

2016. május

therascreen[®] RAS Extension Pyro[®] Kit kézikönyv



1. verzió

IVD

In vitro diagnosztikai használatra

A humán KRAS onkogén 3. és 4. exonjában és a humán NRAS onkogén 2., 3. és 4. exonjában lévő mutációk kimutatására

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NÉMETORSZÁG

R2 **MAT** 1085873HU



Tartalomjegyzék

Alkalmazási terület	5
Összefoglalás és magyarázat	5
Az eljárás elve	7
Kontrollok	8
Szállított anyagok	9
A kit tartalma	9
Szükséges, de nem biztosított anyagok	10
Figyelmeztetések és óvintézkedések	13
Általános óvintézkedések	13
A reagensek tárolása és kezelése.....	14
Mintagyűjtés, előkészítés elemzésre és tárolás	15
Eljárás	17
DNS-izolálás	17
1. protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futtatási beállítása	17
2. protokoll: PCR a <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kittel együtt szállított PCR reagensek használatával.....	20
3. protokoll: PCR termékek immobilizációja Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökbe	23
4. protokoll: Minták előkészítése a PyroMark Q24 rendszeren végzett Pyrosequencing elemzés előtt	25
5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása	29
6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése.....	32
Az eredmények értelmezése	37

Reprezentatív eredmények	42
Hibaelhárítási útmutató	45
Minőség-ellenőrzés	47
Korlátozások	47
Teljesítményjellemzők	48
A vak minta határértéke (LOB) és kimutatási határérték (LOD)	48
GGT >TGT és GGT > GTT mutációk az NRAS 13. kodonjában	50
Linearitás	51
Precizitás	52
Diagnosztikai kiértékelés	55
Irodalomjegyzék	59
Szimbólumok	59
Kapcsolatfelvételi adatok	60
„A” függelék: A <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro tesztek beállítása	61
„B” függelék: A hulladéktartály és a vályúk ürítése	66
Rendelési információk	68

Alkalmazási terület

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit a humán KRAS onkogén 59., 61., 117. és 146. kodonjaiban és a humán NRAS onkogén 12., 13., 59., 61., 117. és 146. kodonjaiban lévő mutációk kvantitatív kimutatására szolgáló, Pyrosequencing® technológián alapuló, formalinban fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), metasztatikus colorectalis rákos (metastatic colorectal cancer, mCRC) humán szövetből kivont DNS-t felhasználó in vitro diagnosztikai teszt.

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit az olyan mCRC betegek azonosításának elősegítésére szolgál, akiknél eredményesnek bizonyulhatnak az olyan anti-EGFR kezelések, mint a cetuximab- és panitumumab-kezelés (1).

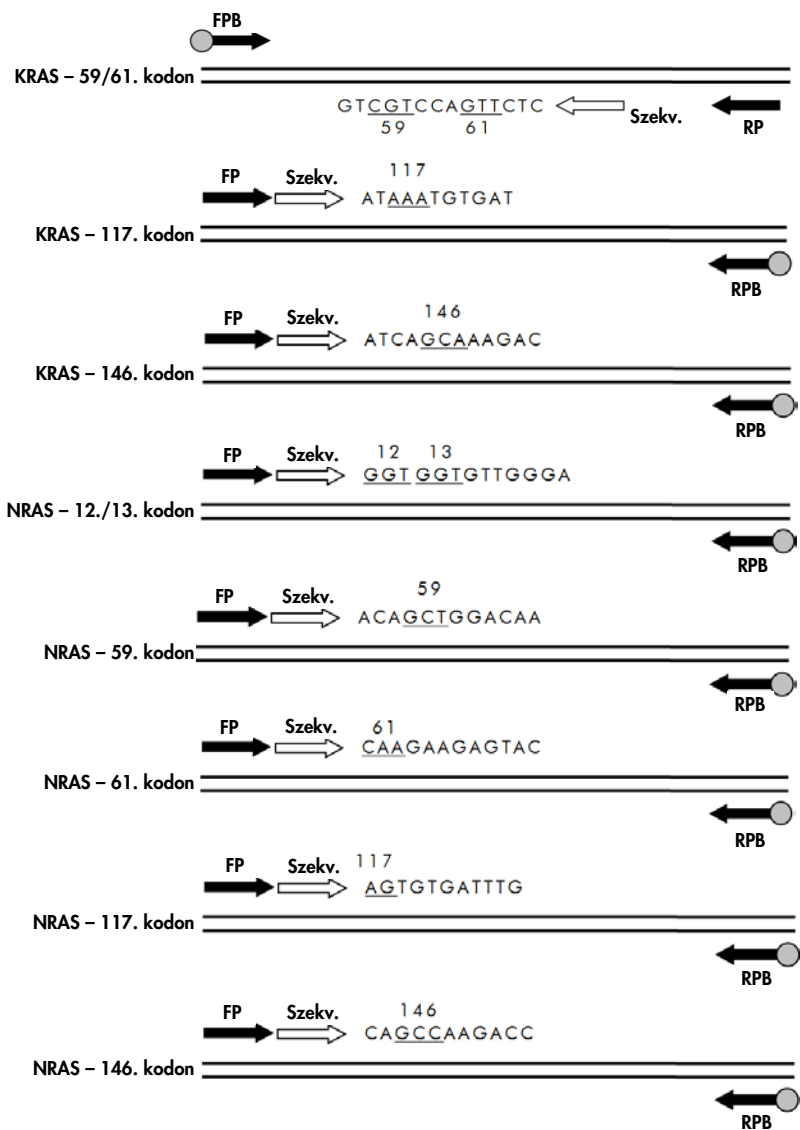
A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit kizárólag a PyroMark Q24 rendszeren alkalmazható. A PyroMark Q24 rendszerek az alábbiakat tartalmazzák:

- A PyroMark Q24 készülék vagy a PyroMark Q24 MDx készülék.
- A PyroMark Q24 Vacuum Workstation vagy a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- A PyroMark Q24 Software (2.0-ás verzió) vagy a PyroMark Q24 MDx Software (2.0-ás verzió).

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit olyan szakemberek, pl. technikusok és orvosok általi használatra szolgál, akik képzettek az in vitro diagnosztikai eljárások és a molekuláris biológiai technikák területén, valamint a PyroMark Q24 rendszer használatában.

Összefoglalás és magyarázat

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit a humán KRAS gén 3. és 4. exonjában és a humán NRAS gén 2., 3. és 4. exonjában lévő mutációk kvantitatív mérésére szolgál. A kit nyolc tesztet tartalmaz (1. ábra).



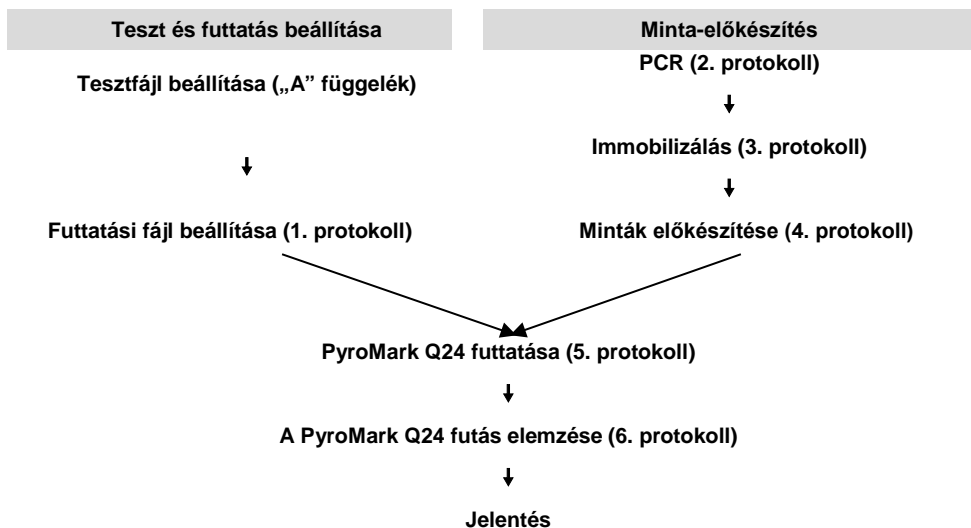
1. ábra: A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit tesztjei.

A PCR külön-külön amplifikálja a nyolc régiót, és szekvenálja a megadott régión keresztül. A lefedett területen található mutációk különálló, a vad típusú mintákból származó lenyomatoktól megkülönböztethető mintázatokat eredményeznek a Pyrogram® lenyomaton. A PyroMark® Q24 szoftverrel elemezhető mutációkat a 15. táblázat („A” függelék: A *therascreen* RAS Extension Pyro tesztek beállítása) ismerteti. A KRAS 117. és 146. kodonjainak és az NRAS 12./13., 59., 61., 117. és 146. kodonjainak tesztjei előrefelé szekvenáltak, a KRAS 59./61. kodonjainak tesztje pedig visszafelé szekvenált. A termék minden teszthez egy PCR primerkeveréket és egy szekvenáló primert tartalmaz. A primerek oldatokba vannak vegyítve; minden oldatos üveg 24 µl primert vagy primerkeveréket tartalmaz.

