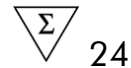


Příručka k soupravě *therascreen*[®] KRAS Pyro[®]



Verze 1

IVD

Pro diagnostiku in vitro

CE

REF

971460

HB

1061825CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R3

MAT

1061825CS



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;
- rozborů nukleových kyselin a proteinů;
- výzkum microRNA a RNAi;
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozborů.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách www.qiagen.com.

Obsah

Účel použití	5
Shrnutí a vysvětlení	5
Princip postupu	6
Dodávané materiály	8
Obsah soupravy	8
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	10
Upozornění a bezpečnostní opatření	11
Bezpečnostní informace	11
Obecná ustanovení	11
Skladování činidel a manipulace s nimi	13
Manipulace se vzorkem a jeho skladování	13
Postup	14
Izolace DNA	14
Protokoly	
■ 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24	15
■ 2: PCR s PCR činidly dodanými v soupravě <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	17
■ 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance	20
■ 4: Příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24	22
■ 5: Spuštění systému PyroMark Q24	26
■ 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24	28
Interpretace výsledků	31
Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu	31
Návod na řešení potíží	35
Kontrola kvality	37
Omezení	37
Funkční vlastnosti	38
Mez slepého vzorku a mez detekce	38
Linearita	40
Střední přesnost	40
Diagnostické vyhodnocení	41

Odkazy	42
Symboly	43
Kontaktní údaje	43
Dodatek A: Nastavení pyrosekvenční analýzy <i>therascreen</i> KRAS Pyro	44
Příloha B: Vyprázdnění zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami	47
Informace pro objednávky	49

Účel použití

Souprava *therascreen* KRAS Pyro Kit je prostředek pro detekci in vitro a slouží pro kvantitativní detekci mutací v kodonech 12, 13 a 61 lidského genu KRAS v genomové DNA získané ze vzorků lidské tkáně. Princip je založen na sekvenování nukleových kyselin s využitím technologie pyrosekvenování.

Souprava *therascreen* KRAS Pyro Kit je určena jako pomocný test při výběru pacientů s kolorektálním karcinomem, u nichž je vyšší pravděpodobnost úspěšnosti léčby pomocí protilátek proti EGFR, jako je panitumumab nebo cetuximab. Pro diagnostiku in vitro.

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

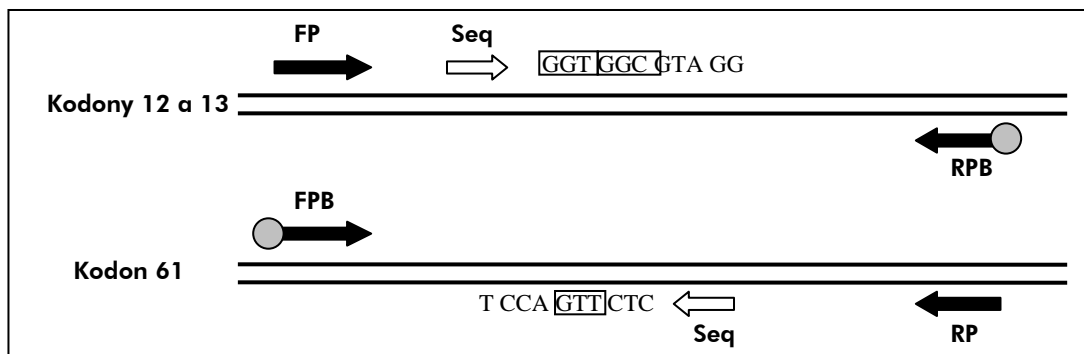
- Přístroj PyroMark Q24 a přístroj PyroMark Q24 MDx.
- Vakuová stanice PyroMark Q24 a vakuová stanice PyroMark Q24 MDx.
- Software PyroMark Q24 (verze 2.0) a software PyroMark Q24 MDx (verze 2.0).

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

V Evropě vzrůstá zájem o analýzu mutací genu KRAS, neboť Evropské komise rozhodla o podmíněném schválení registrace přípravků panitumumab a cetuximab pro léčbu pacientů s metastázemi kolorektálního karcinomu, u kterých je přítomen nemutovaný gen KRAS (divokého typu). To znamená, že přípravky panitumumab a cetuximab lze podávat pouze pacientům, u nichž byly provedeny testy stavu mutací genu KRAS.

Souprava *therascreen* KRAS Pyro Kit s označením CE-IVD slouží ke kvantitativnímu stanovení mutací lidského genu KRAS v kodonech 12, 13 a 61. Souprava obsahuje dvě analýzy: jednu pro detekci mutací v kodonech 12 a 13 a druhou pro detekci mutací v kodonu 61 (obrázek 1). 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 1. Zobrazení analýzy KRAS. Označená sekvence je analyzovaná sekvence u vzorku divokého typu. **FP** a **FPB**: přímé PCR primery (B označuje biotinylacii); **RP** a **RPB**: zpětné PCR primery (B označuje biotinylacii); **Seq**: sekvenační primery.

Poznámka: Kodony 12 a 13 se sekvenují v přímém směru a kodon 61 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

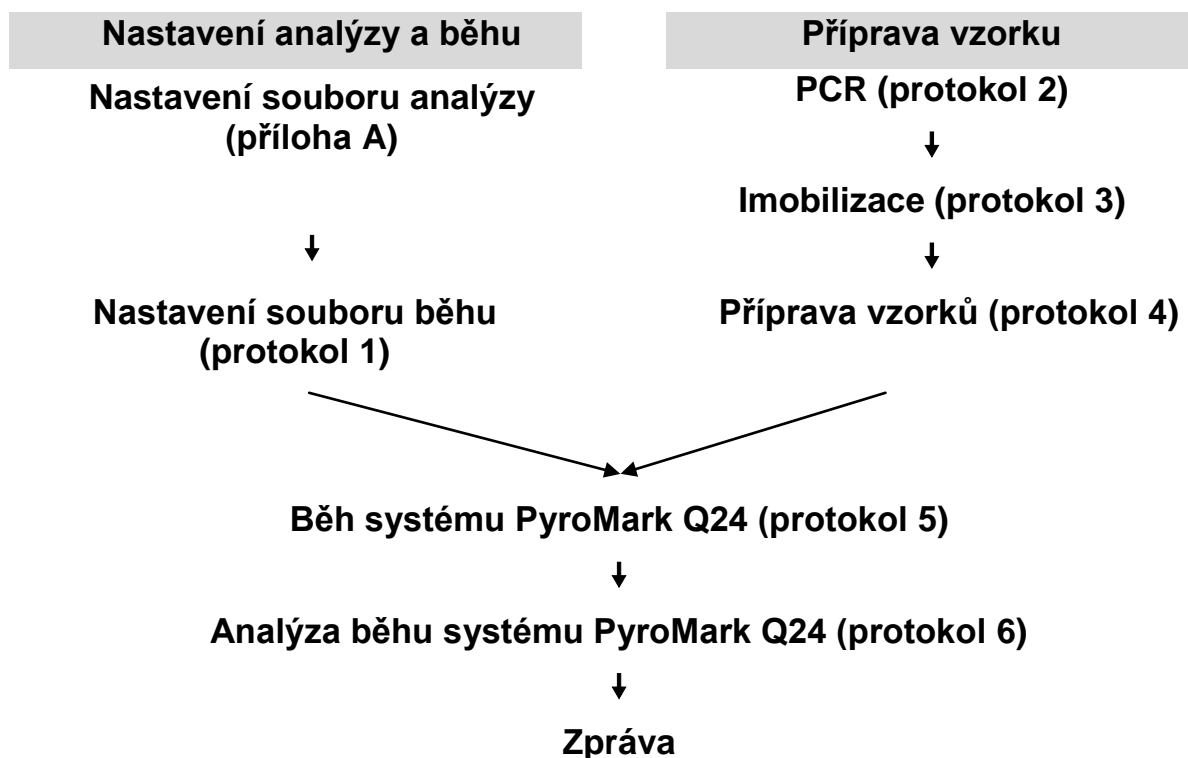
Na schématu pracovního postupu je zobrazen průběh analýzy. Po PCR s primery vymezujícími kodony 12/13 a kodon 61 se amplikony imobilizují na kuličky Streptavidin Sepharose® High Performance. Připraví se jednořetězcová DNA a dojde k hybridizaci příslušných sekvenačních primerů a DNA. Vzorky se pak analyzují v systému PyroMark Q24 prostřednictvím souboru nastavení běhu a souboru běhu.

