

# Příručka k soupravě *therascreen*<sup>®</sup> BRAF Pyro<sup>®</sup> Kit



Verze 2

**IVD**

Pro diagnostiku in vitro



**REF**

971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
NĚMECKO

**R2**

**MAT**

1074213CS



# Technologie QIAGEN pro zpracování a analýzu vzorků

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru vzorku až po výsledek.

## **QIAGEN určuje standardy pro:**

- purifikaci DNA, RNA a proteinů;
- rozборы nukleových kyselin a proteinů;
- výzkum microRNA a RNAi;
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozборы.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Obsah

<b>Účel použití</b>	<b>4</b>
<b>Shrnutí a vysvětlení</b>	<b>4</b>
<b>Princip postupu</b>	<b>5</b>
<b>Dodávané materiály</b>	<b>7</b>
Obsah soupravy	7
<b>Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy</b>	<b>9</b>
<b>Upozornění a bezpečnostní opatření</b>	<b>11</b>
Bezpečnostní informace	11
Obecná ustanovení	11
<b>Skladování činidel a manipulace s nimi</b>	<b>13</b>
<b>Manipulace se vzorkem a jeho skladování</b>	<b>13</b>
<b>Postup</b>	<b>14</b>
Izolace DNA	14
■ Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24	15
■ Protokol 2: PCR s činidly dodanými v soupravě <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	17
■ Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance	20
■ Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24	22
■ Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24	26
■ Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24	28
<b>Interpretace výsledků</b>	<b>31</b>
Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu	31
Návod na řešení potíží	34
<b>Kontrola kvality</b>	<b>37</b>
<b>Omezení</b>	<b>38</b>
<b>Funkční vlastnosti</b>	<b>38</b>
<b>Literatura</b>	<b>43</b>
<b>Symboly</b>	<b>43</b>
<b>Kontaktní údaje</b>	<b>44</b>
<b>Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy <i>therascreen</i> BRAF Pyro</b>	<b>45</b>
<b>Příloha B: Vyprázdnění odpadního zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami</b>	<b>48</b>
<b>Informace pro objednávky</b>	<b>49</b>

## Účel použití

Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit je prostředek sloužící ke kvantitativní detekci mutací in vitro založené na metodě Pyrosequencing® v kodonech 600 a 464 až 469 lidského genu BRAF v genomové DNA získané ze vzorků lidské tkáně.

Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit je určena k poskytování informací klinickým lékařům pomáhajícím při výběru pacientů s karcinomem, u nichž bude větší pravděpodobnost úspěšnosti léčby pomocí protilátek proti EGFR. Pro diagnostiku in vitro.

Určeno k použití pouze se systémem PyroMark® Q24. Systém PyroMark Q24 obsahuje:

- Přístroj PyroMark Q24 a přístroj PyroMark Q24 MDx.
- Vakuová stanice PyroMark Q24 a vakuová stanice PyroMark Q24 MDx.
- Software PyroMark Q24 (verze 2.0) a software PyroMark Q24 MDx (verze 2.0).

Tento výrobek je určen k použití pouze pro profesionální uživatele, jako jsou laboranti nebo lékaři vyškolení v postupech pro diagnostiku in vitro, molekulárně biologických metodách a obsluze systému PyroMark Q24.

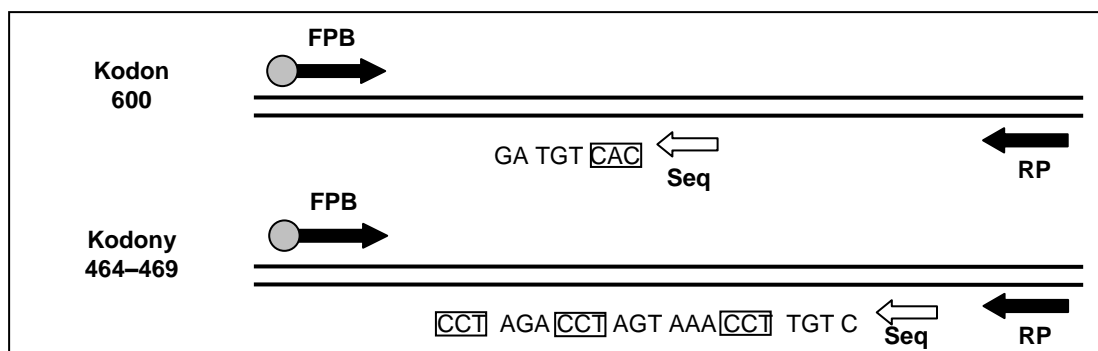
## Shrnutí a vysvětlení

Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit slouží ke kvantitativnímu stanovení mutací lidského genu BRAF v kodonech 600 exonu 15 a 464–469 exonu 11 (obrázek 1).

<b>Exon 15</b>	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA <span style="border: 1px solid black;">GTG</span> AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
<b>Exon 11</b>	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCTGAT GGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT <span style="border: 1px solid black;">GGA</span> TCT <span style="border: 1px solid black;">GGA</span> TCATTT <span style="border: 1px solid black;">GGA</span> ACA GTCTACAAGGGAAAGTGGCATG

**Obrázek 1. Genomový obsah sekvenovaných oblastí lidského genu BRAF (Ensembl ID ENSG00000157764).** Kodony 600, 464, 466 a 469 jsou označeny rámečky.

Souprava obsahuje dvě analýzy: jednu k detekci mutací v kodonu 600 a jednu k detekci mutací v kodonech 464 až 469 (obrázek 2). Pomocí PCR se tyto dvě oblasti odděleně amplifikují a definované oblasti se sekvenují. Sekvence v okolí daných poloh slouží jako normalizační a referenční píky pro kvantifikaci a stanovení kvality analýzy.



**Obrázek 2. Zobrazení analýzy BRAF.** Označená sekvence je analyzovaná sekvence u vzorku divokého typu. **FPB**: přímé PCR primery (B označuje biotinylation); **RP**: zpětné PCR primery; **Seq**: sekvenační primery.

Obě analýzy jsou sekvenovány ve zpětném směru.

Výrobek obsahuje pro každou analýzu směs PCR primerů a sekvenační primer. Primery jsou dodány v roztoku. Každá lahvička obsahuje 24 µl každého primeru nebo směsi primerů.

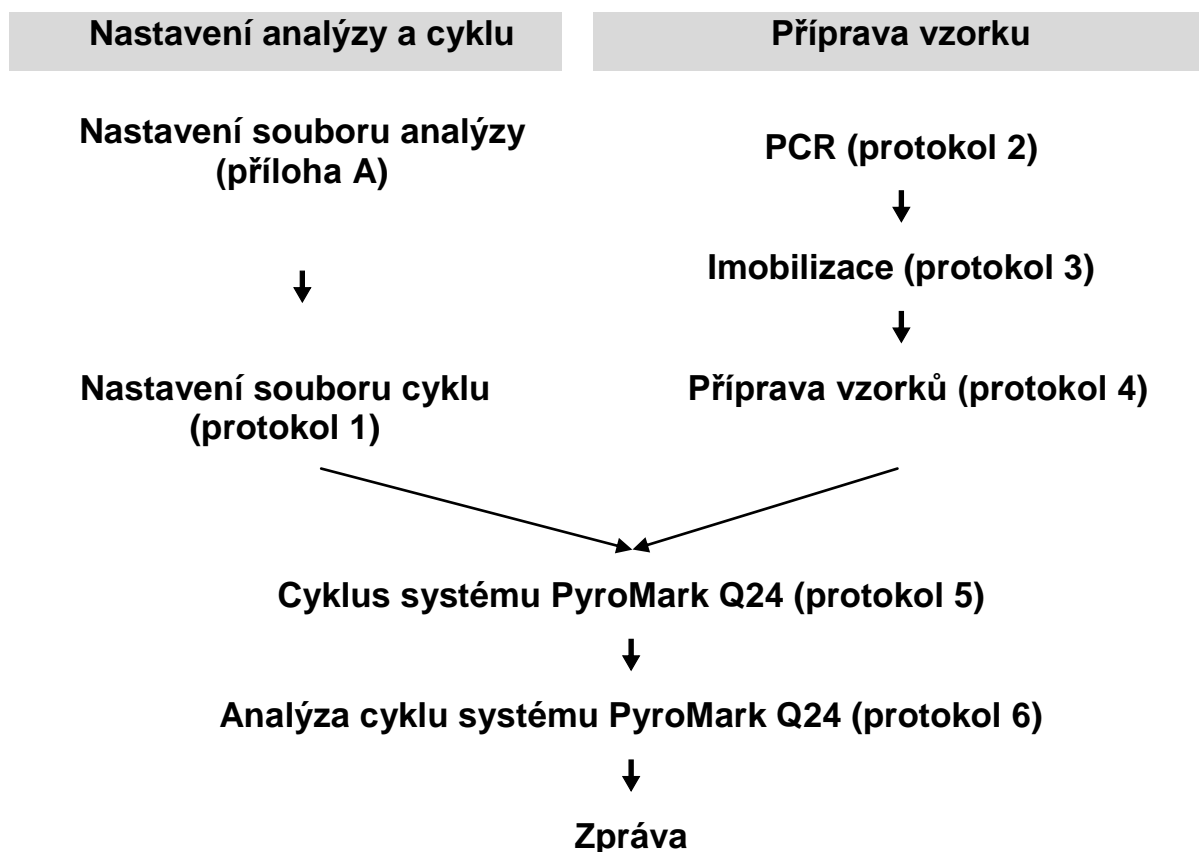
## Princip postupu

Na schématu pracovního postupu je na straně 6 zobrazen průběh analýzy. Po PCR s primery vymezujícími kodon 600 a kodony 464 až 469 se amplicony imobilizují na kuličky Streptavidin Sepharose® High Performance. Připraví se jednořetězcová DNA a dojde k hybridizaci příslušných sekvenačních primerů a DNA. Vzorky se pak analyzují v systému PyroMark Q24 prostřednictvím souboru nastavení cyklu a souboru cyklu.

K analýze cyklu je doporučeno použít modul BRAF Plug-in Report. Modul BRAF Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). K analýze cyklu však lze použít i analytický nástroj, který je součástí systému PyroMark Q24. Po ukončení cyklu lze upravit analyzovanou sekvenci i pro detekci vzácných mutací (viz „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“, strana 28).

**Poznámka:** Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s předchozí revizí příručky *therascreen BRAF Pyro Kit* (verze 1, červenec 2011) mírně změněno. Viz „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“, strana 20, „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24“, strana 22a „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“, strana 28.

