kell a gyöngyöket a kifogásuk előtt.

4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt

A PyroMark Q24 Pyrosequencing analízis előtt ez a protokoll írja le az egyszálú DNS előkészítését és a szekvenáló primer templáttal történő összekapcsolását.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A szekvenáló primereket tartalmazó csövek kinyitása előtt röviden centrifugálja le azokat, hogy a tartalom a cső aljára kerüljön.
- Adja a 2 különböző szekvenáló primer-t azonos módon, mint ahogy meghatározta azt a futási beállításban (lásd " 1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása", 15. oldal), az analizálni kívánt régiótól függően (kodon 12 és 13, vagy kodon 61).
- A munkafolyamat kissé módosult a *therascreen NRAS Pyro Kit Handbook* R1 módosításához képest (18. lépés). A 80 C°-os melegítést követően ne rövidítse le a minta kihűlési idejét.
- Rendszeresen végezze el a szűrő filterek funkció tesztjét a *PyroMark Q24 User Manual* alapján és ha kell cserélje ki a szűrő filtereket.

Kezdés előtti teendők

- Helyezze a PyroMark Q24 Plate Holder-t egy 80 C°-ra előmelegített thermoblokkra a 17. lépésnél. Hagyja a második PyroMark Q24 Plate Holder-t szobahőmérsékleten (15-25 C°) a 18. lépéshez.
- A PyroMark Wash Buffer 10x-es koncentrátum. Első használat előtt hígítsa 1x-es oldattá, úgy hogy adjon 225 ml nagy tisztaságú vizet 25 ml 10x-es PyroMark Wash Buffer-hez (végtérfogat 250 ml).

Az 1x-es, használatra kész PyroMark Wash Buffer oldat 2–8°C-on eltartható a jelzett lejáratú időig.

Procedúra

1. Hígítson elegendő mennyiséget az egyes szekvenáló primerekből **Seq Primer NRAS 12/13** és **Seq Primer NRAS 61** a **PyroMark Q24 Annealing Buffer-t** használva a **7. Táblázat** szerint.

Hígítson nagyobb mennyiséget a szekvenáló primerekből, mint amennyi az össze minta szekvenáláshoz szükséges lenne (minták száma + egy extra).

7. Táblázat. Példa a szekvenáló primerek hígítására

Összetétel	Térfogat/minta (μ l)	Térfogat 9 + 1 reakcióra (μ l)
Seq Primer NRAS 12/13 vagy Seq Primer NRAS 61	0.8	8
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Össztérfogat	25	250

2. Tegyen 25 μ l-t a hígított szekvenáló primer-ből a PyroMark Q24 Plate egyes csöveibe a futási beállításoknak megfelelően (lásd “ 1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal).

Tartsa az egyik PyroMark Q24 Plate Holder-t (tartozék a PyroMark Q24 Vacuum Workstation-nak) szobahőmérsékleten (15-25 C°) és használja tartóként, a plate előkészítése és mozgatása során.

3. Helyezze a 3. Protokoll alapján előkészített PCR plate-et (vagy strip-et) és a PyroMark Q24 Plate-et a munkaasztalra (2. Ábra).

Ellenőrizze a plate helyes orientációját, a mintafelvétel alapján.



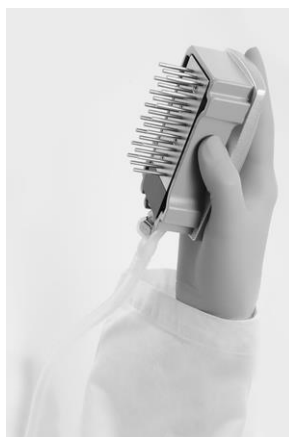
2. Ábra. A PCR plate (vagy strip) és a PyroMark Q24 Plate elhelyezése a vákuum munkaasztalon.

4. A vákuum bekapcsolásával hozzon létre vákuumot az eszközben.
5. Óvatosan eressze le a szűrő szondákat a PCR plate-be (vagy strip-be), hogy összegyűjtse a templát DNS-sel kötésben lévő gyöngyöket. Tartsa a szondákat itt 15 másodpercig. Óvatosan emelje fel a vákuum fejet.

Megjegyzés: A szefaróz gyöngyök gyorsan ülepednek. A gyöngyök kivételének közvetlenül a mozgatót követően kell megtörténnie.

Ha több mint 1 perc telik el a plate vagy a strip mozgatót követően, akkor újra 1 percig mozgatni kell a gyöngyöket a kifogásuk előtt.

6. Helyezze a vákuum fejet a 40 ml, 70%-os etanolt tartalmazó kádba (2. Ábra). Öblítse a szűrő szondákat 5 másodpercen keresztül.
7. Helyezze a vákuum fejet a 40 ml, Denaturation Solution-t tartalmazó kádba (2. Ábra). Öblítse a szűrő szondákat 5 másodpercen keresztül.
8. Helyezze a vákuum fejet az 50 ml, Wash Buffer-t tartalmazó kádba (2. Ábra). Öblítse a szűrő szondákat 10 másodpercen keresztül.
9. Emelje fel a vákuum fejet, majd 5 másodpercig döntse hátra, a függőleges 90°-on túl, hogy a folyadék lecsurogjon a szűrő szondákból (3. Ábra).



3. Ábra. A vákuum fej hátradöntése, a függőleges 90°-on túl.

10. Miközben a vákuum fejet a PyroMark Q24 Plate fölé tartja zárja le a vákuum kapcsolót az eszközön (Off).
11. Oldja le a gyöngyöket a PyroMark Q24 Plate-be, úgy hogy engedje a szűrő szondákat a hígított szekvenáló primer-be, majd óvatosan mozgassa az eszközt egyik oldalról a másikra.
Vigyázzon, nehogy felsértse a PyroMark Q24 Plate felszínét, megkarcolva azt a szűrő szondákkal.
12. Helyezze a vákuum fejet nagy tisztaságú vizet tartalmazó kádba (2. Ábra) és mozgassa azt 10 másodpercig.
13. Nagy tisztaságú vízbe merítve (2. Ábra) és vákuumot alkalmazva mossa át a szűrő szondákat. Öblítse a szondákat 70 ml nagy tisztaságú vízzel.
14. Emelje fel a vákuum fejet, majd 5 másodpercig döntse hátra, a függőleges 90°-on túl, hogy a folyadék lecsurogjon a szűrő szondákból (3. Ábra).
15. Zárja le a vákuum kapcsolót az eszközön (Off) és helyezze vákuum fejet a Parking (P) pozícióba.
16. Kapcsolja ki a vákuum pumpát.

Megjegyzés: A munkanap végén kidobhatja a keletkezett folyékony hulladékot és a megmaradt oldatokat, valamint ellenőrizheti, hogy maradt-e por illetve folyadék általi szennyeződés a PyroMark Q24 Vacuum Workstation-on, lásd B Melléklet, **Fehler! Textmarke nicht definiert..** oldal.

17. **Az előmelegített PyroMark Q24 Plate Holder segítségével melegítse fel a mintákat tartalmazó PyroMark Q24 Plate-et 2 percig 80 C°-ra.**
18. **Vegye le a PyroMark Q24 Plate-et a meleg plate tartóról és helyezze a másik PyroMark Q24 Plate Holder-re, ami szobahőmérsékleten (15-25 C°) volt tartva és hagyja, hogy a minták 10-15 perc alatt szobahőmérsékletűre hűljenek.**
19. **Folytassa ezzel "5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása ", 26. oldal.**

5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása

A protokoll leírja a PyroMark Gold Q24 reagensek előkészítését és betöltését a PyroMark Q24 Cartridge-ba, valamint egy PyroMark Q24 futás elindítását és leállítását. A futtatás beállításáról részletes leírást a *PyroMark Q24 User Manual*-ban talál.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A Pre Run információs riport, ami a futási beállításoknál a „Tools” menüben található (lásd “ 1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal), információt ad arról, hogy mennyi nukleotid, enzim és szubsztrát puffer szükséges egy specifikus futáshoz.