K analýze běhu je doporučeno použít modul KRAS Plug-in Report. Modul KRAS Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese pyro.plugin@qiagen.com.

K analýze běhu však lze použít i analytický nástroj, který je součástí systému PyroMark Q24. Po ukončení běhu lze upravit analyzovanou sekvenci i pro detekci vzácných mutací (viz „Protokol 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24“, strana 28).

Poznámka: Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s příručkou *PyroMark KRAS Kit* a revizí R1 *příručky theascreen KRAS Pyro Kit* mírně změněno (viz „Protokol 2: PCR s PCR činidly dodanými v soupravě theascreen KRAS Pyro Kit“, strana 17 a „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24“, strana 22).

Schéma pracovního postupu analýzy *therascreen* KRAS Pyro



Ovládací prvky

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

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


Dodávané materiály

Obsah soupravy

Souprava *therascreen* KRAS Pyro Kit (krabice 1/2)

Souprava <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
Katalogové č.	971460
Počet reakcí	24
Seq primer KRAS 12/13	24 µl
Seq primer KRAS 61	24 µl
PCR primer KRAS 12/13	24 µl
PCR primer KRAS 61	24 µl
PCR master mix PyroMark, 2x	850 µl
Koncentrát CoralLoad [®] , 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Nemethylovaná kontrolní DNA, 10 ng/µl	100 µl

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

Pufry a činidla <i>therascreen</i>		
Vazebný pufr PyroMark		10 ml
Hybridizační pufr PyroMark		10 ml
Denaturační roztok PyroMark*		250 ml
Promývací pufr PyroMark, 10x		25 ml
Směs enzymů		1 lahvička
Směs substrátů		1 lahvička
dATP \square S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Příručka		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 jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

- 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)
- PyroMark Q24 (kat. č. 9001513 nebo 9001514)*[†]
- PyroMark Q24 Software (kat. č. 9019063 nebo 9019062)[†]
- Destičky PyroMark Q24 (kat. č. 979301)[†]
- Kazeta PyroMark Q24 (kat. č. 979302)[†]
- Vakuová stanice PyroMark Q24 (kat. č. 9001515 nebo 9001517)*[†]
- 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[®] 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 pufru PyroMark, 10x.

- Ethanol (70%)[‡]

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

[†] Označení CE-IVD je v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES. Všechny ostatní uvedené výrobky nemají označení CE-IVD podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES.

[‡] Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje jiné látky, například metanol nebo metyletylketon.

Doporučené míchačky destiček

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

Tabulka 1. Míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* KRAS Pyro Kit

Výrobce	Výrobek	Katalogové číslo
Eppendorf	Thermomixer comfort (základní zařízení)	5355 000.011
	Termoblok pro MTP	5363 000.012
	Adaptační destička na PCR zkumavky 96 x 0,2 ml ke vložení do bloků pro mikrotitrační destičky	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Upozornění a bezpečnostní opatření

Jako in vitro diagnostikum

Bezpečnostní informace

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

Na komponenty soupravy *therascreen* KRAS Pyro Kit se vztahují následující bezpečnostní věty a bezpečnostní opatření.

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 bylo lehce změněno (viz „Protokol 2: PCR s PCR činidly dodanými v soupravě therascreen KRAS Pyro Kit“, strana 17 a „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24“, strana 22) ve srovnání s příručkou *PyroMark KRAS Kit* a revizí R1 příručky therascreen *KRAS Pyro Kit*.
- Komponenty tohoto produktu stačí k provedení 24 reakcí v až 5 nezávislých bězích.
- 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* KRAS Pyro Kit se dodává ve dvou krabicích. Krabice Souprava *therascreen* KRAS Pyro Kit (krabice 1/2) se dodává v suchém ledu. PCR master mixy PyroMark, koncentrát CoralLoad, nemethylovaná kontrolní DNA a všechny primery musí být při dodání uloženy při teplotě -30 až -15°C .

Krabice s pufry a činidly *therascreen* (krabice 2/2) obsahuje pufry, směs enzymů, směs substrátů, dATP α 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* KRAS 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 z krve nebo vzorků tkání fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE).

Nelze použít vzorky pacientů, kterým je podáván heparin. Nelze použít vzorky krve, které byly odebrány do zkumavek obsahujících antikoagulační činidlo heparin. Heparin ovlivňuje PCR.

Postup

Izolace DNA

Funkčnost systému pro extrakci lidské DNA ze vzorků tumorů fixovaných formalinem zalitých v parafinu byla stanovena pomocí souprav EZ1[®] DNA Tissue Kit a QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit. U systému QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit byla funkčnost stanovena u vzorků krve od zdravých dárců s přidavkem nádorových buněk.

Na purifikaci DNA z uvedených typů vzorků lidské tkáně k použití v soupravě *therascreen* KRAS Pyro Kit jsou doporučeny soupravy QIAGEN[®] uvedené v tabulce 2. Purifikaci DNA provádějte podle pokynů v příručkách k daným soupravám.

Tabulka 2. Doporučené soupravy na purifikaci DNA pro účely soupravy *therascreen* KRAS Pyro Kit

Materiál vzorku	Souprava na izolaci nukleových kyselin	Katalogové číslo (QIAGEN)
Tkáně zalité v parafinu	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Krev	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* 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[®] EZ1 (kat. č. 9000705; již není v nabídce) a kartou EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9015862).

[†] Označení CE-IVD je v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES.

Protokol 1: Nastavení běhu 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 KRAS Plug-in Report, vytvořte nastavení analýzy (viz Příloha A, strana 44). To je třeba provést pouze jednou před prvním spuštěním pyrosekvenčních analýz *therascreen* KRAS Pyro. Pokud byl nainstalován modul KRAS Plug-in Report, jsou v prohlížeči zkratk softwaru PyroMark Q24 ve složce „Example Files/PyroMark Setups/KRAS“ k dispozici předem definovaná nastavení analýz. Modul KRAS Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese pyro.plugin@qiagen.com.

Postup


1. **Klikněte na tlačítko  na panelu nástrojů.**

Vytvořil se nový soubor běhu.

2. **Zadejte parametry běhu (viz část „Parametry běhu“ na straně 16).**
3. **Na destičce zadejte analýzy kodonů 12/13 i 61 k jamkám odpovídajícím daným testovaným vzorkům.**

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 běžích pyrosekvenování (viz „Ovládací prvky“, strana 7).