Az eljárás elve

A teszteljárás munkafolyamatát a 2. ábra (a következő oldalon) szemlélteti. A PCR művelet végrehajtása után a rendszer a primerekkel célba veszi a vizsgált területet, és az ampikonokat Streptavidin Sepharose® High Performance gyöngyökön immobilizálja. Egyszálú DNS jön létre, és a megfelelő szekvenáló primerek hozzákapcsolódnak a DNS-hez. A mintákat ezután analizálja a PyroMark Q24 rendszer egy tesztbeállítási fájl és egy futtatási fájl segítségével.

A „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) lehetőség beállítható a különböző mutációk detektálására a futtatás után (lásd „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése”, 32. oldal és „A” függelék: A *therascreen* RAS Extension Pyro tesztek beállítása”, 61. oldal).



2. ábra: A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit eljárás munkafolyamata.

Kontrollok

A PCR és szekvenálási reakciók pozitív kontrolljaként a kit metilátlan kontroll DNS-t tartalmaz. A kitben lévő kontroll DNS a szekvenált régiókban vad típusú genotípussal rendelkezik. Minden Pyrosequencing futtatás minden egyes tesztjében legyen egy kontroll DNS minta. Ez az eredmények megfelelő értelmezéséhez és az alacsony értéket adó mutációk azonosításához szükséges (lásd „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése”, 32. oldal).

Továbbá legalább egy teszthez egy negatív (templát DNS nélküli) kontrollt is bele kell foglalni minden PCR setupba.

Szállított anyagok

A kit tartalma

Doboz (1/2)

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Katalógusszám	971590
Készítmények száma	24
Seq Primer KRAS 59/61	24 µl
Seq Primer KRAS 117	24 µl
Seq Primer KRAS 146	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13	24 µl
Seq Primer NRAS 59	24 µl
Seq Primer NRAS 61	24 µl
Seq Primer NRAS 117	24 µl
Seq Primer NRAS 146	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61	24 µl
PCR Primer KRAS 117	24 µl
PCR Primer KRAS 146	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13	24 µl
PCR Primer NRAS 59	24 µl
PCR Primer NRAS 61	24 µl
PCR Primer NRAS 117	24 µl
PCR Primer NRAS 146	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x-es	1,2 ml
H ₂ O	6 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl	3 x 100 µl

Doboz (2/2)

Pufferek és reagensek	Térfogat
PyroMark Binding Buffer	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture	2 cső
Substrate Mixture	2 cső
dATP α S	2 x 1180 μ l
dCTP	2 x 1180 μ l
dGTP	2 x 1180 μ l
dTTP	2 x 1180 μ l
therascreen RAS Extension Pyro Kit kézikönyv (angol)	1 db

* Nátrium-hidroxidot tartalmaz.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (safety data sheets, SDS-ek) tartalmazznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Reagensek

- DNS-izoláló készlet (lásd „DNS-izolálás”, 17. oldal)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalógusszám: 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Nagy tisztaságú víz (Milli-Q® 18,2 M Ω x cm vagy azzal egyenértékű)

Megjegyzés: A kitben elegendő víz található a PCR-hez, DNS immobilizációhoz és az Enzyme Mixture enzimkeverék és Substrate Mixture szubsztrátelegy feloldásához; további nagy tisztaságú vízre van szükség a 10x-es PyroMark Wash Buffer mosópuffer felhígításához.

- Etanol (70%)*

Fogyóeszközök

- Steril pipettahegyek (szűrővel a PCR setuphoz)
- 24-cellás PCR-lemezek (lásd „Javasolt 24 cellás lemezek”, 12. oldal)
- Öntapadó fólia
- PyroMark Q24 Plate (katalógusszám: 979301)[†]
- PyroMark Q24 Cartridge (katalógusszám: 979302)[†]

Felszerelés

- Pipetták (állítható)[‡]
- Asztali mikrocentrifuga[‡]
- PCR készülék[‡] és megfelelő PCR csövek
- PyroMark Q24 MDx vagy PyroMark Q24 (katalógusszám: 9001513 vagy 9001514)[‡]
- PyroMark Q24 MDx vagy PyroMark Q24 Vacuum Workstation (katalógusszám: 9001515 vagy 9001516 vagy 9001518 vagy 9001519)[‡]
- Tálcsás rázógépe[‡] a gyöngyökbe történő immobilizációhoz (lásd „Ajánlott tálcsás rázógépek”, 12. oldal)
- Fűtőblokk[‡], amely képes 80 °C-ra felfűteni

* Ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol más anyagokat, például metanolt vagy metil-etil-ketont is tartalmaz.

[†] CE-IVD-jellel ellátva a 98/79/EK direktíva alapján. A többi felsorolt termék nem CE-IVD-jelölésű a 98/79/EK számú EU irányelv alapján.

[‡] Ellenőrizze, hogy a műszerek a gyártó ajánlásai szerint rendszeresen lettek-e ellenőrizve és kalibrálva.

Ajánlott tálcás rázógépek

Az 1. táblázat által felsorolt körkörös mozgású tálcás rázógépek javasoltak a *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel történő használatra.

1. táblázat: A *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel történő használatra javasolt tálcás rázógépek

Gyártó	Termék	Katalógusszám
Eppendorf	ThermoMixer® C (alapeszköz)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Javasolt 24 cellás lemezek

A 2 táblázat által felsorolt 24 cellás lemezek javasoltak a *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel történő használatra.

2. táblázat: A *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel történő használatra javasolt 24 cellás lemezek

Gyártó	Termék	Katalógusszám
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24 cellás	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 cella, átlátszó csővek	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR-lemezek, keret nélkül	G030

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmazzák. Ezek elérhetők online, a www.qiagen.com/safety weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN® kitek és a kitben található komponensek biztonsági adatlapja.

Általános óvintézkedések

Mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- Ennek a terméknek a komponensi tesztenként 24 reakció elvégzésére elegendőek.
- Steril pipettahegyeket (szűrővel a PCR setuphoz) használjon.
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és a reakcióelegyhez térben elkülönített helyen adja hozzá őket.
- A futtatás megkezdése előtt a komponensek hőmérsékletét szobahőmérsékletre (15–25 °C) kell hozni.
- Feloldás után keverje meg (pipetázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd centrifugálja a komponenseket.
- A mutációs állapotok megítélése nem alapulhat hibás eredményeken.

A reagensek tárolása és kezelése

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kitet két külön dobozban szállítják. A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit (2/1. doboz) szárazjégben érkezik. Megérkezése után a PyroMark PCR Master Mix, a CoralLoad koncentrátum, a metilálatlan kontroll DNS és az összes primer –15 °C és –25 °C között tárolandó.

A puffereket, Enzyme Mixture enzimkeveréket, Substrate Mixture szubsztrátelegyet, dATP α S-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t (a Pyrosequencing elemzés reagenseit) tartalmazó Pyro pufferek és reagensek (2/2. doboz) szállítása hűtőcsomagolásban történik. Ezeket a komponenseket érkezés után 2–8 °C-os hőmérsékleten kell tárolni. Az aktivitásvesztés minimalizálása érdekében ajánlott az enzimkeveréket és a szubsztrátelegyet is az eredeti fiolájában tartani.

A rekonstituált enzim- és szubsztrátelegyek legalább 10 napon át stabilak maradnak 2–8 °C-on. A rekonstituált enzim- és szubsztrátelegyek lefagyaszthatók és saját fiolájukban tárolhatók –15 °C és –25 °C között. A fagyasztott reagenseket nem szabad hatnál többször lefagyasztani és újra felolvasztani.

Megjegyzés: A nukleotidok nem fagyaszthatók le.

Ilyen tárolási körülmények között a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit a kit lejáratí idejéig stabil.

Mintagyűjtés, előkészítés elemzésre és tárolás

Megjegyzés: Minden mintát potenciálisan fertőző anyagnak kell tekinteni.

A mintaanyagnak FFPE szövetből nyert humán genomiális DNS-nek kell lennie. A minták minőségének biztosítása érdekében a mintákat a standard patológiai eljárásnak megfelelően kell szállítani.

A tumorminták heterogének, ezért a tumor egy mintájából kapott adatok eltérhetnek a tumor más metszeteiből származó adatoktól. A tumorminták nem tumoros szövetet is tartalmazhatnak. A nem tumoros szövetből származó DNS várhatóan nem tartalmaz a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit által kimutatható mutációkat.

A szövetminták előkészítése

Megjegyzés: Száraz kést használjon. Ezt a lépést ne lamináris áramlást biztosító vagy elszívó fülkében végezze.

- Kaparja le a metszetről a tumoros szövetet, és helyezze felcímkézett mikrocentrifuga-csövekbe, minden egyes minta esetén új kést használva.

Szövetminták előkészítése DNS-extrakcióra

- Standard anyagok és módszerek használatával fixálja a szövetmintát 10%-os neutrális pufferelt formalinba (neutral buffered formalin, NBF), és ágyazza paraffinba a szövetmintát. Mikrotommal vágjon 5 µm-es sorozatmetszeteket a paraffinblokkból, és helyezze őket üveg tárgylemezre.
- Egy szakembernek (pl. patológusnak) ki kell értékelnie egy Hematoxylin & Eosin (H&E)-festett metszetet a tumoros tartalom és terület meghatározása érdekében. Jelölje meg a festett metszetet, hogy elkülönítse a tumort a normál szövetből. A DNS-extrakcióhoz sorozatmetszeteket használjon.