Kezdés előtti teendők

- Kapcsolja be a PyroMark Q24 készüléket. A bekapcsoló gombot a készülék hátsó oldalán találja.

Procedúra

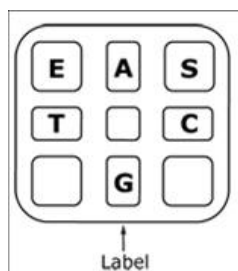
1. **Oldja fel a fagyasztva-szárított enzim és szubsztrát mixeket is 620 µl vízben (H₂O, tartozék).**
2. **Az összekeveredés érdekében forgassa meg óvatosan a csövet.**
Ne vortexelje!

A biztos beoldódás érdekében hagyja a csövet szobahőmérsékleten (15-25 C°) 5-10 percig. Győződjön meg róla, hogy az oldat ne legyen zavaros, mielőtt a PyroMark Q24 Cartridge-ba tölti. Ha nem használja fel azonnal a reagenseket, tegye jégre* vagy hűtőbe.

3. **Biztosítsa, hogy a reagensek és a PyroMark Q24 Cartridge elérje a környezeti hőmérsékletet (20-25 C°).**
4. **Fordítsa a PyroMark Q24 Cartridge-ot a címkes oldalával magafelé.**
5. **Töltse fel a PyroMark Q24 Cartridge-ot a szükséges mennyiségű nukleotidokkal, enzim és szubsztrát mixekkel a 4. Ábrának megfelelően.**

Vigyázzon, hogy ne kerüljön buborék a cartridge-ba a pipetázáskor.

* Amikor vegyszerekkel dolgozik, mindig viseljen megfelelő köpenyt, eldobható gumikesztyűt és védőszemüveget. További információkért olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS), amelyek a termék forgalmazójától szerezhetők be.



4. Ábra. A PyroMark Q24 Cartridge felülnézeti képe. A jelölések az egyes reagens tartó csöveknek megfelelőek. A futási beállítások „Tools” menüjében található Pre Run információs riport alapján, mérje be a megfelelő mennyiségű enzim mix-et (E), szubsztrát mix-et (S) és nukleotidokat (A, T, C, G).

6. **Nyissa ki a cartridge kaput, helyezze be a feltöltött reagens cartridge-ot a jelzett oldalával kifelé. Tolja be teljesen a cartridge-ot, majd nyomja le.**
7. **Biztosítsa, hogy a vonal legyen látható a cartridge előtt és zárja a kaput.**
8. **Nyissa ki a plate-tartó keretet és helyezze a plate-et a fűthető blokkra.**
9. **Zárja a plate-tartó keretet és a készülék fedelét.**
10. **Tegye a futási file tartalmú USB eszközt a készülék elején lévő portba.**
Megjegyzés: Ne vegye ki az USB eszközt a futás befejezése előtt.
11. **Válassza a „Run” parancsot a főmenüben (az érintőképernyő ▲ és ▼ gombjaival), majd nyomja meg az „OK”-t.**
12. **Válassza ki a futási file-t az érintőképernyő ▲ és ▼ gombjaival.**
Megjegyzés: A mappa tartalmának megtekintéséhez válassza ki a mappát és nyomja meg a „Select”-et. Az előző nézethez nyomja meg a „Back”-ot.
13. **Ha kiválasztotta a futási file-t, a futás elindításához nyomjon „Select”-et.**
14. **Ha a futás befejeződött és a készülék megerősítette, hogy a futási file-t az USB eszközre mentette, nyomjon „Close”-t.**
15. **Húzza ki az USB eszközt.**
16. **Nyissa fel a készülék fedelét.**
17. **Nyissa ki a cartridge kaput és vegye ki a reagens cartridge-ot, úgy hogy először emelje fel, majd húzza kifelé.**
18. **Zárja a kaput.**
19. **Nyissa ki a plate-tartó keretet és vegye ki a plate-et a fűthető blokkról.**
20. **Zárja le a plate-tartó keretet és a készülék fedelét.**
21. **Dobja ki a plate-et és tisztítsa ki a cartridge-ot a mellékelt terméklapon található utasítások alapján.**
22. **Elemesse a futást a “6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése”, 28. oldal alapján.**

6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése

A protokoll leírja a NRAS futás mutáció elemzését a PyroMark Q24 szoftverrel.

Procedúra

1. Helyezze be a számítógép USB portjába a feldogozott futási file-t tartalmazó USB eszközt.
2. Windows Explorert használva helyezze el a futási file-t a számítógépen.
3. Nyissa meg a futási file-t a PyroMark Q24 Software AQ módjában, úgy hogy a „File” menüből kiválasztja az „Open”-t, vagy úgy hogy kettőt klikkel a file-ra (☑) az egyszerűsített keresőben.
4. Ellenőrizzük, hogy az A-csúcs redukciós faktor (Analysis Parameters fül a Analysis Setup fül alatt) 0.86-ra van beállítva az NRAS Codon 61-es vizsgálathoz.
5. Hogy analizáljuk a futást és legyen egy összképünk az eredményekről klikkeljünk az egyik analízis gombra.



Minden well analizálása



Csak a kiválasztott well analizálása.

Az elemzett eredmények (allél frekvenciák) és a minőségbiztosítás a Pyrogram[®] vonal variábilis pozíciója felett látható. További információért kérjük, nézze meg a *PyroMark Q24 kézikönyvet*.

6. **Riportkészítéshez válassza az „AQ Full Report”-ot vagy az „AQ Analysis Results”-ot a „Reports” menüben.**

A leggyakoribb mutációk mind a három vizsgált NRAS kodonra a 35. nukleotidnál (második bázis a 12. kodonban), a 38. nukleotidnál (második bázis a 13. kodonban) valamint a 182. nukleotidnál (második bázis a 61. nukleotidnál) találhatóak. Ezért a standard „Sequence to Analyze”-a, amit meghatározott az Analysis Setup-ban, felismeri a mutációkat ebben a pozícióban (lásd A Melléklet, 41. oldal). Ha a minta tartalmaz egy mutációt a 34., a 37., a 181., vagy a 183. nukleotidnál, a „Sequence to Analyze” átírható úgy, hogy elemezze a mutációt ebben a pozícióban is, ahogy az A Melléklet írja.

A humán NRAS gén 12/13 kodon és 61 kodon mutációk gyakoriságának naprakész adatai elérhetőek a Sanger Institute honlapjáról:

www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Megjegyzés: Az értékelhető eredményekhez ajánlott a 30 RLU alatti egyes csúcsmagasság. A vizsgálat beállításnál legyen 30 RLU a „megfelelő minőség csúcsmagassága” (*PyroMark Q24 User Manual* és A Melléklet).

Megjegyzés: Az allélkvantifikálás értékelésére és dokumentálására az „AQ Analysis Results”-ot kell használni. A számok a Pyrogram-ban kerekített értékek és nem mutatnak pontos kvantifikációt.

Megjegyzés: A Pyrogramot mindig össze kell vetni a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. A mért csúcsnak egyeznie kell a hisztogram oszlop magasságával.

A 35., a 38. nukleotidnál vagy a 182. nukleotidnál detektálható mutációt nem mutató minták, vagy „Check” illetve „Failed” minőségű minták újbóli elemzése.

