

Instrukcja Zestawu *therascreen*[®] NRAS Pyro[®]



Wersja 1

IVD

Do użytku diagnostycznego in vitro

CE

REF

971530

HB

1061828EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3 **MAT** 1061828PL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Firma QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii oczyszczania próbek i ich analizy, umożliwiając izolację i wykrywanie zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane, wysokiej jakości produkty i usługi zapewniają sukces na każdym etapie - od chwili pobrania próbki do uzyskania wyniku.

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:

- oczyszczania DNA, RNA i białek
- analizy kwasów nukleinowych i białek
- badań nad mikroRNA oraz RNAi
- automatyzacji technologii obróbki próbek i ich analizy

Naszą misją jest umożliwienie Wam osiągnięcia znakomitych i przełomowych wyników w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Przeznaczenie Zestawu	5
Streszczenie i Wyjaśnienia	5
Zasada Procedury	6
Kontrole	7
Materiały Dostarczone	8
Zawartość zestawu	8
Materiały Wymagane, ale Niedostarczone	10
Zalecane wytrząsarki płytek	11
Ostrzeżenia i Uwagi	11
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	11
Uwagi ogólne	12
Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami	13
Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami	13
Procedura	14
Izolacja DNA	14
Protokół 1: Konfiguracja eksperymentu na systemie PyroMark Q24	15
Protokół 2: PCR przy użyciu odczynników zawartych w zestawie <i>therascreen</i> NRAS Pyro	17
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do kulek Streptavidin Sepharose High Performance	20
Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24	22
Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24	26
Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24	28
Interpretacja Wyników	30
Interpretacja wyników detekcji i analizy mutacji występujących na niskim poziomie	30
Rozwiązywanie problemów	34
Kontrola Jakości	36
Ograniczenia	36
Charakterystyka Wydajności	37
Limit dla próby ślepej (LOB) oraz limit detekcji (LOD)	37

Liniowość	39
Precyzja	40
Ocena diagnostyczna	40
Literatura	42
Symbole	42
Informacje Kontaktowe	43
Dodatek A: Przygotowanie reakcji <i>therascreen</i> NRAS Pyro	44
Załącznik B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory	47
Informacje Dotyczące Zamawiania	48

Przeznaczenie Zestawu

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro to test *in vitro* oparty na detekcji sekwencji nukleotydowej przy pomocy technologii Pirosekwencjonowania®, służący do ilościowego wykrywania mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu NRAS w genomowym DNA pochodzącym z próbek tkanek ludzkich.

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro ma na celu dostarczenie klinicytom informacji pomagających w wyborze pacjentów z chorobą nowotworową, którzy mogliby odnieść korzyść z terapii anty-EGFR. Do zastosowania diagnostycznego *in vitro*.

Do użytku tylko z systemem PyroMark® Q24. Systemy PyroMark Q24 obejmują następujące składowe:

- Urządzenie PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Stacja próżniowa (Vacuum Workstation) PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (wersja 2.0) i oprogramowanie PyroMark Q24 MDx (wersja 2.0).

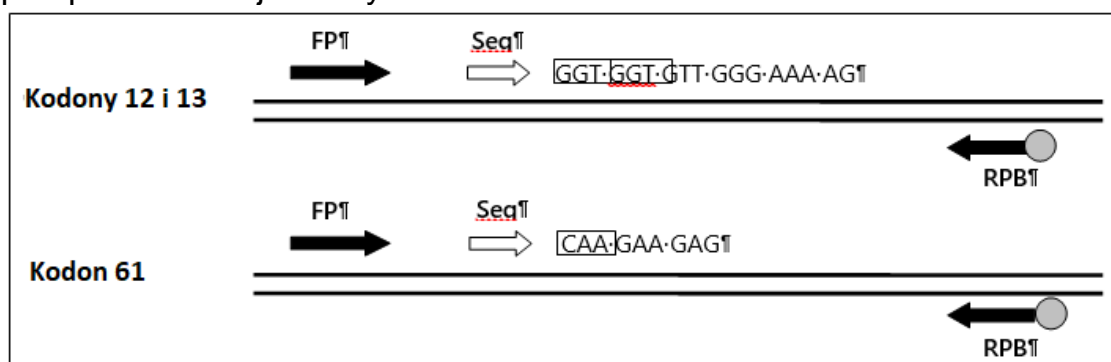
Produkt jest przeznaczony do użytku przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie procedur diagnostycznych *in vitro*, technik biologii molekularnej i Systemu PyroMark Q24.

Streszczenie i Wyjaśnienia

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro służy do ilościowych pomiarów mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu NRAS.

Zestaw składa się z dwóch testów (Rys. 1): jednej do wykrywania mutacji w kodonach 12 i 13 i drugiego do wykrywania mutacji w kodonie 61.

Dwa regiony amplifikuje się oddzielnie za pomocą PCR a następnie sekwencjonuje określony region. Sekwencje otaczające określone pozycje służą jako piki normalizacyjne odniesienia do oceny ilościowej i jakościowej przeprowadzonej analizy.



Rysunek 1. Ilustracja testu NRAS. Wskazana sekwencja jest analizowaną sekwencją dla próbki typu dzikiego. **FP**: Startery PCR przednie; **RPB**: Startery PCR wsteczne (B oznacza biotynylację); **Seq**: Startery sekwencyjne.

Sekwencjonowanie dla obu analiz przebiega w kierunku do przodu.

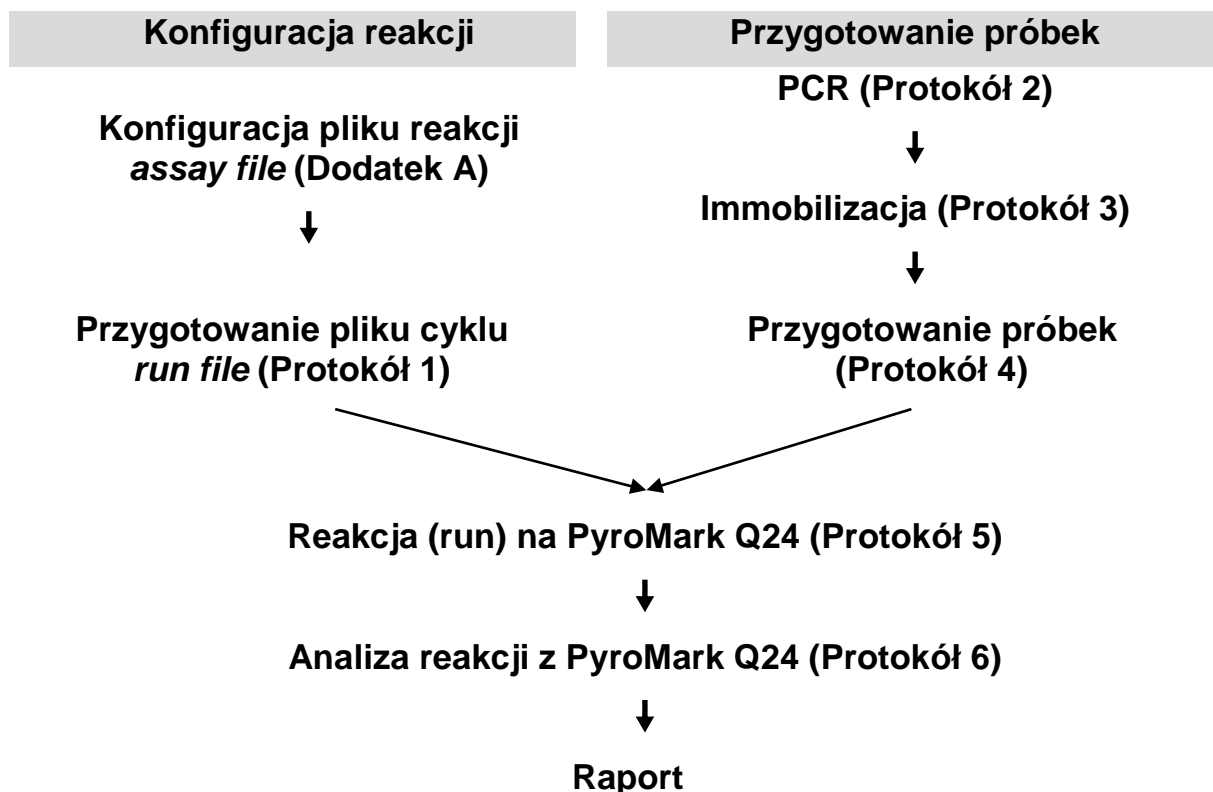
Produkt składa się z mieszaniny starterów PCR i starterów do sekwencjonowania dla każdego testu. Startery dostarczane są w roztworze. Każda próbówka zawiera 24 µl każdego startera lub mieszaniny starterów.

Zasada Procedury

Poniższy schemat pracy ilustruje procedurę testu. Po PCR, w którym stosowano startery kompatybilne z kodonami 12/13 i kodonem 61, uzyskane amplikony są unieruchamiane na kulkach Streptavidin Sepharose® High Performance. Przygotowuje się jednoniciowe DNA, a odpowiadające mu startery do sekwencjonowania przyłączają się do DNA. Próbki są następnie analizowane na aparacie PyroMark Q24 przy użyciu zaprogramowanych wcześniej protokołów ('assay setup files' oraz 'run file'). Sekwencja do analizy (Sequence to Analyze) może być dostosowana do wykrywania rzadkich mutacji po zakończeniu reakcji (Patrz 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 28).

Uwaga: Schemat pracy został nieznacznie zmodyfikowany w porównaniu z wersją R1 Instrukcji obsługi Zestawu *therascreen* NRAS Pyro (patrz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 22).

Schemat procedury *therascreen* NRAS Pyro



Kontrole

Niemetylowane kontrolne DNA jest zawarte w zestawie jako kontrola pozytywna dla reakcji PCR i sekwencjonowania. To kontrolne DNA ma genotyp typu dzikiego w regionach sekwencjonowanych przy użyciu tego zestawu i jest wymagany do odpowiedniej interpretacji wyników i identyfikacji rzadkich mutacji (patrz 'Interpretacja Wyników', str. 30). Do każdej analizy należy włączyć próbkę z niemetylowanym kontrolnym DNA dla każdego cyklu pirosekwencjonowania.

Ponadto kontrola negatywna (bez matrycowego DNA) powinna być włączona do każdej reakcji PCR dla co najmniej jednego testu.


Materiały Dostarczone

Zawartość zestawu

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro (pudełko 1/2)

<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	(24)
Nr katalogowy	971530
Liczba reakcji	24
Seq Primer NRAS 12/13 (starter sekwencyjny)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (starter sekwencyjny)	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13 (starter PCR)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (starter PCR)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (mieszanka do PCR)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (barwnik, koncentrat 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Niezmetylowane DNA kontrolne)	100 µl

Bufory i odczynniki *therascreen* (pudełko 2/2)

Bufory i odczynniki <i>therascreen</i>		
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (roztwór denaturujący)		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (bufor płuczący)		25 ml
Enzyme Mixture (mieszanina enzymów)		1 fiolka
Substrate Mixture (mieszanina substratów)		1 fiolka
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Instrukcja w języku angielskim		1

* Zawiera wodorotlenek sodu.