## Schéma pracovního postupu analýzy *therascreen* BRAF Pyro



### Kontroly

Součástí soupravy je nemetylovaná kontrolní DNA jako pozitivní kontrola pro PCR a sekvenační reakce. Tato kontrolní DNA má v oblastech sekvenovaných pomocí této soupravy genotypy divokého typu a je vyžadována k interpretaci adekvátních výsledků a identifikaci nízkoúrovňových mutací (viz „Interpretace výsledků“, strana 31). Zahrnuje vzorek s nemetylovanou kontrolní DNA pro každou analýzu ve všech cyklech pyrosekvenování.

Navíc lze pro alespoň jednu analýzu zahrnout do nastavení PCR i negativní kontrolu (bez templátu DNA).

## Dodávané materiály

### Obsah soupravy

#### Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit (krabice 1/2)

<b><i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalogové č.</b>	<b>971470</b>
<b>Počet reakcí</b>	<b>24</b>
Seq Primer BRAF 600	24 µl
Seq Primer BRAF 464–469	24 µl
PCR Primer BRAF 600	24 µl
PCR Primer BRAF 464–469	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (PCR master mix PyroMark)	850 µl
CoralLoad <sup>®</sup> Concentrate, 10x (Koncentrát CoralLoad <sup>®</sup> )	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Nemethylovaná kontrolní DNA)	100 µl

## Pufry a činidla *therascreen* (krabice 2/2)

<b>Pufry a činidla</b>	
PyroMark Binding Buffer (Vazebný pufr PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Hybridizační pufr PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (Denaturační roztok PyroMark)	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (Promývací pufr PyroMark)	25 ml
Enzyme Mixture (Směs enzymů)	1 lahvička
Substrate Mixture (Směs substrátů)	1 lahvička
dATP $\alpha$ S	1180 $\mu$ l
dCTP	1180 $\mu$ l
dGTP	1180 $\mu$ l
dTTP	1180 $\mu$ l
therascreen <i>BRAF Pyro Kit Handbook</i> (anglicky)	1

\* Obsahuje hydroxid sodný.



## Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

- Souprava na izolaci DNA (viz „Izolace DNA“, strana 14)
  - Pipety (nastavitelné)\*
  - Sterilní špičky na pipety (s filtry pro nastavení PCR)
  - Stolní mikrocentrifuga\*
  - Termocykler\* a příslušné PCR zkumavky
  - Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat. č. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
  - PyroMark Q24 (kat. č. 9001513 nebo 9001514)\*<sup>†</sup>
  - Software PyroMark Q24 (kat. č. 9019063 nebo 9019062)<sup>†</sup>
  - Destičky PyroMark Q24 (kat. č. 979301)<sup>†</sup>
  - Kazeta PyroMark Q24 (kat. č. 979302)<sup>†</sup>
  - Vakuová stanice PyroMark Q24 (kat. č. 9001515 nebo 9001517)\*<sup>†</sup>
  - Míchačka destiček\* pro imobilizaci na kuličky
  - Topný blok\* s dosažitelnou teplotou 80 °C
  - PCR destičky se 24 jamkami nebo stripy
  - Víčka na stripy
  - Vysoce čištěná voda (Milli-Q<sup>®</sup> 18,2 MΩ x cm nebo ekvivalent).
- Poznámka:** Součástí dodávky je dostatečný objem vody pro PCR, imobilizaci DNA a k rozpuštění směsi enzymů a směsi substrátů. Další vysoce čištěná voda je nutná na ředění promývacího pufu PyroMark, 10x.
- Ethanol (70%)<sup>‡</sup>

\* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

<sup>†</sup> Označení CE-IVD je v souladu se směrnicí Evropské unie 98/79/ES. Všechny ostatní uvedené výrobky nemají označení CE-IVD podle směrnice Evropské unie 98/79/ES.

<sup>‡</sup> Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje jiné látky, například metanol nebo metyletylketon.

## Doporučené míchačky destiček

Míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* BRAF Pyro Kit jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1: Míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* BRAF Pyro Kit**

Výrobce	Výrobek	Katalogové číslo
Eppendorf	Thermomixer comfort (základní zařízení)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag <sup>®</sup> Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Doporučené destičky s 24 jamkami

Destičky s 24 jamkami doporučené k použití se soupravou *therascreen* BRAF Pyro Kit jsou uvedeny v tabulce 2 (Tabulka 2).

**Tabulka 2. Destičky s 24 jamkami doporučené k použití se soupravou *therascreen* BRAF Pyro Kit**

Výrobce	Výrobek	Katalogové číslo
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

# Upozornění a bezpečnostní opatření

## Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Na komponenty soupravy therascreen BRAF Pyro Kit se vztahují následující upozornění na nebezpečí a pokyny pro bezpečné zacházení.

### PyroMark Denaturation Solution



Varování! Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Může být korozivní pro kovy. Uniklý produkt absorbujte, aby se zabránilo materiálním škodám. Uchovávejte pouze v původním obalu. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

### PyroMark Enzyme Mixture



Obsahuje: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Nebezpečí! Dráždí kůži. Způsobuje vážné poškození očí. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI expozici nebo podezření: Volejte TOXIKOLOGICKÉ STŘEDISKO nebo lékaře. Odložte kontaminované oblečení a před použitím je vyperte. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

### PyroMark Substrate Mixture



Obsahuje: acetic acid. Varování! Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření. Odložte kontaminované oblečení a před použitím je vyperte. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

## Obecná ustanovení

**Poznámka:** Uživatel musí vždy věnovat pozornost následujícím okolnostem:

- Pro dosažení optimálních výsledků je nutné přísně dodržovat pokyny v návodu pro uživatele. Jiné ředění činidel než to, které je popsáno v této příručce, se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu.
- Schéma pracovního postupu (viz „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ (strana 20), „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24“ (strana 22) a „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“, strana 28) bylo v porovnání s revizí R1 příručky theascreen *BRAF Pyro Kit* mírně změněno.
- Součástí tohoto produktu stačí k provedení 24 reakcí v až 5 nezávislých cyklech.
- Používejte sterilní špičky na pipety (s filtry pro nastavení PCR).
- Pozitivní materiály (vzorky, pozitivní kontroly a amplikony) se musí skladovat a extrahovat odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Před zahájením analýzy důkladně rozmrazte všechny složky na pokojovou teplotu (15 až 25 °C).
- Po rozmrazení složky promíchejte (opakovaným pipetováním nahoru a dolů nebo na pulsní třepačce) a krátce odstředte.
- Na základě nezdařených výsledků nelze posuzovat stav mutací.

## Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit se dodává ve dvou krabicích. Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit (krabice 1/2) se dodává v suchém ledu. PCR master mixy PyroMark, koncentrát CoralLoad, nemetylovaná kontrolní DNA a všechny primery musí být po dodání uloženy při teplotě -30 až -15 °C.

Krabice s pufrů a činidly *therascreen* (krabice 2/2) obsahuje pufrů, směs enzymů, směs substrátů, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP a dTTP (činidla na pyrosekvenční analýzu) a dodává se v chladícím obalu. Při dodání by měly být uvedené součásti uloženy při teplotě 2 až 8 °C. Z důvodu minimalizace ztráty aktivity se doporučuje uchovávat směs enzymů i substrátů v dodaných lahvičkách.

Rekonstituované směsi enzymů nebo substrátů jsou stabilní po dobu nejméně 10 dnů při teplotě 2 až 8 °C. Rekonstituované směsi enzymů nebo substrátů lze zamrazit a uložit v původních lahvičkách při teplotě -30 až -15 °C. Zmražená činidla by neměla prodělat opakované zmražení/rozmražení více než třikrát.

**Poznámka:** Nukleotidy se nesmí zamrazovat.

Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit je stabilní až do doby použitelnosti soupravy, uchovává-li se za stanovených podmínek.

## Manipulace se vzorkem a jeho skladování

Všechny vzorky jsou potenciálně infekční a podle toho se s nimi musí zacházet.

Materiál vzorků tvoří lidská DNA extrahovaná ze vzorků tkání (FFPE) fixovaných formalinem zalitých v parafinu.

## Postup

### Izolace DNA

Funkční parametry systému pro extrakci lidské DNA ze vzorků tumorů fixovaných formalinem zalitých v parafinu byly stanoveny pomocí souprav EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit a QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit.

Na purifikaci DNA z uvedených typů vzorků lidské tkáně k použití v soupravě *therascreen* BRAF Pyro Kit jsou doporučeny soupravy QIAGEN<sup>®</sup> uvedené v tabulce 3. Purifikaci DNA provádějte podle pokynů v příručkách k daným soupravám.

**Tabulka 3. Doporučené soupravy na purifikaci DNA pro účely soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit**

<b>Materiál vzorku</b>	<b>Souprava na izolaci nukleových kyselin</b>	<b>Katalogové číslo (QIAGEN)</b>
Tkáně zalité v parafinu	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

\* Postupujte dle protokolu pro použití tkání zalitých v parafinu. Souprava EZ1 DNA Tissue Kit by se měla používat společně se stanicí EZ1 Advanced (kat. č. 9001410 nebo 9001411) a kartou EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9018298), se stanicí EZ1 Advanced XL (kat. č. 9001492) a kartou EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9018700) nebo se stanicí BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (kat. č. 9000705; již není v nabídce) a kartou EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9015862).

# Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24



## Důležitý bod před zahájením

- V případě potřeby lze získat celý rozsah výsledků ověřením meze vzorku divokého typu na normálním vzorku. Bližší informace naleznete v pokynech CLSI EP17-A „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline“ (Protokol pro určení mezí detekce a mezí kvantifikace, schválené pokyny).

## Úkony před zahájením

- Pokud nebyl nainstalován modul BRAF Plug-in Report, vytvořte nastavení analýzy (viz „Příloha A: Nastavení pyrosekvenční analýzy *therascreen* BRAF“, strana 45). To je třeba provést pouze jednou před prvním spuštěním pyrosekvenční analýzy *therascreen* BRAF. Pokud byl nainstalován modul BRAF Plug-in Report, jsou v prohlížeči zkratk softwaru PyroMark Q24 ve složce „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ k dispozici předem definovaná nastavení analýz. Modul BRAF Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Postup

- 1. Klikněte na tlačítko  na panelu nástrojů.**  
Vytvořil se nový soubor cyklu.
- 2. Zadejte parametry cyklu (viz část „Parametry cyklu“ na straně 16).**
- 3. Na destičce zadejte analýzy pro kodon 600 a kodony 464–469 k jamkám odpovídajícím daným testovaným vzorkům.**  
**Poznámka:** Pro alespoň jednu analýzu lze zahrnout do každého nastavení PCR i negativní vzorek (bez templátu DNA).  
**Poznámka:** Zahrnuje vzorek s nemethylovanou kontrolní DNA pro každou analýzu ve všech cyklech pyrosekvenování (viz „Kontroly“, strana 6).
- 4. Jakmile je cyklus nastaven a systém PyroMark Q24 připraven ke spuštění, vytiskněte si seznam požadovaných objemů směsi enzymů, směsi substrátů, nukleotidů a uspořádání destičky. Z nabídky „Tools“ (Nástroje) vyberte položku „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním cyklu) a po zobrazení zprávy klikněte na tlačítko .**
- 5. Zavřete soubor cyklu a pomocí Průzkumníku Windows® jej zkopírujte na jednotku USB dodanou se systémem.**  
**Poznámka:** Vytištěnou zprávu s informacemi před spuštěním cyklu použijte jako šablonu při nanášení vzorků (viz „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ na straně 20).