Kiemelten ajánlott elemezni minden mintát, amelyben nem mutatott ki mutációt a standard „Sequence to Analyze” a 35., a 38. vagy a 182. nukleotidban, valamint azokat a mintákat amelyek „Check” vagy „Failed” minőségi értéket kaptak. A „Check” vagy „Failed” minőségi érték utalhat mutációra a 35., 28. és a 182. nukleotidhoz képest eltérő pozíciókban, csúcsmagasság eltéréseket okozva a referencia diszpenzációknál. Például egy csúcs megjelenése az első három diszpenzáció során a 12/13-as kodonban azt mutatja, hogy a 34. nukleotidnál (12. kodon) mutáció van.

Újbóli elemzéshez és a 34., 37. nukleotid mutációinak detektálásához az „Analysis Setup”-ban változtassa meg a „Sequence to Analyze”-t **GNTGNTGTTGGGAAAAGC**-ről **NGTNGTGTGGGAAAAGC**-re. Kiklikeljen az „Apply”-ra, majd a „To All”-ra, ha az „Apply Analysis Setup” ablak megjelenik.

Újbóli elemzéshez és a 181. nukleotid mutációinak detektálásához változtassa meg a „Sequence to Analyze” beállításánál a következő szekvenciát: **CNAGAAGAGTA**, erre: **VAAGAAGAGTA**

Újbóli elemzéshez és a 183. nukleotid mutációinak detektálásához változtassa meg a „Sequence to Analyze” beállításánál a szekvenciát, erre: **CANGAAGAGTA**. Kiklikeljen az „Apply”-ra, majd a „To All”-ra, ha az „Apply Analysis Setup” ablak megjelenik.

Megjegyzés: A „Sequence to Analyze” megváltoztatása után biztosítsa, hogy az egy csúcsnyi küszöbérték magasság legyen beállítva 30 RLU-ra.

Megjegyzés: Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogram oszlop magasságával, nem magyarázhatók ritka vagy váratlan mutációval, akkor ez nem lehet alapja a mutációs státusz megítélésének. Futtassa újra a mintát.

Az eredmények értékelése

Az analízis eredményeinek értékelése és az alacsony-szintű mutációk detektálása

Az összehasonlítás, valamint a háttér szint ellenőrzése miatt kiemelten ajánlott metilátlan kontroll DNS vizsgálata minden futás alkalmával. A mért gyakoriság a kontroll minta esetén kisebb vagy egyenlő, mint az üres minta határértéke (LOB).

Minden mintát meg kell vizsgálni a detekció határértékével kapcsolatban (LOD, lásd 8. Táblázat) és a következőképpen kell értékelni.

- Mutációs gyakoriság $<$ LOD: Vad típus
- Mutációs gyakoriság \geq LOD és \leq LOD + 3% egység: Lehetséges alacsony-szintű mutáció
- Mutációs gyakoriság $>$ LOD + 3% egység: Mutáció

A jelzett, lehetséges, alacsony gyakoriságú mutációt hordozó minták csak akkor tekinthetők pozitívnak, ha konfirmáltuk egy metilátlan kontroll DNS minta duplikált újrafuttatásával. Mindkét duplikátum eredménye \geq LOD és nem egyezik a kontroll mintával. Egyéb esetben vadtypusként kell kezelni.

A LOB feletti gyakoriság a kontroll mintában, egy általánosnál magasabb háttérszintet ad az adott futás során, amely az allékvantifikálásra lehet hatással, különösen alacsony mutációs szinteken. Ekkor a gyakoriság LOD (8. Táblázat) és LOD+3% egység közötti és nem lehet alapja a mutációs státusz elbírálásának. Futtassa újra a mintát egy lehetséges alacsonyszintű mutációval.

Megjegyzés: Tumoros beteg esetében egy kezelési döntés sosem alapulhat csupán az NRAS mutációs státuszán.

8. Táblázat. A LOB és LOD értékek meghatározzák a specifikus mutációt

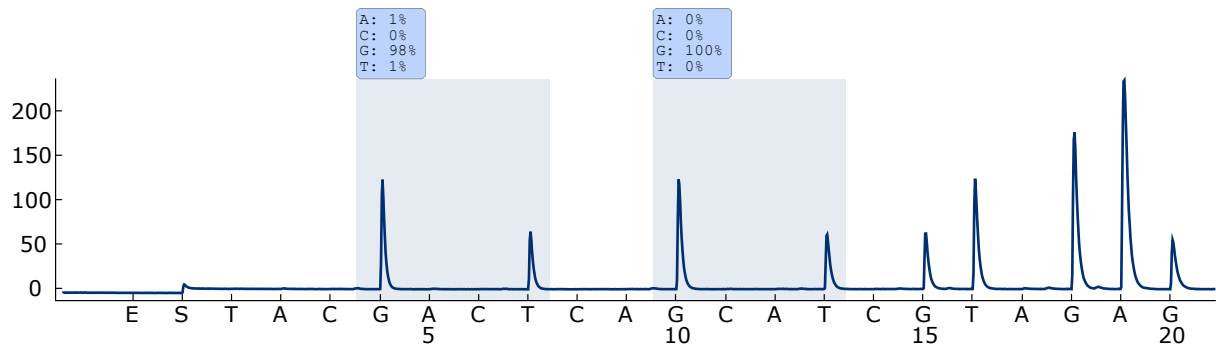
Nukleinsav csere	Aminosav csere	LOB (% egység)	LOD (% egység)	COSMIC ID* (V42)
kodon 12 (GGT)				
AGT	G12S	1.4	3.4	563
TGT	G12C	0.6	2.5	562
CGT	G12R	0.4	2.4	561
GAT	G12D	1.8	3.8	564
GTT	G12V	3.8	8.8	566
GCT	G12A	0.5	2.5	565
kodon 13 (GGT)				
AGT	G13S	1.2	3.2	571
TGT	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
CGT	G13R	0.3	2.3	569
GAT	G13D	0.8	2.8	573
GTT	G13V	0.0	2.0 (5) [†]	574
GCT	G13A	0.8	2.8	575
kodon 61 (CAA)				
AAA	Q61K	4.1	6.7	580
CGA	Q61R	0.8	2.2	584
CTA	Q61L	0.7	2.1	583
CAT	Q61H	0.4	1.8	585
CAC	Q61H	5.4	8.0	586
CAG	Q61Q	2.1	5.8	587

* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer értékei, elérhető a Sanger Institute honlapjáról: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

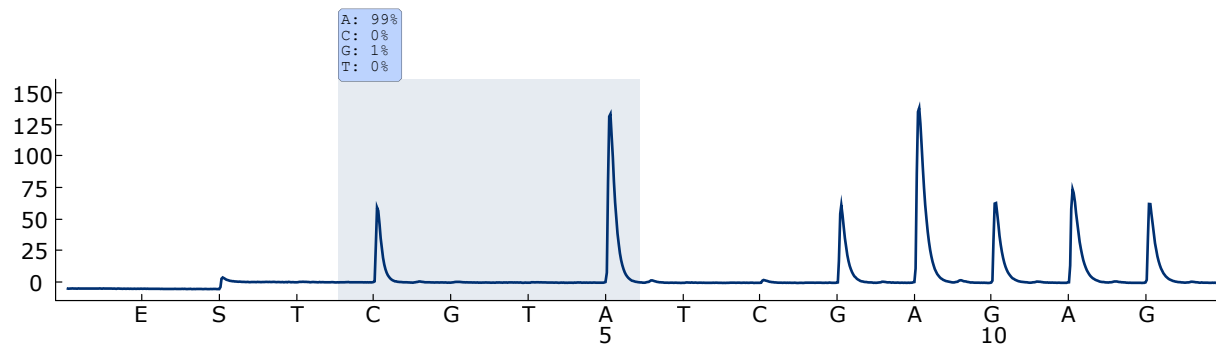
[†] A legalacsonyabb mutációs szint a mintában \geq LOD gyakoriságot eredményez.