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

Podczas pracy z chemikaliami należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS), dostępnymi u dostawcy produktu.

- Zestaw do izolacji DNA (patrz 'Izolacja DNA', strona 14)
- Pipety (regulowane)*
- Sterylne końcówki pipet (z filtrami do nastawiania reakcji PCR)
- Mikrowirówka nastołowa*
- Termocykler* i odpowiednie probówki do PCR
- Sefarozą opłaszczoną streptawidyną (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (nr kat. 9001513 lub 9001514)*†
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (nr kat. 9019063 lub 9019062)†
- Płytki PyroMark Q24 (nr kat. 979301)†
- Kartridże PyroMark Q24 (nr kat. 979302)†
- Robocza stacja próżniowa PyroMark Q24 (nr kat. 9001515 lub 9001517)*†
- Wytrząsarki mikroplytek* do immobilizacji na kulkach sefarozytowych
- Blok grzewczy* zdolny do osiągnięcia temperatury 80°C
- 24-dołkowe płytki lub stripy PCR
- Zatyczki do stripów
- Woda wysokiej czystości (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm lub równoważna)
Uwaga: W zestawie dostarczono wystarczającą ilość wody potrzebnej do PCR, immobilizacji DNA i do rozpuszczenia mieszaniny enzymów i substratów; do rozcieńczenia buforu myjącego PyroMark 10x potrzebna jest dodatkowa woda o wysokiej czystości
- Etanol (70%)‡

* Upewnij się, że urządzenia zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

† Oznakowanie CE-IVD zgodnie z Dyrektywą EU 98/79/EC. Pozostałe wymienione produkty nie posiadają oznakowania CE-IVD zgodnie z Dyrektywą UE 98/79/EC.

‡ Nie używaj zdenaturowanego alkoholu, który może zawierać niepożądane substancje, jak metanol lub metylenoketon.

Zalecane wytrząsarki płytek

Wytrząsarki płytek zalecane do użycia z Zestawem *therascreen* NRAS Pyro przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wytrząsarki płytek zalecane do użycia z Zestawem *therascreen* NRAS Pyro

Producent	Produkt	Numer kat.
Eppendorf	Thermomixer comfort (model podstawowy)	5355 000.011
	Termoblok do MTP	5363 000.012
	Adapter płytkowy do probówek PCR 96 x 0,2ml do wkładania w blokach do płytek mikrotitracyjnych	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Ostrzeżenia i Uwagi

Do diagnostyki in vitro

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami bezpieczeństwa materiałów (SDS) dostępnymi w internecie w postaci plików PDF pod adresem www.qiagen.com/safety, gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty dla każdego zestawu oraz poszczególnych komponentów zestawów QIAGEN.

Następujące oświadczenia ostrzegawcze odnoszą się do komponentów Zestawu *therascreen* NRAS Pyro.

PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący)



Ostrzeżenie! Działa drażniąco na skórę. Wywołuje poważne podrażnienia oczu. Może powodować korozję metali. Należy wycierać rozlany odczynnik, aby zapobiec uszkodzeniom materiałów. Przechowywać tylko w oryginalnym opakowaniu. Noś rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.

PyroMark Enzyme Mixture (mieszanka enzymów)



Zawiera: (R*,R*)-1,4-Dimerkaptobutano-2,3-diol; kwas octowy. Niebezpieczeństwo! Powoduje podrażnienia skóry. Wywołuje poważne podrażnienia oczu. **PO DOSTANIU SIĘ DO OCZU:** przemywaj wodą przez kilka minut. Jeśli masz szkła kontaktowe wyjmij je jeśli to możliwe i nadal płucz. W przypadku kontaktu lub wątpliwości: dzwoń do centrum zatruc lub do lekarza/szpitala. Zdejmij zanieczyszczoną odzież i oczyść przed ponownym użyciem. Noś rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.

PyroMark Substrate Mixture (mieszanka substratów)



Zawiera: kwas octowy. Ostrzeżenie! Powoduje podrażnienia skóry. Wywołuje poważne podrażnienia oczu. Jeśli podrażnienie oczu nie ustępuje poszukaj pomocy medycznej. Zdejmij zanieczyszczoną odzież i oczyść przed ponownym użyciem. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

Uwagi ogólne

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę na następujące aspekty.

- Aby uzyskać optymalne wyniki, wymagane jest dokładne postępowanie zgodnie z instrukcją użytkownika. Rozcieńczanie odczynników w inny sposób niż opisane w tym podręczniku nie jest zalecane i może spowodować utratę wydajności.
- Procedura wykonania analiz została nieznacznie zmodyfikowana (patrz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 22) w porównaniu z wersją R1 Instrukcji Zestawu *therascreen* NRAS Pyro.
- Składniki tego produktu są wystarczające do przeprowadzenia 24 reakcji w maksymalnie 5 niezależnych seriach.
- Używaj sterylnych końcówek do pipet z filtrami (do konfiguracji PCR).
- Przechowuj i ekstrahuj materiały dodatnie (próbki, kontrole dodatnie i amplikony) oddzielnie od pozostałych odczynników i dodawaj je do mieszaniny reakcyjnej w odseparowanym przestrzennie pomieszczeniu.

- Przed rozpoczęciem należy dokładnie rozmrozić wszystkie składniki w temperaturze pokojowej (15-25°C).
- Po rozmrożeniu, wymieszaj składniki (kilkakrotnie pipetuj lub przez worteksowanie pulsacyjne) i krótko zwirowuj.
- Wyniki nieudanej analizy nie są podstawą do oceny statusu mutacji.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro jest dostarczany w dwóch pudełkach. Zestaw *therascreen* NRAS Pyro (pudełko 1/2) jest dostarczany na suchym lodzie. PyroMark PCR Master Mix, koncentrat CoralLoad, niezmetylowane kontrolne DNA i wszystkie startery powinny być przechowywane w temperaturze -30°C do -15°C zaraz po dostarczeniu.

Bufoiry i odczynniki w Zestawie *therascreen* NRAS Pyro (pudełko 2/2) zawierające bufoiry, mieszaninę enzymów, mieszaninę substratów, dATP α S, dCTP, dGTP i dTTP (odcynniki do analizy met. pirosekwencjonowania) są dostarczane na wkładkach chłodzących. Po dostarczeniu składniki te należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Aby zminimalizować utratę aktywności, zaleca się przechowywanie zarówno mieszaniny enzymów, jak i mieszaniny substratów w dostarczonych próbkach.

Rekonstruowany enzym i mieszaniny substratów są trwałe przez co najmniej 10 dni w temperaturze 2-8°C. Rekonstruowany enzym i mieszaniny substratów można zamrozić i przechowywać w próbkach w temperaturze od -30°C do -15°C. Zamrożone odcynniki nie powinny być poddawane więcej niż 3 cyklom zamrażania i rozmrażania.

Uwaga: Nukleotydów nie należy zamrażać.

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro jest stabilny do daty ważności zestawu, pod warunkiem przechowywania w tych warunkach.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Materiałem do badań jest ludzkie DNA wyekstrahowane z krwi lub z próbek tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). Nie wolno używać próbek od osób poddawanych leczeniu heparyną. Nie należy używać próbek krwi pobranych do próbek zawierających heparynę jako antykoagulant. Heparyna zaburza reakcję PCR.

Procedura

Izolacja DNA

Wydajność systemu określono przy wykorzystaniu Zestawu EZ1® DNA Tissue oraz Zestawu QIAamp® DNA FFPE Tissue służących do izolacji ludzkiego DNA z próbek nowotworu utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). Dla Zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini, wydajność została określona z wykorzystaniem próbek krwi zdrowego dawcy, częściowo z dodatkiem komórek nowotworowych.

Zestawy firmy QIAGEN® przedstawione w Tabeli 2 są zalecane do izolacji DNA z wymienionych typów ludzkich próbek przy wykorzystaniu Zestawu *therascreen* NRAS Pyro. Izolację DNA należy przeprowadzić zgodnie z odpowiednimi instrukcjami dla poszczególnych zestawów.

Tabela 2. Zestawy do izolacji DNA zalecane do użycia z Zestawem *therascreen* NRAS Pyro

Rodzaj próbki	Zestaw do izolacji kwasów nukleinowych	Numer kat. (QIAGEN)
Tkanka FFPE	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Krew	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Postępuj zgodnie z instrukcją dla próbek FFPE. Zestaw EZ1 DNA Tissue powinien być użytkowany wraz z aparatem EZ1 Advanced (nr kat. 9001410 lub 9001411) i kartą EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018298) lub z aparatem EZ1 Advanced XL (nr kat. 9001492) i kartą EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018700), bądź też z aparatem BioRobot® EZ1 (nr kat. 9000705; już niedostępny w ofercie) oraz kartą EZ1 DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9015862).

† Oznakowanie CE-IVD zgodne z Dyrektywą EU 98/79/EC.

Protokół 1: Konfiguracja eksperymentu na systemie PyroMark Q24

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- Jeśli jest to wymagane, LOB (limit próby ślepej) może zostać potwierdzony przez użycie próbki dzikiej i wygenerowanie całej płytki wyników. Szczegółowe informacje znajdują się w Wytycznych CLSI EP17-A 'Protokół dot. określania granicy detekcji i granicy oceny ilościowej; zatwierdzone wytyczne'.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Skonfiguruj analizę (Assay Setup) jak to opisano w Dodatku A. Należy to zrobić tylko raz, przed pierwszym rozpoczęciem analizy Zestawem *therascreen* NRAS Pyro.

Procedura

1. Na pasku narzędzi wybierz .

Zostanie utworzony nowy plik reakcji (run file).

2. Wprowadź parametry reakcji (zobacz 'Parametry reakcji', strona 16).

3. Przygotuj płytkę dodając reakcje dla kodonów 12/13 i kodonu 61 do studzienek odpowiadających próbkom do analizy

Uwaga: Próbka kontroli ujemnej (bez matrycowego DNA) powinna być włączona do każdego testu PCR dla co najmniej jednej reakcji.

Uwaga: Kontrola z niemetylowanym kontrolnym DNA powinna być uwzględniona w każdej analizie każdej reakcji pirosekwencjonowania (patrz 'Kontrole' strona 7).

4. Gdy reakcja jest już zaprogramowana i gotowa do przeprowadzenia na PyroMark Q24, wydrukuj listę wymaganych objętości mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów i nukleotydów oraz konfiguracji płytki. Wybierz 'Pre Run Information' (Informacje przed uruchomieniem) z menu 'Tools' (narzędzia), a kiedy pojawi się raport kliknij .

5. Zamknij plik reakcji i skopiuj go na pamięć USB (dostarczoną z systemem) za pomocą Windows® Explorer.

Wydrukowane informacje mogą być użyte jako wzór przy pipetowaniu próbek na płytkę (patrz 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do kulek Streptavidin Sepharose High Performance', strona 20).