Spuštění analýzy destičky na systému PyroMark Q24 viz „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 26.

## Parametry cyklu

„Run name“ (Název cyklu):	Název cyklu je dán uložením souboru. Přejmenováním souboru dojde i ke změně názvu cyklu.
„Instrument method“ (Metoda přístroje):	Vyberte metodu přístroje podle kazety, která se bude pro daný cyklus používat. Viz instrukce dodané s výrobky.
„Plate ID“ (ID destičky):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte ID destičky PyroMark Q24.
„Bar code“ (Čárový kód):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte číslo čárového kódu destičky. Máte-li případně k počítači připojenou čtečku čárových kódů, kód přečtete čtečkou. Ukazatel myši nastavte (a klikněte) do textového pole „Barcode“ (Čárový kód) a sejměte čárový kód.
„Kit and Reagent ID“ (ID soupravy a činidla):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte číslo šarže soupravy <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit, která bude použita. Číslo šarže je uvedeno na štítku výrobku. <b>Poznámka:</b> Doporučuje se zadávat ID činidel i soupravy, aby bylo možné v případě potřeby vysledovat neočekávané problémy s činidly.
„Run note“ (Poznámky k cyklu):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte poznámku k obsahu nebo účelu cyklu.

## Přidání souborů analýz

Analýzu lze k jamce připojit některým z těchto způsobů:

- Klikněte na jamku pravým tlačítkem a z místní nabídky vyberte položku „Load Assay“ (Načíst analýzu).
- Vyberte analýzu v prohlížeči zkratk, klikněte na ni a přetáhněte na jamku.

Jamka se označí barevně podle zvolené načtené analýzy.

## Zadání ID vzorků a poznámek

Chcete-li zadat ID vzorku nebo poznámku, vyberte buňku a zadejte text.

Chcete-li ID vzorku nebo poznámku upravit, vyberte buňku (stávající obsah se označí) nebo na buňku dvakrát klikněte.



## Protokol 2: PCR s činidly dodanými v soupravě *therascreen* BRAF Pyro Kit

Tento protokol popisuje amplifikaci PCR oblasti obsahující kodon 600 a amplifikaci PCR oblasti obsahující kodony 464–469 s použitím soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit.

### Důležité body před zahájením

- DNA polymeráza HotStarTaq® v master mixu PyroMark PCR vyžaduje aktivační krok **15 min při 95 °C**.
- Všechny reakční směsi připravujte před zahájením pyrosekvenanční analýzy v prostoru odděleném od prostoru určeného na purifikaci DNA, přidávání templátu DNA do PCR, analýzy PCR produktů nebo přípravy vzorků.
- Používejte jednorázové špičky obsahující hydrofobní filtry z důvodu minimalizace křížové kontaminace.

### Úkony před zahájením

- Zkumavky s PCR primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Upravte koncentraci DNA vzorku a kontroly dle potřeby na 0,4 – 2 ng/μl.

### Postup

#### 1. Všechny potřebné složky rozmrazte (viz tabulka 4).

Před použitím řádně promíchejte.

#### 2. Pro každou sadu PCR primerů připravte reakční směs podle tabulky 4.

Reakční směs obvykle obsahuje všechny složky nutné pro provedení PCR kromě vzorku.

Reakční směs připravte v objemu vyšším než je nutné pro provedení celkového počtu PCR analýz.

**Tabulka 4. Příprava reakční směsi pro každou směs PCR primerů**

<b>Složka</b>	<b>Objem na reakci (μl)</b>
PCR master mix PyroMark, 2x	12,5
Koncentrát CoralLoad, 10x	2,5
PCR Primer BRAF kodon 600 <b>nebo</b> PCR Primer BRAF kodony 464–469	1,0
Voda (H <sub>2</sub> O, součást dodávky)	4,0
<b>Celkový objem</b>	<b>20,0</b>

**3. Reakční směs řádně promíchejte a naneste 20 μl do každé PCR zkumavky.**

Není nutné mít PCR zkumavky uložené v ledu, neboť HotStarTaq DNA polymeráza je při laboratorní teplotě neaktivní.

**4. Do jednotlivých PCR zkumavek přidejte 5 μl templátu DNA (2–10 ng genomové DNA) (viz tabulka 5) a důkladně promíchejte.**

**Poznámka:** Pro alespoň jednu analýzu lze zahrnout do každého nastavení PCR i negativní kontrolní vzorek (bez templátu DNA).

**Poznámka:** Zahrnuje vzorek s nemetylovanou kontrolní DNA pro každou analýzu ve všech cyklech pyrosekvenování (viz „Kontroly“, strana 6).

**Tabulka 5. Příprava PCR**

<b>Složka</b>	<b>Objem na reakci (μl)</b>
Reakční směs	20
Vzorek DNA	5
<b>Celkový objem</b>	<b>25</b>

5. Termocykler naprogramujte podle pokynů výrobce na podmínky uvedené v tabulce 6.

**Tabulka 6. Optimalizovaný protokol cyklování**

			Poznámky
<b>Iničiační aktivační krok:</b>	15 minut	95 °C	Tento zahřívací krok slouží k aktivaci HotStarTaq DNA polymerázy.
<b>Cyklování ve 3 krocích:</b>			
Denaturace	20 sekund	95 °C	
Hybridizace	30 sekund	53 °C	
Polymerizace	20 sekund	72 °C	
Počet cyklů	42		
<b>Konečná hybridizace:</b>	5 minut	72 °C	

6. Uložte PCR zkumavky do termocykleru a spusťte cyklovací program.
7. Po ukončení amplifikace pokračujte částí „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ na straně 20.

## Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance

Tento protokol popisuje imobilizaci templátu DNA na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare), která musí předcházet analýze na systému PyroMark Q24.

### Úkony před zahájením

- Před zahájením imobilizace nechte všechna požadovaná činidla a roztoky temperovat na laboratorní teplotu (15–25 °C).

### Důležité body před zahájením

- Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s předchozí revizí *příručky* theascreen *BRAF Pyro Kit* (verze 1, červenec 2011, krok 2) mírně změněno.

### Postup

1. Jemně protřepejte lahvičku obsahující Streptavidin Sepharose High Performance, aby byl roztok homogenní.
2. Připravte master mix pro imobilizaci DNA podle tabulky 7. Připravte o 10 % vyšší objem, než je nutné pro provedení celkového množství reakcí.

Tabulka 7. Master mix pro imobilizaci DNA

Složka	Objem na vzorek (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Vazebný pufr PyroMark	40
Voda (H <sub>2</sub> O, součást dodávky)	29
<b>Celkový objem</b>	<b>70</b>

**Poznámka:** Tento protokol platí pro Streptavidin Sepharose High Performance s číslem šarže 10057037 nebo vyšším. Při použití kuliček Streptavidin Sepharose High Performance Beads s číslem šarže nižším než 10057037 musí být objem kuliček na vzorek zvýšen na 2 μl, a zároveň je nutné ve stejném poměru snížit objem vody.

3. Naneste 70 μl master mixu do jamek na 24jamkové PCR destičce nebo stripu podle předem definovaného nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 15).

4. **Do každé jamky obsahující master mix přidejte 10 µl biotinylovaného PCR produktu z protokolu 2 podle předem definovaného nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 15).**

**Poznámka:** Po nanesení master mixu i PCR produktu by celkový objem v jamce měl být 80 µl.

5. **PCR destičku (nebo stripy) zavřete víčky.**

**Poznámka:** Zkontrolujte, zda nemůže dojít k přetékání kapaliny mezi jamkami.

6. **Míchejte PCR destičku při laboratorní teplotě (15–25 °C) po dobu 5–10 min při 1400 ot./min.**

**Poznámka:** Během tohoto kroku nachystejte vakuovou stanici PyroMark Q24 na přípravu vzorku podle návodu v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. **Pokračujte přímo částí „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24“ na straně 22.**

**Poznámka:** Sepharosové kuličky rychle sedimentují. Kuličky je nutné odebrat okamžitě po míchání.

Pokud od míchání destiček (nebo stripů) uplyne více než 1 minuta, zamíchejte je před odběrem kuliček znovu po dobu 1 minuty.

## Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24

Tento protokol popisuje přípravu jednořetězcové DNA a připojení sekvenačních primerů k templátu před provedením pyrosekvenační analýzy na systému PyroMark Q24.

### Důležité body před zahájením

- Zkumavky se sekvenačními primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- S ohledem na to, kterou oblast chcete analyzovat (kodon 600 nebo kodony 464–469), naneste 2 různé sekvenační primery podle stejného vzoru, který byl definován v nastavení cyklu pro danou destičku (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 15).
- Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s předchozí revizí *příručky theascreen BRAF Pyro Kit* (verze 1, červenec 2011, krok 18) mírně změněno. Dobu chlazení vzorků po jejich zahřátí na 80 °C nezkracujte.
- Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*), a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.

### Úkony před zahájením

- Jeden stojan na destičky PyroMark Q24 uložte na předehřátý topný blok na teplotu 80 °C jako přípravu na krok 17. Druhý stojan na destičky PyroMark Q24, který bude použit v kroku 18, ponechte v prostředí s laboratorní teplotou (15–25 °C).
- Promývací pufr PyroMark je dodáván v 10 x koncentrované formě. Před prvním použitím naředte 1 dávku pracovního roztoku: k 25 ml 10x koncentrovaného promývacího pufru PyroMark přidejte 225 ml vysoce čištěné vody (konečný objem bude 250 ml).

**Poznámka:** Pracovní roztok promývacího pufru 1x PyroMark je stabilní při 2–8 °C až do vyznačené doby použitelnosti.

## Postup

1. **Nařeďte dostatečné množství daného sekvenačního primeru Seq primer BRAF 600 nebo Seq primer BRAF 464–469 hybridizačním pufrům PyroMark podle Tabulky 8.**

Roztok sekvenačních primerů připravte o objemu větším než je požadované množství pro sekvenování celkového počtu vzorků (počet vzorků + jedna dávka navíc).