- Makrodisszekció nélküli feldolgozáshoz területenként >20% tumortartalmú metszeteket használjon (lásd a következő pontot).
- A területenként <20% tumortartalmú metszetek esetén végezzen makrodisszekciót egy vagy több metszeten. Ártalmatlanítsa a nem tumoros szövetet.
- A <4 mm² területű metszetek esetén dolgozzon fel két vagy több metszetet, hogy a teljes tumoros területet legalább 4 mm²-re növelje (makrodisszekciós és makrodisszekció nélküli minták esetén egyaránt). Ártalmatlanítsa a nem tumoros szövetet.
- Egy új steril késsel kaparja le a szövetről a felesleges paraffint.

Tárolás

Az FFPE blokkokat és tárgylemezeket szobahőmérsékleten tárolja. A tárgylemezek DNS-extrakció előtt legfeljebb 4 hétig tárolhatók környezeti hőmérsékleten.

A genomiális DNS extrakció után 1 hétig tárolható 2–8 °C-on, majd pedig használat előtt legfeljebb 8 hétig –15 és –25 °C közötti hőmérsékleten.

Eljárás

DNS-izolálás

A megadott humán mintatípus DNS-tisztítására, valamint a *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel történő használatra a 3. táblázat által ismertetett QIAGEN kit javasolt. Ennek a kitnek a használatához kövesse a kit kézikönyvének DNS-tisztítással kapcsolatos utasításait.

3. táblázat: A *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel való használathoz ajánlott DNS tisztító kit

Mintatípus	Nukleinsav izolációs készlet	Katalógusszám (QIAGEN)
Paraffinba ágyazott szövet	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

1. protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futtatási beállítása

Kezdés előtti teendők

- Hozzon létre egy tesztbeállítást, lásd „„A” függelék: A *therascreen* RAS Extension Pyro tesztek beállítása”, 61. oldal. Ezt csak egyszer kell beállítani, az RAS Extension Pyro teszt első alkalommal történő futtatása előtt.
- Ne helyezzen „templát nélküli kontroll” cellák és várhatóan alacsony jelű cellák mellé magas jelintenzitású mintákat. Ez ugyanis ahhoz vezethet, hogy a rendszer az egyik cella jelét a mellette lévő cellában is észleli.

Eljárás


1. Kattintson a  ikonra az eszköztárban.

A rendszer új futtatási fájlt hoz létre.

2. Adja meg a futtatási paramétereket (lásd „Futtatási paraméterek”, 18. o.).
3. Készítse elő a lemezt: adja hozzá a tesztek a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit mind a nyolc tesztjéhez, az elemzendő mintáknak megfelelő cellákhoz.

Megjegyzés: Legalább egy teszthez egy negatív (templát DNS nélküli) kontrollt is bele kell foglalni minden PCR setupba.

Megjegyzés: Vad típusú kontrollként használjon egy metilátlan kontroll DNS mintát minden Pyrosequencing futtatás minden egyes tesztjéhez (lásd 2. ábra, 8. oldal).

- Amikor beállította a futtatást, és készen áll elindítani a PyroMark Q24 rendszeren, nyomtassa ki az enzimkeverékek, szubsztrátelegyek és nukleotidok szükséges térfogatait, valamint a mintalemez setupot. Válassza a „Tools” (Eszközök) menü „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) elemét. A jelentés megjelenésekor kattintson a  gombra.
- Zárja be a futtatási fájlt és a Windows® Explorer használatával másolja át (a rendszerrel együtt szállított) USB-adathordozóra.

Megjegyzés: A kinyomtatott futtatás előtti információk sablonként használhatók a minta setuphoz (lásd „3. protokoll: PCR termékek immobilizációja Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökbe”, 23. oldal).

Megjegyzés: A lemez PyroMark Q24 rendszeren történő futtatásához lásd „5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 29. oldal.

Futtatási paraméterek

- **Run name (Futtatás neve):** A futtatásnak a rendszer a fájl mentésekor ad nevet. A fájl átnevezésével a futtatás neve is megváltozik.
- **Instrument method (Készülékmód):** Válassza ki a készülékmódot a futtatáshoz használt kazettának megfelelően; lásd a termékekhez mellékelt utasításokat.
- **Plate ID (Lemezazonosító) (opcionális):** Adja meg a PyroMark Q24 Plate azonosítóját.
- **Bar code (Vonalkód) (opcionális):** Írja be a mintalemez vonalkódja számsorát, vagy ha rendelkezik vonalkód-leolvasóval, és az csatlakoztatva van a számítógépéhez, vigye az egérmutatót a „Barcode” (Vonalkód) jelölőnégyzethez (kattintson a négyzetre), és szkennelje be a vonalkódot.

- **Kit and reagent ID (Kit- és reagensazonosító) (opcionális):** Adja meg a *therascreen* RAS Extension Pyro Kithez használandó sarzsszámot. A sarzsszám a termék címkén található meg.

Megjegyzés: Javasoljuk mindkét sarzsszámot megadni, hogy a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit bármilyen váratlan problémája visszakövethető legyen.

- **Futtatási megjegyzés (opcionális):** Írjon be megjegyzést a futtatás összetevőivel vagy céljával kapcsolatban.

Tesztfájlok hozzáadása

Teszt cellához adásához tegye az alábbiak egyikét:

- Kattintson jobb egérgombbal a cellára, és válassza ki a „Load Assay” (Teszt betöltése) opciót a megjelenő környezeti menüből.
- Válassza ki a kívánt tesztet a parancsikon-böngészőből, majd kattintson rá, és húzza át a cellához.

A cella a cellába töltött tesztnek megfelelő szinkódolást kap.

Mintaazonosítók és megjegyzések bevitele

Mintaazonosító vagy megjegyzés beviteléhez válassza ki a cellát, és vigye be a szöveget.

Mintaazonosító vagy megjegyzés szerkesztéséhez vagy válassza ki a cellát (az aktuális tartalom kerül kiválasztásra), vagy kattintson kétszer a cellára.

2. protokoll: PCR a *therascreen* RAS Extension Pyro Kittel együtt szállított PCR reagensek használatával

Ez a protokoll a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit használatával a humán KRES gén 3. és 4. exonjában és a humán NRAS gén 2., 3. és 4. exonjában lévő nyolc különböző terület PCR amplifikációjára szolgál.

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- A PyroMark PCR Master Mix keverékben lévő HotStarTaq® DNS-polimeráz 15 perces, 95 °C-on végzett aktivációt igényel.
- Készítsen elő minden reakcióelegyet egy, a DNS tisztításra használt munkaterülettől különálló helyen, hozzáadva a templátot a PCR-hez, PCR termék analízishez vagy minta-előkészítéshez a Pyrosequencing elemzés előtt.
- A keresztszennyeződés megelőzésére használjon egyszer használatos, hidrofób szűrőt tartalmazó hegyeket.

Kezdés előtti teendők

- A PCR primereket tartalmazó csövek felnyitása előtt végezzen rövid centrifugálást, hogy a tartalom összegyűljön a cső alján.
- Ha szükséges, állítsa a kontroll és a minta DNS koncentrációját 0,4–2 ng/μl értékre.

Eljárás

1. Olvassa ki az összes szükséges komponenst (4. táblázat).

Használat előtt alaposan keverje össze őket.

2. A 4. táblázat tartalmának megfelelően készítsen egy reakcióelegyet minden egyes PCR primerkészlethez.

A reakcióelegy, a mintát kivéve, a PCR-reakcióhoz szükséges összes komponenst tartalmazza.

Az összes elvégzendő PCR teszthez szükségesnél nagyobb mennyiségű reakcióelegyet készítsen.

4. táblázat: Reakcióelegy készítése az egyes PCR primer keverékekhez

Komponens	Térfogat/reakció (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad koncentrátum, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 59/61 vagy PCR Primer KRAS 117 vagy PCR Primer KRAS 146 vagy PCR Primer NRAS 12/13 vagy PCR Primer NRAS 59 vagy PCR Primer NRAS 61 vagy PCR Primer NRAS 117 vagy PCR Primer NRAS 146	1
Víz (H ₂ O, a kit része)	4
Teljes térfogat	20

3. Keverje össze alaposan a reakcióelegyet, majd adagoljon 20 µl-t minden egyes PCR csőbe.

A PCR csöveket nem szükséges jégen tárolni, mivel a HotStarTaq DNS polimeráz szobahőmérsékleten inaktív.

4. Adjon hozzá 5 µl templát DNS-t (2–10 ng genomiális DNS-t) az egyes PCR csövek tartalmához (5. táblázat), és keverje össze alaposan.

Megjegyzés: Legalább egy teszthez egy negatív (templát DNS nélküli) kontrollt is bele kell foglalni minden PCR setupba.

Megjegyzés: Vad típusú kontrollként használjon egy metilálatlan kontroll DNS mintát minden Pyrosequencing futtatás minden egyes tesztjéhez (lásd „Kontrollok”, 8. oldal).