4. **Jakmile je běh 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 běhu) a po zobrazení zprávy klikněte na tlačítko .**
5. **Zavřete soubor běhu a pomocí Průzkumníku Windows® jej zkopírujte na jednotku USB dodanou se systémem.**

Poznámka: Vytisknutou zprávu s informacemi před spuštěním běhu 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 běhu**

„Run name“ (Název běhu):	Název běhu je dán uložením souboru. Přejmenováním souboru dojde i ke změně názvu běhu.
„Instrument method“ (Metoda přístroje):	Vyberte metodu přístroje podle kazety, která se bude pro daný běh používat. Viz instrukce dodané s výrobky.
„Plate ID“ (ID destičky):	Nepovinné: Zadejte ID destičky PyroMark Q24.
„Bar code“ (Čárový kód):	Nepovinné: Zadejte číslo čárového kódu destičky. Pokud máte k počítači připojenu čtečku čárových kódů, kód přečtěte čtečkou. Umístěte kazatel myši do textového pole „Barcode“ (Čárový kód) a kliknutím čárový kód sejměte.
„Kit ID“ (ID soupravy):	Nepovinné: Zadejte číslo šarže použité soupravy <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit. Číslo šarže je uvedeno na štítku výrobku. Poznámka: Doporučuje se zadávat ID činidel i soupravy, aby bylo možné v případě potřeby vysledovat neočekávané problémy s činidly.
„Run note“ (Poznámky k běhu):	Nepovinné: Zadejte poznámku k obsahu nebo účelu běhu.

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 PCR činidly dodanými v soupravě *therascreen* KRAS Pyro Kit

Tento protokol popisuje amplifikaci PCR oblasti obsahující kodon 12 a kodon 13 a amplifikaci PCR oblasti obsahující kodon 61 s použitím soupravy *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Důležité body před zahájením

- Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s příručkou *PyroMark KRAS Kit* (krok 5) mírně změněno.
- HotStarTaq[®] DNA polymeráza v master mixu *PyroMark* 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 potřebná činidla rozmrazte (viz tabulka 3).

Před použitím řádně promíchejte.

2. Pro každou sadu PCR primerů připravte reakční směs podle tabulky 3.

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 3. Příprava reakční směsi pro každou směs PCR primerů

Složka	Objem na reakci (μl)
PCR master mix PyroMark, 2x	12,5
Koncentrát CoralLoad, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 12/13 nebo PCR Primer KRAS 61	1,0
Voda (H ₂ O, součást dodávky)	4,0
Celkový objem	20,0

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 4) 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 bázích pyrosekvenování (viz „Ovládací prvky“, strana 7).

Tabulka 4. Příprava PCR

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

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

Tabulka 5. Optimalizovaný protokol cyklování

			Poznámky
Iniciační aktivační krok:	15 minut	95 °C	Tento zahřívací krok slouží k aktivaci HotStarTaq DNA polymerázy.
Cyklování ve 3 krocích:			
Denaturace	20 sekund	95 °C	
Hybridizace	30 sekund	53 °C	
Prodlužování	20 sekund	72 °C	
Počet cyklů	42		
Konečné prodlužování:	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).

Postup

1. Jemně protřepejte lahvičku obsahující Streptavidin Sepharose High Performance, aby byl roztok homogenní.
2. Připravte master mix pro imobilizaci DNA podle tabulky 6. Připravte o 10 % vyšší objem, než je nutné pro provedení celkového množství reakcí.

Tabulka 6. Master mix pro imobilizaci DNA

Složka	Objem na vzorek (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Vazebný pufr PyroMark	40
Voda (H ₂ O, součást dodávky)	28
Celkový objem	70

3. Naneste 70 µl master mixu do jamek na 24jamkové PCR destičce nebo stripu podle předem definovaného nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24 “ na straně 15).
4. Do každé zkumavky obsahující master mix naneste 10 µl biotinylovaného PCR produktu z protokolu 2 podle předem definovaného nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu 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*.

- 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 pyrosequenční analýzou na systému PyroMark Q24

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

Důležité body před zahájením

- Zkumavky se sekvenčními primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- S ohledem na to, kterou oblast chcete analyzovat (kodon 12 a 13 nebo kodon 61), naneste 2 různé sekvenční primery podle stejného vzoru, který byl definován v nastavení běhu pro danou destičku (viz „Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24 “ na straně 15).
- Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s revizí R1 příručky theراسreen *KRAS Pyro Kit* (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*, 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 10 x 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. Naředte dostatečné množství daného sekvenčního primeru **Seq primer KRAS 12/13** nebo **Seq primer KRAS 61** hybridizačním pufrem **PyroMark** podle tabulky 7.

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

Tabulka 7. Příklad ředění sekvenačních primerů

Složka	Objem na vzorek (μl)	Objem na 9 + 1 reakcí (μl)
Seq Primer KRAS 12/13 nebo Seq Primer KRAS 61	0,8	8
Hybridizační pufr PyroMark	24,2	242
Celkový objem	25	250

2. Do každé jamky na destičce PyroMark Q24 naneste 25 μl naředěného sekvenačního primeru podle vzoru v nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu 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 stripy) z protokolu 3 a destičku PyroMark Q24 na pracovní stůl (obrázek 2).

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



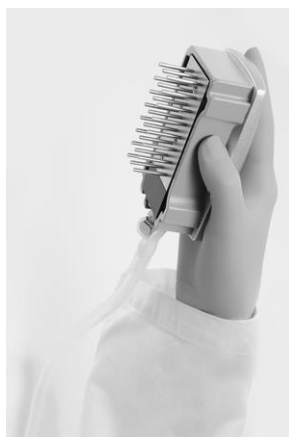
Obrázek 2. Uložení PCR destičky (nebo stripů) a destičky PyroMark Q24 do vakuové stanice.

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

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.

6. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml 70% etanolu (obrázek 2). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
7. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml denaturačního roztoku (obrázek 2). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
8. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 50 ml promývacího pufry (obrázek 2). 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 3).



Obrázek 3. 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 2) a po dobu 10 sekund hlavici protřepávejte.
13. Promyjte filtrační sondy ponořením do vysoce čištěné vody (obrázek 2) 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 3).
15. Zavřete přívod vakua na hlavici (poloha Off) a uložte vakuovou 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, straně 47).

17. Ohřejte destičku PyroMark Q24 se vzorky na 80 °C po dobu 2 minut s využitím předeheřátého 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 běhu systému PyroMark Q24. Podrobnější popis uvádějící nastavení běhu naleznete v *příručce pro uživatele systému PyroMark Q24*.

Důležitý bod před zahájením

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

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 (H₂O, součást dodávky).

2. Míchání proveďte mírným kroužením lahvičkou.

Poznámka: Neprovádějte vířivé pohyby!

Poznámka: Aby bylo zajištěno úplné rozpuštění směsi, ponechte ji v prostředí s laboratorní teplotou (15 – 25 °C) po dobu 5 – 10 minut. Před započítím plnění kazety PyroMark Q24 se přesvědčte, že roztok není zakalený. Pokud nemají být činidla bezprostředně použita, uložte lahvičky s činidly na led* nebo do ledničky.

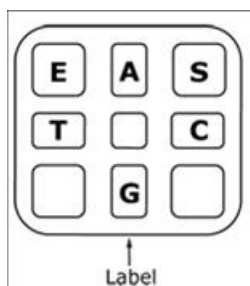
3. Umožněte činidlům a kazetě PyroMark Q24 získat okolní teplotu (20 – 25 °C).

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 4.

Přesvědčte se, že se z pipety nepřenesly do kazety žádné vzduchové bubliny.

* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu..



Obrázek 4. 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 běhu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení běhu.