Neřeďte a uložte více sekvenačních primerů.

**Tabulka 8. Příklad ředění sekvenačních primerů**

<b>Složka</b>	<b>Objem na vzorek (μl)</b>	<b>Objem na 9 + 1 reakcí (μl)</b>
Seq Primer BRAF 600 <b>nebo</b> Seq Primer BRAF 464–469	0,8	8
Hybridizační pufr PyroMark	24,2	242
<b>Celkový objem</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

2. **Do každé jamky na destičce PyroMark Q24 naneste 25 μl naředěného sekvenačního primeru podle vzoru v nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 15).**

**Poznámka:** Jeden stojan na destičky PyroMark Q24 (součást dodávky vakuové stanice PyroMark Q24) uchovávejte při laboratorní teplotě (15–25 °C) a používejte jej jako pomůcku při přípravě a přenášení destičky.

3. **Uložte PCR destičku (nebo strip) z protokolu 3 a destičku PyroMark Q24 na pracovní stůl (obrázek 3).**

Prohlédněte PCR destičku a ujistěte se, že se v roztoku nachází kuličky Sepharose.

**Poznámka:** Zkontrolujte, zda má destička stejnou orientaci jako při nanášení vzorku.



Obrázek 3. Uložení PCR destičky (nebo stripů) a destičky PyroMark Q24 do vakuové stanice.

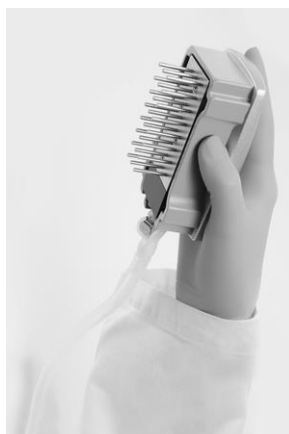
4. Přepněte na přívod vakua a zaveďte vakuum do hlavice.
5. Opatrně spusťte filtrační sondy vakuové hlavice do PCR destičky (nebo stripů) a odeberte kuličky obsahující imobilizovaný templát. Sondy ponechejte na místě po dobu 15 sekund. Při zvedání vakuové hlavice postupujte velmi opatrně.

**Poznámka:** Sepharosové kuličky rychle sedimentují. Pokud od míchání destiček (nebo stripů) uplyne více než 1 minuta, zamíchejte je před odběrem kuliček znovu po dobu 1 minuty.

Prohlédněte PCR destičku, zda obsahuje všechny vzorky z vakuové hlavice.

6. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml 70 % etanolu (obrázek 3). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
7. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml denaturačního roztoku (obrázek 3). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
8. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 50 ml promývacího pufru (obrázek 3). Proplachujte filtrační sondy po dobu 10 sekund.
9. Zvedněte vakuovou hlavici nahoru, naklopte ji svisle přes 90° a po dobu 5 sekund nechte tekutinu na filtračních sondách oschnout (obrázek 4).





Obrázek 4. Zobrazení vakuové hlavice naklopené svisle přes 90°.

10. Podržte vakuovou hlavici nad destičkou PyroMark Q24 a zavřete přívod vakua na hlavici (poloha Off).
11. Ponořte filtrační sondy do roztoku sekvenačních primerů a jemným třepáním hlavice do stran uvolněte kuličky do destičky PyroMark Q24.  
**Poznámka:** Dbejte na to, aby nedošlo ke zničení povrchu destičky PyroMark Q24 poškrábáním filtračními sondami.
12. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující vysoce čištěnou vodu (obrázek 3) a po dobu 10 sekund hlavici protřepávejte.
13. Promyjte filtrační sondy ponořením do vysoce čištěné vody (obrázek 3) a zavedením vakua. Opláchněte sondy 70 ml vysoce čištěné vody.
14. Zvedněte vakuovou hlavici nahoru, naklopte ji svisle přes 90° a po dobu 5 sekund nechte tekutinu na filtračních sondách oschnout (obrázek 4).
15. Zavřete přívod vakua na vakuové hlavici (poloha Off) a uložte hlavici do zajištěné polohy (P).
16. Vypněte vakuovou pumpu.  
**Poznámka:** Na konci pracovního dne je potřeba zlikvidovat odpadní a zbytkové roztoky a zkontrolovat vakuovou stanici PyroMark Q24, zdali není znečištěna prachem a potřísněna tekutinami (viz příloha B, na straně 48).
17. Ohřejte destičku PyroMark Q24 se vzorky na 80 °C po dobu 2 minut s využitím přehřátého stojanu na destičky PyroMark Q24.
18. Odeberte destičku PyroMark Q24 z horkého stojanu, položte ji na druhý stojan PyroMark Q24 umístěný v prostředí s laboratorní teplotou (15–25 °C) a nechte vzorky vychladnout na laboratorní teplotu po dobu 10–15 minut.
19. Pokračujte částí „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 26.

## Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24

Tento protokol popisuje přípravu a nanesení činidel PyroMark Gold Q24 na kazetu PyroMark Q24 a zahájení a ukončení cyklu systému PyroMark Q24. Podrobnější popis uvádějící nastavení cyklu naleznete v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

### Důležitý bod před zahájením

- Ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním cyklu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 15), jsou uvedeny informace o objemu nukleotidů, enzymů, substrátů a pufrů nutných pro provedení daného cyklu.

### Úkony před zahájením

- Zapněte systém PyroMark Q24. Hlavní vypínač je umístěn na zadní straně přístroje.

### Postup

- 1. Rozpusťte lyofilizovanou směs enzymů a směs substrátů vždy v 620 µl vody (H<sub>2</sub>O, součást dodávky).**
- 2. Míchání proveďte mírným kroužením lahvičkou.**  
**Poznámka:** Nepoužívejte třepačku!  
**Poznámka:** Aby bylo zajištěno úplné rozpuštění směsi, ponechte ji v prostředí s laboratorní teplotou (15–25 °C) po dobu 5–10 minut. Před započtením plnění kazety PyroMark Q24 se přesvědčte, že roztok není zakalený. Pokud nemají být činidla bezprostředně použita, uložte lahvičky s činidly na led<sup>§</sup> nebo do ledničky.
- 3. Umožněte činidlům a kazetě PyroMark Q24 získat okolní teplotu (20–25 °C).**
- 4. Umístěte kazetu PyroMark Q24 tak, aby byla natočena štítkem k vám.**
- 5. Naneste na kazetu PyroMark Q24 příslušné objemy nukleotidů, směsi enzymů a směsi substrátů podle obrázku 5.**  
Přesvědčte se, že se z pipety nepřenesly do kazety žádné vzduchové bubliny.

<sup>§</sup> Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v bezpečnostních listech (MSDS) příslušných materiálů, které obdržíte od dodavatele výrobku.



**Obrázek 5. Obrázek kazety PyroMark Q24 shora.** Popisy odpovídají štítkům na lahvičkách s činidly. Přidejte směs enzymů (**E**), směs substrátů (**S**) a nukleotidy (**A**, **T**, **C**, **G**) podle údajů o objemech uvedených ve zprávě Pre Run information (Informace před spuštěním cyklu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení cyklu.

6. Otevřete dvířka kazety a vložte kazetu naplněnou činidly štítkem ven. Kazetu zcela zasuňte a zatlačte dolů.
7. Zkontrolujte, zda je vidět linka na přední straně kazety, a zavřete dvířka.
8. Otevřete rámeček na upevnění destičky a umístěte destičku na topný blok.
9. Zavřete rámeček na upevnění destičky a víko přístroje.
10. Do USB portu na přední straně přístroje zasuňte USB jednotku (obsahující soubor cyklu).  
Poznámka: USB jednotku nechte zasunutou až do ukončení cyklu.
11. Z hlavní nabídky vyberte příkaz „Run“ (Spustit) pomocí tlačítek ▲ a ▼ na obrazovce a stiskněte tlačítko „OK“.
12. Pomocí tlačítek na obrazovce ▲ a ▼ vyberte soubor cyklu.  
Poznámka: Chcete-li si prohlédnout obsah složky, vyberte danou složku a stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat). Chcete-li se vrátit zpět na předchozí zobrazení, stiskněte tlačítko „Back“ (Zpět).
13. Máte-li vybraný požadovaný cyklus, stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat).
14. Jakmile se cyklus dokončí a přístroj potvrdí, že soubor cyklu byl uložen na USB jednotku, stiskněte tlačítko „Close“ (Zavřít).
15. Vyjměte USB jednotku.
16. Otevřete víko přístroje.
17. Otevřete dvířka kazety a kazetu s reagenty nadzdvihněte a vytáhněte ven.
18. Zavřete dvířka.
19. Otevřete rámeček na upevnění destičky a odeberte destičku z topného bloku.
20. Zavřete rámeček na upevnění destičky a víko přístroje.
21. Destičku zlikvidujte a kazetu vyčistěte podle návodu k výrobku, který je součástí dodávky kazety.
22. Proved'te analýzu cyklu, jak je popsáno v tématu „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 28.

## Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24

Tento protokol popisuje analýzu mutací po dokončeném cyklu BRAF pomocí softwaru PyroMark Q24.

### Postup

1. Zasuňte USB jednotku obsahující vytvořený soubor cyklu do USB portu počítače.
2. Pomocí Průzkumníku Windows přesuňte soubor cyklu z USB jednotky do požadovaného umístění v počítači.
3. Otevřete soubor cyklu v režimu AQ softwaru PyroMark Q24 buď zvolením možnosti „Open“ (Otevřít) v nabídce „File“ (Soubor) nebo dvojitým kliknutím na soubor (☑) v prohlížeči zkratk.
4. Existují 2 metody analýzy cyklu. Pokud používáte modul BRAF Plug-in Report, přejděte na krok 5. Pokud používáte AQ analýzu, která je součástí systému PyroMark Q24, přejděte na krok 6.