5. táblázat: A PCR-vizsgálat előkészítése

Komponens	Térfogat/reakció (µl)
Reakcióelegy	20
DNS minta	5
Teljes térfogat	25

5. Programozza be a thermocyclert a gyártó utasításai szerint, a 6. táblázat által ismertetett feltételek alkalmazásával.

6. táblázat: Optimalizált cycling protokoll

	Idő	Hőmérséklet	Megjegyzések
Kezdeti aktiválási lépés:	15 perc	95 °C	A HotStarTaq DNS polimerázt ez a felfűtési lépés aktiválja
3 lépéses cycling:			
Denaturálás	20 mp	95 °C	
Kapcsolódás	30 mp	53 °C	
Lánchosszabbítás	20 mp	72 °C	
Ciklusok száma	42	–	
Végső lánchosszabbítási lépés:	5 perc	72 °C	

6. Helyezze a PCR csöveket a thermocyclerbe, és indítsa el a cycling programot.
7. Az amplifikálás után folytassa a „3. protokoll: PCR termékek immobilizációja Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökbe” protokollal, lásd 23. oldal.
- A PCR minták 2–8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 3 napig tárolhatók.

3. protokoll: PCR termékek immobilizációja Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökbe

Ez a protokoll a templát DNS Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökbe történő immobilizációjára szolgál a PyroMark Q24 rendszeren végzett elemzés előtt.

Kezdés előtti teendők

- A kezdés előtt hagyja, hogy minden szükséges reagens és oldat szoba-hőmérsékletűre (15–25 °C) melegedjen.
- A PyroMark Q24 rendszert a futtatás megkezdése előtt legalább 30 perccel kapcsolja be. A főkapcsoló a készülék hátulján található.
- Helyezzen egy PyroMark Q24 lemeztartót egy 80 °C-ra felmelegített melegítőblokkra. Egy második PyroMark Q24 lemeztartót hagyjon szobahőmérsékleten (15–25 °C).
- A PyroMark Wash Buffer 10x-es koncentrátumként található a kitben. Az első használat előtt 25 ml 10x-es PyroMark Wash Buffer mosópufferhez 225 ml nagy tisztaságú víz hozzáadásával hígítsa 1x-es munkaoldattá az anyagot (a végső térfogat 250 ml).

Megjegyzés: Az 1x-es PyroMark Wash Buffer mosópuffer munkaoldat 2–8 °C közötti hőmérsékleten a jelölt lejárati ideig stabil.

- Készítse elő a PyroMark Q24 Vacuum Workstation munkaállomást mintaelőkészítéshez a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvben* ismertetett módon.

Eljárás

1. Óvatosan rázza fel a Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyöket tartalmazó palackot, amíg tartalma egynemű oldattá nem válik.
2. A 7. táblázat által ismertetett módon készítsen mesterkeveréket a DNS immobilizációhoz.

Az összes elvégzendő reakcióhoz szükségesnél nagyobb térfogatmennyiséget készítsen (az összes reakcióhoz + még egyhez).

7. táblázat: Mesterkeverék a DNS immobilizációhoz

Komponens	Térfogat/reakció (µl)
PyroMark Binding Buffer	40
Víz (H ₂ O, a kit része)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Teljes térfogat	70

3. A futtatási beállításban előírtaknak megfelelően adjon hozzá 70 µl mesterkeveréket a 24 cellás PCR-lemez celláihoz (lásd „1. protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futtatási beállítása”, 17. oldal).

A Sepharose gyöngyök gyorsan ülepednek. Pipettával vagy rövid vortexeléssel végzett gyakori keveréssel gondoskodjon a mesterkeverék homogenitásáról. A mesterkeveréket ne centrifugálja.

4. Adjon 10 µl biotinilált PCR terméket a 2. protokollból minden egyes mesterkeveréket tartalmazó cellához a futtatási beállításban előre meghatározottak szerint (lásd „2. protokoll: PCR a theascreen RAS Extension Pyro Kittel *együtt* szállított PCR reagensek használatával”, 20. oldal).

A cellánkénti teljes térfogatnak a mesterkeverék és a PCR termék hozzáadása után 80 µl-nek kell lennie.

5. Öntapadó fóliával zárja le a PCR-lemezt.

Gondoskodjon róla, hogy a cellák között ne lehessen szivárgás.

6. Rázza a PCR-lemezt szobahőmérsékleten (15–25 °C) 5–10 perccig, 1400 rpm sebességgel.

A lépés közben azonnal lépjen tovább a „4. protokoll: Minták előkészítése a PyroMark Q24 rendszeren végzett Pyrosequencing elemzés előtt” műveletre, lásd 25. oldal.

4. protokoll: Minták előkészítése a PyroMark Q24 rendszeren végzett Pyrosequencing elemzés előtt

Ez a protokoll egyszálú DNS előkészítésére és a szekvenáló primer templáthoz történő anneálására szolgál a PyroMark Q24 rendszeren végzett Pyrosequencing elemzés előtt.

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- A szekvenáló primereket tartalmazó csövek felnyitása előtt végezzen rövid centrifugálást, hogy a tartalom összegyűljön a csövek alján.
- A különböző szekvenáló primereket a futtatási beállítás által (lásd „1. protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futtatási beállítása”, 17. oldal) a lemezhez előírt mintázat szerint adja hozzá, az elemzési régiótól függően.
- Rendszeres időközönként végezze el a funkciótesztet a szűrőszondákra, a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* szerint, és a jelzett időpontokban cserélje ki a szűrőszondákat.

Eljárás

1. Hígítson fel megfelelő mennyiséget minden egyes szekvenáló primerből a PyroMark Annealing Buffer pufferben a 8. táblázat által ismertetett módon.

Az összes szekvenálandó mintához szükségesnél nagyobb térfogatmennyiségű hígított szekvenáló primert készítsen (az összes mintához + még egyhez).

Ne hígítson és ne tároljon a szükségesnél több szekvenáló primert.

8. táblázat: Példa szekvenáló primerek hígítására

Komponens	Térfogat/minta (µl)	Térfogat 9 + 1 reakcióhoz (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Seq Primer KRAS 59/61 vagy Seq Primer KRAS 117 vagy Seq Primer KRAS 146 vagy Seq Primer NRAS 12/13 vagy Seq Primer NRAS 59 vagy Seq Primer NRAS 61 vagy Seq Primer NRAS 117 vagy Seq Primer NRAS 146	0,8	8
Teljes térfogat	25	250

2. A futtatási beállításnak megfelelően adjon 25 µl hígított szekvenáló primert a PyroMark Q24 Plate minden egyes cellájához (lásd „1. protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futtatási beállítása”, 17. oldal).

Tartsa az egyik (a PyroMark Q24 Vacuum Workstation munkaállomással szállított) PyroMark Q24 lemeztartót szobahőmérsékleten (15–25 °C), és használja segítségként a lemez előkészítése és mozgatása során.

3. Kapcsolja be a PyroMark Q24 Vacuum Workstation vákuumpumpáját.
4. Helyezze a 3. protokoll PCR-lemezét és a PyroMark Q24 Plate lemezt a vákuum munkaállomásra (3. ábra).

Vizsgálja meg a PCR-lemezt, és győződjön meg róla, hogy a Sepharose gyöngyök oldatban vannak-e. Győződjön meg róla, hogy a PCR-lemez ugyanabban a helyzetben van-e, mint a minták betöltésekor.



3. ábra: A PCR-lemez és a PyroMark Q24 Plate elhelyezése a vákuum munkaállomáson.

5. A vákuum bekapcsolásával alkalmazzon vákuumot az eszközön.
6. Lassan eressze le a vákuumeszköz szűrőszondáit a PCR-lemezre az immobilizált templátot tartalmazó gyöngyök befogásához. Tartsa 15 mp-en át egy helyben a szondákat. A vákuumeszköz felemelésekor óvatosan járjon el.

Megjegyzés: A Sepharose gyöngyök gyorsan ülepednek. A gyöngyöket a felkeverés után azonnal be kell fogni. Ha a lemez felkeverése után több mint 1 perc eltelt, a gyöngyök befogása előtt keverje ismét 1 percig a lemezt.

Vizsgálja meg a PCR-lemezt, hogy a vákuumeszköz minden mintát felszívott-e.

7. Vigye át a vákuumeszközt a 40 ml 70%-os etanolt tartalmazó vályúba (1. vályú; 3. ábra). Öblítse 5 mp-ig a szűrőszondákat.
8. Vigye át a vákuumeszközt a 40 ml denaturáló oldatot tartalmazó vályúba (2. vályú; 3. ábra). Öblítse 5 mp-ig a szűrőszondákat.

9. Vigye át a vákuumeszközt az 50 ml mosópuffert tartalmazó vályúba (3. vályú; 3. ábra).
Öblítse 10 mp-ig a szűrőszondákat.
10. Emelje fel- és hátrafelé a vákuumeszközt 90°-nál nagyobb függőleges szögben, és tartsa így 5 mp-ig, hogy a folyadék lefolyhasson a szűrőszondákról (4. ábra).



4. ábra: A 90°-nál nagyobb függőleges szögben felemelt vákuumeszköz ábrázolása.