Reprezentatív eredmények

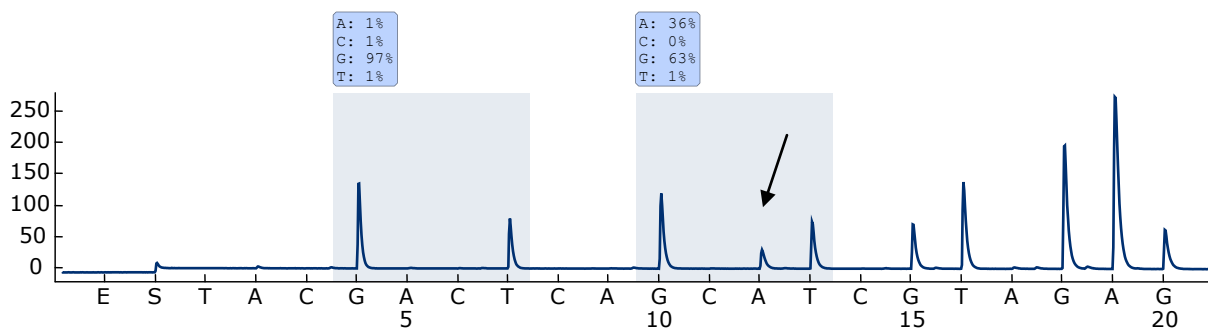
Reprezentatív Pyrogram eredmények a 5-9. Ábrákon.



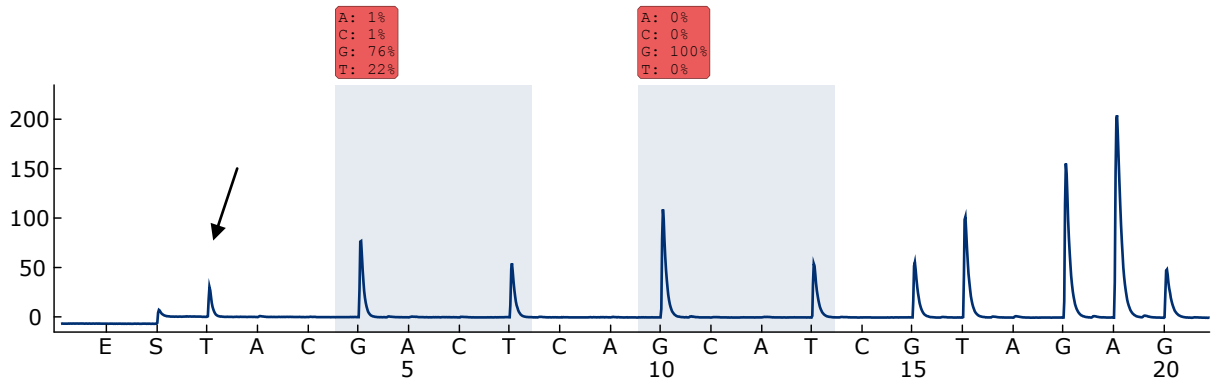
5. Ábra. Pyrogram lenyomat, a 12-es és 13-as kodonra vad genotípust hordozó minta elemzését követően.



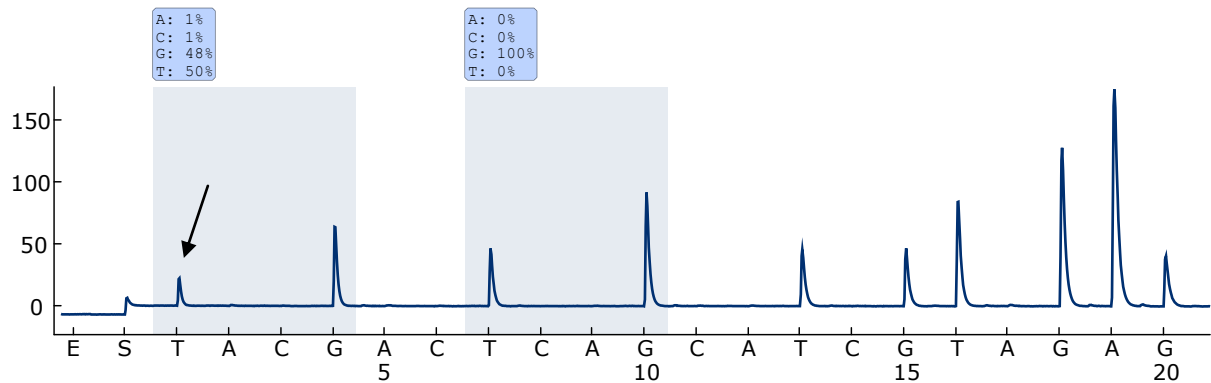
6. Ábra. Pyrogram lenyomat, a 61-es kodonra vad genotípust hordozó minta elemzését követően.



7. Ábra. Pyrogram lenyomat, a 12-es kodon, 2-es bázisánál GGT → GAT mutációt hordozó minta elemzését követően (a 35. nukleotid nyíllal jelölt) a „Sequence to Analyze”-al GNTGNTGTTGGGAAAAGC.



8. Ábra. Pyrogram lenyomat, a 12-es kodon, 1-es bázisánál GGT→ TGT mutációt hordozó minta elemzését követően (a 34. nukleotid nyíllal jelölt), ahol a “Sequence to Analyze” GNTGNTGTTGGGAAAAGC a 12-es kodon 2-es bázisát célozza (35. nukleotid). A piros szín jelöli, hogy ez a szekvencia nem várt és ellenőrzést igényel.



9. Ábra. Pyrogram lenyomat és eredmény, a 8. Ábra mintájának újra történő elemzését követően. A GGT→ AGT mutáció újra lett elemezve a “Sequence to Analyze” NGTNGTGTGGGAAAAGC által a 12-es kodon 1-es bázisát célozva (34. nukleotid).

Hibaelhárítási útmutató

Ez a rész segíthet megoldani a felmerülő problémákat. További információkért lásd a Technical Support Center Gyakran Ismételt Kérdések lapját:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN Technical Services kutatói mindig örömmel válaszolnak bármilyen kérdésére, akár információkkal vagy protokollokkal kapcsolatban ezt a kézikönyvet illetően, akár a sample and assay technologies témakörben (elérhetőségeket a hátoldalon talál, vagy látogasson el a: www.qiagen.com-ra).

Megjegyzés: A készülékre vonatkozó általános hibaelhárítást a *PyroMark Q24 User Manual*-ban találja.

Megjegyzések és javaslatok

Jel a detektálása a templát nélküli mintában (negatív kontroll)

- | | |
|------------------------------|---|
| a) Csövek közötti keresztzaj | Egy cső jele detektálható a szomszédos csőben. Kerülje el, hogy nagy jelintenzitású minta kerüljön a templát nélküli minta mellé. |
| b) PCR szennyeződés | Használjon steril, szűrős pipetta hegyet. Tárolja és csomagolja a mintákat, a kontrollokat és az amplikonokat külön a PCR reagensektől. |

Gyenge vagy váratlan szekvenciák

- | | |
|-------------------------------|--|
| a) Gyenge minőségű genomi DNS | Az alacsony minőségű genomi DNS okozhatja a PCR sikertelenségét. A PCR minták vizsgálatához használjon elektroforézis technikát (pl.: QIAxcel [®] rendszert, vagy agaróz gélelektroforézist). |
|-------------------------------|--|

„Check” vagy „failed” eredmény

- | | |
|--|---|
| a) Alacsony csúcsmagasság | PCR összemérés- vagy Pyroszekvenálás előtti mintapreparálás során bekövetkező hiba eredményez alacsony csúcsokat. Végezzen funkció tesztet a szűrő szondákkal és cserélje ki ha kell.