6. Otevřete dvířka kazety a vložte kazetu naplněnou reagenty 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 běhu).
Poznámka: USB jednotku nechte zasunutou až do ukončení běhu.
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 běhu.
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 běh, stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat).
14. Jakmile se běh dokončí a přístroj potvrdí, že soubor běhu byl uložen na USB jednotku, stiskněte tlačítko „Close“ (Zavřít).
15. Vyměňte 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 běhu, jak je popsáno v tématu „Protokol 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24“ na straně 28.

Protokol 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24

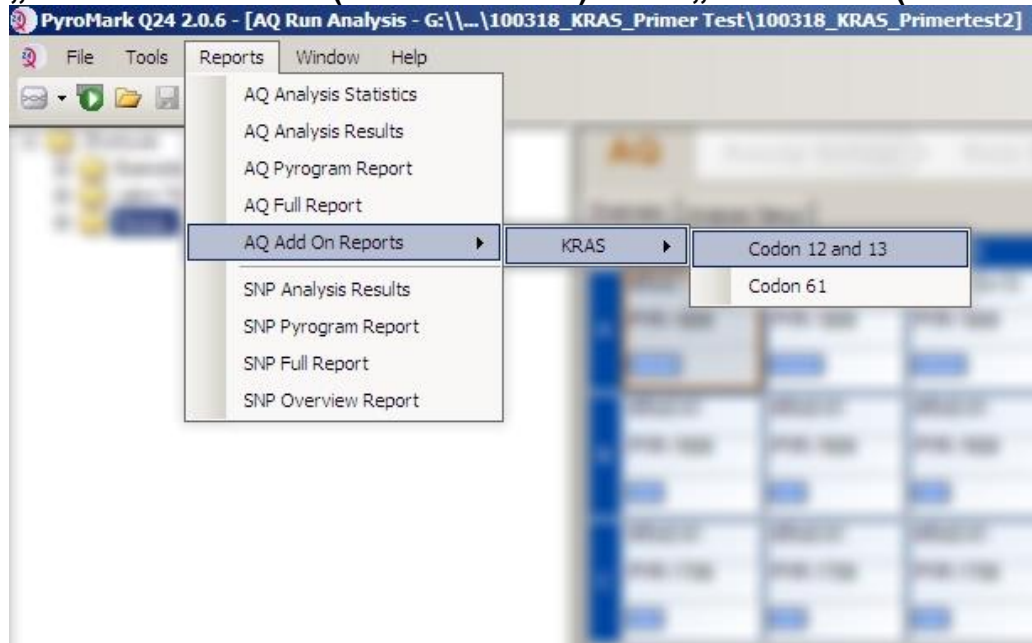
Tento protokol popisuje analýzu mutací po dokončeném běhu KRAS pomocí softwaru PyroMark Q24.

Postup

1. Zasuňte USB jednotku obsahující vytvořený soubor běhu do USB portu počítače.
2. Pomocí Průzkumníku Windows přesuňte soubor běhu z USB jednotky do požadovaného umístění v počítači.
3. Otevřete soubor běhu 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 dvě metody analýzy běhu. Pokud používáte modul KRAS 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 KRAS Plug-in Report. Modul KRAS Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese pyro.plugin@qiagen.com. V této zprávě je zajištěno, aby byly jednotlivé hodnoty LOD (tabulka 8) a různé analyzované sekvence použity k automatické detekci všech mutací.

5. Použití modulu KRAS Plug-in Report se zprávou pro analýzu KRAS: Chcete-li vytvořit zprávu, vyberte z nabídky „Reports“ (Zprávy) položku „AQ Add On Reports/KRAS“ (Přidat AQ zprávu/KRAS) a pak „Codon 12 and 13“ (Kodon 12 a 13) nebo „Codon 61“ (Kodon 61).





Obrázek 5. Obrazovka AQ Run Analysis (Běh AQ analýzy)

V jamkách automaticky proběhne analýza všech mutací, pro které je dána mez detekce (LOD) v tabulce 8. Výsledky se zobrazí v přehledné tabulce (obrázek 6) a následují i podrobné výsledky, které zahrnují například pyrogramy a kvalitu analýzy.

Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				

 See detailed results for further explanation.

Obrázek 6. Tabulka s přehledem výsledků.

6. Použití AQ analýzy:

Chcete-li provést analýzu běhu 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 pozicí proměnné v záznamu Pyrogram[®]. Bližší informace o analýze běhu najdete v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24.

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

Poznámka: Nejčastější mutace přítomné v genu KRAS bývají v nukleotidu 35 (druhá báze kodonu 12). Z tohoto důvodu je v nastavení analýzy uvedena jako standardní analyzovaná sekvence genu KRAS právě tato sekvence na kodonu 12 a 13 zaměřená na přítomnost mutace v dané pozici (viz příloha A, strana 44). Pokud vzorek obsahuje mutaci v nukleotidu 34 (první báze kodonu 12), lze změnit analyzovanou sekvenci na analýzu přítomnosti mutace v této pozici, jak je uvedeno v příloze A. Podobně lze změnit analyzovanou sekvenci u analýzy kodonu 61 genu KRAS, jak je popsáno v příloze A.

Aktualizované četnosti mutací lidského genu KRAS v kodonu 12/13 a kodonu 61 jsou dostupné online na adrese Sangerova ústavu www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

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).

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 v nukleotidu 35 (kodon 12) nebo 183 (kodon 61), a vzorků, u kterých bylo u hodnocení kvality uvedeno „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo).

Důrazně se doporučuje zopakovat 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). Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) a „Failed“ (Selhalo) může poukazovat na mutaci v jiné pozici než u nukleotidu 35 nebo 183, což by vedlo k odchylkám ve výšce píku při referenčním přidávání nukleotidů. Například pík u kteréhokoli z prvních 3 přidání ukazuje, že u nukleotidu 34 se nachází mutace.

Chcete-li zopakovat analýzu a zaměřit se na mutaci u nukleotidu 34, přejděte na „Analysis Setup“ (Nastavení analýzy) a změňte položku „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) z *GNTGRCGTAGGC* na *NGTGRCGTAGGC*. Klikněte na tlačítko „Apply“ (Použít) a po zobrazení okna „Apply Analysis Setup“ (Použít nastavení analýzy), klikněte na možnost „To All“ (Na všechny).

Chcete-li zopakovat analýzu a zaměřit se na mutaci u nukleotidu 182 (druhá pozice v kodonu 61), změňte u položky „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) u analýzy kodonu 61 hodnotu na následující sekvenci.

CTCTHGACCTG

Chcete-li zopakovat analýzu a zaměřit se na mutaci u nukleotidu 181 (první pozice v kodonu 61), změňte u položky „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) u analýzy kodonu 61 hodnotu na následující sekvenci.

CTCTTSACCTG

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

Poznámka: Pokud naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a tento jev nelze vysvětlit vzácnými nebo neočekávanými mutacemi, není podle výsledku možné posoudit stav mutací. Doporučuje se provést novou analýzu vzorku.

Interpretace výsledků

Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu

Je důrazně doporučeno, aby každý běh 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 viz tabulka 8) a interpretovány následujícím způsobem.

- Frekvence mutace < LOD: Divoký typ
- Frekvence mutace \geq LOD a \leq LOD + 3 % jednotek: Potenciální mutace s nízkou úrovní výskytu

Poznámka: Pokud tato situace nastane při používání modulu Plug-in Report (krok 5 v „Protokol 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24“, strana 28) 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 jiném případě by měl být vzorek posouzen jako divoký typ.