11. Kapcsolja ki a vákuumot, miközben a vákuumeszközt a PyroMark Q24 Plate fölé tartja.
12. A szűrőszondák oldott szekvenáló primerbe mártásával és a vákuumeszköz óvatosan egyik oldalról a másikra mozgatásával engedje ki a gyöngyöket a PyroMark Q24 Plate lemezre.
Megjegyzés: Vigyázzon, nehogy a szűrőszondákkal megkarcolja és megsértse a PyroMark Q24 Plate felületét.
13. Vigye át a vákuumeszközt a nagy tisztaságú vizet tartalmazó vályúba (4. vályú; 3. ábra), és rázza 10 mp-ig a vákuumeszközt.
14. Mártsa a szondákat a nagy tisztaságú vizet tartalmazó vályúba, és mossa át a szűrőszondákat (5. vályú; 3. ábra), majd alkalmazzon vákuumot. Öblítse át a szűrőszondákat 70 ml nagy tisztaságú vízzel.
15. Emelje fel- és hátrafelé a vákuumeszközt 90°-nál nagyobb függőleges szögben, és tartsa így 5 mp-ig, hogy a folyadék lefolyhasson a szűrőszondákról (4. ábra).

16. Kapcsolja ki a vákuumeszközt, és helyezze a vákuumeszköz parkoló (P) állásba.

17. Kapcsolja ki a vákuumpumpát.

Megjegyzés: A munkanap végén a folyékony hulladékot és a maradék oldatokat ártalmatlanítani kell, és meg kell vizsgálni, hogy a PyroMark Q24 Vacuum Workstation munkaállomáson nincsenek-e por- vagy folyadéknyomok. Lásd „„B” függelék: A hulladéktartály és a vályúk ürítése”, 66. oldal.

18. Az előmelegített PyroMark Q24 lemeztartóval melegítse 80 °C-on 2 percig a mintákat tartalmazó PyroMark Q24 Plate lemezt.

19. Vegye le a PyroMark Q24 Plate lemezt a forró lemeztartóról, és helyezze át egy második, szobahőmérsékleten (15–25 °C) tartott PyroMark Q24 lemeztartóra 10–15 percre, hogy a minták szoba-hőmérsékletűre hűlhessenek.

Folytassa azonnal a „5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása” protokollal, lásd 29. oldal.

5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása

Ez a protokoll a PyroMark Gold Q24 reagensek előkészítését és PyroMark Q24 Cartridge kazettába történő betöltését, valamint a PyroMark Q24 futtatásának elindítását és befejezését ismerteti. A futtatás beállítását illető részletesebb tájékoztatásért lásd a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvet*.

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- A futtatás előtti információk jelentés – amely megtalálható a „Tools” (Eszközök) menüben a futtatási beállításban (lásd „1. protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futtatási beállítása”, 17. oldal) – információkat nyújt egy adott specifikus futtatáshoz szükséges nukleotidok, polimeráz enzim és szubsztrát puffer térfogatáról.
- A kazetta helyes működésének biztosítása érdekében (hidrofób szűrők nélküli) egyszer használatos hegyekkel töltsse fel a kazettát.

Eljárás

1. Oldja fel a liofilizált enzim- és szubsztrátelegeket 620 µl vízben (H₂O, mellékelve).

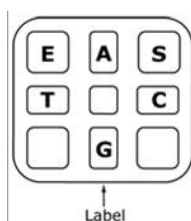
- Az üveg óvatos forgatásával keverje el.

Megjegyzés: Ne vortexelje!

A keverék teljes feloldódása érdekében hagyja a keveréket 5–10 percig szobahőmérsékleten (15–25 °C). A PyroMark Q24 Cartridge kazettába történő betöltés előtt ellenőrizze, hogy nem zavaros-e az oldat. Ha a reagenseket nem használja fel azonnal, tegye a reagensüvegeket jégre vagy hűtött tárolóba.

- Hagyja, hogy a reagensek és a PyroMark Q24 Cartridge elérje a környezeti hőmérsékletet (20–25 °C).
- A PyroMark Q24 Cartridge kazettát úgy helyezze el, hogy a felirat Ön felé nézzen.
- Töltse fel a PyroMark Q24 Cartridge kazettát a megfelelő térfogatú nukleotidokkal, enzim- és szubsztrátelegyekkel az 5 ábra szerint.

Ellenőrizze, hogy nem került-e át légbuborék a pipettából a kazettába.



5. ábra: A PyroMark Q24 Cartridge ábrázolása felülnézetből. A feliratok megfelelnek a reagensüvegeken található címkéknek. Adja hozzá az enzimkeveréket (E), a szubsztrátelegyet (S) és a nukleotidokat (A, T, C, G), a futtatási beállítások „Tools” (Eszközök) menüjében található „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) jelentésben megadott térfogatok szerint.

- Nyissa ki a kazetta ajtaját, és helyezze be a feltöltött reagenskazettát úgy, hogy a címke kifelé nézzen. Nyomja be teljesen a kazettát, majd nyomja le.
- Ellenőrizze, hogy látható-e a kazetta előtt a vonal, majd zárja be az ajtót.
- Nyissa ki a lemeztartó keretet, és helyezze a lemezt a melegítőblokkra.
- Zárja be a lemeztartó keretet, és a készülék fedelét.

10. Helyezze a (futtatási fájl tartalmazó) USB-adathordozót a készülék elején található USB-portba.
A futtatás befejeződése előtt ne távolítsa el az USB-adathordozót.
11. A főmenüből válassza ki a „Run” (Futtatás) parancsot (a ▲ és ▼ képernyő-gombok segítségével), majd nyomja meg az „OK” lehetőséget.
12. A ▲ és ▼ képernyőgombokkal válassza ki a futtatási fájlt.
Egy mappa tartalmának megtekintéséhez válassza ki a mappát és nyomja meg a „Select” (Kiválasztás) gombot. A korábbi nézethez történő visszatéréshez nyomja meg a „Back” (Vissza) gombot.
13. A futtatási fájl kiválasztása után a futtatás indításához nyomja meg a „Select” (Kiválasztás) gombot.
14. Miután a futtatás befejeződött, és a készülék megerősíti, hogy elmentette a futtatási fájlt az USB-adathordozóra, nyomja meg a „Close” (Bezárás) gombot.
15. Távolítsa el az USB-adathordozót.
16. Nyissa fel a készülék fedelét.
17. Nyissa ki a kazetta ajtaját, és a reagenskazettát felemelve és kifelé húzva vegye ki a kazettát.
18. Zárja be az ajtót.
19. Nyissa ki a lemeztartó keretet, és vegye le a lemezt a melegítőblokkról.
20. Zárja be a lemeztartó keretet, és a készülék fedelét.
21. Ártalmatlanítsa a lemezt, és a kazettához mellékelte terméktájékoztatóban szereplő utasításokat követve tisztítsa meg a kazettát.
22. Elemezze a futtatást a „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése” szerint, lásd 32. oldal.

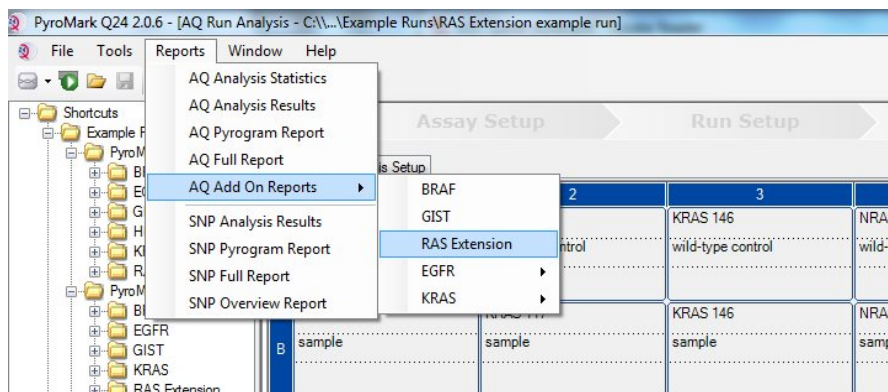
6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése

Ez a protokoll egy PyroMark Q24 szoftverrel végzett, befejezett *therascreen* RAS Extension Pyro futtatás mutációelemzését ismerteti.

Eljárás

1. Csatlakoztassa a feldolgozott futtatás fájlt tartalmazó USB-adathordozót a számítógép USB-csatlakozójához.
2. Másolja át a futtatási fájlt az USB-adathordozóról a számítógép kívánt célmappájába a Windows Explorer használatával.
3. A PyroMark Q24 szoftverben AQ módban nyissa meg a futtatási fájlt úgy, hogy a „File” (Fájl) menüben az „Open” (Megnyitás) lehetőséget választja, vagy duplán kattint a fájlra (📁) a hivatkozásokat tartalmazó böngészőfelületen.
4. Beépülő modul jelentés létrehozásához az RAS Extension Plug-in Report használatával válassza a menü „Reports” (Jelentések) pontjában az „AQ Add On Reports/RAS Extension” (AQ bővítmény jelentései / RAS Extension) lehetőséget (6. ábra).

Megjegyzés: A KRAS 61. kodonjában található mutációk elemzését külön kell elvégezni a KRAS beépülő modul használatával, a „Reports” (Jelentések) menü „AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61” (AQ bővítmény jelentései / KRAS / 61. kodon) pontjának kiválasztásával.