„Check” figyelmeztetéskor figyelmesen vesse össze a Pyrogram-ot a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. Ha a mért csúcs megegyezik a hisztogram oszlop magasságával az eredmény érvényes. Más esetben javasolt újra futtatni a mintát. |
| b) Mutáció nem található a „Sequence to Analyze” során | Állítsa be a sequence to analyze-t a vizsgálati beállításban (lásd A Melléklet, 41. oldal) és elemezze újra a futást. |

Megjegyzések és javaslatok

- c) Váratlan ritka mutáció A „Check” vagy „failed” minőség értékelést okozhat egy nem várt csúcs mintázat. Ez jelezhet egy váratlan mutációt, amely nem lett elemezve a plug-in report által. Ezek a minták analizálhatóak manuálisan a PyroMark Q24 Software használatával, a nem várt mutációknak megfelelően.
- d) Nagy csúcsmagasság eltérésre vonatkozó figyelmeztetés egy diszpenzációnál A Pyrogram-ot figyelmesen össze kell vetni a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogram oszlop magasságával és nem magyarázhatóak ritka mutációkkal, javasolt újra futtatni a mintát.

Magas háttér

- a) A nukleotidok nem megfelelő tárolása Tárolja a nukleotidokat 2-8 C° között. A -15 és -25 C° közötti tárolás háttér növekedését okoz.
- b) A minták Pyroszekvenálási analízis előtti túl rövid hűtése Hagyja a mintákat a PyroMark Q24 Plate Holder-en szobahőmérsékleten (15-25 C°) 10-15 percig. Ne rövidítse le a hűtési időt.
- c) A cartridge szennyeződése Óvatosan tisztítsa a cartridge-ot, a terméklapnak megfelelően. Tárolja a cartridge-ot portól és fénytől védve.

Nincs jel a pozitív kontrollban (metilálatlan kontroll DNS)

- a) Elégtelen enzim vagy szubsztrát mix a csövekben Biztosítsa a PyroMark Q24 Cartridge feltöltését a „Tools” menüben található „Pre Run Information”-nak megfelelően.
- b) A reagenseket nem megfelelően tárolta vagy hígította Készítse elő a PyroMark Q24 Gold reagenseket az „5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 26. oldal alapján.
- c) PCR vagy minta preparálási hiba PCR összemérés-, PCR készülék programozás- vagy Pyroszekvenálás előtti mintapreparálás során bekövetkező hiba következménye, hogy nincs jel. Végezzen funkció tesztet a szűrő szondákkal a PyroMark Q24 User Manual alapján és cserélje ki ha kell. Ismételje meg a PCR-t és a Pyroszekvenálási elemzést.

Minőségellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített Minőség Menedzsment Rendszere szerint, a *therascreen* NRAS Pyro Kit minden lot. számára tesztelve van az előre meghatározott specifikációkra, hogy biztosítsák a folyamatos termék minőséget.

Korlátozások

A diagnosztikai eredményeket értelmezni kell más klinikai és laboratóriumi leletekkel kapcsolatba.

A felhasználó felelős az összes laboratóriumban használt folyamat validált teljesítményéért, amelyeket a QIAGEN teljesítmény vizsgálata nem fed le.

Teljesítmény jellemzők

Az üres minta határértéke és a detektálás határa

Az üres minta határait (Limit of blank – LOB), illetve a detektálási határokat (Limit of detection – LOD) számos mutációra meghatározták plazmid keverékek segítségével (9. Táblázat). Mind a LOB, mind a LOD a Laboratóriumi Szabványok Intézet (CLSI) EP17-A Irányelve „A detektálási határok és kvantifikálási szabályok meghatározására vonatkozó protokoll; minősített irányelv”-ben leírt ajánlások alapján lettek meghatározva. α és β hibák (hibás negatív és hibás pozitív) lettek 5%-ra beállítva.

A LOB értékek a vad típusú mintával kapott mért frekvenciát fejezik ki. A LOD értékek a legalacsonyabb pozitívnek minősíthető jelet (mért frekvencia) képviselik egy adott mutációra.

GGT → TGT és GGT → GTT mutáció a 13-as kodonban

Ennél a mutációnál, az üres mérések konzisztensen közel voltak a 0 % egységhez egy nem Gauss-eloszlást eredményezve. LOD így egy másik módszerrel lett meghatározva a CLSI EP17-A Irányelv alapján. 2% egységre lett beállítva a legalacsonyabb jel az alapvonal felett, amely jelzi a mutáció (LOD) jelenlétét ezekben a pozíciókban, ami egyértelműen az üres mérés 95-dik százaléka felett van. Amikor egy olyan mintát elemeztünk, amelynek a mutációs szintje a 9. táblázat zárojeles részével megegyező mutációs szintű, az eredmények 95%-a (n=72) olyan jelet szolgáltatott, amelyet pozitívnak lehetett minősíteni (\geq LOD).

9. Táblázat. LOB és LOD értékek meghatározzák a specifikus mutációt

Nukleinsav csere	Aminosav csere	LOB (% egység)	LOD (% egység)	COSMIC ID* (V47)
kodon 12 (GGT)				
AGT	G12S	1.4	3.4	563
TGT	G12C	0.6	2.5	562
CGT	G12R	0.4	2.4	561
GAT	G12D	1.8	3.8	564
GTT	G12V	3.8	8.8	566
GCT	G12A	0.5	2.5	565
kodon 13 (GGT)				
AGT	G13S	1.2	3.2	571
TGT	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
CGT	G13R	0.3	2.3	569
GAT	G13D	0.8	2.8	573
GTT	G13V	0.0	2.0 (5) [†]	574
GCT	G13A	0.8	2.8	575
kodon 61 (CAA)				
AAA	Q61K	4.1	6.7	580
CGA	Q61R	0.8	2.2	584
CTA	Q61L	0.7	2.1	583
CAT	Q61H	0.4	1.8	585
CAC	Q61H	5.4	8.0	586
CAG	Q61Q	2.1	5.8	587

* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer értékei, elérhető a Sanger Institute honlapjáról: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† A legalacsonyabb mutációs szint a mintában \geq LOD gyakoriságot eredményez.

Megjegyzés: Az értékek meghatározásához olyan futtatások lettek alapul véve, amelyekben a vadtypust vagy mutált szekvenciát hordozó plazmid keverékek szolgáltak templákként a PCR amplifikációhoz.

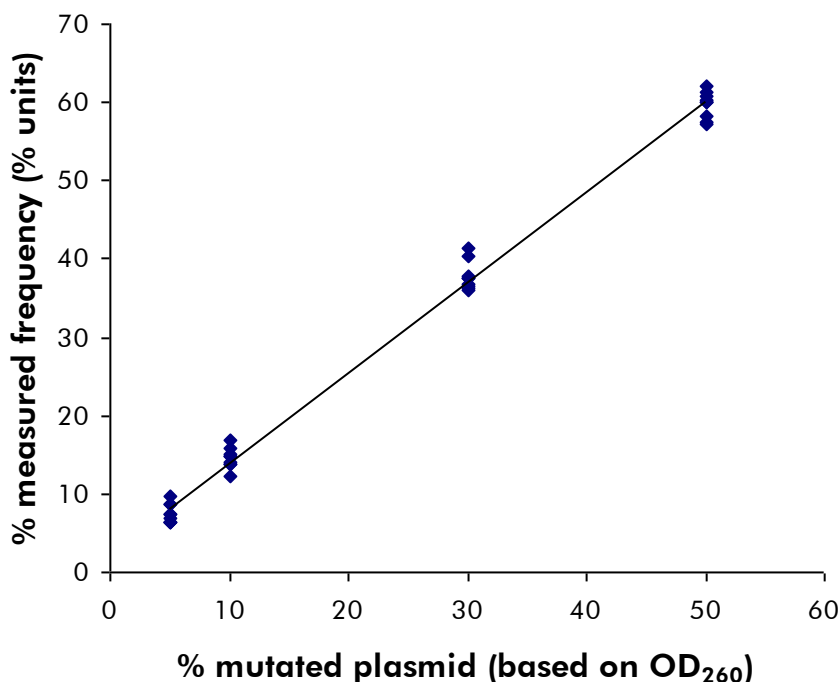
Javasolt, hogy a metódus teljesítményt konfirmáljuk a laboratóriumban.