Aby przeanalizować próbki na płytce w systemie PyroMark Q24, zobacz 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 26.

Parametry cyklu

Run name (nazwa reakcji):	Nazwa reakcji zostaje wyświetlona po zapisaniu pliku. Zmiana nazwy pliku zmienia także nazwę reakcji
Instrument method (metoda urządzenia):	Wybierz metodę analizy zapisaną w urządzeniu zgodnie z kartridżem, który będzie używany w reakcji. Patrz instrukcje dostarczone z poszczególnymi zestawami.
Plate ID (identyfikator płytki):	Opcjonalnie: Wprowadź ID płytki PyroMark Q24.
Bar code (kod kreskowy):	Opcjonalnie: Wprowadź numer kodu kreskowego dla płytki lub, jeśli dysponujesz czytnikiem kodów kreskowych podłączonym do komputera, kliknij na pole tekstowe dla kodu kreskowego i zeskanuj kod.
Kit and Reagent ID (identyfikator zestawu i odczynnika):	Opcjonalnie: Wprowadź numer partii (lot) Zestawu <i>therascreen</i> NRAS Pyro który będzie używany. Numer partii znajduje się na etykiecie. Uwaga: Zalecamy wprowadzanie zarówno numeru partii odczynnika jak i zestawu, co może być pomocne przy rozwiązywaniu ewentualnych problemów związanych z używanymi odczynnikami.
Run note (notatka do reakcji):	Opcjonalnie: Wprowadź notatkę o zawartości albo celu danej reakcji.

Przypisywanie plików analizy

Aby przypisać plik analizy do dołka reakcyjnego należy:

- Kliknąć pole odpowiadającą wybranemu dołkowi prawym przyciskiem myszy i wybrać 'Load Assay' (załaduj reakcję) z menu kontekstowego.
LUB
- Wybrać odpowiednią reakcję poprzez menu oprogramowania, a następnie zaznaczyć i przeciągnąć ją do wybranego pola odpowiadającego dołkowi.

Każdemu polu studzienki zostaje przyporządkowany kolor odpowiadający określonej analizie.

Wprowadzanie nazw próbek oraz notatek

Aby wprowadzić identyfikator próbki lub notatkę, wybierz komórkę i wprowadź tekst.

Aby edytować identyfikator próbki lub notatkę, wybierz komórkę (zostanie wybrana bieżąca zawartość) lub kliknij dwukrotnie tę komórkę.

Protokół 2: PCR przy użyciu odczynników zawartych w zestawie *therascreen* NRAS Pyro

Protokół ten służy do amplifikacji PCR regionu zawierającego kodon 12 i kodon 13, oraz oddzielnej amplifikacji PCR regionu zawierającego kodon 61 z wykorzystaniem Zestawu *therascreen* NRAS Pyro.

Ważne uwagi przed rozpoczęciem

- Polimeraza DNA HotStarTaq[®] zawarta w PyroMark Master Mix wymaga etapu aktywacji przez 15 minut w 95°C.
- Przygotuj wszystkie mieszaniny reakcyjne w pomieszczeniu odrębnym niż pomieszczenie używane do oczyszczania DNA, dodając matrycę DNA do PCR, analizę produktu PCR lub przygotowanie próbek przed analizą metodą pirosekwencjonowania.
- Używaj jednorazowych końcówek do pipet z filtrami hydrofobowymi, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczeń krzyżowych.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek ze starterami do PCR, zwiruj je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Dostosuj stężenie kontrolnego DNA oraz próbki do 0,4-2 ng/μl, jeśli to konieczne.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne składniki (patrz Tabela 3).

Przed użyciem dobrze wymieszaj.

2. Przygotuj mieszaninę reakcyjną dla każdego zestawu starterów PCR zgodnie z Tabelą 3.

Mieszanina reakcyjna zwykle zawiera wszystkie składniki potrzebne do PCR z wyjątkiem próbki.

Przygotuj większą objętość mieszaniny reakcyjnej niż wymagana dla całkowitej liczby testów PCR, które należy wykonać.

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdego zestawu starterów PCR

Składnik	Objętość/reakcję (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer NRAS 12/13 lub PCR Primer NRAS 61	1,0
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	4,0
Objętość całkowita	20,0

3. Dokładnie wymieszaj mieszaninę reakcyjną i dodaj po 20 µl do każdej próbki PCR.

Nie ma potrzeby trzymania próbek PCR na lodzie, ponieważ polimeraza DNA HotStarTaq jest nieaktywna w temperaturze pokojowej.

4. Dodaj 5 µl matrycy DNA (2-10 ng genomowego DNA) do poszczególnych próbek PCR (patrz Tabela 4) i dokładnie wymieszaj

Uwaga: Próbkę z kontrolą ujemną (bez matrycy DNA) powinna być włączona w każdej konfiguracji PCR dla co najmniej jednego testu.

Uwaga: Należy dołączyć próbkę z niemetylowanym kontrolnym DNA dla każdego testu w każdym cyklu analizy metodą pirosekwencjonowania (patrz 'Kontrole' strona 7)

Tabela 4. Przygotowanie PCR

Składnik	Objętość/reakcję (µl)
Mieszanina reakcyjna	20
Próbka DNA	5
Objętość całkowita	25

5. Zaprogramuj termocykler zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu parametrów opisanych w Tabeli 5.

Tabela 5. Zoptymalizowany protokół reakcji PCR

			Komentarze
Aktywacja wstępna:	15 minut	95°C	Polimeraza DNA HotStarTaq DNA jest aktywowana na tym etapie.
Cykle 3-etapowe:			
Denaturacja	20 sekund	95°C	
Hybrydyzacja	30 sekund	53°C	
Wydłużanie	20 sekund	72°C	
Ilość cykli	42		
Wydłużanie końcowe:	5 minut	72°C	

6. Umieść probówki PCR w termocyklerze i rozpocznij program.
7. Po amplifikacji przejdź do 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do kulek Streptavidin Sepharose High Performance' strona 20.

Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do kulek Streptavidin Sepharose High Performance

Ten protokół służy unieruchomieniu matrycy DNA na kulkach Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) przed analizą na systemie PyroMark Q24.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem pozwól wszystkim niezbędnym odczynnikom na osiągnięcie temperatury pokojowej (15–25°C).

Procedura

1. Delikatnie potrząśnij butelką zawierającą kulki Streptavidin Sepharose High Performance, aby uzyskać jednorodny roztwór.
2. Przygotuj mieszaninę ‘master mix’ do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 6. Przygotuj o 10% większą objętość niż wymagana dla liczby reakcji, które mają być przeprowadzone.

Tabela 6. Mieszanina ‘master mix’ do immobilizacji DNA

Składnik	Objętość/próbkę (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)	40
Woda (H ₂ O, dostarczona)	28
Objętość całkowita	70

3. Dodaj 70 µl mieszaniny ‘master mix’ do dołków 24-dołkowej płytki PCR lub pasków, zgodnie z wcześniej ustaloną konfiguracją reakcji (patrz ‘Protokół 1: Konfiguracja eksperymentu na systemie PyroMark Q24’, strona 15).
4. Dodaj 10 µl biotynylowanego produktu PCR z Protokołu 2 do każdej studzienki zawierającej master mix, jak określono wcześniej w konfiguracji reakcji (patrz ‘Protokół 2: PCR przy użyciu odczynników zawartych w zestawie *therascreen* NRAS Pyro’, strona 17).
Całkowita objętość po dodaniu master mix i produktu PCR powinna wynosić 80 µl na studzienkę.
5. Zaklej płytkę PCR (lub paski) za pomocą zatyczek.
Upewnij się, że nie ma możliwości przeciekania między studzienkami

6. Wytrząsaj płytkę PCR w temperaturze pokojowej (15-25°C) przez 5-10 minut przy 1400 rpm

Na tym etapie przygotuj stację próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) do przygotowania próbek zgodnie z opisem w *Podręczniku Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

7. Przejdź natychmiast do 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 22.

Uwaga: Kulki sefarozy szybko sedymentują. Kulki należy pobierać bezpośrednio po wytrząsaniu.

Jeśli od zakończenia mieszania płytki lub pasków upłynęła więcej niż 1 minuta, należy powtórzyć mieszanie przez 1 minutę przed pobraniem kulek.

Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24

Ten protokół służy do preparatyki jednoniciowego DNA oraz hybrydyzacji starterów sekwencyjnych do matrycy przed rozpoczęciem analizy met. pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek ze starterami sekwencyjnymi zwiń je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Dodaj 2 różne startery sekwencyjne w takiej samej kolejności zgodnej z wcześniej zdefiniowanymi ustawieniami reakcji (run setup) dla używanej płytki (patrz 'Protokół 1: Konfiguracja eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 15) i w zależności od analizowanego regionu (kodony 12 i 13 lub kodon 61).
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem wersji R1 *Instrukcji Zestawu theascreen NRAS Pyro* (krok 18). Nie należy skracać czasu schładzania próbek po inkubacji w 80°C.
- Należy regularnie przeprowadzać test funkcjonalności końcówek filtrujących jak to zostało opisane w *Podręczniku Użytkownika PyroMark Q24* oraz wymieniać je zgodnie z zaleceniami.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Umieść jeden statyw do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) na bloku grzejmym nagrzanym do 80°C bloku grzejmym, aby użyć go w kroku 17 procedury. Drugi statyw trzymaj w temperaturze pokojowej (15–25°C), aby użyć go w kroku 18.
- Bufor płuczący (PyroMark Wash Buffer) jest dostarczany jako koncentrat (10x). Przed pierwszym użyciem rozcieńcz go do stężenia roboczego (1x) poprzez dodanie 225 ml wody o wysokiej czystości do 25 ml koncentratu (celem uzyskania końcowej objętości 250 ml).
- Bufor płuczący w stężeniu roboczym (1x PyroMark Wash Buffer) jest stabilny w temp. 2–8°C do końca oznaczonego terminu ważności.

Procedura

- 1. Rozcieńcz wystarczającą ilość każdego startera sekwencyjnego Seq Primer NRAS 12/13 i Seq Primer NRAS 61 w buforze hybrydyzacyjnym (PyroMark Annealing Buffer) jak przedstawiono w Tabeli 7.**

Przygotuj większą objętość rozcieńczonych starterów sekwencyjnych niż wymagana dla całkowitej liczby próbek do sekwencjonowania (dla wymaganej liczby próbek + jednej dodatkowo).

Tabela 7. Przykładowe rozcieńczenia starterów sekwencyjnych

Składnik	Objętość/próbkę (µl)	Objętość dla 9 + 1 reakcji (µl)
Seq Primer NRAS 12/13 lub Seq Primer NRAS 61	0,8	8
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Objętość całkowita	25	250

- 2. Dodaj 25 µl rozcieńzonego startera sekwencyjnego do każdego dołka na płytce (PyroMark Q24 Plate) zgodnie z wcześniej zdefiniowanymi ustawieniami analizy 'run setup' (patrz 'Protokół 1: Konfiguracja eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 15).**

Trzymaj jeden ze statywów do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) dostarczony wraz ze stacją próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) w temp. pokojowej (15–25°C) i używaj podczas przygotowania i przenoszenia płytki.