6. ábra: RAS Extension Plug-in Report menü.

A szoftver az összes cella esetében az összes olyan mutáció elemzését automatikusan elvégzi, amelynek szerepel az LOD-értéke a 9. táblázat felsorolásban, lásd 40. oldal. Az eredményeket egy áttekintő táblázat fogja megjeleníteni (7. ábra), amelyet a részletes eredmények követnek, pyrogramot és elemzési minőséget is tartalmazva.

Summary

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

⚠ See detailed results below.

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

7. ábra: RAS Extension Plug-in Report.

5. AQ elemzés használata:

A futtatás elemzéséhez és az eredmények áttekintéséhez kattintson az egyik „Analyze” (Elemzés) gombra.



Összes cella elemzése.



Kiválasztott cellák elemzése.

Az elemzés eredményei (az allélgyakoriságok) és a minőségértékelés a pyrogram lenyomaton a változó pozíciója felett jelennek meg. A futtatás elemzésével kapcsolatos további információkért lásd a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvet*.

Lelet létrehozásához válassza a „Reports” (Jelentések) menü „AQ Full Report” (Teljes AQ jelentés) vagy „AQ Analysis Results” (AQ elemzés eredményei) lehetőségét.

Megjegyzés: A megbízható eredmények érdekében javasoljuk, hogy az önálló csúcsok magassági küszöbértéke 30 RLU feletti értékre legyen állítva. A tesztbeállításban a „required peak height for passed quality” (megfelelt minőséghez szükséges csúcsmagasság) elemnél adjon meg 30 RLU értéket, és állítsa az A-csúcs csökkentési tényezőjét 0,86-ra az NRAS 61. kodon vizsgálatához (lásd „A” függelék: *A thescreen* RAS Extension Pyro tesztek beállítása”, 61. oldal, és *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv*).

Az „AQ Analysis Results” (AQ analízis eredmények) jelentést használja az allélok mennyiségi meghatározásának dokumentálására és értelmezésére. A pyrogramon látható számok kerekítettek, és nem a pontos kvantifikálást jelzik.

Megjegyzés: A pyrogramot mindig össze kell hasonlítani a hisztogrammal, amely a pyrogram ablakában a jobb egérgombbal kattintva jeleníthető meg. A mért csúcsoknak egyezniük kell a hisztogramoszlopok magasságával. Lásd még: „Az eredmények értelmezése”, 37. oldal.

Az olyan minták ismételt elemzése, amelyeknél nem detektált mutációt a standard „Sequence to analyze” (Elemzendő szekvencia) program, vagy amelyek „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségértékelést kaptak.

A standard „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) az elemzésbeállításban meghatározottaknak megfelelően a leggyakoribb pontmutációkat célozza a *thescreen* RAS Extension Pyro tesztekben.

Erősen ajánlott az összes olyan minta manuális újraelemzése, amelyeknél nem detektált mutációt a standard „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) program, valamint amelyek „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségértékelést kaptak. A „Check” (Ellenőrizendő) és a „Failed” (Sikertelen) minőségértékelés jelezhet olyan mutációt, amelyre a standard „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) nem terjedt ki, ezáltal váratlan referenciacsúcsokat eredményezve.

Más mutációk ismételt elemzéséhez és megcélzásához lépjen az „Analysis Setup” (Elemzésbeállítás) felületre, és váltson át „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) lehetőségre minden olyan variáns esetén, amely az „A” függelékben a 16. táblázat és 17. táblázat alatt szerepel, vagy más ritka vagy váratlan mutációk variánsai esetén. Kattintson az „Apply” (Alkalmaz) gombra, majd kattintson a „To All” (Minden mintára) gombra, amikor megjelenik az „Apply Analysis Setup” (Elemzési beállítások alkalmazása) ablak.

A humán KRAS és NRAS génekben lévő mutációk frissített gyakorisága online elérhető a Sanger Institute oldalán, a www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ címen.

Megjegyzés: A „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) megváltoztatása után gondoskodjon arról, hogy az önálló csúcsok magassági küszöbértéke 30 RLU-ra legyen állítva, valamint arról is, hogy az A-csúcs csökkentési tényezője az NRAS 61. kodonjának elemzéséhez 0,86-ra legyen állítva (lásd „A” függelék: A *therascreen* RAS Extension Pyro tesztek beállítása”, 61. oldal).

Megjegyzés: A szekvenált régióban további ritka vagy váratlan mutációk lehetnek jelen, amelyek másik „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) használatával elemezhetők, a váratlan mutációkat figyelembe véve.

Megjegyzés: Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogramoszlopok magasságával, és ez nem magyarázható ritka vagy váratlan mutációval, akkor az eredmény nem használható a mutációs státusz megítélésére. Javasolt a minta újrafuttatása.

Az eredmények értelmezése

Az elemzés eredményeinek értelmezése és az alacsony értéket adó mutációk kimutatása

Minden Pyrosequencing futtatás minden egyes tesztjében legyen egy kontroll DNS minta. Ez az eredmények megfelelő értelmezéséhez és az alacsony értéket adó mutációk azonosításához, valamint a háttérszintek ellenőrzéséhez szükséges. A kontrollminta mért gyakoriságának a vak minta határértékénél (limit of blank, LOB) kisebbnek vagy azzal egyenlőnek kell lennie. Egy mutáció jelenlétének meghatározásakor használhatók a kézikönyvben megadott LOB (vak minta határértéke) és LOD (kimutatási határérték) értékek. Ezeket az értékeket a vad típusú vagy a releváns mutálódott szekvenciát hordozó plazmid keverékekkel mérték.

A PyroMark Q24 szoftverrel vagy a beépülő modul jelentésekkel végzett elemzés után három eredmény lehetséges. LOD adatok esetén lásd 9. táblázat.

- Mutációk gyakorisága $< \text{LOD}$: Mutáció nem mutatható ki
- Mutációk gyakorisága $> \text{LOD} + 3\%$ egység: Mutáció
- Mutációk gyakorisága $\geq \text{LOD}$ és $\leq \text{LOD} + 3\%$ egység: Potenciális alacsony értéket adó mutációk

Megjegyzés: Ha az RAS Extension Plug-in Report használatakor (lásd a „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése” 5. lépését a 32. oldalon) ez előfordul, a rendszer figyelmeztetést küld.

Az LOD és LOD + 3 % egység közötti tartomány optimális körülmények között lehetővé teszi az alacsony értéket adó mutációk szenzitív kimutatását. Ha a metilálatlan kontrollmintánál az LOB feletti gyakoriság tapasztalható, az a szokásosnál magasabb háttérértéket jelez az adott futtatás esetében, amely hatással lehet az allélkvantifikálásra, különösen alacsony értéket adó mutációknál. Ezért a „Potential low level mutation” (Potenciális alacsony értéket adó mutáció) figyelmeztetéssel ellátott eredményeket körültekintően kell értékelni.

A potenciális alacsony értéket adó mutációk jelzésű mintákat csak akkor szabad mutáció szempontjából pozitívnak tekinteni, ha azt egy párhuzamossal és egy metilálatlan kontroll DNS-t tartalmazó mintával végzett ismételt futtatás is megerősíti. A két párhuzamos eredményének ugyanazt a mutációt kell jeleznie \geq LOD értékkel, a kontrollmintának pedig „No mutation detected” (Nem mutatható ki mutáció) jelzésűnek kell lennie. Ellenkező esetben a mintát „No mutation detected” (Nem mutatható ki mutáció) eredményűnek kell tekinteni.

Egy mutáció fokozott háttérértéke a kézikönyvben felsorolt LOB értékek és a metilálatlan kontroll DNS-sel végzett mérések eredményeinek összehasonlításával mutatható ki. A potenciális alacsony értéket adó mutáció jelzésű minták akkor tekinthetők ismétlés nélkül „Mutation not detected” (Nem mutatható ki mutáció) eredményűnek, ha a metilálatlan kontroll DNS mért gyakorisága nagyobb, mint a kézikönyvben a vonatkozó mutációhoz megadott LOB érték. Potenciális alacsony értéket adó mutáció esetén ezért három különböző helyzet lehetséges.

1. A metilálatlan kontroll DNS mért gyakorisága nagyobb, mint az adott mutáció esetén megadott LOB: A minta ismétlés nélkül „Mutation not detected” (Nem mutatható ki mutáció) eredményűnek tekinthető.
2. Két párhuzamos által nem azonos eredményt adó mérés: Tekintse a mintát „Mutation not detected” (Nem mutatható ki mutáció) eredményűnek.

3. A két párhuzamos mérés azonos eredményt ad, és a metilálatlan kontroll DNS mért gyakorisága kisebb, mint az adott mutáció esetén megadott LOB: Mutáció mutatható ki.

Megjegyzés: A pyrogramot mindig össze kell hasonlítani a hisztogrammal, amely a pyrogram ablakában a jobb egérgombbal kattintva jeleníthető meg. A mért csúcsoknak egyezniük kell a hisztogramoszlopok magasságával. Ellenőrizni kell, hogy a pyrogramon láthatók-e nem várt csúcsok. Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogramoszlopok magasságával, és ez nem magyarázható ritka vagy váratlan mutációval, akkor javasolt megismételni a minta futtatását. A mutációs állapotok megítélése nem alapulhat hibás eredményen. Érvényes mutáció esetén a csúcsmagasság változása mindig kapcsolódik egy másik csúcs magasságának kapcsolódó változásához. Egyetlen csúcs magasságának változása nem tekinthető mutációra utaló jelnek.