- Frekvence mutace > LOD + 3 % jednotek: Mutace

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

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

Poznámka: Naměřená frekvence nad LOB v kontrolním vzorku ukazuje na vyšší než obvyklou úroveň pozadí v těchto jednotlivých bězích, která by mohla mít vliv na kvantifikaci alel, a to zejména u nízkých mutačních úrovní. V tomto případě nejsou naměřené frekvence v rozsahu od LOD (tabulka 8) do LOD + 3 % jednotek základem pro posouzení stavu mutací. Je doporučeno provést novou analýzu vzorků s potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu.

Poznámka: K vytvoření dat LOB a LOD se používal algoritmus zprávy na modulu KRAS Plug-in Report. Manuální analýza pomocí aplikačního softwaru PyroMark popisovaná v protokolu 6 (na straně 28) může vykazovat mírně odlišné hodnoty.

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

Tabulka 8. LOB a LOD určené pro specifické mutace

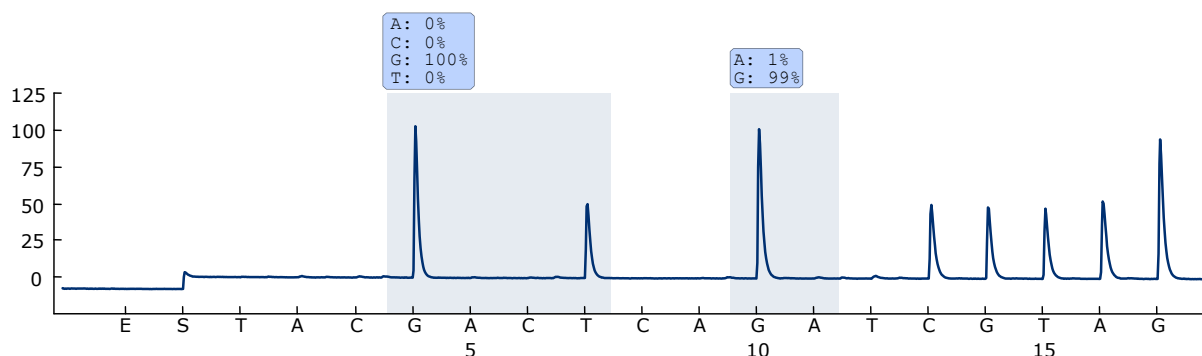
Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), při analýze ve zpětném směru (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* 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/.

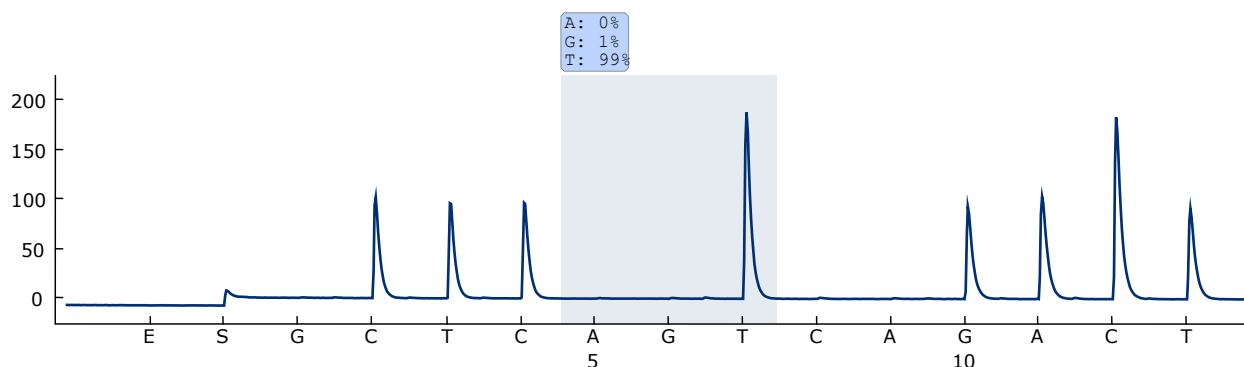
[†] Nejnižší úroveň mutace ve vzorku, která vede k naměření frekvence \geq LOD.

Ukázkové výsledky AQ analýzy, která je součástí systému PyroMark Q24

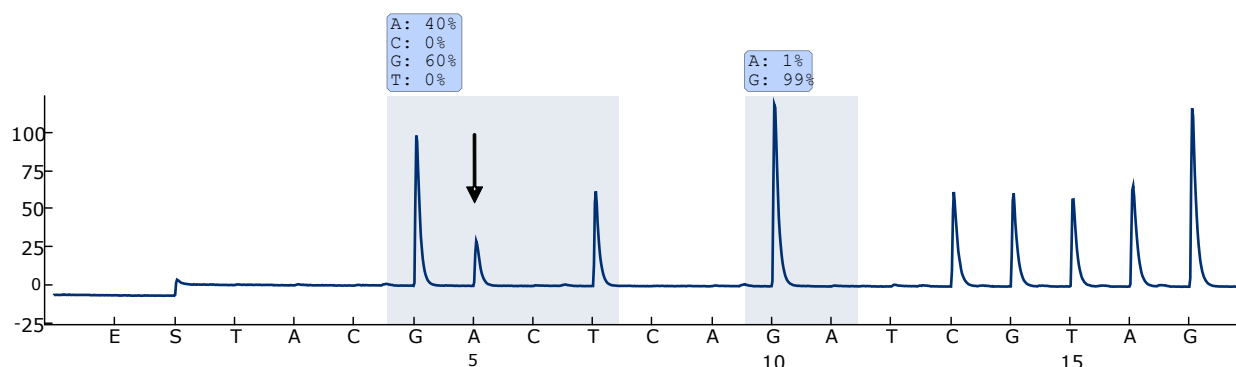
Na obrázcích 7 – 11 jsou uvedeny ukázkové výsledky pyrogramu.



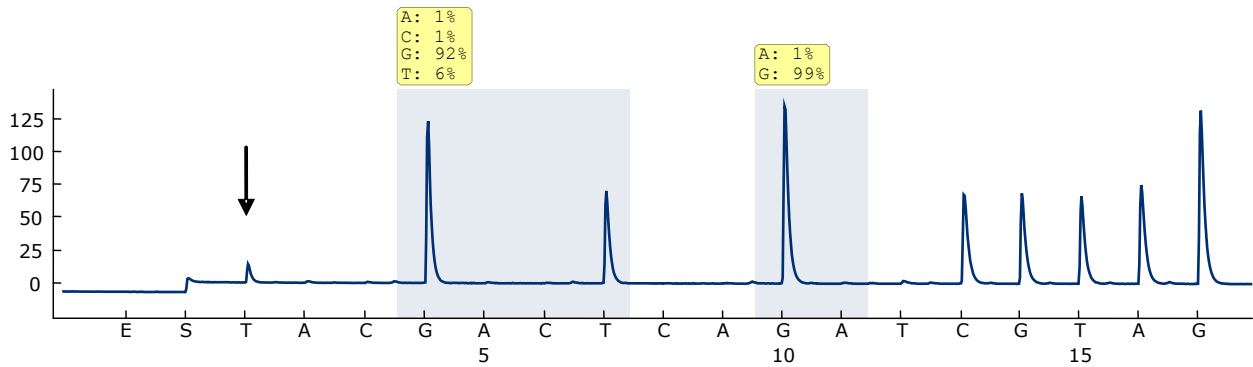
Obrázek 7. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s genotypem divokého typu v kodonech 12 a 13.