- 3. Umieść płytkę PCR (lub paski) z Protokołu 3 oraz płytkę PyroMark Q24 na próżniowej stacji roboczej (Rysunek 2).**

Upewnij się, że płytka jest w tym samym położeniu, co podczas dodawania próbek.



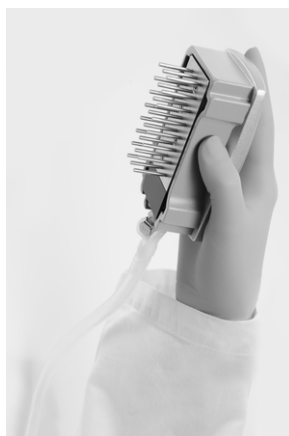
Rysunek 2. Umieszczanie płytki PCR oraz płytki PyroMark Q24 na stacji próżniowej.

4. **Włącz ssanie w narzędziu próżniowym przy pomocy znajdującego się na nim włącznika.**
5. **Ostrożnie zbliż końcówki filtrujące (filter probes) narzędzia próżniowego do dołków płytki PCR (lub pasków) celem zebrania (przyssania) cząsteczek sefarozy zawierających immobilizowaną mRTCę. Przytrzymaj końcówki w tej pozycji przez 15 sekund. Ostrożnie unieś narzędzie próżniowe.**

Uwaga: Kulki sefarozy szybko sedimentują. Ich pobranie musi nastąpić bezzwłocznie po ich wytrząsaniu.

Jeśli od zakończenia wytrząsania płytki (pasków) upłynęła więcej niż 1 minuta, należy powtórzyć wytrząsanie przez 1 minutę przed pobraniem kulek.

6. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 40 ml 70% etanolu (wanienka 1, Rysunek 2). Płucz końcówki filtrujące przez 5 sekund.**
7. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 40 ml roztworu denaturującego (Denaturation Solution; wanienka 2, Rysunek 2). Płucz końcówki filtrujące przez 5 sekund.**
8. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 50 ml buforu płuczącego (Wash Buffer; wanienka 3, Rysunek 2). Płucz końcówki filtrujące przez 10 sekund.**
9. **Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunku 3, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**



Rysunek 3. Narzędzie próżniowe uniesione celem odessania całego płynu z filtrów.

10. **Ostrożnie przenieś narzędzie próżniowe nad płytkę PyroMark Q24 Plate, a następnie wyłącz ssanie przełącznikiem na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off').**
11. **Obniż narzędzie próżniowe tak, aby końcówki filtrujące znalazły się w dołkach płytki PyroMark Q24 Plate zawierających rozcieńczony starter sekwencyjny, a następnie delikatnie poruszaj narzędziem**

próżniowym na boki celem uwolnienia cząsteczek sefarozy do roztworu.

Uważaj, aby nie uszkodzić powierzchni płytki PyroMark Q24 poprzez zadrapanie jej końcówkami filtrującymi.

- 12. Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki z wodą o wysokiej czystości (Rysunek 2) i wytrząsaj przez 10 sekund.**
- 13. Przepłucz końcówki filtrujące poprzez ich zanurzenie w wodzie o wysokiej czystości (Rysunek 2) i włączenie próżni. Przepłucz końcówki ok. 70 ml wody o wysokiej czystości**
- 14. Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunku 3, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**
- 15. Wyłącz ssanie na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off') i umieść je w miejscu spoczynkowym (Parking (P) position).**
- 16. Wyłącz pompę próżniową.**

Uwaga: Na koniec dnia roboczego, wszystkie resztki płynów powinny zostać usunięte, a stacja próżniowa PyroMark Q24 sprawdzona pod kątem zanieczyszczeń (patrz Dodatek B, strona 44).
- 17. Inkubuj płytkę PyroMark Q24 z próbką w temp. 80°C przez 2 minuty używając podgrzanego wcześniej statywu (PyroMark Q24 Plate Holder).**
- 18. Usuń płytkę PyroMark Q24 z podgrzanego statywu i umieść na drugim statywie przechowywanym w temp. pokojowej (15–25°C), aby pozwolić próbkom dojść do temperatury pokojowej w ciągu 10–15 minut.**
- 19. Przejdź do 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 26.**

Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24

Protokół ten przedstawia proces przygotowania i dodawania odczynników PyroMark Gold Q24 do kartridża PyroMark Q24 oraz rozpoczęcie i zakończenie reakcji na aparacie PyroMark Q24. Więcej szczegółów na ten temat zobacz w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Ważna informacja przed rozpoczęciem

- Raport informacyjny dla ustawień reakcji (Pre Run), który można znaleźć w menu 'Tools' (zobacz 'Protokół 1: Konfiguracja eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 15), dostarcza informacji dotyczących objętości nukleotydów, mieszanin enzymów, substratów oraz buforów wymaganych dla danej reakcji.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Włącz aparat PyroMark Q24. Włącznik znajduje się z tyłu aparatu.

Procedura

1. **Rozpuść zliofilizowane mieszaniny enzymów i substratów w 620 µl (każda) wody (H₂O, dostarczona).**
2. **Delikatnie wymieszaj.**

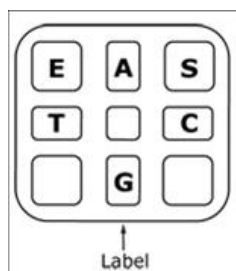
Nie worteksuj!

Aby zapewnić pełne rozpuszczenie mieszaniny, pozostaw ją w temp. pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut. Przed dodaniem do kartridża PyroMark Q24 upewnij się, że roztwór nie jest mętny. Jeśli odczynniki nie mają zostać zużyte natychmiast, umieść probówki na lodzie* lub w lodówce.

3. **Pozwól, aby odczynniki i kartridż PyroMark Q24 osiągnęły temperaturę otoczenia (20–25°C).**
4. **Postaw kartridż PyroMark Q24 etykietą zwróconą w swoją stronę.**
5. **Dodaj do kartridża PyroMark Q24 odpowiednie objętości nukleotydów oraz mieszanin enzymów i substratów, zgodnie z Rysunkiem 4.**

Uważaj, aby nie przenosić pęcherzyków powietrza z końcówek pipet do studzienek kartridża.

* Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami bezpieczeństwa materiałów (SDS), dostępnymi u producentów lub dostawców produktów.




Rysunek 4. Wygląd kartridża PyroMark Q24 z góry. Oznaczenia korelują z oznaczeniami na etykietach odczynników. Dodaj mieszaniny enzymów (**E**), mieszaniny substratów (**S**) oraz nukleotydów (**A**, **T**, **C**, **G**) zgodnie z informacjami zawartymi w raporcie przed-reakcyjnym (pre run information) report w menu 'Tools'.

6. **Otwórz bramkę kartridża w aparacie PyroMark Q24 i wstaw kartridż napełniony odczynnikami z etykietą zwróconą w kierunku operatora. Wsuń kartridż do końca, a następnie dociśnij w dół.**
7. **Upewnij się, że z przodu kartridża jest widoczna linia, po czym zamknij bramkę.**
8. **Otwórz ramkę do blokowania płytki PyroMark Q24 Plate i umieść płytkę na bloku grzejącym.**
9. **Zamknij ramkę do blokowania płytki oraz pokrywę aparatu.**
10. **Podłącz nośnik pamięci USB zawierający plik reakcyjny 'run file' do portu USB znajdującego się w przedniej części urządzenia. Nie usuwaj nośnika pamięci USB przed zakończeniem reakcji.**
11. **W menu głównym wybierz 'Run' (używając przycisków ▲ oraz ▼) i wciśnij 'OK'.**
12. **Wybierz plik reakcji używając przycisków ▲ i ▼ na ekranie. Aby zobaczyć zawartość folderu, wybierz folder i naciśnij 'Select'. Aby wrócić do poprzedniego widoku, naciśnij 'Back'.**
13. **Kiedy plik reakcyjny jest wybrany, naciśnij 'Select', aby rozpocząć reakcję.**
14. **Po skończonej reakcji, gdy aparat wyświetli informację o zapisaniu całej analizy na nośniku pamięci USB, wybierz 'Close'.**
15. **Wyjmij pamięć USB.**
16. **Otwórz pokrywę aparatu.**
17. **Otwórz bramkę zabezpieczającą kartridż i wyjmij go. Należy go pociągnąć lekko w górę, a następnie do siebie.**
18. **Zamknij bramkę.**
19. **Otwórz ramkę zabezpieczającą płytkę i usuń płytkę z bloku grzejącego.**
20. **Zamknij ramkę zabezpieczającą płytkę oraz pokrywę aparatu.**
21. **Usuń płytkę i umyj kartridż zgodnie z zaleceniami zawartymi w instrukcji załączonej do kartridża.**
22. **Dokonaj analizy reakcji zgodnie z opisem w 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 22.**

Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24

Protokół ten przedstawia analizę mutacji zakończonej reakcji NRAS przy użyciu oprogramowania PyroMark Q24.

Procedura

1. **Włóż pamięć USB zawierającą plik reakcyjny do portu USB komputera.**
2. **Przenieś plik reakcyjny z pamięci USB do wybranej lokalizacji w komputerze przy użyciu Eksploratora Windows.**
3. **Otwórz plik run w trybie AQ oprogramowania PyroMark Q24, wybierając 'Open' w menu 'File' lub klikając dwukrotnie ikonę  w przeglądarce skrótów.**
4. **Sprawdź, czy współczynnik 'A-peak reduction factor' (karta Analysis Parameters - parametry analizy) w zakładce Ustawienia Analizy jest ustawiony na 0,86 dla testów NRAS Kodon 61.**
5. **Celem dokonania analizy reakcji i otrzymania kliknij na jeden z przycisków 'Analize'.**



Analiza wszystkich próbek (dołków).



Analiza wybranych próbek (dołków).

Wyniki analizy (częstotliwości alleli) oraz ocena jakościowa są przedstawiane powyżej zmiennej pozycji na wykresie pyrogramu. Więcej szczegółowych informacji na temat analizy przebiegu znajduje się w *Podręczniku Użytkownika Aparatu PyroMark Q24*.

6. Aby wygenerować raport, wybierz 'AQ Full Report' (pełny raport AQ) lub 'AQ Analysis Results' (wyniki analizy AQ) w menu raportów 'Reports'.
Najczęstsze mutacje dla każdego z trzech analizowanych kodonów NRAS znajdują się w nukleotydzie 35 (druga zasada kodonu 12), nukleotydzie 38 (druga zasada kodonu 13) i nukleotydzie 182 (druga zasada kodonu 61). Dlatego standardowa 'Sequence to Analyze' zdefiniowana w konfiguracji analizy odnosi się do mutacji w tych pozycjach (patrz Dodatek A, strona 44). Jeśli próbka zawiera mutację w nukleotydzie 34, nukleotydzie 37, nukleotydzie 181 lub nukleotydzie 183, 'Sekwencja do analizy' może zostać zmieniona w celu analizy statusu mutacji w tych pozycjach, jak opisano w Dodatek A, strona 44.