Linearitás

A linearitás meghatározásánál a vadtypust vagy mutáns szekvenciát hordozó plazmidok lettek összekeverve a 12 és 13 kodon GGT>GAT mutációk esetében valamint a 61 kodon CAA>CGA esetében. A plazmidok, különböző mennyiségekben lettek összekeverve, annak érdekében, hogy a következő négy mutációs szinteket adják (5, 10, 30, és 50%). Az egyes keveréket három különböző LOT számú theascreen NRAS Pyro kit-el elemezték három Pryszekvenáló futással, mindet három ismétléssel.

Az eredmények (n=9 minden egyes mutációs szintben) meghatározása a CLSI EP6-A Irányelve „Kvantitatív mérési folyamatok linearitásának becslése: statisztikai megközelítés; jóváhagyott irányelv”-ben leírtaknak megfelelően történt és az Analyse-it[®] Software v.2.21-el (Analyse-it Software, Kft., UK) lettek kielemezve és a 10. Ábrán vannak bemutatva a 12 kodon GGT>GAT mutációra.

Az eredmények lineárisak voltak egy megengedett 5% egység nem-linearitásban a tesztelt 5-50% mutációs szint tartományban. Hasonló eredményt kaptunk



10. Ábra. A 12. kodon GGT → GAT mutációjának linearitása

Precízió

A precíziós adatok által meghatározhatjuk a vizsgálatok teljes variabilitásának összegét. Három különböző szinten lett meghatározva a fent említett plazmid keverékekkel, három ismétléssel.

A folyamatosságot (assay-közi és batch-közi variabilitás) a linearitás meghatározására szolgáló adatok alapján számolták ki (három futás ugyanazon a napon a *therascreen* NRAS Pyro Kit három különböző LOT-jával). A közbelső precízió (inter-laboratórium variabilitás) három különböző napon, három különböző futásban lett meghatározva egy laboron belül, váltakozó operátorral. A PyroMark Q24 készüléken folytak a vizsgálatok és a *therascreen* NRAS Pyro Kit-ek LOT-jaival. A reprodukálhatóság (inter-laboratórium variabilitás) két különböző futásból lett kiszámolva egy külső és egy belső laboratóriumba a *therascreen* NRAS Pyro Kit különböző LOT-jaival.

A precíziós becslések a mért mutációs frekvenciák szórásából vannak kifejezve % egységben (10. táblázat). A folyamatosság, a közbelső precízió, és a reprodukálhatóság a GGT>GAT mutáció 12 kodonjában 1.2–1.9, 1.0–2.0 volt, és 1.3–3.1 % egység, egyenként, a mért 5–50% mutációs szinten. Hasonló eredmények születtek a GGT>GAT mutációkra a 13 kodonban és a CAA>CGA –re a 61 kodonban.

10. Táblázat: A 12 Kodon GGT>GAT mutációjánál precíziója*

% mutált plazmid [†]	Folyamatosság		Közbelső precízió		Reprodukálhatóság	
	Átlag	SD	Átlag	SD	Átlag	SD
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

* Minden adat % egységben.

[†] OD₂₆₀ mérések alapján. SD: Szórás. (n=9 a folyamatosság és közbelső precízió esetén, n=12 reprodukálhatóság esetén).

Diagnosztikai értékelés

A *therascreen* NRAS Pyro Kit kiértékelése a Sanger szekvenálással összehasonlítva történt. A DNS izolálás 100 formalinban–fixált parafinba–ágyazott (FFPE) prospektív csontvelő tumor mintákból történt és analizálva lett a 12./ 13. kodon illetve 61 kodon mutációira.

A tesztelési DNS izolálásához QIAamp DNA FFPE Tissue Kit volt használva és az analízis a *therascreen* NRAS Pyro Kit-tel történt a PyroMark Q24-en valamint a sanger szekvenálás ABI 3130 Genetic Analyzer-al.

A 100 vizsgált minta közül 97 mintára meghatározható volt a mutáció státusza a sanger szekvenálással a 12./ 13. kodon illetve 61 kodonra. A *therascreen* NRAS Pyro Kit 97 illetve 98 minta mutációs státuszát volt képes meghatározni a 12./ 13. kodon illetve 61 kodonra egymásután.

A 100-ból négy minta esetében a 12 és 13 kodonban mutációt detektált a sanger szekvenálás. Ezekből kettőben a mutációs státusz reprodukálható volt az *therascreen* NRAS Pyro kit-el, kettőben pedig nem jelentkezett mutáció. Az eredményeket a 11 és 12 táblázat illusztrálja. A 61 kodonban semmilyen mutáció nem volt detektálható.

Kivéve azokat a mintákat, amelyek nem mutattak egyezést a sanger szekvenálás és a *therascreen* NRAS Pyro Kit 98% és 100% hasonlóságot mutatott a 12/13 és 61-es kodonokban (11 és 12 táblázat).

11. Táblázat: Elemzett csontvelő minták eredménye a 12/13 kodonban

		Sanger szekvenálás			Összes
		Mutáns	Vadtípus	Ismeretlen	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutáns	2	0	0	2
	Vad típus	2	90	3	95
	Ismeretlen	0	3	0	3
	Összes	4	93	3	100

12. Táblázat: Elemzett csontvelő minták eredménye a 61 kodonban

		Sanger szekvenálás			Összes
		Mutáns	Vadtípus	Ismeretlen	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutáns	0	0	0	0
	Vadtípus	0	95	3	98
	Ismeretlen	0	2	0	2
	Összes	0	97	3	100

Megjegyzés: Az összes teljesítményjellemző meghatározásához indított futtatás esetében a jel 30 RLU fölött volt, mint megszokott módon 10 ng DNS-nél, amelyet formalinban–fixált parafinba–ágyazott (FFPE) szövetből izoláltak.






Referenciák

A QIAGEN egy széleskörű naprakész online adatbázissal rendelkezik a QIAGEN termékeivel kapcsolatos tudományos publikációkról. Az átfogó

keresőfunkció által könnyen megtalálja a keresett cikket egy egyszerű kulcsszó beütésével vagy a szűkítő funkció segítségével – applikációra, kutatási területre, címre, stb. vonatkozólag.

A referenciák teljes listájáért kérjük, keresse fel a QIAGEN Referencia Online Adatbázist a www.qiagen.com/RefDB/search.asp címen vagy konzultáljon a QIAGEN Technical Services-vel, vagy a helyi disztribútorával.

Szimbólumok

 Σ	N> tesztre elegendő reagenst tartalmaz
	Eddig elhasználandó
IVD	In vitro diagnosztikai orvosi készülék
REF	Katalógus szám
LOT	Lot. szám
MAT	Anyagszám
COMP	Komponensek
CONT	Tartalmaz
NUM	Szám
NaOH	Nátrium-hidroxid
GTIN	Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)
	Hőmérsékletkorlátozás
	Gyártó
	Nézze át a használati utasítást

Kontaktinformáció

Technikai segítségért illetve további információért kérjük, keresse fel a Technical Support Központot: www.qiagen.com/Support, vagy keresse a QIAGEN Technical Service Osztályt vagy helyi disztribútorát (lásd hátsó oldal vagy www.qiagen.com).