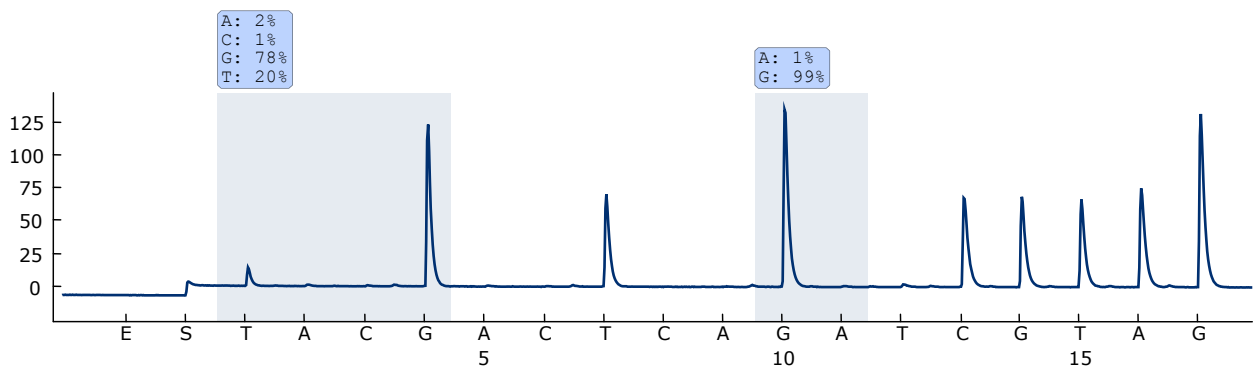
Obrázek 8. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s genotypem divokého typu v kodonu 61.



Obrázek 9. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s mutací GGT → GAT u báze 2 v kodonu 12 (nukleotid 35, označen šipkou).



Obrázek 10. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorků s mutací GGT → TGT u báze 1 kodonu 12 (nukleotid 34, označený šipkou) se zaměřením na bázi 2 v kodonu 12 (nukleotid 35) nastavenou na *GNTGRCGTAGGC* prostřednictvím položky „Sequence to Analyze” (Analyzovaná sekvence). Žlutá barva označuje, že sekvence je neočekávaná a vyžaduje další ověření.



Obrázek 11. Záznam pyrogramu a výsledky získané z opakované analýzy vzorku v obrázku 10. Mutace GGT → TGT byla znova analyzována se zaměřením na bázi 1 v kodonu 12 (nukleotid 34) prostřednictvím položky „Sequence to Analyze” (Analyzovaná sekvence) dané na *NGTGRCGTAGGC*.

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. 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).

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

Komentáře a návrhy

Signály u kontroly bez templátu (negativní kontroly)

- | | |
|--------------------------------------|---|
| a) Vzájemné signály sousedních 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 [®] nebo elektroforézou na agarózovém gelu). |
|-------------------------------|--|

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

- | | |
|--------------------|--|
| a) Malá výška píku | <p>Příčinou nízkých píků mohou být chyby při přípravě PCR nebo vzorku před zahájením pyrosekvenování. Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v <i>příručce pro uživatele systému PyroMark Q24</i>, a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.</p> <p>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.</p> |
|--------------------|--|

Komentáře a návrhy

- b) Mutace není definována jako „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) V nastavení analýzy upravte analyzovanou sekvenci (viz Příloha A, strana 44) a analýzu běhu 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 dané ve zprávě na plug-in modulu. Takové vzorky by se měly analyzovat manuálně pomocí softwaru PyroMark Q24 a s ohledem na možnost přítomnosti neočekávaných mutací.
- 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.

Výrazné pozadí

- a) Nesprávné skladování nukleotidů Nukleotidy skladujte při teplotě 2 až 8 °C. Uchovávání při teplotách –15 až –25 °C může zvyšovat pozadí.
- b) Krátká doba chlazení vzorků před pyrosekvenační 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 kontrola (kontrolní nemetylovaná DNA) nevykazuje signál.

- a) Nedostatečné množství směsi enzymů nebo substrátů ve všech jamkách Zkontrolujte, že jste správně naplnili kazetu PyroMark Q24 podle zadání ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním běhu) v nabídce „Tools“ (Nástroje).

Komentáře a návrhy

- | | |
|---|--|
| b) Činidla nebyla správně uskladněna nebo naředěna. | Připravte činidla PyroMark Q24 Gold podle pokynů dodaných k daným činidlům. |
| c) Nedostatečná aktivace DNA polymerázy HotStarTaq | DNA polymeráza HotStarTaq v master mixu PyroMark PCR vyžaduje aktivační krok 15 min při 95 °C. |
| d) Chyba při přípravě PCR nebo vzorku | Manipulační chyby při nastavení PCR, programování cyklieru PCR nebo přípravě vzorku před zahájením pyrosekvenování mohou mít za následek ztrátu signálu. Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v <i>příručce pro uživatele systému PyroMark Q24</i> , a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte. Zopakujte PCR a pyrosekvenační analýzu. |

Kontrola kvality

V souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobků společnosti QIAGEN je každá výrobní šarže souprav *therascreen* KRAS Pyro Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

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 9). LOB a LOD byly stanoveny podle doporučení v pokynech Ústavu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) 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). α - a β -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 GGT → GTT v kodonu 12

U této mutace byla slepá měření soustavně blízko 0 % jednotek (n = 72), což bylo příčinou negaussovského rozdělení. LOD se proto stanovovalo jinou metodou na základě doporučení CLSI podle pokynu EP17A. Nejnižší signál, který určoval přítomnost mutace (LOD) v této poloze, byl dán jako 1 % jednotka, která je jasně nad úrovní soustavné základní úrovně (LOB) při 0 % jednotek. Při analýze vzorku s úrovní mutace 7 % vykazovalo 95 % výsledků (n = 89) signál, který lze považovat za pozitivní (\geq LOD, tj. \geq 1 % jednotka).

Tabulka 9. LOB a LOD určené pro specifické mutace

Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), při analýze ve zpětném směru (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* 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/.

[†] Nejnižší úroveň mutace ve vzorku, která vede k naměření frekvence \geq LOD.

Poznámka: Tyto hodnoty vycházely z běhů, kde směsi plasmidů nesly divoký typ nebo kde byly mutované sekvence použity jako vzor při amplifikaci PCR.

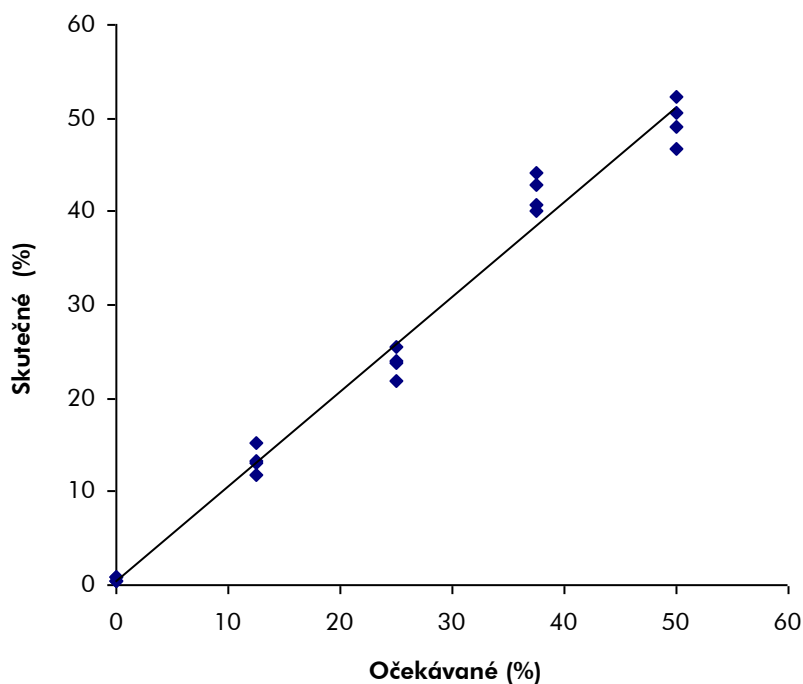
Poznámka: K vytvoření dat LOB a LOD se používal algoritmus zprávy na modulu KRAS Plug-in Report. Manuální analýza pomocí aplikačního softwaru PyroMark Q24 popisovaná v protokolu 6 (na straně 28) může vykazovat mírně odlišné hodnoty.