Zaktualizowane częstotliwości mutacji w ludzkim genie NRAS w kodonach 12/13 i kodonie 61 są dostarczane online przez Sanger Institute na stronie www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Uwaga: Aby uzyskać wiarygodne wyniki, zalecamy, aby pojedyncze wysokości pików były powyżej 30 RLU. Ustaw 30 RLU jako 'required peak height for passed quality' (wymagana wysokość pików spełniająca kryteria jakości) w ustawieniach reakcji (patrz *Instrukcja Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* i Dodatek A).

Uwaga: Raport z wynikami analizy AQ (AQ Analysis Results) powinien być wykorzystany do dokumentacji i interpretacji oceny ilościowej allelu. Liczby przedstawione w pyrogramie są zaokrąglone i nie pokazują dokładnej analizy ilościowej.

Uwaga: Pyrogram powinien zawsze być porównywany z histogramem, który można wyświetlić klikając prawym przyciskiem myszy w oknie Pyrogram. Mierzone piki powinny być zgodne z wysokością słupków histogramu.

Reanaliza próbek bez wykrytych mutacji w nukleotydach 35, 38 lub 182 z oceną jakości 'Check' (sprawdź) lub 'Failed' (niepowodzenie).

Zdecydowanie zalecamy ponowne przeanalizowanie wszystkich próbek bez wykrycia mutacji za pomocą standardowej 'Sequence to Analyze' w nukleotydach 35, 38 lub 182, a także próbek, które otrzymały ocenę jakości 'Check' lub 'Failed'. Oceny jakości 'Check' i 'Failed' mogą wskazywać na mutację w pozycji innej niż nukleotyd 35, 38 lub 182, powodując odchylenia wysokości pików w dozowaniach referencyjnych. Na przykład, pik w którymkolwiek z pierwszych 3 dozowań w teście dla kodonów 12/13 wykazuje, że mutacja jest obecna dla nukleotydu 34 kodonu 12.

Celem reanalizy i wykrycia mutacji w nukleotydach 34 i 37, przejdź do 'Analysis Setup' i zmień 'Sequence to Analyze' z **GNTGNTGTTGGGAAAAGC** na **NGTNGTGTGGGAAAAGC**. Kliknij 'Apply' (zastosuj) i następnie kliknij 'To All' (dla wszystkich), kiedy pojawi się okno 'Apply Analysis Setup'.

Aby ponownie przeanalizować i ukierunkować mutacje w nukleotydzie 181, przejdź do 'Analysis Setup' i zmień 'Sequence to Analyze' z **CNAGAAGAGTA** na **VAAGAAGAGTA**.

Aby ponownie przeanalizować i ukierunkować mutacje w nukleotydzie 183, zmień 'Sequence to Analyze' na **CANGAAGAGTA**. Kliknij 'Zastosuj', a następnie kliknij 'To All' (dla wszystkich), gdy pojawi się okno 'Apply Analysis Setup'.

Uwaga: Po zmianie 'Sequence to Analyze' upewnij się, że próg odcięcia dla pojedynczej wysokości pików jest ustawiony na 30 RLU. Dodatkowo, upewnij się, że współczynnik 'A-peak reduction factor' jest ustawiony na 0,86 dla analizy kodonu NRAS 61.

Uwaga: Jeżeli zmierzone piki nie odpowiadają wysokości słupków histogramu i nie można ich wytłumaczyć rzadkimi lub nieoczekiwanymi mutacjami, zaleca się ponowne puszczenie reakcji dla próbki.

Interpretacja Wyników

Interpretacja wyników detekcji i analizy mutacji występujących na niskim poziomie

Zdecydowanie zaleca się, aby niemetylowane DNA kontrolne było zawarte w każdej analizie dla porównania i jako kontrola dla poziomów tła. Zmierzona częstotliwość próbki kontrolnej powinna być mniejsza lub równa wartości LOB.

Wszystkie próbki należy zbadać w odniesieniu do limitu detekcji (LOD, patrz Tabela 8) i zinterpretować w następujący sposób:

- Częstotliwość mutacji $< \text{LOD}$: typ dziki
- Częstotliwość mutacji $\geq \text{LOD}$ i $\leq \text{LOD} + 3\%$: Potencjalnie rzadka mutacja
- Częstotliwość mutacji $> \text{LOD} + 3\%$: Mutacja

Próbki raportowane jako zawierające potencjalnie mutacje na niskim poziomie mogą być uznane za pozytywne dla mutacji tylko wtedy, gdy zostaną potwierdzone przez powtórzną analizę w duplikacie razem z próbką z niemetylowanym kontrolnym DNA. Wynik obu duplikatów powinien być $\geq \text{LOD}$ i różny od próbki kontrolnej. W przeciwnym razie próbkę należy ocenić jako typ dziki.

Zmierzona częstotliwość powyżej LOB w próbce kontrolnej wskazuje wyższy niż zwykle poziom tła w odpowiednim cyklu, co może wpływać na ocenę ilościową allela, szczególnie w przypadku rzadkich mutacji. W tym przypadku zmierzone częstotliwości w zakresie od LOD (Tabela 8) do LOD + 3% nie są podstawą do oceny statusu mutacji. Zaleca się ponowne testowanie próbek z potencjalnie rzadką mutacją.

Uwaga: Decyzja dotycząca leczenia pacjentów nowotworowych nie może opierać się wyłącznie na statusie mutacji NRAS.

Tabela 8. Wartości LOB oraz LOD ustalone dla konkretnych mutacji

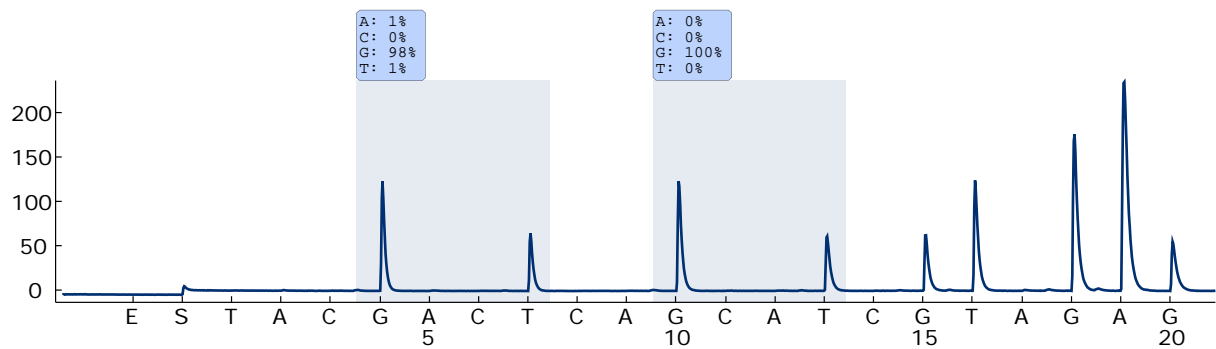
Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V47)
Kodon 12 (GGT)				
AGT	G12S	1,4	3,4	563
TGT	G12C	0,6	2,5	562
CGT	G12R	0,4	2,4	561
GAT	G12D	1,8	3,8	564
GTT	G12V	3,8	8,8	566
GCT	G12A	0,5	2,5	565
Kodon 13 (GGT)				
AGT	G13S	1,2	3,2	571
TGT	G13C	1,2	3,2 (4) [†]	570
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

* Źródło: 'Catalogue of Somatic Mutations in Cancer', dostępne online na stronie Sanger Institute pod adresem www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

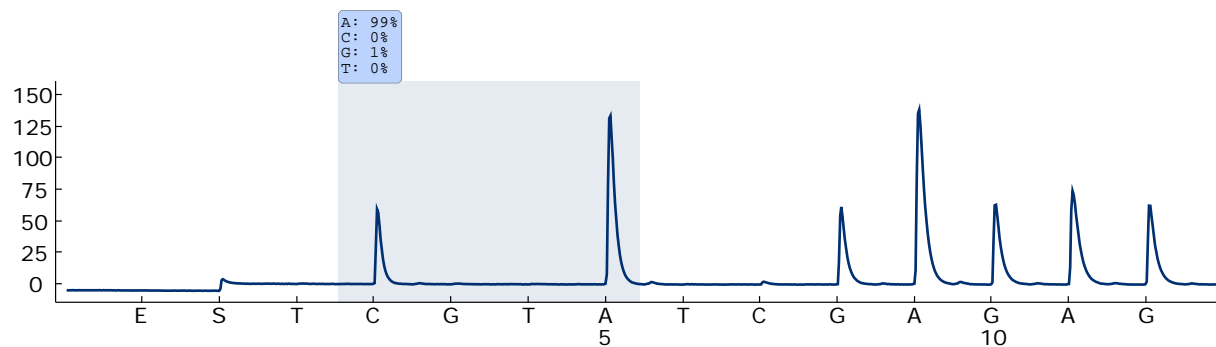
[†] Najniższy poziom mutacji w próbce skutkujący zmierzoną częstotliwością \geq LOD.

Reprezentatywne wyniki

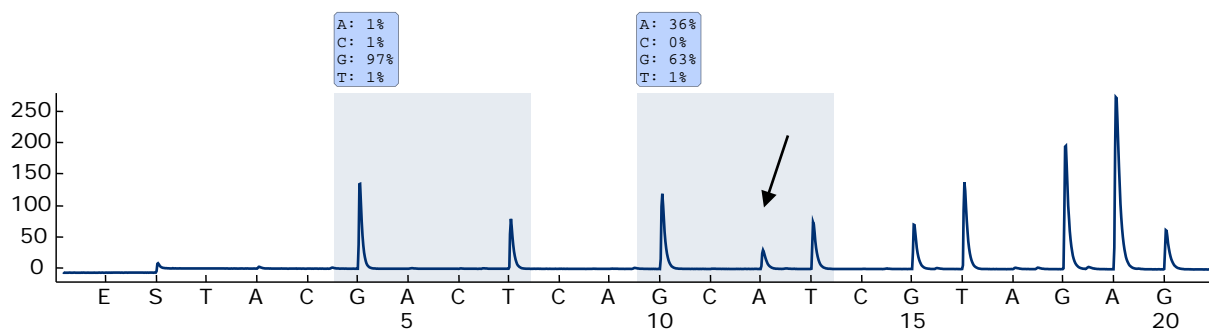
Reprezentatywne wyniki pyrogramów są przedstawione na rysunkach 5–9.