A Melléklet: *therascreen* NRAS Pyro vizsgálat beállításai

Mielőtt első alkalommal futtatnánk a *therascreen* NRAS Pyro Assay-t, be kell állítanunk az assay file-t. Állítsuk be az assay-t az NRAS Kodon 12/13 és Kodon 61-re a PyroMark Q24 Software segítségével, az alábbiak szerint.

Procedúra

NRAS 12-es és 13-as kodon

A1. Klikkeljen  az eszköztárba és válassza ki a „New AQ Assay”-t.

A2. Az alábbi szekvenciát írja be a „Sequence to Analyze” részhez.

GNTGNTGTTGGGAAAAGC

A legfrekvenciáltabb mutáció a 12-es és 13-as kodonban, a 35-ös és 38-as nukleotidnál (második pozíció) lesz detektálva a „Sequence to Analyze” segítségével.

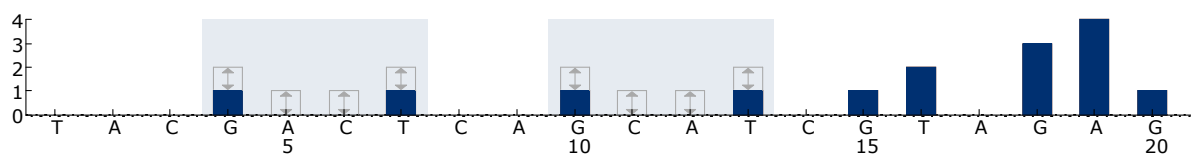
A „Sequence to Analyze” megváltoztatható a futás után, annak érdekében, hogy más mutációkat is tudjunk elemezni más pozíciókban.

A 34-es és 37-es nukleotidnál (első pozíció) lévő mutáció elemzéséhez, változtassa meg a „Sequence to Analyze”-t a következő szekvenciára
NGTNGTGTTGGGAAAAGC

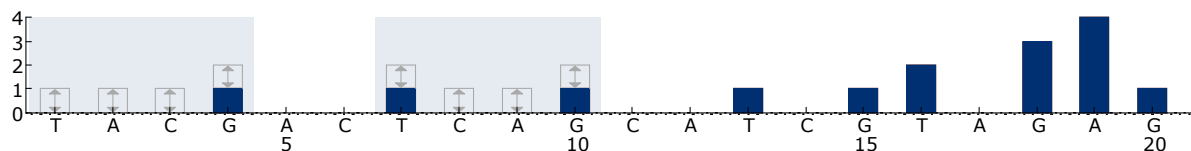
Megjegyzés: Állítása be az egy csúcsmagasság küszöbértéket 30 RLU-re.

A3. Manuálisan adja hozzá a következő „Dispensation Order”-t.

TACGACTCAGCATCGTAGAG



11. Ábra. A 12-es kodon (35-ös nukleotid) és a 13-as kodon (38-as nukleotid) hisztogram-ja, ahol a „Sequence to Analyze” GNTGNTGTTGGGAAAAGC.



12. Ábra. A 12-es kodon (34-ös nukleotid) és a 13-as kodon (37-as nukleotid) hisztogram-ja, ahol a „Sequence to Analyze” NGTNGTGTTGGGAAAAGC.

- A4. Kiklikkeljen az „Analysis Parameters”-re és emelje a „Peak Height Threshold – Required peak height for passed quality”-t 30-ra.**
- A5. Kiklikkeljen  az eszköztárba, mentse az assay-t, mint „NRAScodon 12+13”.**

NRAS 61-es kodon

A1. Kiklikkeljen  az eszköztárba és válassza ki a „New AQ Assay”-t.

**A2. Az alábbi szekvenciát írja be a „Sequence to Analyze” részhez.
CNAGAAGAGTA**

A legfrekvenciáltabb mutáció a 61-es kodonban, a 183-as nukleotidnál (második pozíció) lesz detektálva a „Sequence to Analyze” segítségével.

A „Sequence to Analyze” megváltoztatható a futás után, annak érdekében, hogy más mutációkat is tudjunk elemezni más pozíciókban.

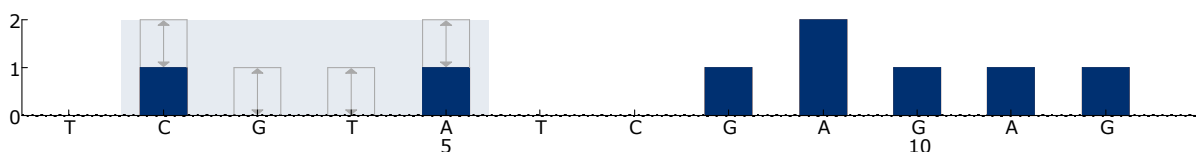
A 181-es nukleotidnál (első pozíció) lévő mutáció elemzéséhez, változtassa meg a „Sequence to Analyze”-t a következőre

VAAGAAGAGTA

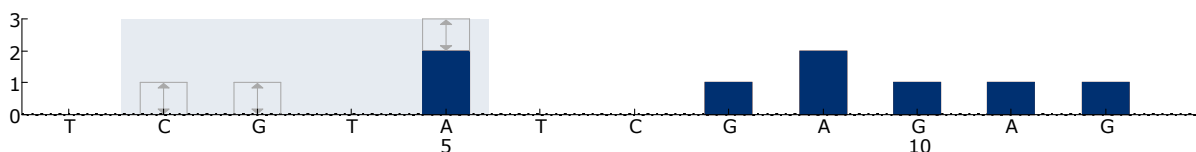
A 183-es nukleotidnál (harmadik pozíció) lévő mutáció elemzéséhez, változtassa meg a „Sequence to Analyze”-t a következő szekvenciára
CANGAAGAGTA

Megjegyzés: Állítsa be az egy csúcsmagasság küszöbértéket 30 RLU-re. Ellenőrizze, hogy az A-csúcs redukciós faktora is 0.86-ra van állítva az NRAS 61 kodonjának vizsgálatához.

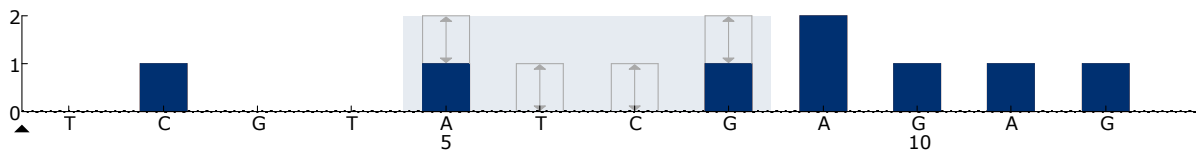
**A3. Manuálisan adja hozzá a következő „Dispensation Order”-t.
TCGTATCGAGAG**




13. Ábra. A 61-es kodon (182-as nukleotid) és hisztogram-ja, ahol a „Sequence to Analyze” **CNAGAAGAGTA.**




14. Ábra. A 61-es kodon (181-as nukleotid) és hisztogram-ja, ahol a „Sequence to Analyze” **VAAGAAGAGTA.**



15. Ábra. A 61-es kodon (183-as nukleotid) és hisztogram-ja, ahol a „Sequence to Analyze” CANGAAGAGTA.

- A4 Klickeljen az „Analysis Parameters”-re és emelje a „Peak Height Threshold – Required peak height for passed quality”-t 30-ra.
- A5. Klickeljen az “Analysis Parameters”-re, és csökkentse a “A-peak reduction factor:”-t 0.86-ra.
- A6. Klickeljen  az eszköztárba, mentse az assay-t, mint „NRAScodon 61”.