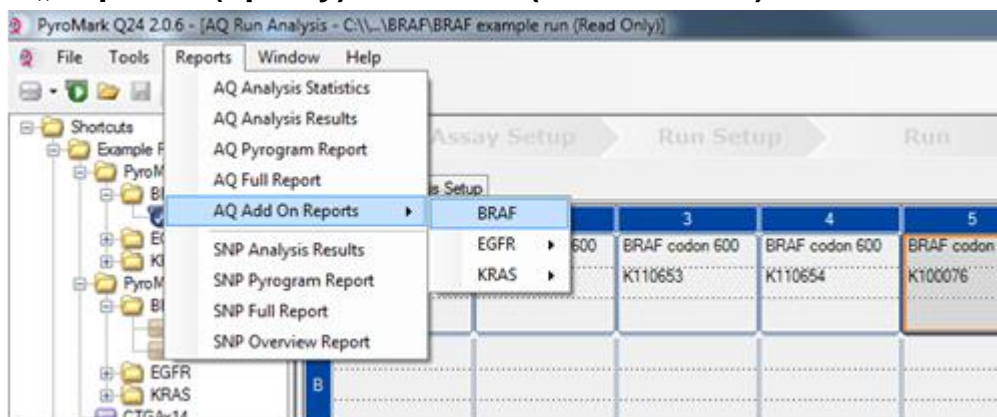
**Poznámka:** Důrazně doporučujeme používat k interpretaci výsledků modul BRAF Plug-in Report. Modul BRAF Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). V této zprávě je zajištěno, aby byly jednotlivé hodnoty LOD tabulka 9 a různé analyzované sekvence použity k automatické detekci všech mutací.

**Poznámka:** Složité mutace BRAF kodonu 600 a 469 není možné analyzovat v softwaru PyroMark Q24 pomocí AQ analýzy. Doporučujeme použít BRAF Plug-in Report pro analýzu složitých mutací kodonu 600 a 469.

**Poznámka:** Některé konkrétní mutace v kodonu 600 a také mutace G469A a G469S nemusí být přesně rozlišeny při hladinách mutace nižší než 10 %.

### 5. Použití modulu BRAF Plug-in Report:

Chcete-li vytvořit zprávu, zvolte „AQ Add On Reports/BRAF“ z „Reports“ (Zprávy) v nabídce (viz obrázek 6).



Obrázek 6. Nabídka BRAF Plug-in Report.

V jamkách automaticky proběhne analýza všech mutací, pro které je dána mez detekce (LOD) v tabulce 9. Výsledky se zobrazí v přehledné tabulce (obrázek 7) a následují i podrobné výsledky, které zahrnují například pyrogramy a kvalitu analýzy.

### Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

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

Obrázek 7. Zpráva BRAF Plug-in Report.

## 6. Použití AQ analýzy:

**Chcete-li provést analýzu cyklu a získat přehled výsledků, klikněte na jedno z tlačítek analýzy.**



Analyzovat všechny jamky.



Analyzovat vybranou jamku.

Výsledky analýzy (četnost alel) a stanovení kvality se zobrazí nad pozici proměnné v záznamu Pyrogram<sup>®</sup>. Bližší informace o analýze cyklu najdete v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

## 7. Chcete-li vytvořit zprávu, vyberte z nabídky „Reports“ (Zprávy) možnost „AQ Full Report“ (Celá zpráva AQ) nebo „AQ Analysis Results“ (Výsledky AQ analýzy).

**Poznámka:** Za spolehlivé se doporučuje považovat výsledky, kde výška píku přesahuje 30 RLU. V nastavení analýzy určete hodnotu 30 RLU jako „požadovanou výšku píku pro uznání kvality výsledku“ (viz Příloha A a Příručka pro uživatele systému PyroMark Q24 [*PyroMark Q24 User Manual*]).

**Poznámka:** Zpráva s výsledky AQ analýzy by se měla použít jako dokumentace a interpretace kvantitativního vyhodnocení alel. Čísla uváděná v pyrogramu jsou zaokrouhlena a neudávají zcela přesnou kvantitativní hodnotu.

**Poznámka:** Pyrogram by měl být vždy porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Naměřené píky by měly výškově odpovídat sloupcům histogramu.

**Opakování analýzy vzorků, u nichž nebyla detekována mutace GTG → GAG nebo s hodnocením kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo)**

Nejčastější mutace v genu BRAF je GTG → GAG v nukleotidu 1799 (druhá báze kodonu 600). Z tohoto důvodu je standardní „analyzovaná sekvence“ definovaná v nastavení testu zaměřena tuto mutaci (viz Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy theascreen BRAF Pyro, strana 45).

Analýzu všech vzorků, u kterých nebyla detekována mutace ve standardní analyzované sekvenci, a vzorků, u kterých bylo u hodnocení kvality uvedeno „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo), nebo vykazují píky, které neodpovídají výšce sloupců histogramu, je důrazně doporučeno zopakovat. Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) a „Failed“ (Selhalo) může poukazovat na mutaci, kterou nepostihuje standardní analyzovaná sekvence s velkými výslednými odchylkami píků.

Chcete-li provést opakovanou analýzu na cílové mutace na nukleotidu 1798 nebo 1799 kodonu 600, přejděte na „Analysis Setup“ (Nastavení analýzy) a změňte položku „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) na některou z doplňkových položek „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) uvedených v části „Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy theascreen BRAF Pyro“, strana 45. Klikněte na tlačítko „Apply“ (Použít) a po zobrazení okna „Apply Analysis Setup“ (Použít nastavení analýzy), klikněte na možnost „To All“ (Na všechny).

Aktualizované četnosti mutací lidského genu BRAF v kodonu 600 a kodonech 464 až 469 jsou dostupné online na adrese Sangerova ústavu [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Poznámka:** Po změně položky „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) se ujistěte, že je prahová hodnota pro výšku samostatného píku nastavena na 30 RLU.

**Poznámka:** V sekvenované oblasti mohou být přítomny další vzácné nebo neočekávané mutace a mohou být analyzovány pomocí alternativní položky „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) beroucí v potaz neočekávané mutace.

**Poznámka:** Pokud naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a nelze tento jev vysvětlit vzácnými nebo neočekávanými mutacemi, je doporučeno provést novou analýzu vzorku.

## Interpretace výsledků

### Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu

Je důrazně doporučeno, aby každý cyklus zahrnoval i kontrolní nemethylovanou DNA pro srovnání a jako kontrolu úrovní v pozadí. Naměřená frekvence kontrolního vzorku by měla být menší nebo rovna mezi slepého vzorku (LOB, limit of blank).

Všechny vzorky by měly být prozkoumány s ohledem na meze detekce (LOD, Tabulka 9) a interpretovány následujícím způsobem.

- Frekvence mutace < LOD: Mutace nebyla detekována
- Frekvence mutace  $\geq$  LOD a  $\leq$  LOD + 3 % jednotek: Potenciální mutace s nízkou úrovní výskytu

**Poznámka:** Pokud tato situace nastane při používání modulu BRAF Plug-in Report (viz krok 5, „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“, strana 26) zobrazí se upozornění.

Vzorky s hlášenou potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu by měly být považovány z hlediska této mutace za pozitivní pouze v případě, že bude potvrzena další duplicitní analýzou se vzorkem s nemethylovanou kontrolní DNA. Výsledek obou duplicitních analýz musí být  $\geq$  LOD a lišit se od kontrolního vzorku. V opačném případě by měl být vzorek posouzen jako „Mutace nebyla detekována“.

- Frekvence mutace > LOD + 3 % jednotek: Mutace

Pokud používáte modul BRAF Plug-in Report, je toto provedeno automaticky.

**Poznámka:** K interpretaci výsledků je doporučeno používat modul BRAF Plug-in Report. K podrobnějšímu prozkoumání vzorků s hlášenou potenciální mutací o nízké hladině doporučujeme provést další analýzu vzorku ručně v aplikačním softwaru (např. pro porovnání s frekvencí této mutace v kontrolním vzorku).

**Poznámka:** Některé konkrétní mutace v kodonu 600 a také mutace G469A a G469S nemusí být přesně rozlišeny při hladinách mutace nižší než 10 %.

**Poznámka:** Naměřená frekvence nad LOB v kontrolním vzorku ukazuje na vyšší než obvyklou úroveň pozadí v těchto jednotlivých cyklech, která by mohla mít vliv na kvantifikaci alel, a to zejména u nízkých mutačních úrovní. V tomto případě nejsou naměřené četnosti v rozsahu od LOD (Tabulka 9) do LOD + 3 % jednotek základem pro posouzení stavu mutací. Je doporučeno provést novou analýzu vzorků s potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu.

**Poznámka:** Rozhodnutí o léčbě pacientů s nádorovým onemocněním nelze zakládat výhradně na analýze stavu mutací genu BRAF.

**Tabulka 9. LOB a LOD určené pro specifické mutace**

<b>Substituce nukleové kyseliny</b>	<b>Substituce amino-kyseliny</b>	<b>LOB (% jednotek)</b>	<b>LOD (% jednotek)</b>	<b>COSMIC ID* (V46)</b>
<b>Kodon 600 (GTG) při analýze ve zpětném směru (CAC)</b>				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
<b>Kodon 469 (GGA) při analýze ve zpětném směru (TCC)</b>				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
<b>Kodon 466 (GGA) při analýze ve zpětném směru (TCC)</b>				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
<b>Kodon 464 (GGA) při analýze ve zpětném směru (TCC)</b>				
[1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

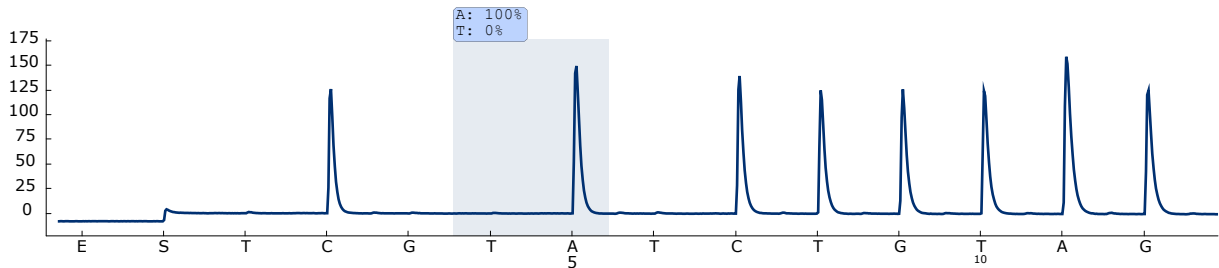
\* Podle Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) dostupného online na stránkách Sangerova ústavu [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

<sup>†</sup> Nejnižší hladina mutace ve vzorku, která vede k naměření frekvence  $\geq$ LOD.