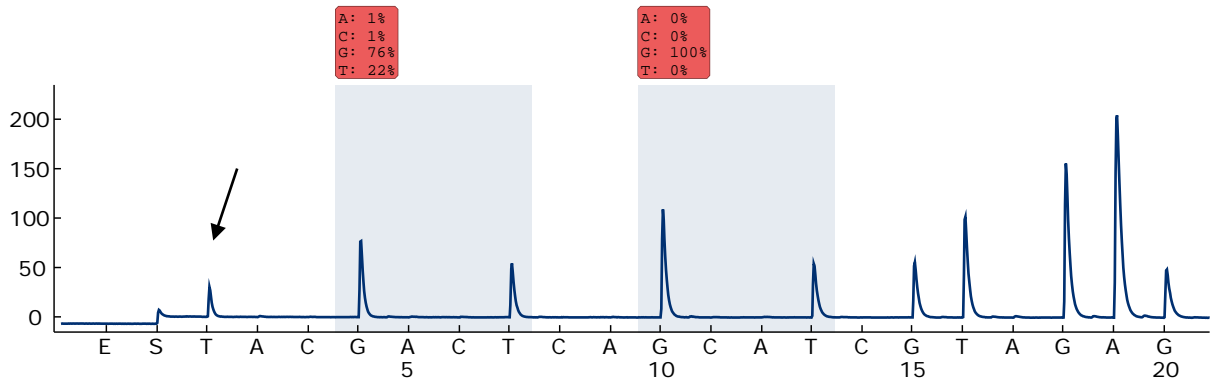
Rysunek 5. Pyrogram z analizy próbki z genotypem typu dzikiego w kodonach 12-13.



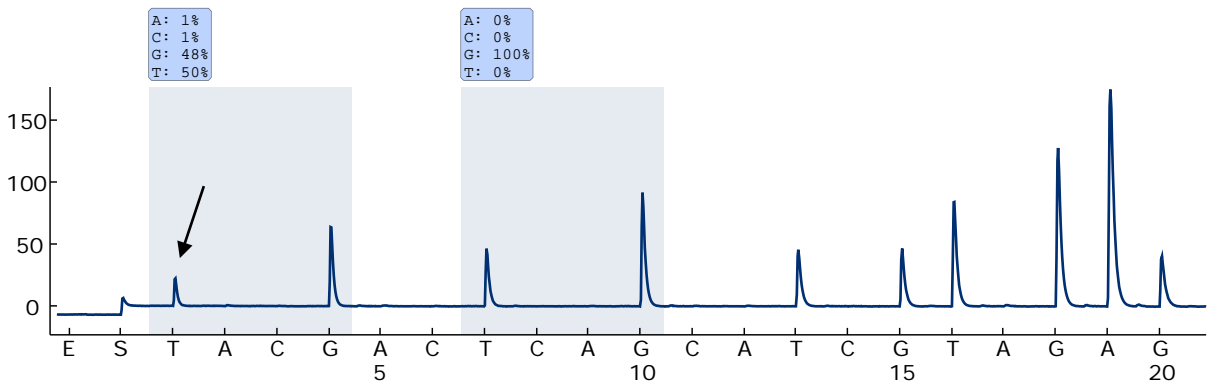
Rysunek 6. Pyrogram z analizy próbki z genotypem typu dzikiego w kodonie 61.



Rysunek 7. Pyrogram z analizy próbki z mutacją GGT → GAT w zasadzie 2 kodonu 13 (nukleotyd 38, oznaczony strzałką) z 'Sequence to Analyze' GNTGNTGTTGGGAAAAGC.



Rysunek 8. Pyrogram z analizy próbki z mutacją GGT→AGT w zasadzie 1 kodonu 12 (nukleotyd 34, wskazany strzałką) z ‘Sequence to Analyze’ *GNTGNTGTTGGGAAAAGC* do wykrywania zasady 2 w kodonie 12 (nukleotyd 35). Czerwony kolor oznacza, że ta sekwencja jest nieoczekiwana i musi zostać zweryfikowana.



Rysunek 9. Pyrogram z powtórnej analizy próbki z Rys. 8. Mutację GGT→AGT ponownie przeanalizowano za pomocą ‘Sequence to Analyze’ *NGTNGTGTGGGAAAAGC* do wykrywania zasady 1 w kodonie 12 (nukleotyd 34).

Rozwiązywanie problemów

Ten przewodnik może być pomocny w przypadku potrzeby rozwiązywania problemów. Więcej informacji dotyczących rozwiązywania problemów można znaleźć na stronie internetowej 'Frequently Asked Questions' (często zadawane pytania) w centrum pomocy technicznej: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z Działu Technicznego QIAGEN zawsze chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów zawartych w niniejszym podręczniku lub próbek i analiz (informacje kontaktowe, informacje można znaleźć na tylnej stronie okładki lub na stronie www.qiagen.com).

Uwaga: Ogólne informacje dotyczące rozwiązywania problemów związanych z aparatem PyroMark Q24 mogą być znalezione w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Komentarze i sugestie

Sygnal dla kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

- | | |
|---|---|
| a) Przenikanie sygnału pomiędzy dołkami | Sygnal z jednego dołka jest wykrywany w sąsiednim dołku. Unikaj umieszczania próbek o wysokiej intensywności sygnału obok próbek bez matrycy. |
| b) Zanieczyszczenie PCR | Używaj sterylnych końcówek do pipet z filtrami. Przechowuj i izoluj materiały takie jak próbki, kontrole i amplikony z dala od odczynników PCR. |

Słaba lub niespodziewana sekwencja

- | | |
|---------------------------------|---|
| a) Niskiej jakości genomowe DNA | DNA genomowe o niskiej jakości może być przyczyną nieudanego PCR. Analizuj próbki PCR używając technik elektroforetycznych (np. QIAxcel® System lub elektroforeza w żelu agarozowym). |
|---------------------------------|---|

Komentarze i sugestie

Wynik 'Check' (sprawdź) lub 'Failed' (niepowodzenie)

- | | |
|---|---|
| a) Zbyt mała wysokość pików | <p>Błędy w przygotowaniu PCR lub przygotowaniu próbek do pirosekwencjonowania mogą prowadzić do powstawania zbyt małych pików.</p> <p>Regularnie przeprowadzaj test funkcjonowania końcówek filtrujących oraz wymieniaj je na nowe zgodnie z zaleceniami opisanymi w <i>Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24</i>.</p> <p>W przypadku pojawienia się komunikatu 'Check', uważnie porównaj pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecane jest powtórzenie reakcji dla danej próbki.</p> |
| b) Mutacja nie zdefiniowana w 'Sequence to Analyze' | <p>Dostosuj sekwencję do analizy w ustawieniach testu (patrz Dodatek A, strona 44) i ponownie przeanalizuj cykl.</p> |
| c) Niespodziewane rzadkie mutacje | <p>Ocena jakości 'Check' lub 'Failed' może być spowodowana niespodziewanym wzorem wykresu. Może to wskazywać na obecność niespodziewanej mutacji, która nie jest analizowana przez daną sekwencję do analizy (Sequence to Analyze). Takie próbki powinny być analizowane z użyciem alternatywnej sekwencji do analizy uwzględniającej niespodziewane mutacje.</p> |
| d) Ostrzeżenie o wysokiej wysokości pików dla dyspensacji | <p>Należy uważnie porównać pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecane jest powtórna reakcja dla danej próbki.</p> |

Wysoki poziom tła

- | | |
|---|--|
| a) Niewłaściwe przechowywanie nukleotydów | <p>Przechowuj nukleotydy w temp. 2–8°C. Przechowywanie w –15 do –25°C może powodować wzrost poziomu tła.</p> |
|---|--|

Komentarze i sugestie

- | | |
|--|---|
| b) Krótki czas schładzania próbek przed rozpoczęciem analizy met. pirosekwencjonowania | Trzymaj próbki na statywie PyroMark Q24 w temp. pokojowej przez 10–15 minut. Nie skracaj czasu schładzania. |
| c) Zanieczyszczenie kartridża | Dokładnie oczyść kartridż zgodnie z wytycznymi w instrukcji. Przechowuj kartridż zabezpieczony przed światłem i kurzem. |

Brak sygnałów dla kontroli dodatnich (niemetylowane DNA kontrolne)

- | | |
|---|---|
| a) Niewystarczająca ilość mieszaniny enzymów lub substratów dla wszystkich próbek | Upewnij się, że kartridż aparatu PyroMark Q24 jest napełniony odczynnikami zgodnie z protokołem przed-reakcyjnym (Pre Run Information) z menu 'Tools'. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie lub rozcieńczanie odczynników | Przygotuj odczynniki <i>therascreen</i> zgodnie z instrukcją w 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 26. |
| c) Niepowodzenie w reakcji PCR lub przygotowaniu próbek | Błędy w przygotowaniu reakcji PCR, programowaniu termocyklera lub przygotowaniu próbki do analizy mogą skutkować brakiem sygnału. Przeprowadź test funkcjonowania końcówek filtrujących zgodnie z wytycznymi zawartymi w <i>Instrukcji Użytkownika Aparatu PyroMark Q24</i> i wymień je na nowe jeśli potrzeba. Powtórz PCR oraz analizę met. pirosekwencjonowania. |

Kontrola Jakości

Zgodnie z wymaganiami certyfikatu zarządzania jakością ISO firmy QIAGEN, każda partia produktu *therascreen* NRAS Pyro jest testowana względem predeterminowanych specyfikacji, celem zapewnienia stałej jakości produktu.

Ograniczenia

Wszelkie wygenerowane wyniki diagnostyczne muszą być interpretowane w powiązaniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

Sprawdzenie wydajności systemu jest odpowiedzialnością użytkownika w kontekście procedur stosowanych w jego laboratorium, a które nie są objęte testami wykonywanymi przez QIAGEN.

Charakterystyka Wydajności

Limit dla próby ślepej (LOB) oraz limit detekcji (LOD)

Wartości LOB oraz LOD zostały ustalone dla szeregu mutacji przy pomocy mieszanin plazmidów (Tabela 9). LOB i LOD zostały określone zgodnie z zaleceniami zawartymi w Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protokół ustalania limitów detekcji oraz limitów pomiarów ilościowych; zaaprobowany poradnik). Błędy α oraz β (odpowiednio fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne) zostały ustawione na 5%. Wartości LOB reprezentują zmierzoną częstotliwość uzyskaną dla próbki typu dzikiego. Wartości LOD reprezentują najniższy sygnał (mierzoną częstotliwość), który można uznać za dodatni dla danej mutacji.

Mutacje GGT→TGT i GGT→GTT w kodonie 13

Dla tych mutacji, ślepe pomiary wynosiły zwykle 0%, co spowodowało rozkład nie-Gaussowski. LOD ustalono zatem przy użyciu innej metody, zgodnie z zaleceniami Wytycznych CLSI EP17 A. Najniższy sygnał, który wskazuje na obecność mutacji (LOD) w tych pozycjach, został ustawiony na 2% powyżej odpowiedniego poziomu bazowego zdefiniowanego przez 95 percentyl ślepych pomiarów. Analizując próbkę z poziomem mutacji podanym w nawiasach w Tabeli 9, 95% wyników (n=72) dało sygnał, który można uznać za dodatni (\geq LOD).

Tabela 9. LOB i LOD określone dla danej mutacji

Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	LOB (%)	LOD (%)	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

* Źródło: 'Catalogue of Somatic Mutations in Cancer', dostępne online na stronie Sanger Institute pod adresem www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† Najniższy poziom mutacji w próbce skutkujący zmierzoną częstotliwością □LOD.