Poznámka: Je doporučeno funkčnost metody potvrdit v laboratoři.

Linearita

Měření linearity probíhalo podle pokynu CLSI EP6-A „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline“ (Hodnocení linearity kvantitativních měřicích postupů: statistická metoda; schválené pokyny)

Plasmidy nesoucí divoký typ a mutované sekvence byly smíchány v poměrech, které ve výsledné směsi daly uvedené hladiny mutací: 0 %, 12,5 %, 25 %, 37,5 % a 50 %. Na destičku byly naneseny čtyři replikáty každé směsi v náhodném pořadí a analyzovány. Výsledky mutace GGT → TGT v kodonu 12 byly analyzovány softwarem Analyse-it® v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) a jsou zobrazeny na obrázku 12.



Obrázek 12. Linearita mutace GGT → TGT v kodonu 12.

Celková opakovatelnost byla 1,64 % jednotek a výsledky byly lineární v rámci povolené nelinearity 3 % jednotek. Podobné výsledky byly naměřeny i pro mutaci GGC → GAC v kodonu 13.

Střední přesnost

Stanovení linearity mutace GGT → TGT v kodonu 12 bylo opakováno 3 pracovníky ve 3 různých dnech a s použitím různých kombinací činidel a přístroje PyroMark Q24. Výsledky těchto 3 běhů uvádí tabulka 2.

Tabulka 12. Střední přesnost

% mutovaného plasmidu [†]	Běh 1		Běh 2		Běh 3		Souhrn	
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

* Všechny hodnoty jsou dány jako % jednotky. SD: směrodatná odchylka.

[†] Na základě měření OD₂₆₀.

Hodnoty střední přesnosti měření (SD) byly 0,6 – 2,0 % jednotek v měřeném rozmezí úrovní mutací 0 – 50 %.

Diagnostické vyhodnocení

Souprava *therascreen* KRAS Pyro Kit byla hodnocena ve srovnání se soupravou DxS KRAS Mutation Kit. Ze 100 vzorků očekávaných kolorektálních karcinomů fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE) byla extrahována DNA a analyzována na přítomnost mutací v kodonech 12 a 13.

Izolace testované DNA se prováděla pomocí soupravy EZ1 DNA Tissue Kit a analýza pomocí souprav *therascreen* KRAS Pyro Kit na systému PyroMark Q24 a DxS KRAS Mutation Kit na systému ABI PRISM[®] 7900HT SDS.

Ze 100 analyzovaných vzorků bylo možné soupravou DxS KRAS Mutation Kit určit stav mutací u 91 vzorků. Soupravou *therascreen* KRAS Pyro Kit bylo možné určit stav mutací u 94 vzorků.

Vyjma vzorků, které selhaly u jedné či obou souprav, soupravy *therascreen* KRAS Pyro Kit a DxS KRAS Mutation Kit vykazaly 100% shodu výsledků.

Diagnostická citlivost soupravy *therascreen* KRAS Pyro Kit byla 100 % a diagnostická specifita byla 100 % (tabulka 13).

Tabulka 13. Výsledky analýzy přítomnosti mutací v kodonech 12 a 13 u vzorků očekávaných kolorektálních karcinomů

		Souprava DxS KRAS Mutation Kit			
		Mutant	Divoký typ	Neznámý	Celkem
Souprava <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Mutant	33	0	1	34
	Divoký typ	0	57	3	60
	Neznámý	0	1	5	6
	Celkem	33	58	9	100

Analýza kodonu 61

Stejných 100 vzorků bylo analyzováno na přítomnost mutace v kodonu 61 pomocí soupravy *therascreen* KRAS Pyro Kit. K selhání kvalitativního stanovení analýzy kodonu 61 došlo pouze u jediného vzorku. Tento vzorek selhal také při analýze kodonů 12 a 13 soupravami *therascreen* KRAS Pyro Kit i DxS, což napovídá, že daná DNA neměla dostatečnou kvalitu. Vyšší úspěšnost analýzy kodonu 61 ukazuje, že tato analýza je méně závislá na kvalitě DNA než analýza kodonů 12 a 13 jak soupravou *therascreen* KRAS Pyro Kit, tak soupravou DxS. Souprava DxS neumožňuje analýzu mutací v kodonu 61, a proto nebylo možné provést přímé srovnání obou analýz.

Mutace v kodonu 61 byly zjištěny ve 4 z 99 vzorků. Tři vzorky obsahovaly v kodonu 61 časté mutace (CAC, CAT, CTA), zatímco čtvrtý vzorek obsahoval mutace v kodonu 60 (GGT→GGA) i v kodonu 61 (CAA→AAA).






Poznámka: Ve všech bžích použitých k determinaci výkonnostních charakteristik signál převyšoval 60 RLU při běžné analýze 10 ng DNA izolované z tkání fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE).

Odkazy

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 nebo se můžete obrátit na technické služby společnosti QIAGEN či místního dodavatele.

Symbols

	Obsahuje činidla pro <N> testů
<N>	
	Datum použitelnosti
IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
REF	Katalogové číslo
LOT	Číslo šarže
MAT	Číslo materiálu
COMP	Součásti
CONT	Obsahuje
NUM	Číslo
GTIN	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 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).

Dodatek A: Nastavení pyrosekvenační analýzy *therascreen* KRAS Pyro


Pokud byl nainstalován modul KRAS Plugin Report, jsou v prohlížeči zkratk software PyroMark Q24 ve složce „Example Files/PyroMark Setups/KRAS“ k dispozici předem definovaná nastavení analýz pro kodony 12 a 13 a kodon 61. Následující kroky není nutné provádět. Modul KRAS Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese pyro.plugin@qiagen.com.

Důrazně se doporučuje používat raději modul KRAS Plug-in Report než manuální analýzu. Po instalaci modulu plug-in nebo vždy po instalaci nového softwaru či vyšší verze softwaru na počítač na pracovišti je nutné zkontrolovat správnou funkčnost modulu plug-in dle návodu v příručce k modulu Plug-In Quick Guide.

Pokud modul KRAS Plug-in Report není nainstalován, je nutné před prvním spuštěním analýzy *therascreen* KRAS Pyro nastavit soubor analýzy ručně. Nastavte analýzu KRAS kodonů 12 a 13 a KRAS kodonu 61 pomocí softwaru PyroMark Q24, jak je popsáno níže.

Postup

Kodony 12 a 13 genu KRAS

1. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).
2. Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci.