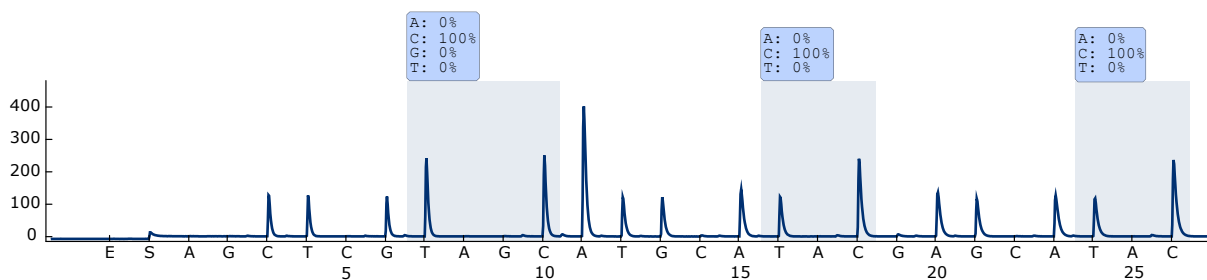


## Reprezentativní výsledky

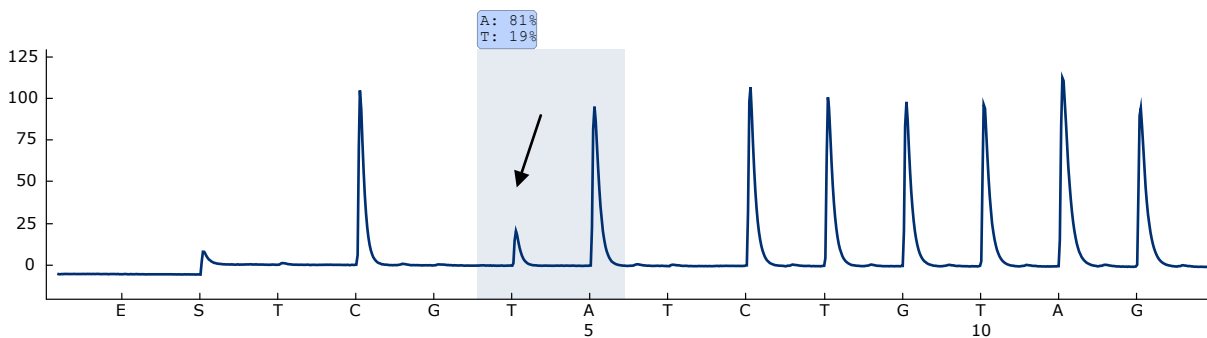
Na obrázcích 8–10 jsou uvedeny ukázkové výsledky pyrogramu.



**Obrázek 8.** Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s genotypem divokého typu v kodonu 600 s analyzovanou sekvencí *CWCTGTAGC*.



**Obrázek 9.** Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s genotypem divokého typu v kodonech 464 až 469 s analyzovanou sekvencí *CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA*.



**Obrázek 10.** Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorků s mutací *GTG → GAG* (V600E) u báze 2 kodonu 600 (nukleotid 1799, označený šipkou) s analyzovanou sekvencí *CWCTGTAGC*.

## Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologií přípravy vzorků či zpracování analýz (kontaktní informace najdete na zadní straně obálky nebo na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Poznámka:** Řešení všeobecných problémů s přístrojem jsou uvedena v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

### Komentáře a návrhy

---

#### Signály u kontroly bez templátu (negativní kontroly)

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| a) Vzájemné signály susedních jamek | Signál z jedné jamky je detekován v sousední jamce. Neumisťujte vzorky s vysokou intenzitou signálu vedle kontrolních jamek bez templátu.           |
| b) Kontaminace PCR                  | Používejte sterilní pipetovací špičky s filtry. Materiál, jako jsou vzorky, kontroly a amplikony, uchovávejte a extrahujte odděleně od činidel PCR. |

#### Slabá nebo neočekávaná sekvence

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| a) Nízká kvalita genomové DNA | Nízká kvalita genomové DNA může být příčinou selhání PCR. Proveďte analýzu PCR vzorků elektroforézou (například na systému QIAxcel <sup>®</sup> Advanced nebo elektroforézou na agarózovém gelu). |
|-------------------------------|---|

## Komentáře a návrhy

---

### Výsledek „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo)

- a) Malá výška píku Příčinou nízkých píků mohou být chyby při přípravě PCR nebo vzorku před zahájením pyrosekvenování.
- Je důležité, aby všechny vzorky byly vakuovou hlavici plně uchopeny. Dbejte, aby se vakuová hlavice zanořovala do vzorků pomalu a aby geometrie PCR destičky nebo proužku, použité imobilizaci DNA, umožňovala kompletní zachycení vzorků.
- Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*), a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.
- V případě upozornění „Check“ (Ověřit) pečlivě porovnejte pyrogram s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Pokud naměřené píky odpovídají výškám sloupců histogramu, výsledek je platný. V jiném případě je doporučeno provést novou analýzu vzorku.
- b) Mutace není definována jako „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence)
- V nastavení analýzy upravte analyzovanou sekvenci (viz Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy *therascreen* BRAF Pyro, strana 45) a analýzu cyklu zopakujte.
- c) Neočekávaná vzácná mutace
- Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) může být vyvoláno neočekávaným uspořádáním píků. Tento jev může poukazovat na přítomnost neočekávané mutace, která není součástí analýzy podle poskytnuté „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence). Tyto vzorky by se měly analyzovat pomocí alternativní analyzované sekvence s ohledem na možnost přítomnosti neočekávaných mutací.

## Komentáře a návrhy

---

- d) Upozornění na odchylku výšky vysokého píku pro přidání  
Pyrogram by měl být pečlivě porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. V případě, že naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a nelze tento jev vysvětlit vzácnými mutacemi, je doporučeno provést novou analýzu vzorku.
- e) Upozornění „High peak height deviation“ (Odchylka výšky vysokého píku) pro přidání 6 do analýzy kodonu 600 analyzované sekvence CAYCTGTAGC  
Pyrogram by měl být pečlivě porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. V případě, že je šum pozadí při přidání T6 nižší než očekávaná hladina a zbývající změřené píky odpovídají výšce sloupců histogramu, je možné upozornění a hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) ignorovat.
- f) Upozornění „High peak height deviation“ (Odchylka výšky vysokého píku) pro přidání 3 nebo 4 do analýzy kodonu 600 analyzované sekvence CVCTGTAGC  
Pyrogram by měl být pečlivě porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. V případě, že je šum pozadí při přidání G3 nebo T4 nižší než očekávaná hladina a zbývající změřené píky odpovídají výšce sloupců histogramu, je možné upozornění a hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) ignorovat.
- g) V analýze kodonu 600 s analyzovanou sekvencí CVCTGTAGC se zobrazuje hlášení s upozorněním: „The sequence contains less reference peaks than required“ (Sekvence obsahuje méně referenčních píků než je vyžadováno).  
Pokud naměřené píky odpovídají výškám sloupců histogramu, upozornění i hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) je možné ignorovat.

## Komentáře a návrhy

---

### Výrazné pozadí

- |   |  |
|---|--|
| a) Nesprávné skladování nukleotidů                          | Nukleotidy skladujte při teplotě 2 až 8 °C. Uchovávání při teplotách -15 až -25 °C může zvyšovat šum pozadí.                   |
| b) Krátká doba chlazení vzorků před pyro-sekvenční analýzou | Vzorky uložte na držáku destiček PyroMark Q24 na 10 až 15 minut do prostoru s laboratorní teplotou. Dobu chlazení nezkracujte. |
| c) Kontaminace kazety                                       | Kazetu pečlivě vyčistěte, jak je popsáno v návodu k výrobku. Uložte kazetu na místě chráněném před světlem a prachem.          |

### Pozitivní kontroly (kontrolní nemetylovaná DNA) nevykazují signál.

- |   |  |
|---|--|
| a) Nedostatečné množství směsi enzymů nebo substrátů ve všech jamkách | Přesvědčte se, zda jste správně naplnili kazetu PyroMark Q24 podle zadání ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním cyklu) v nabídce „Tools“ (Nástroje).   |
| b) Činidla nebyla správně uskladněna nebo naředěna.                   | Připravte činidla <i>therascreen</i> podle pokynů v části „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 26.  |
| c) Chyba při přípravě PCR nebo vzorku.                                | Manipulační chyby při nastavení PCR, programování cyklu PCR nebo přípravě vzorku před zahájením pyrosekvenování mohou mít za následek ztrátu signálu. Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 ( <i>PyroMark Q24 User Manual</i> ), a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte. Zopakujte PCR a pyrosekvenční analýzu. |

## Kontrola kvality

K zajištění stálé kvality produktu je v souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobků společnosti QIAGEN každá výrobní šarže souprav *therascreen* BRAF Pyro Kit testována podle předem stanovených specifikací.

## Omezení

Všechny získané diagnostické výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými nebo laboratorními nálezy.

Každý uživatel je zodpovědný za platnost funkčnosti systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčnosti výrobků QIAGEN.

## Funkční vlastnosti

### Mez slepého vzorku a mez detekce

Mez slepého vzorku (LOB, limit of blank) a mez detekce (LOD, limit of detection) byly stanoveny pro určitý počet mutací pomocí směsi plasmidů (tabulka 10). LOB a LOD byly stanoveny podle doporučení v pokynech Ústavu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A „Protokol pro určení mezí detekce a mezí kvantifikace, schválené pokyny“.  $\alpha$ - a  $\beta$ -chyby (falešně pozitivní a falešně negativní) byly dány jako 5 %. Hodnoty LOB představují frekvenci naměřenou u standardních vzorků divokého typu. Hodnoty LOD představují nejnižší signál (naměřenou frekvenci), který lze pro danou mutaci považovat za pozitivní.

### Mutace (GTG → GGG) a (GTG → GCG) v kodonu 600 a (GGA → GAA) v kodonu 464

U těchto mutací byla buď slepá měření soustavně blízko 0 % jednotek ( $n = 72$ ), což bylo příčinou negaussovského rozdělení, nebo mělo u této mutace negaussovské rozdělení měření vzorků s nejnižšími úrovněmi mutací. Hodnota LOD byla proto stanovena pomocí jiné metody dle doporučení pokynů CLSI EP17-A. Nejnižší signál, který určuje přítomnost mutace (LOD) v těchto polohách, byl dán jako 2 % jednotek nad úroveň příslušné základní úrovně definované 95. percentilem ze slepých měření. Při analýze vzorku s úrovní mutace uvedené v tabulce 10 v závorkách vykazovalo 95 % výsledků ( $n = 72$ ) signál, který lze považovat za pozitivní ( $\geq$ LOD).