Uwaga: Wartości te były oparte na próbach, w których mieszaniny plazmidów niosących sekwencję typu dzikiego lub odpowiednio zmutowaną sekwencję zastosowano jako matrycę do amplifikacji PCR.

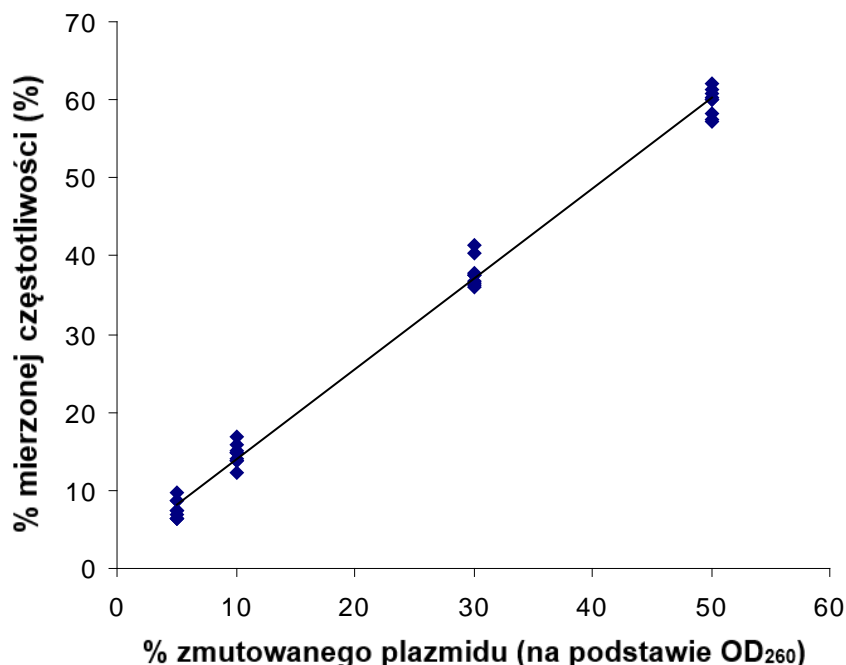
Zaleca się potwierdzenie skuteczności tej metody w laboratorium.

Liniowość

Liniowość określono stosując mieszaniny plazmidów niosących sekwencję typu dzikiego lub zmutowaną dla mutacji GGT>GAT w kodonach 12 i 13 i mutację CAA>CGA w kodonie 61. Plazmidy zmieszano w proporcjach, aby uzyskać cztery poziomy mutacji (5, 10, 30 i 50%). Każdą mieszaninę analizowano trzema różnymi partiami Zestawu *therascreen* NRAS Pyro w trzech seriach pirosekwencjonowania z trzema powtórzeniami.

Wyniki (n=9 dla każdego poziomu mutacji) analizowano zgodnie z CLSI Guideline EP6-A 'Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline' (Ocena liniowości w procedurach pomiarów ilościowych: podejście statystyczne; zaaprobowany poradnik' przy użyciu oprogramowania Analyze-it® v2.21 (Analyze-it Software, Ltd., UK) i dla mutacji GGT>GAT w kodonie 12 są pokazane na Rys. 10.

Wyniki były liniowe w granicach dopuszczalnej nieliniowości 5% w badanym zakresie od 5 do 50% poziomu mutacji. Podobne wyniki otrzymano dla mutacji GGT>GAT w kodonie 13 i CAA>CGA w kodonie 61.



Rysunek 10. Liniowość mutacji GGT→GAT w kodonie 12.

Precyzja

Dane dotyczące precyzji pozwalają na określenie całkowitej zmienności testów i uzyskano je na trzech różnych poziomach przez analizę wyżej wymienionych mieszanin plazmidów z trzema powtórzeniami każdy.

Powtarzalność (w ramach tego samego testu i zmienność między seriami) została obliczona na podstawie danych do określenia liniowości (trzy cykle tego samego dnia przy użyciu różnych partii Zestawu *therascreen* NRAS Pyro). Pośrednia precyzja (zmienność wewnątrzlaboratoryjna) została określona w trzech cyklach w jednym laboratorium w trzy różne dni z różnymi operatorami, aparatami PyroMark Q24 i wieloma Zestawami *therascreen* NRAS Pyro. Odtwarzalność (zmienność międzylaboratoryjna) została obliczona w dwóch seriach w wewnętrznym i zewnętrznym laboratorium i przy użyciu różnych Zestawów *therascreen* NRAS Pyro.

Wartości precyzji wyrażono jako odchylenie standardowe zmierzonych częstotliwości mutacji w % (Tabela 10). Powtarzalność, pośrednia precyzja i odtwarzalność dla mutacji GGT>GAT w kodonie 12 wynosiła odpowiednio 1,2-1,9, 1,0-2,0 i 1,3-3,1% w mierzonym zakresie 5-50% poziomu mutacji. Podobne wyniki otrzymano dla mutacji GGT>GAT w kodonie 13 i CAA>CGA w kodonie 61.

Tabela 10. Precyzja dla mutacji GGT>GAT w kodonie 12*

% plazmidów zmutowanych [†]	Powtarzalność		Uśredniona precyzja		Odtwarzalność	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	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

* Wszystkie wartości są podane jako [%].

[†] Oparte na pomiarach OD₂₆₀, SD: odchylenie standardowe (n=9 f dla powtarzalności i pośredniej precyzji, n=12 dla odtwarzalności).

Ocena diagnostyczna

Zestaw *therascreen* NRAS Pyro został oceniony w porównaniu z sekwencjonowaniem Sangera. DNA wyizolowano ze 100 próbek nowotworowych (FFPE) szpiku kostnego i analizowano pod kątem mutacji w kodonach 12/13 i kodonie 61.

DNA izolowano przy użyciu zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue. Analizę met. pirosekwencjonowania wykonano za pomocą Zestawu *therascreen* NRAS

Pyro w aparacie PyroMark Q24, a sekwencjonowanie Sangera analizowano w analizatorze genetycznym ABI™ 3130.

Ze 100 próbek analizowanych przez sekwencjonowanie Sangera status mutacji można było określić w 97 próbkach zarówno dla kodonu 12/13, jak i kodonu 61. Za pomocą Zestawu *therascreen* NRAS Pyro możliwe było określenie statusu mutacji odpowiednio w 97 i 98 próbkach dla kodonu 12/13 i kodonu 61.

W czterech ze 100 próbek wykryto mutację w kodonie 12 lub kodonie 13 sekwencjonowaniem Sangera. W dwóch z tych próbek stan mutacji można odtworzyć za pomocą Zestawu *therascreen* NRAS Pyro, podczas gdy dla dwóch próbek nie wykryto żadnej mutacji. Wyniki zilustrowano w Tabelach 11 i 12. Nie wykryto mutacji w kodonie 61.

Z wyłączeniem próbek, które zawiodły w jednej lub obu metodach, Zestaw *therascreen* NRAS Pyro i sekwencjonowanie Sangera wykazały 98% i 100% zgodność w wynikach odpowiednio dla kodonów 12/13 i kodonu 61 (Tabela 11 i 12).

Tabela 11. Wyniki analizowanych próbek szpiku kostnego dla kodonów 12/13

		Sekwencjonowanie Sangera			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> NRAS Pyro	Mutant	2	0	0	2
	Typ dziki	2	90	3	95
	Nieznany	0	3	0	3
	Suma	4	93	3	100

Tabela 12. Wyniki analizowanych próbek szpiku kostnego dla kodonu 61

		Sekwencjonowanie Sangera			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> NRAS Pyro	Mutant	0	0	0	0
	Typ dziki	0	95	3	98
	Nieznany	0	2	0	2
	Suma	0	97	3	100

Uwaga: We wszystkich analizach wykonanych do określenia charakterystyki wydajności sygnał wynosił ponad 30 RLU, jak rutynowo uzyskuje się z 10 ng DNA z próbek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE).

QIAGEN utrzymuje dużą, aktualną internetową bazę publikacji naukowych wykorzystujących produkty QIAGEN. Wszechstronne opcje wyszukiwania pozwalają znaleźć potrzebne artykuły, poprzez proste wyszukiwanie słów kluczowych lub przez podanie aplikacji, obszaru badań, tytułu itp.

Aby uzyskać pełną listę referencji, odwiedź Bazę danych QIAGEN w Internecie pod adresem www.qiagen.com/RefDB/search.asp lub skontaktuj się z działem technicznym QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem.

Literatura

QIAGEN utrzymuje dużą, aktualną internetową bazę publikacji naukowych wykorzystujących produkty QIAGEN. Wszechstronne opcje wyszukiwania pozwalają znaleźć potrzebne artykuły, poprzez proste wyszukiwanie słów kluczowych lub przez podanie aplikacji, obszaru badań, tytułu itp.

Aby uzyskać pełną listę referencji, odwiedź Bazę danych QIAGEN w Internecie pod adresem www.qiagen.com/RefDB/search.asp lub skontaktuj się z działem technicznym QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem.

Symbole



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające na <N> testów



Zużyj przed



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer partii



Numer materiału



Składniki



Zawiera



Numer



Wodorotlenek sodu



Globalny Numer Handlowy Produktu (Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe



Producent



Zapoznaj się z instrukcją użytkowania

Informacje Kontaktowe

Aby uzyskać pomoc techniczną i znaleźć więcej informacji, zapraszamy do naszego Centrum Pomocy Technicznej www.qiagen.com/Support lub do kontaktu z Serwisem Pomocy Technicznej QIAGEN bądź do kontaktu z lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub odwiedź www.qiagen.com).

Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* NRAS Pyro

Przed przeprowadzeniem reakcji *therascreen* NRAS Pyro po raz pierwszy, należy skonfigurować plik reakcji. Skonfiguruj analizę dla kodonów 12/13 i kodonu 61 NRAS przy użyciu oprogramowania PyroMark Q24, jak opisano poniżej.

Procedura

Kodony NRAS 12 i 13

A1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New AQ Assay' (nowa analiza AQ).

A2. Wpisz następującą sekwencję w polu 'Sequence to Analyze' (sekwencja do analizy):

GNTGNTGTTGGGAAAAGC

Najczęstsze mutacje w kodonach 12 i 13 będą wykrywane w nukleotydach 35 i 38 (druga pozycja) przy użyciu tej sekwencji do analizy.

Seqwencję do analizy można zmienić po skończeniu reakcji, aby przeanalizować mutacje w różnych pozycjach.