Megjegyzés: Az eredmények értelmezéséhez javasolt az RAS Extension Plug-in Report beépülő modult alkalmazni. Javasoljuk, hogy azon minták esetében, amelyeknél a jelentés alapján fennáll az alacsony értéket adó mutáció lehetősége, végezzen el egy további manuális elemzést az alkalmazásszoftveren (pl. a kontrollminta mutációs gyakoriságával való összehasonlítás céljából).

Megjegyzés: A rákos betegek terápiájáról nem szabad kizárólag a KRAS és az NRAS mutációs státusza alapján dönteni.

9. táblázat: A specifikus mutációk számára meghatározott LOB és LOD

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

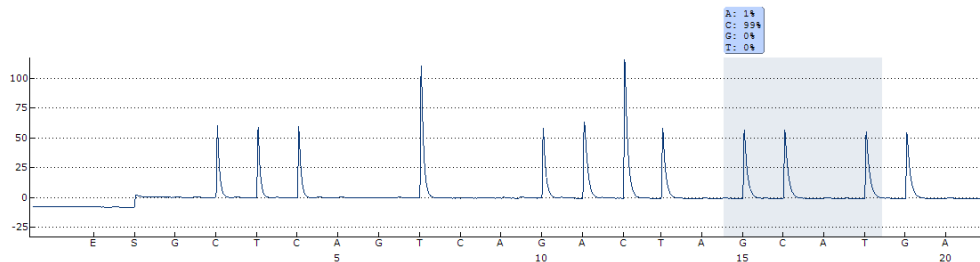
Nukleinsavcsere	Aminosavcsere	LOB (% egység)	LOD (% egység)	COSMIC ID* (V70)
KRAS – 59. kodon (GCA)				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
NRAS – 61. kodon (CAA)				
181C>A	Q61K	4,1	6,7	580
182A>G	Q61R	0,8	2,2	584
182A>T	Q61L	0,7	2,1	583
183A>T	Q61H	0,4	1,8	585
183A>C	Q61H	5,4	8,0	586
183A>G	Q61Q	2,1	5,8	587
NRAS – 117. kodon (AAG)				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
NRAS – 146. kodon (GCC)				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Szomatikus rákmutációk katalógusa) értékei, amely elérhető a Sanger Institute honlapján: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

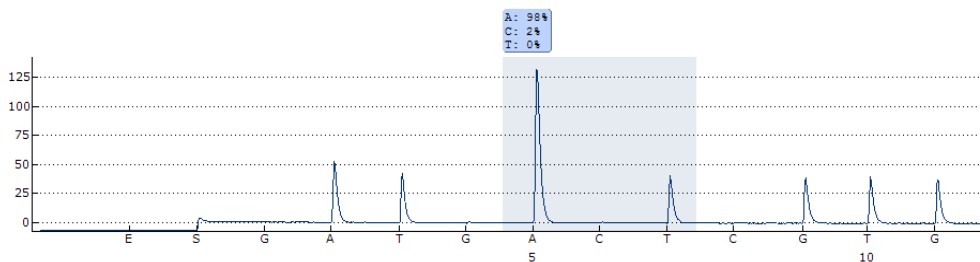
† A ≥ LOD gyakoriságot eredményező legalacsonyabb mutációérték a mintában.

Reprezentatív eredmények

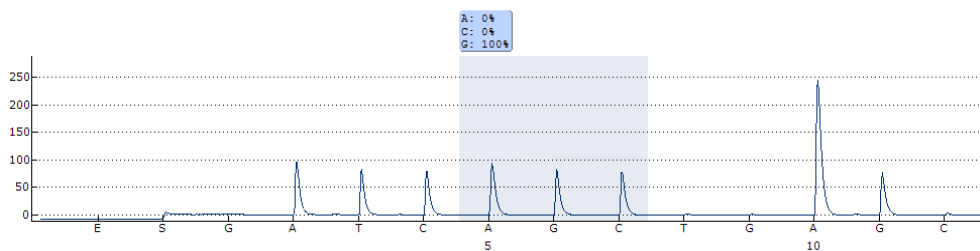
A reprezentatív pyrogrameredményeket a 8. ábra – 15. ábra tartalmazza.



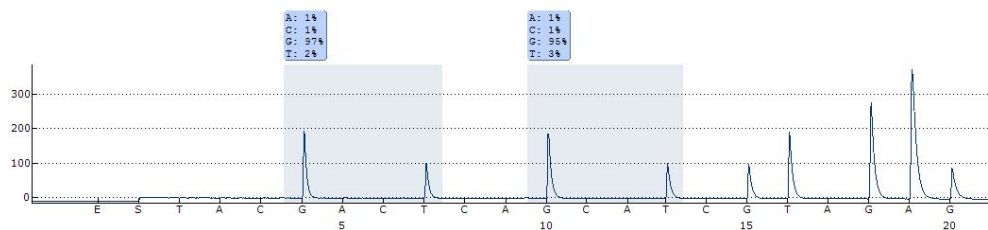
8. ábra: Vad genotípusú minta KRAS 59/61 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



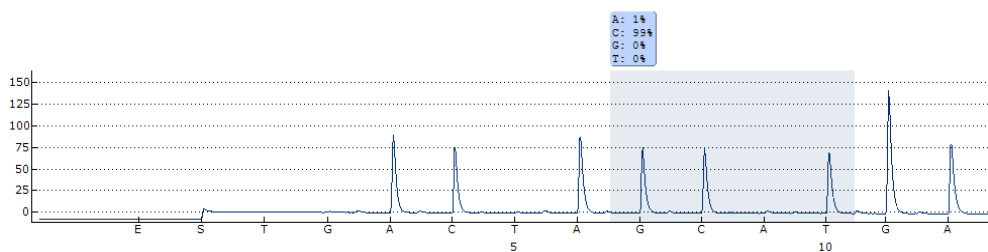
9. ábra: Vad genotípusú minta KRAS 117 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



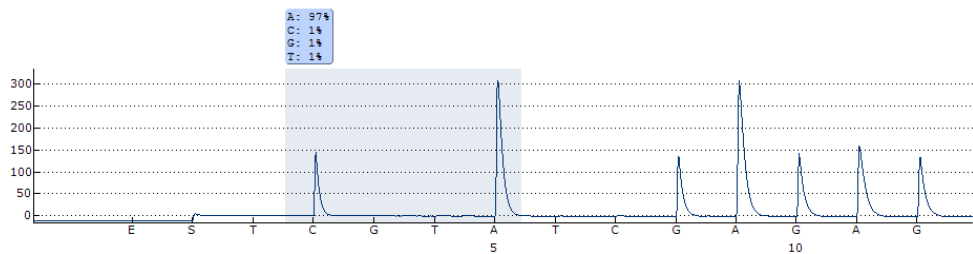
10. ábra: Vad genotípusú minta KRAS 146 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



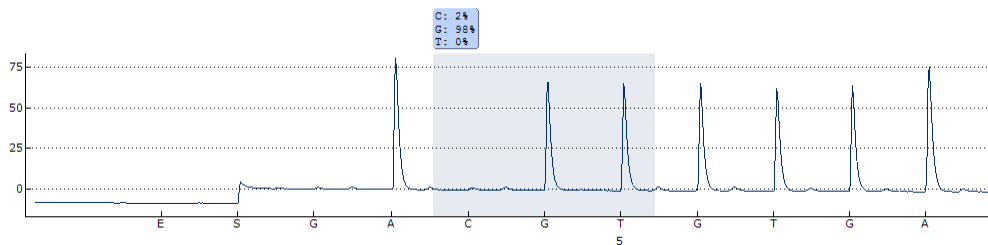
11. ábra: Vad genotípusú minta NRAS 12/13 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



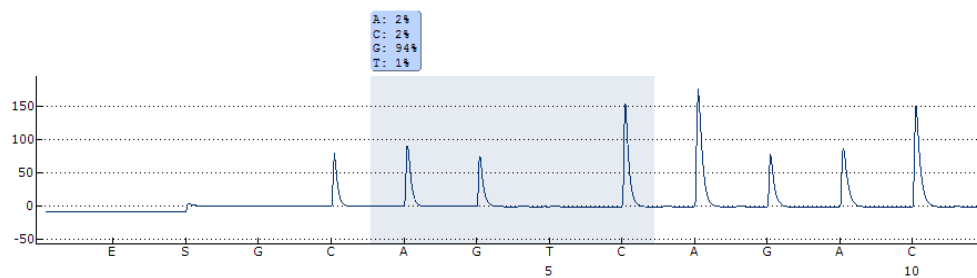
12. ábra: Vad genotípusú minta NRAS 59 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



13. ábra: Vad genotípusú minta NRAS 61 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



14. ábra: Vad genotípusú minta NRAS 117 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.



15. ábra: Vad genotípusú minta NRAS 146 teszttel végzett elemzése után kapott pyrogramlenyomat.

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN műszaki szolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és vizsgálati módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a kézikönyv hátlapján vagy a következő címen található: www.qiagen.com).