B Melléklet: A szeméttároló és a szemetes tartályok kiürítése

WARNING 	Veszélyes Vegyi Anyagok A vákuum munkaállomásnál használt Denaturation Solution nátrium hidroxid tartalmú, ami szemre és bőrre irritáló hatású. Mindig viseljen biztonsági szemüveget, kesztyűt és köpenyt. Egy felelős személynek (pl.: laboratórium menedzser) muszáj megtennie az elengedhetetlen elővigyázatossági lépéseket, hogy biztosítsa a munkahely biztonságát és azt, hogy a műszert kezelő személyzet ne legyen kitéve semmilyen veszélyes toxikus anyagnak (vegyi vagy biológiai), mint az a alkalmazandó Anyagbiztonsági Adatlapon (SDSs) vagy OSHA*-ban, ACGIH†-ban vagy COSHH‡-ban le van írva. A gázok és veszélyes hulladékok szelőzését a nemzeti, állami és helyi egészségügyi és biztonsági szabályozások és törvények alapján kell megoldani.
---	---

* OSHA: Foglalkozási Biztonság és Egészségügyi Apparátus (Amerikai Egyesült Államok)

† ACGIH: Ipari Higiéniai Kormányzat Amerikai Kongresszusa (Amerikai Egyesült Államok)

‡ COSHH: Veszélyes és Egészségügyi Anyagok Kontrollja (Egyesült Királyság)

A laboratóriumi hulladékok elhelyezésével kapcsolatban vegye figyelembe a központi, állami és helyi környezetvédelmi szabályozásokat.

Kezdés előtti fontos szempont

- Ez a protokoll magas tisztaságú vízminőséget igényel (Milli-Q 18.2 MΩ x cm, www.millipore.com, vagy vele egyenértékűt).

Procedúra

- B1. Biztosítsa, hogy a vákuum eszköz ne legyen vákuum alatt. A vákuum legyen lekapcsolva (Off) és a vákuum pumpa is legyen ki kapcsolva.**
- B2. Ürítse ki a tartályokban lévő anyagokat.**
- B3. Öblítse ki a tartályokat magas vízminőségű tiszta vízzel vagy cserélje ki azokat, ha szükséges.**
- B4. Ürítse ki a hulladéktárolót.**
Megjegyzés: A fedő a gumicső leválasztása nélkül is levehető.
- B5. Ha a vákuum munkaállomást tisztítani kell (például por vagy kiömlés miatt), kérjük, kövesse a PyroMark Q24 kézikönyvben leírtakat.**

Megrendelési Információk

Termék	Tartalom	Kat. szám
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	24 reakcióra a PyroMark Q24-es rendszeren: kit (24) Seq primerek, PCR primerek, metilálatlan kontroll DNS, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad koncentrátum, PyroMark binding puffer, PyroMark Annealing puffer, PyroMark denaturációs oldat, PyroMark mosó puffer, Enzim mix, szubsztrát mix, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP és H ₂ O	971530
PyroMark Q24 MDx	Szekvencia alapú detekció platform 24 parallel minta piroszekvenálására	9001513
PyroMark Q24	Szekvencia alapú detekció platform 24 parallel minta piroszekvenálására	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vákuum munkaállomás (220V) 24 minta parallel elkészítésére PCR termékből egyszálú templáttá	9001517* 9001515 [†]
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vákuum munkaállomás (220 V) 24 minta parallel elkészítésére PCR termékből egyszálú templáttá	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Applikációs szoftver	9019063
PyroMark Q24 Software	Analízis Szoftver	9019062
Kiegészítők		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 csöves szekvenáló-reakció plate	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Nukleotidok és reagensek diszpenziójára szükséges patronok	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Újrahasználható filter próbák a PyroMark vákuum munkaállomás Q96 és Q24-hez	979010

* UK csak.

[†] a Világ többi részén.

Termék	Tartalom	Kat. szám
PyroMark Control Oligo	A rendszer installáció ellenőrzésére	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	A rendszer teljesítmény konfirmációjára	979304
Kapcsolódó termékek		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNS prep-nek: 50 QIAamp MinElute® oszlop, Proteinase K, Pufferek, Gyűjtőcsövek (2ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 DNS prep-nek: reagens patronok (szövet), Eldobható filter hegyek, eldobható hegytartók, minta csövek (2 ml), elúciós csövek (1,5 ml), puffer G2, Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 prep-nek: QIAamp Mini Spin oszlop, pufferek, reagensek, csövek, VacConnectors	61104

A legfrissebb licenc információért és termék specifikus jogi nyilatkozatért, kérjük, keresse a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvet, vagy használati utasítást. A QIAGEN kit kézikönyvek és használati útmutatók megtalálhatóak a www.qiagen.com címen vagy lekérhetőek a QIAGEN Technical Service-től vagy a helyi disztribútorától.

Szándékosan üresen hagyva

Az alkalmazó országoknak:

A TERMÉK MEGVÁSÁRLÁSÁVAL A VÁSÁRLÓNAK LEHETŐSÉGE VAN HASZNÁLNI EZT DIAGNOSZTIKAI SZOLGÁLTATÁS TELJESÍTÉSÉRE HUMÁN IN VITRO DIAGNOSZTIKÁBAN. MÁS JOGGAL, ÁLTALÁNOS SZABADALOMMAL VAGY EGYÉB LICENCEL NEM RUHÁZ FEL A VÁSÁRLÁS, MINT EZ A SPECIFIKUS JOG A HASZNÁLATRA.

Védjegyek: QIAGEN[®], QIAamp[®], QIAxcel[®], BioRobot[®], CoralLoad[®], EZ1[®], HotStarTaq[®], MinElute[®], Pyro[®], Pyrogram[®], PyroMark[®], Pyrosequencing[®], *therascreen*[®] (QIAGEN Group); ABI[™] (Life Technologies Corporation); Analyse-it[®] (Analyse-it Software, Ltd., UK); Milli-Q[®] (Millipore Corporation); Sepharose[®] (GE Healthcare); Variomag (Florida Scientific Services, Inc.); Windows[®] (Microsoft Corporation).

Meghatározott Licenc Megállapodás

A Therascreen NRAS Pyro Kit vásárlója, vagy használója tudomásul veszi az alábbi feltételeket:

1. A *therascreen* NRAS Pyro Kit csak a *therascreen NRAS Pyro Kit Kézikönyv* alapján használható és csak a kitben lévő alkatrészek használhatóak hozzá. A QIAGEN semmilyen licencet nem biztosít arra az esetre, ha nem kizárólag a kit-ben található alkatrészek kerülnek felhasználásra vagy más alkatrészekkel kerülnek egyesítésre, mint a *therascreen NRAS Pyro Kit Kézikönyvében* leírtak, illetve a www.qiagen.com oldalról letölthető további protokollokban leírtak.
2. A QIAGEN - határozottan megállapított licenc-en kívül - semmilyen garanciát nem vállal arra, hogy a kit és a felhasználása egy harmadik fél jogait nem sérti.
3. A kit és komponenseinek a licence-e egy felhasználásra szólnak és nem újrahaznosítható, felújítható vagy eladható.
4. A QIAGEN visszautasít bármilyen egyéb licenc-et, ami más mint a határozottan közölt.
5. A kit vevője illetve felhasználója hozzájárul ahhoz, hogy nem tesz semmilyen lépést és nem segít elő másokat semmilyen olyan lépésben, ami a fenti tiltott tevékenységekhez vezethet. A QIAGEN ezen Meghatározott Licenc Megállapodás bármilyen megszegése esetén jogi útra léphet bármely bíróságon és vissza fogja kapni a vizsgálati és bírósági költségeket, beleértve az ügyvédi díjat, bármilyen esetben érvényesül ez a Meghatározott Licenc Megállapodás vagy azok a szellemi tulajdonjogok, amik a Kit-hez és/vagy az összetevőikhez kapcsolódnak.

Frissebb licenc részletekért keresse fel a www.qiagen.com oldalt.

© 2015 QIAGEN, minden jog fenntartva.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)