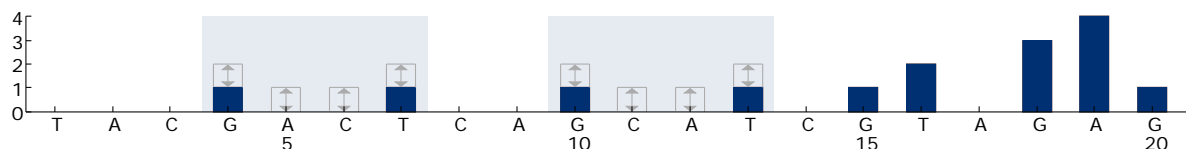
Aby sprawdzić, czy mutacje są obecne w nukleotydach 34 lub 37 (pierwsza pozycja), zmień 'Sequence to Analyze' na następującą sekwencję:

NGTNGTGTTGGGAAAAGC

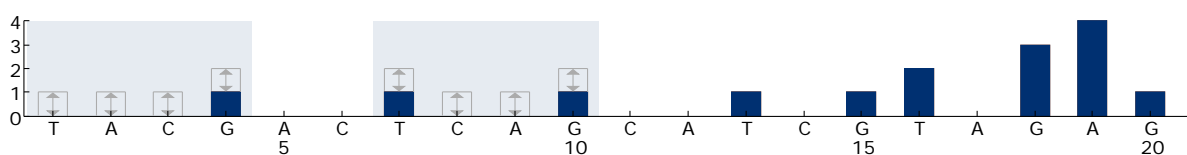
Uwaga: Upewnij się, że próg odcięcia dla pojedynczego pików jest ustawiony na 30 RLU.

A3. Wprowadź ręcznie następującą 'Dispensation Order' (kolejność dozowania).

TACGACTCAGCATCGTAGAG



Rysunek 11. Histogram dla kodonów 12 (nukleotyd 35) i 13 (nukleotyd 38) wraz z 'Sequence to Analyze' *GNTGNTGTTGGGAAAAGC*.



Rysunek 12. Histogram dla kodonów 12 (nukleotyd 34) i 13 (nukleotyd 37) wraz z 'Sequence to Analyze' *NGTNGTGTGGGAAAAGC*.

A4. Wybierz zakładkę 'Analysis Parameters' (parametry analizy) i zwiększ 'Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:' (odcięcie wysokości piku – wymagana wysokość piku spełniająca kryteria jakości) do 30.

A5. Kliknij  w pasku narzędzi i zapisz reakcję jako 'NRAScodons 12+13'.

Kodon NRAS 61

A1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New AQ Assay' (nowa zanaliza AQ).

A2. Wpisz następującą sekwencję w polu 'Sequence to Analyze' (sekwencja do analizy):
CNAGAAGAGTA

Za pomocą tej sekwencji do analizy zostanie wykryta najczęstsza mutacja w kodonie 61 w nukleotydzie 182 (druga pozycja).

Sekwencję do analizy można zmienić po reakcji, aby przeanalizować mutacje w różnych pozycjach.

Aby sprawdzić, czy mutacje są obecne w nukleotydzie 181 (pierwsza pozycja), zmień 'Sequence to Analyze' na następującą sekwencję:

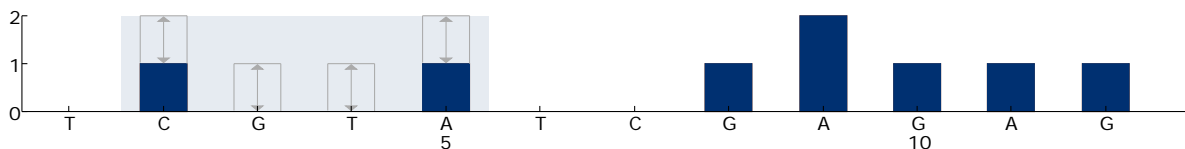
VAAGAAGAGTA

Aby sprawdzić, czy mutacje są obecne w nukleotydzie 183 (trzecia pozycja), zmień 'Sekwencję do analizy' na następującą sekwencję:

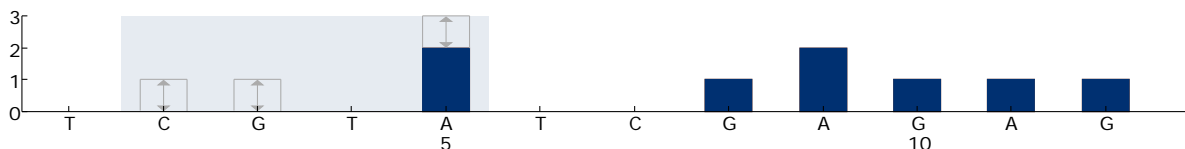
CANGAAGAGTA

Uwaga: Upewnij się, że próg odcięcia dla pojedynczego piku jest ustawiony na 30 RLU. Dodatkowo upewnij się, że współczynnik 'A-Peak Peak Reduction Factor' jest ustawiony na 0,86 dla analizy kodonu NRAS 61.

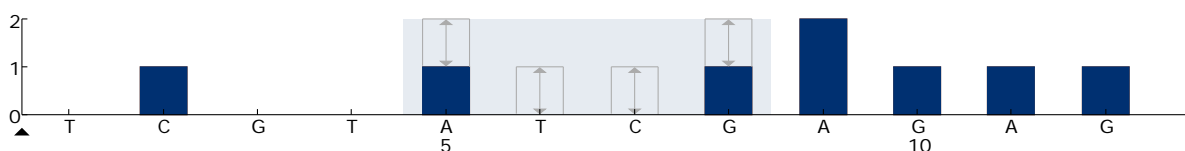
A3. Wprowadź ręcznie następującą 'Dispensation Order' (kolejność dozowania):
TCGTATCGAGAG




Rysunek 13. Histogram dla kodonu 61 (nukleotyd 182) wraz z 'Sequence to Analyze' **CNAGAAGAGTA**.




Rysunek 14. Histogram dla kodonu 61 (nukleotyd 181) wraz z 'Sequence to Analyze' **VAAGAAGAGTA**.



Rysunek 15. Histogram dla kodonu 61 (nukleotyd 183) wraz z 'Sequence to Analyze' **CANGAAGAGTA**.

- A4. Wybierz zakładkę 'Analysis Parameters' (parametry analizy) i zwiększ 'Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:' (odcięcie wysokości pików – wymagana wysokość pików spełniająca kryteria jakości) do 30.
- A5. Kliknij kartę 'Analysis Parameters' i zmniejsz 'A-peak reduction factor' (współczynnik redukcji szczytowej) do 0,86.
- A6. Kliknij  na pasku narzędzi i zapisz test jako 'NRAScodon 61'.

Załącznik B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory

<p>OSTRZEŻENIE</p> 	<p>Niebezpieczne chemikalia</p> <p>Roztwór denaturujący (Denaturation Solution) używany w roboczej stacji próżniowej zawiera wodorotlenek sodu działający drażniąco na skórę i oczy.</p> <p>Zawsze noś okulary ochronne, fartuch i rękawiczki.</p> <p>Osoba lub instytucja odpowiedzialna (np. kierownik laboratorium) musi zadbać, aby miejsce pracy było bezpieczne a operatorzy urządzeń nie byli narażeni na niebezpieczne ilości substancji toksycznych (chemicznych i biologicznych), tak jak to zdefiniowano w odpowiednich kartach bezpieczeństwa (SDS) lub innych dokumentach np. OSHA,* ACGIH,[†] or COSHH[‡].</p> <p>Wietrzenie oparów oraz usuwanie odpadów musi przebiegać w zgodzie ze wszystkimi krajowymi i lokalnymi przepisami dotyczącymi zdrowia i bezpieczeństwa, w tym przepisów BHP.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (United States of America).

[†] ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (United States of America).

[‡] COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (United Kingdom).

Upewnij się, że przestrzegane są wszelkie krajowe i lokalne przepisy środowiskowe dotyczące pozbywania się odpadów laboratoryjnych.

Ważna informacja przed rozpoczęciem

- Ten protokół wymaga użycia wody o wysokiej czystości.

Procedura

- B1. Upewnij się, że narzędzie próżniowe ma wyłączone ssanie (próżnię; pozycja 'Off') i pompa próżniowa jest wyłączona.**
- B2. Wyrzuć wszelkie roztwory pozostawione w wanienkach.**
- B3. Przepłucz waniенki wodą o wysokiej czystości lub w razie potrzeby wymień je na nowe.**
- B4. Opróżnij butlę na odpady płynne.**
Pokrywa może zostać odkręcona bez potrzeby odłączania wężyków
- B5. Jeśli stacja próżniowa musi zostać umyta (nr. z powodu zakurzenia lub rozlania roztworów), postępuj zgodnie z instrukcjami zawartymi w *Podręczniku użytkownika PyroMark Q24*.**

Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	Na 24 reakcje w systemie PyroMark Q24: Seq Primers (startery sekwencyjne), PCR Primers (startery PCR), Unmethylated Control DNA (niemetylowane DNA kontrolne), PyroMark PCR Master Mix (mieszanka do PCR), CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący), PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydyzacyjny), PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący), PyroMark Wash Buffer (bufor płuczący), Enzyme Mixture (mieszanka enzymów), Substrate Mixture (mieszanka substratów), dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP i H ₂ O	971530
PyroMark Q24 MDx	Platforma do detekcji opartej na sekwencji do pirosekwencjonowania 24 próbek jednocześnie	9001513
PyroMark Q24	Platforma do detekcji opartej na sekwencji do pirosekwencjonowania 24 próbek jednocześnie	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation* (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do przygotowywania 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do przygotowywania 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Oprogramowanie aplikacyjne	9019063
PyroMark Q24 Software	Oprogramowanie analityczne	9019062
Akcesoria		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-dołkowa płytki reakcyjna do sekwencjonowania	979301

* Tylko UK.

† Reszta świata.

Produkt	Zawartość	Nr kat.
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartridże do dozowania nukleotydów i odczynników	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Końcówki filtrujące wielokrotengo użytku do stacji próżniowej PyroMark Vacuum Workstation Q96 oraz Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Odczynnik do sprawdzania działania systemu po instalacji	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Odczynnik do testu wydajności systemu po instalacji	979304
Produkty powiązane		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Na 50 izolacji DNA: 50 kolumn QIAamp MinElute® Columns, Proteinase K, Bufory, Probówki (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Na 48 izolacji: kartridże Reagent Cartridges (do tkanki), Disposable Filter-Tips (końcówki do pipet), Disposable Tip-Holders, Sample Tubes (probówki; 2 ml), Elution Tubes (probówki; 1,5 ml), Buffer G2, Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Na 50 izolacji: QIAamp Mini Spin Columns (kolumny), Buffers (bufory), Reagents (odczynniki), Tubes (probówki), VacConnectors (adaptery)	61104

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z podręcznika odpowiedniego zestawu lub z instrukcji obsługi QIAGEN. Podręczniki zestawów QIAGEN i instrukcje obsługi są dostępne na stronie www.qiagen.com. Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Strona celowo pozostawiona pustą

Znaki towarowe: 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).

Ograniczona Umowa Licencyjna

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika Zestawu *therascreen* NRAS Pyro na następujące warunki:

1. Zestaw *therascreen* NRAS Pyro można używać wyłącznie zgodnie z *Instrukcją obsługi Zestawu theascreen NRAS* i tylko razem z elementami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników, które nie zostały dołączone do tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w *Instrukcji obsługi Zestawu theascreen NRAS Pyro* i dodatkowych protokołów dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodejmowanie ani niepozwalanie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji dostępne są na stronie www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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)