**Tabulka 10. LOB a LOD určené pro specifické mutace**

Substituce nukleové kyseliny	Substituce amino-kyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	COSMIC ID* (V46)
<b>Kodon 600 (GTG) při analýze ve zpětném směru (CAC)</b>				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
<b>Kodon 469 (GGA) při analýze ve zpětném směru (TCC)</b>				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
<b>Kodon 466 (GGA) při analýze ve zpětném směru (TCC)</b>				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
<b>Kodon 464 (GGA) při analýze ve zpětném směru (TCC)</b>				
[1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

\* Podle Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) dostupného online na stránkách Sangerova ústavu [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

<sup>†</sup> Nejnižší hladina mutace ve vzorku, která vede k naměření frekvence  $\geq$ LOD.

**Poznámka:** Tyto hodnoty vycházejí z cyklů, kde směsi plasmidů nesly divoký typ nebo kde byly příslušné mutované sekvence použity jako vzor při amplifikaci PCR.

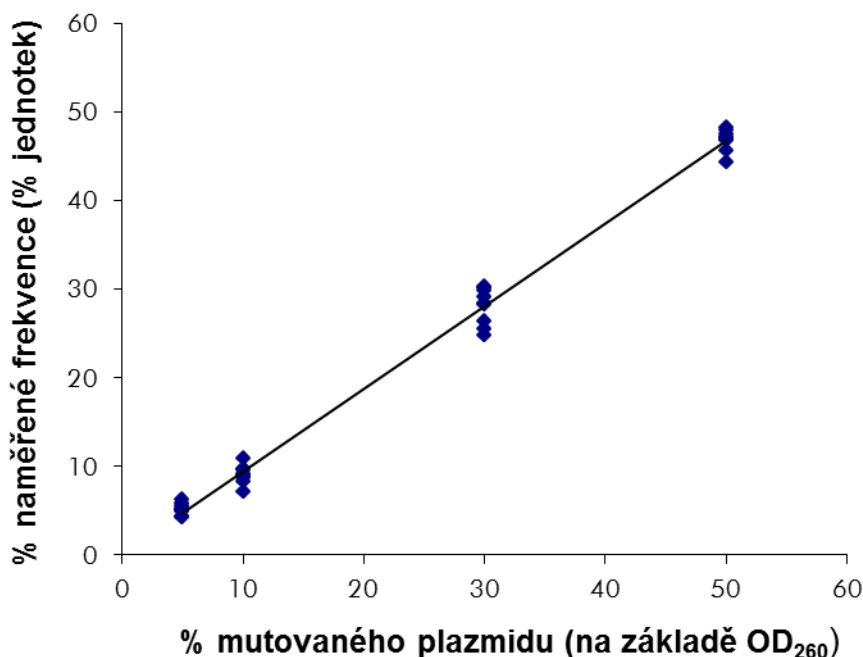
**Pozn.:** Je doporučeno funkčnost metody potvrdit v laboratoři.

## Linearita

Linearita byla stanovena použitím směsi plazmidů nesoucí divoký typ nebo mutované sekvence mutace V600E (GTG → GAG) v kodonu 600 genu BRAF. Plazmidy byly smíchány v poměrech tak, aby poskytly čtyři úrovně mutací (5, 10, 30 a 50 %). Každá směs byla analyzována třemi různými šaržemi soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit ve třech cyklech pyrosekvenování, každý se třemi opakováními.

Výsledky (n = 9 pro každou úroveň výskytu mutací) byly analyzovány podle pokynu CLSI EP6-A “Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline“ (Hodnocení linearity kvantitativních měřících postupů: statistická metoda; schválené pokyny) pomocí softwaru Analyse-it<sup>®</sup> v2.21 a pro mutaci V600E (GTG → GAG) v kodonu 600 jsou zobrazeny na obrázku 11.

Výsledky byly lineární v rámci povolené nelinearity 5 % jednotek v testovaném rozmezí 5 až 50 % úrovní výskytu mutací.



Obrázek 11. Linearita mutace V600E (GTG → GAG) v kodonu 600.

## Přesnost

Tyto údaje o přesnosti umožňují stanovení celkové variability analýz a byly získány třikrát opakovanými analýzami výše uvedených směsí plazmidů na třech různých úrovních.

Opakovatelnost (variabilita v rámci analýzy a mezi dávkami) byla vypočítána na základě dat sloužících ke stanovení linearity (tři cykly ve stejný den s různými šaržemi soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit). Střední přesnost (variabilita v rámci laboratoře) byla stanovena ve třech cyklech v jedné



laboratoři ve třech různých dnech s různými operátory, systémy PyroMark Q24 a šaržemi soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit. Reprodukovatelnost (mezi-laboratorní variabilita) byla vypočítána ze dvou cyklů, jeden v interní a druhý v externí laboratoři, a při použití různých šarží soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit.

Odhady přesnosti jsou vyjádřeny jako směrodatná odchylka naměřených frekvencí mutace v % jednotkách (tabulka 11). Opakovatelnost, střední přesnost a reprodukovatelnost pro mutaci V600E (GTG → GAG) v kodonu 600 byla postupně 0,6 – 2,1; 0,7 – 1,8 a 0,8 – 2,1 % jednotek v měřeném rozsahu 5 až 50 % úrovně výskytu mutace.

**Tabulka 11. Přesnost pro mutaci V600E (GTG → GAG) v kodonu 600\***

% mutovaného plazmidu <sup>†</sup>	Opakovatelnost		Střední přesnost		Reprodukovatelnost	
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD
5	5,2	0,6	4,4	0,7	5,1	0,8
10	9,1	1,0	9,6	1,0	9,6	1,3
30	28,1	2,1	27,9	1,8	28,3	2,1
50	46,9	1,2	46,3	1,5	47,9	1,7

\* Všechny hodnoty jsou dány jako % jednotky. SD: směrodatná odchylka (n = 9).

<sup>†</sup> Na základě měření OD<sub>260</sub>.

## Diagnostické vyhodnocení

Souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit byla hodnocena porovnáním se sekvenováním Sangerovou metodou. DNA byla extrahována ze 100 vzorků kožních tumorů fixovaných formalinem, zalitých v parafinu (FFPE) a analyzovaných na mutace v kodonu 600 a kodonech 464 až 469.

DNA byla izolována pomocí soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Pyro-sekvenční analýza byla provedena na soupravě *therascreen* BRAF Pyro Kit na systému PyroMark Q24 a sekvenováním Sangerovou metodou na genetickém analyzátoru ABI™ 3130.

Ze 100 analyzovaných vzorků může být stav mutací kodonu 600 a kodonů 464 až 469 určen sekvenováním Sangerovou metodou ve všech a soupravou *therascreen* BRAF Pyro Kit (tabulka 12 a 13) v 99 vzorcích.

U čtyř ze 100 vzorků byla mutace V600E (GTG → GAG) detekována sekvenováním Sangerovou metodou. Tři z těchto vzorků měly identické výsledky jako souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit, přičemž jeden vzorek selhal při pyrosekvenční analýze kodonu 600 z důvodu nízkých píků. V analýze kodonů 464 až 469 měl tento vzorek sice dostatečné, avšak podstatně nižší píky než

ostatní vzorky, což naznačuje, že DNA je nízké kvality. Žádná ze vzácných mutací v kodonech 464 až 469 nebyla detekována oběma metodami.

Vyjma vzorku, který v některé metodě selhal, souprava *therascreen* BRAF Pyro Kit a sekvenování Sangerovou metodou ukázaly 100% shodu ve výsledcích jak u kodonu 600, tak u kodonů 464 až 469 (tabulky 12 a 13).

**Tabulka 12. Výsledky analyzovaných vzorků kožních tumorů na kodonu 600**

		Sekvenování Sangerovou metodou			Celkem
		Mutace	Divokého typu	Neznámý	
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutace	3	0	0	3
	Divokého typu	0	96	0	96
	Neznámý	1	0	0	1
	<b>Celkem</b>	<b>4</b>	<b>96</b>	<b>0</b>	<b>100</b>

**Tabulka 13. Výsledky analyzovaných vzorků kožních tumorů na kodonech 464 až 469**

		Sekvenování Sangerovou metodou			Celkem
		Mutace	Divokého typu	Neznámý	
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutace	0	0	0	0
	Divokého typu	0	99	0	99
	Neznámý	0	1	0	1
	<b>Celkem</b>	<b>0</b>	<b>99</b>	<b>0</b>	<b>100</b>

**Poznámka:** Ve všech cyklech použitých k determinaci výkonnostních charakteristik signál převyšoval 30 RLU při běžné analýze 10 ng DNA izolované z tkání fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE). Pyrosekvenační data byla analyzována pomocí modulu BRAF Plug-in Report.

## Literatura

Společnost QIAGEN udržuje velkou aktuální online databázi vědeckých publikací využívajících produkty QIAGEN. Přehledné možnosti vyhledávání umožňují najít požadované články jednoduchým hledáním podle klíčových slov nebo určením aplikace, oblasti výzkumu, názvu atd.

Kompletní seznam odkazů na literaturu najdete v online referenční databázi QIAGEN na stránkách [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) nebo se můžete obrátit na technické služby společnosti QIAGEN či místního dodavatele.

## Symboly

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:



Obsahuje činidla pro <N> testů



Datum použitelnosti



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Součásti



Obsahuje



Číslo



Hydroxid sodný



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití

## Kontaktní údaje

Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) nebo se obraťte telefonicky na některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy *therascreen* BRAF Pyro

Pokud byl nainstalován modul BRAF Plugin Report, jsou v prohlížeči klávesových zkratk software PyroMark Q24 ve složce „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ k dispozici předem definovaná nastavení analýz pro kodony 600 a 464–469. Následující kroky není nutné provádět. Modul BRAF Plug-in Report lze obdržet objednávkou e-mailem na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Důrazně se doporučuje používat raději modul BRAF Plug-in Report než manuální analýzu. Komplexní mutace nelze do analyzované sekvence přidat ručně, je nutné je analyzovat pomocí modulu plug-in. Po instalaci modulu plug-in nebo po každé instalaci nového softwaru či jeho aktualizaci v počítači by mělo být správné fungování modulu plug-in ověřeno, jak je popsáno v příručce k modulu plug-in BRAF (BRAF Plug-In Quick Guide).

Pokud modul BRAF Plug-in Report není nainstalován, je nutné před prvním spuštěním analýzy *therascreen* BRAF Pyro nastavit soubor analýzy ručně. Nastavte analýzu BRAF kodonu 600 a kodonů 464–469 pomocí softwaru PyroMark Q24, jak je popsáno níže.

### Postup

#### BRAF kodon 600

**A1. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).**

**A2. Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci:  
**CWCTGTAGC****

**Poznámka:** Nejčastější mutace v kodonu 600 je GTG → GAG v nukleotidu 1799 (druhá pozice).

Po provedení analýzy mutací v jiných pozicích lze analyzovanou sekvenci změnit.