GNTGRCGTAGGC

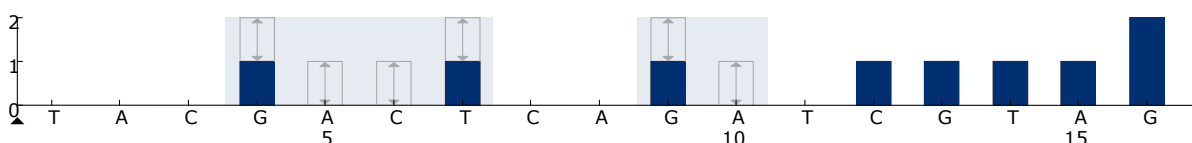
Poznámka: Nejčastější mutace kodonu 12 se bude detekovat u nukleotidu 35 (druhá pozice) prostřednictvím dané analyzované sekvence. Chcete-li analyzovat přítomnost mutace u nukleotidu 34 (první pozice), změňte položku „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) na následující.

NGTGRCGTAGGC

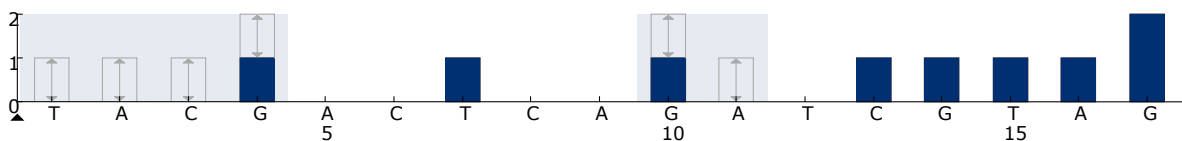
Poznámka: Zkontrolujte, že prahová hodnota pro výšku samostatného píku je nastavena na 30 RLU.

3. Ručně zadejte následující „Dispensation Order“ (Pořadí přidávání nukleotidů):


TACGACTCAGATCGTAG




Obrázek 13. Histogram kodonů 12 (nukleotid 35) a 13 (nukleotid 38) s analyzovanou sekvencí **GNTGRCGTAGGC**.



Obrázek 14. Histogram kodonů 12 (nukleotid 34) a 13 (nukleotid 38) s analyzovanou sekvencí *NGTGRCGTAGGC*.

4. 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**.
5. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „KRAScodon 12+13“.

Kodon 61 genu KRAS

6. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).
7. Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci.

CTCDTGACCTG

Poznámka: Nejčastější mutace kodonu 61 se budou detekovat u nukleotidu 183 (třetí pozice) prostřednictvím dané analyzované sekvence. Chcete-li analyzovat přítomnost mutace u nukleotidu 182 (druhá pozice), změňte položku „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) na následující.

CTCTHGACCTG

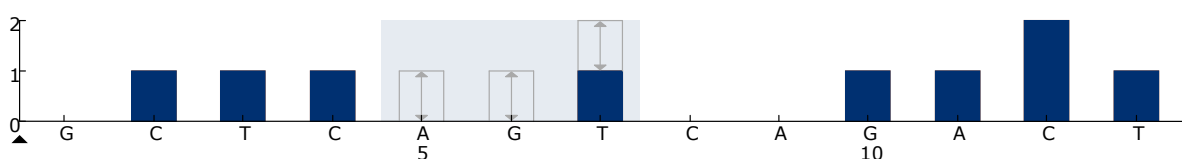
Chcete-li analyzovat přítomnost mutace u nukleotidu 181 (první pozice), změňte položku „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) na následující.

CTCTTSACCTG

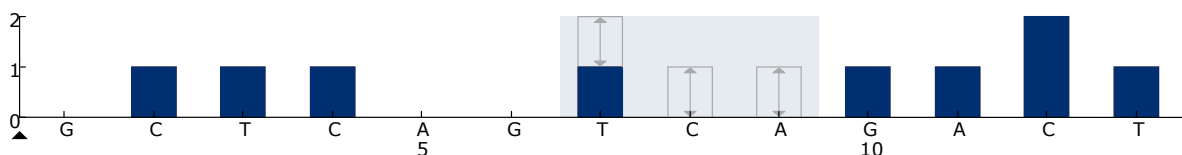
Poznámka: Zkontrolujte, že prahová hodnota pro výšku samostatného píku je nastavena na 30 RLU.

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

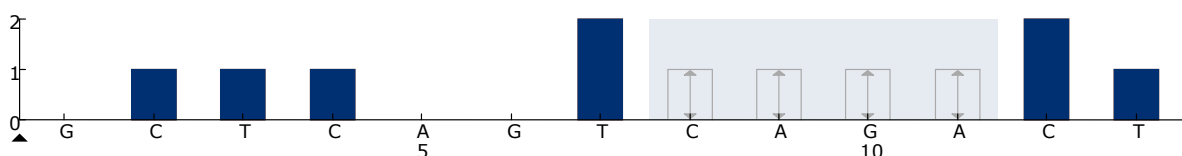
GCTCAGTCAGACT



Obrázek 15. Histogram kodonu 61 (nukleotid 183) s analyzovanou sekvencí *CTCDTGACCTG*.




Obrázek 16. Histogram kodonu 61 (nukleotid 182) s analyzovanou sekvencí CTCTHGACCTG.



Obrázek 17. Histogram kodonu 61 (nukleotid 182) s analyzovanou sekvencí CTCTTSACCTG.

9. 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.
10. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „KRAScodon 61“.

Příloha B: Vyprázdnění zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami

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

* 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 použití vysoce čištěné vody (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, nebo ekvivalent).

Postup

1. Zkontrolujte, že do vakuové hlavice není zavedeno vakuum. Ujistěte se, že přívod vakua je zavřený (Off) a vakuová pumpa je vypnutá.
2. Zlikvidujte všechny roztoky, které zbyly ve vaničkách.
3. Vypláchněte vaničky vysoce čištěnou vodou, v případě potřeby je vyměňte.
4. Vyprázdňte zásobník s odpadními tekutinami.

Poznámka: Víčko lze odejmout bez nutnosti odpojení hadiček.

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

Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	Pro 24 reakcí na systémech PyroMark Q24: Seq primery, PCR primery, nemetylovaná 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 α S, dCTP, dGTP a dTTP a H ₂ O	971460
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
Příslušenství		
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 ve Spojeném království.

† Ostatní státy.

Výrobek	Obsah	Kat. č.
PyroMark Control Oligo	Kontroly pro ověření systému při instalaci	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Kontroly pro ověření výkonu systému	979304
Související produkty		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Souprava na přípravu 50 vzorků DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute [®] , proteináza K, pufr, sběrné 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, proteináza K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Souprava pro přípravu 50 vzorků: odstředivací kolonky QIAamp, pufr, činidla, zkumavky, přípojky na vakuum	61104

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 nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Pro příslušné země:

ZAKOUPENÍM TOHOTO PRODUKTU JE KUPUJÍCÍ OPRÁVNĚN TENTO PRODUKT POUŽÍVAT K VÝKONU DIAGNOSTICKÝCH ÚKONŮ SPOJENÝCH S LIDSKOU DIAGNOSTIKOU IN VITRO. TÍMTO SE NEUDĚLUJE ŽÁDNÝ VŠEOBECNÝ PATENT ANI LICENCE JAKÉKOLI POVAHY, KROMĚ PRÁVA POUŽÍVAT TENTO VÝROBEK, KTERÉ JE DÁNO JEHO NÁKUPEM.

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

Ujednání o omezené licenci

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

1. Soupravu *therascreen* KRAS Pyro Kit lze používat pouze v souladu s pokyny uvedenými v *příručce k soupravě* *therascreen* KRAS 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 popsaných v *příručce k soupravě* *therascreen* KRAS Pyro Kit a dalších protokolech dostupných na stránkách 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, výslovně 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 zákazy 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.

© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ 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 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

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 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

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

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

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

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)