Chcete-li ověřit přítomnost mutací u nukleotidu 1798 (první pozice), změňte sekvenci „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) na následující:

**CAYTGTAGC**

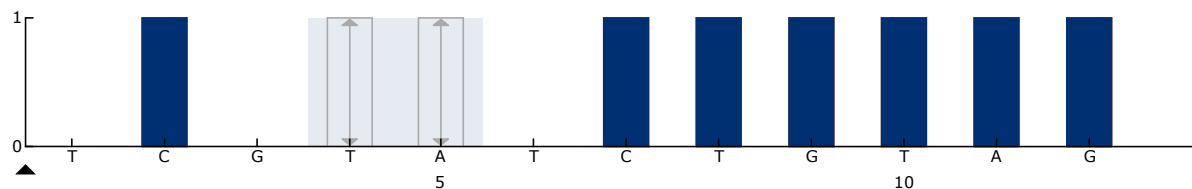
Přítomnost dalších vzácných mutací v nukleotidu 1799 by měla být také analyzována v sekvenci **CVCTGTAGC**.

**Poznámka:** Zkontrolujte, zda je prahová hodnota výšky samostatného píku nastavena na 30 RLU.

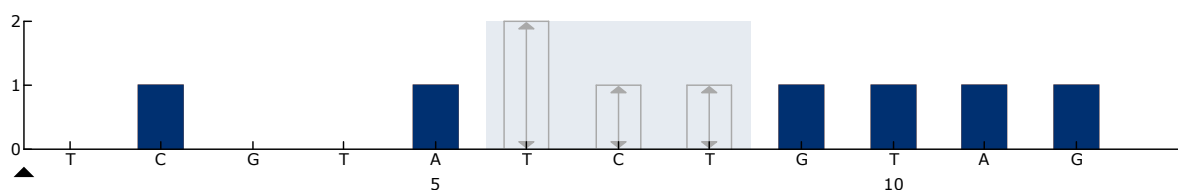
**Poznámka:** Složité mutace BRAF kodonu 600 není možné analyzovat v softwaru PyroMark Q24 pomocí AQ analýzy s použitím položky

„Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence). Doporučujeme použít BRAF Plug-in Report pro analýzu složitých mutací kodonu 600.

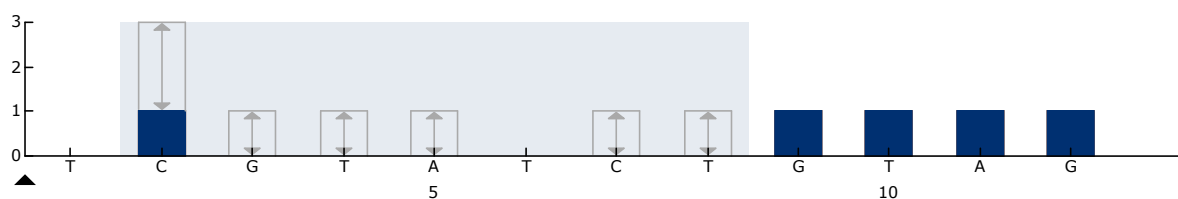
**A3. Ručně zadejte následující „Dispensation Order“ (Pořadí přidávání nukleotidů):**  
**TCGTATCTGTAG**



**Obrázek 12. Histogram kodonu 600 (nukleotid 1799) s analyzovanou sekvencí CWCTGTAGC.**



**Obrázek 13. Histogram kodonu 600 (nukleotid 1798) s analyzovanou sekvencí CAYTGTAGC.**



**Obrázek 14. Histogram kodonu 600 (nukleotid 1799) s analyzovanou sekvencí CVCTGTAGC.**

**A4. Klikněte na kartu „Analysis Parameters“ (Parametry analýzy) a u položky „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ (Prahová hodnota výšky píku – požadovaná výška píku pro uznání kvality výsledku:) zvyšte hodnotu na 30.**

**A5. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „BRAF kodon 600“.**

## BRAF kodony 464–469

**A1.** Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).

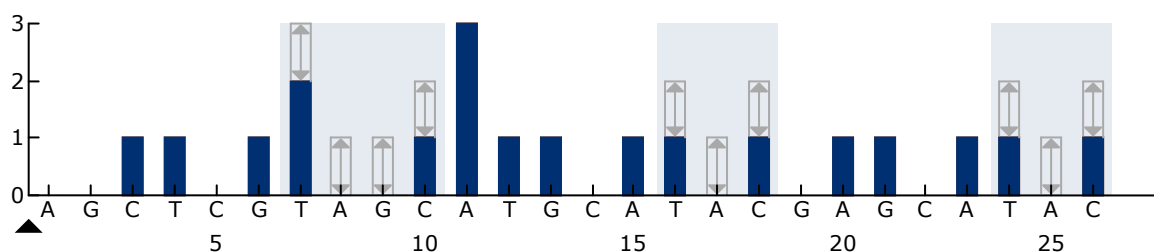
**A2.** Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci:

**CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA**

**Poznámka:** Složitě mutace BRAF kodonu 469 není možné analyzovat v softwaru PyroMark Q24 pomocí AQ analýzy s použitím položky „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence). Doporučujeme použít BRAF Plug-in Report pro analýzu složitých mutací kodonu 469.

**A3.** Ručně zadejte následující „Dispensation Order“ (Pořadí přidávání nukleotidů).

**AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAC**




Obrázek 15. Histogram pro kodony 464–469 (nukleotidy 1391 [kodon 464], 1397 [kodon 466] a 1406 [kodon 469]).

**A4.** Klikněte na kartu „Analysis Parameters“ (Parametry analýzy) a u položky „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ (Prahová hodnota výšky píku – požadovaná výška píku pro uznání kvality výsledku:) zvyšte hodnotu na 30.

**A5.** Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „*BRAF kodony 464–469*“.

## Příloha B: Vyprázdnění odpadního zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami

<p><b>UPOZORNĚNÍ</b></p> 	<p><b>Nebezpečné chemické látky</b></p> <p>Denaturační roztok používaný ve vakuové stanici obsahuje hydroxid sodný, který dráždí oči a pokožku.</p> <p>Vždy používejte ochranné brýle, rukavice a laboratorní oděv.</p> <p>Zodpovědný orgán (například vedoucí laboratoře) musí přijmout nutná bezpečnostní opatření, která zajistí, aby okolní pracoviště bylo bezpečné a pracovníci obsluhující přístroje nebyli vystaveni nebezpečným úrovním toxických látek (chemických či biologických) dle údajů v příslušných bezpečnostních listech (SDS) nebo dokumentech OSHA*, ACGIH† nebo COSHH‡.</p> <p>Odvětrání výparů a likvidace odpadních látek musí být v souladu s národními, státními a místními zdravotnickými a bezpečnostními předpisy.</p>
--	--

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Úřad pro ochranu zdraví a bezpečnosti při práci) (USA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Americká konference státních průmyslových hygieniků) (USA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola látek škodlivých zdraví) (Spojené království)

Při likvidaci laboratorního odpadu zajistěte dodržování státních a místních předpisů o ochraně životního prostředí.

### Důležitý bod před zahájením

- Tento protokol vyžaduje vysoce čištěnou vodu.

### Postup

**B1. Zkontrolujte, že ve vakuové hlavici není vakuum. Ujistěte se, že přívod vakua je zavřený (Off) a vakuová pumpa je vypnutá.**

**B2. Zlikvidujte všechny roztoky, které zbyly ve vaničkách.**

**B3. Vypláchněte vaničky vysoce čištěnou vodou, v případě potřeby je vyměňte.**

**B4. Vyprázdňte zásobník s odpadními tekutinami.**

**Poznámka:** Víčko lze odejmout bez nutnosti odpojení hadiček.

**B5. Je-li nutné vakuovou stanici vyčistit (například kvůli prachu nebo potřísnění tekutinami), postupujte dle pokynů v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).**



## Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	Pro 24 reakcí na systémech PyroMark Q24: Seq primery, PCR primery, nemethylovaná kontrolní DNA, PCR master mix PyroMark, koncentrát CoralLoad, vazebný pufr PyroMark, hybridizační pufr PyroMark, denaturační roztok PyroMark, promývací pufr PyroMark, směs enzymů, směs substrátů, nukleotidy dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP, a H <sub>2</sub> O	971470
PyroMark Q24 MDx	Detekční platforma na sekvenačním základě pro paralelní pyrosekvenování 24 vzorků	9001513
PyroMark Q24	Detekční platforma na sekvenačním základě pro paralelní pyrosekvenování 24 vzorků	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuová stanice (220 V) pro paralelní přípravu 24 vzorků jednořetězcové DNA z PCR produktu	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuová stanice (220 V) pro paralelní přípravu 24 vzorků jednořetězcové DNA z PCR produktu	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Aplikační software	9019063
PyroMark Q24 Software	Software pro analýzu	9019062
<b>Příslušenství</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24jamkové reakční destičky na sekvenování	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kazety na přidávání nukleotidů a činidel	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Opakovaně použitelné sondy s filtrem k vakuové stanici PyroMark Q96 a Q24	979010

\* pouze VB

† ostatní státy

<b>Výrobek</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
PyroMark Control Oligo	Kontroly pro ověření systému při instalaci	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Kontroly pro ověření výkonu systému	979304
<b>Související produkty</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Souprava na přípravu 50 vzorků DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute <sup>®</sup> , proteínáza K, pufrý, odběrné zkumavky (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Souprava pro přípravu 48 vzorků: kazety na činidla (tkáňová), jednorázové špičky s filtrem, jednorázové držáky špiček, zkumavky na odběr vzorků (2 ml), eluční zkumavky (1,5 ml), pufr G2, proteínáza K	953034

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušný manuál soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Manuály souprav QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

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

Registrované názvy, ochranné známky, atd. použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmí být považovány za nechráněné zákonem.

#### **Prohlášení**

Není určeno pro stanovení rizika vyvinutí endometriózy.

#### **Ujednání o omezené licenci**

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel soupravy *therascreen* BRAF Pyro Kit svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Soupravu *therascreen* BRAF Pyro Kit lze používat pouze v souladu s pokyny uvedenými v *příručce k soupravě theascreen BRAF Pyro Kit* a pouze se součástmi, které souprava obsahuje. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění složek, které jsou součástí této soupravy, společně s kterýmikoli složkami, které nejsou součástí této soupravy, s výjimkou případů popsanych v *příručce k soupravě theascreen BRAF Pyro Kit* a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

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

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