Megjegyzések és javaslatok

„Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) eredmény

- a) Alacsony csúcsmagasság
- A PCR beállítás vagy a minta Pyrosequencing előtti előkészítése során vétett kezelési hibák alacsony csúcsokat okozhatnak.
- Fontos, hogy a mintákat a vákuumeszköz teljesen felszívja. Ügyeljen rá, hogy a vákuumeszközt lassan engedje bele a mintákba, és hogy a PCR-lemez vagy az immobilizációhoz használt csőfűzér geometriája lehetővé tegye az összes minta felszívását.
- Rendszeres időközönként végezze el a funkciótesztet a szűrőszondákra, a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* szerint, és a jelzett időpontokban cserélje ki a szűrőszondákat.
- „Check” (Ellenőrizendő) figyelmeztetés esetén gondosan hasonlítsa össze a pyrogramot a hisztogrammal, amely a pyrogram ablakában a jobb egérgombbal kattintva jeleníthető meg. Ha a mért csúcsok azonosak a hisztogramoszlopok magasságával, az eredmény érvényes. Ellenkező esetben javasoljuk a minta ismételt futtatását.
- b) A „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) által nem meghatározott mutáció
- Állítsa be a „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) lehetőséget a tesztbeállításban (lásd „A” függelék: *A thetascreen RAS Extension Pyro tesztek beállítása*, 61. oldal), majd elemezze újra a futtatás eredményét. A „Sequences to Analyze” (Elemzendő szekvenciák) által nem lefedett mutációk a mintázatszimulációs eszközzel azonosíthatók.
- c) Váratlan ritka mutáció
- A „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségi értékelést a nem várt csúcsmintázat okozhatja. Ez jelezhet egy olyan váratlan mutációt, amelyet az adott „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) nem elemez. Ezeknek a mintáknak az elemzését másik „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) használatával, a váratlan mutációkat figyelembe véve kell elemezni. A „Sequences to Analyze” (Elemzendő szekvenciák) által nem lefedett mutációk a mintázatszimulációs eszközzel azonosíthatók.

Megjegyzések és javaslatok

- d) Nagy csúcsmagasságbeli eltérések figyelmeztetés diszpenzációra
- A pyrogramot gondosan össze kell hasonlítani a hisztogrammal, amely a pyrogram ablakában a jobb egérgombbal kattintva jeleníthető meg. Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogramoszlopok magasságával, és ez nem magyarázható ritka mutációval, akkor javasoljuk a minta ismételt futtatását.

Magas háttérérték

- a) Nukleotidok helytelen tárolása
- A nukleotidokat 2–8 °C-os hőmérsékleten tárolja. A –15 és –25 °C közötti tárolás miatt a háttérérték megnövekedhet.
- b) A minták rövid lehülési ideje a Pyrosequencing elemzés előtt
- Tartsa a mintákat a PyroMark Q24 lemeztartóban szobahőmérsékleten 10–15 percig. Ne rövidítse le a hülési időt.
- c) Szennyezett kazetta
- A terméktájékoztató utasításait követve óvatosan tisztítsa meg a kazettát. A kazettát fénytől és portól védett helyen tárolja.

Nincs jel a pozitív kontrollban (metilátlan kontroll DNS)

- a) Az összes cellához nem elegendő enzim- vagy szubsztrátelegy
- Győződjön meg róla, hogy a „Tools” (Eszközök) menü „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) pontjának megfelelően töltötte-e meg a PyroMark Q24 Cartridge kazettát.
- b) Helytelenül tárolt vagy hígított reagensek
- A reagenseket a következő részekben szereplő utasítások szerint készítse elő: „A reagensek tárolása és kezelése”, 14. oldal és „5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 29. oldal.
- c) PCR- vagy minta-előkészítési hiba
- A terméktájékoztató utasításait követve óvatosan tisztítsa meg a kazettát. A kazettát fénytől és portól védett helyen tárolja.

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítva a kit egyenletes és kifogástalan minőségét.

Korlátozások

A teszt 37 mutáció kimutatására szolgál a KRAS vagy az NRAS génekben. A „No Mutation Detected” (Nem mutatható ki mutáció) jelzésű minták tartalmazhatnak a teszt által nem észlelt KRAS vagy NRAS mutációkat.

A mutációk kimutatása függ a minta integritásától és a mintában található amplifikálható DNS mennyiségétől.

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kitet egy polimeráz láncreakciót (PCR-t) alkalmazó eljárás során használják. Mint minden PCR eljárás esetén, a minták szennyeződhetnek a tesztkörnyezet külső DNS-forrásai és a pozitív kontrollban lévő DNS által. A minták és a reakcióelegy reagensek szennyeződésének megelőzése érdekében körültekintően járjon el.

A kapott diagnosztikai eredményeket mindig az egyéb klinikai vagy laboratóriumi leletekkel összefüggésben kell értelmezni.

A felhasználó felelőssége, hogy validálja a rendszer teljesítményét a laboratóriumában alkalmazott bármely olyan eljárásra, amely nem része a QIAGEN teljesítmény-értékelő vizsgálatoknak.

Teljesítményjellemzők

A vak minta határértéke (LOB) és kimutatási határérték (LOD)

A vak minta határértékét (LOB) és a kimutatási határértéket (limit of detection, LOD) számos mutáció esetében meghatározták plazmidelegyek segítségével (10. táblázat). Az LOB és LOD értékeket a Klinikai és Laboratóriumi Szabványok Intézete (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) EP17 A2 jelű, „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (A kimutatási és a kvantifikációs határértékek meghatározásának protokollja; jóváhagyott irányelv) című irányelvének ajánlásai szerint határozták meg. Az α - és β -hibák (álpozitív és álnegatív) beállítása 5%. Az LOB értékek a vad típusú mintával mért gyakoriságot jelzik. Az LOD értékek az adott mutációhoz pozitívnak tekinthető legalacsonyabb jelet (mért gyakoriság) jelzik.

10. táblázat: A specifikus mutációk számára meghatározott LOB és LOD

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

Nukleinsavcsere	Aminosavcsere	LOB (% egység)	LOD (% egység)	COSMIC ID* (V70)
KRAS – 59. kodon (GCA)				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
NRAS – 61. kodon (CAA)				
181C>A	Q61K	4,1	6,7	580
182A>G	Q61R	0,8	2,2	584
182A>T	Q61L	0,7	2,1	583
183A>T	Q61H	0,4	1,8	585
183A>C	Q61H	5,4	8,0	586
183A>G	Q61Q	2,1	5,8	587
NRAS – 117. kodon (AAG)				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
NRAS – 146. kodon (GCC)				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Szomatikus rákmutációk katalógusa) értékei, amely elérhető a Sanger Institute honlapján: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† A \geq LOD gyakoriságot eredményező legalacsonyabb mutációérték a mintában.

GGT >TGT és GGT > GTT mutációk az NRAS 13. kodonjában

Ezeknél a mutációknál a vak minta mérések legtöbbször nem Gauss-féle eloszlást eredményező, 0 százalék egységek voltak. Az LOD értéket ezért más, a CLSI Guideline EP17-A dokumentumban javasolt módszerrel határozták meg. A mutáció jelenlétét jelző legalacsonyabb jelet (LOD) ezekben a pozíciókban a vak minta mérések 95. percentilise által meghatározott adott alapszint feletti 2 százalék egységre állították be. A 9. táblázatban zárójelben megadott mutációs szintű minta elemzésekor az eredmények 95%-a (n=72) adott pozitívnak tekinthető jelet (\geq LOD). Az LOB/LOD értékeket lásd 10. táblázat

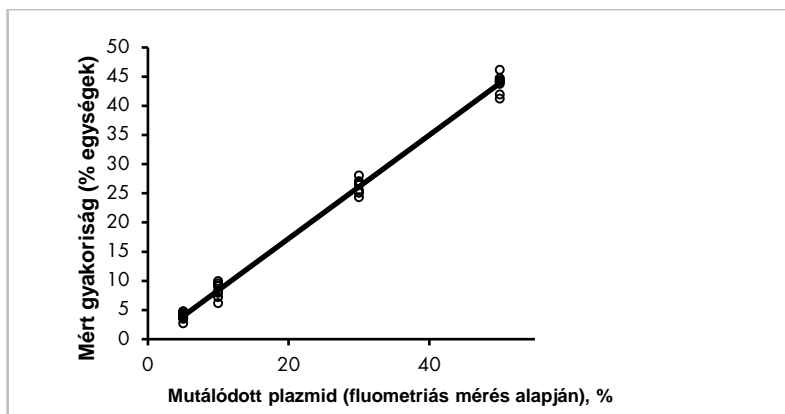
Megjegyzés: Az NRAS 12., 13. és 61. kodonja esetén a PCR és Pyrosequencing primereket a *therascreen* NRAS Pyro Kit (katalógusszám: 971530) tartalmának megváltoztatása nélkül alkalmazták. Ezeknek az NRAS kodonoknak a teljesítményadatai változatlanok maradnak.

Linearitás

A linearitást vad típust vagy a következő mutációk mutáns szekvenciáját hordozó plazmidkeverékekkel határozták meg: 176C>G a KRAS 59. kodonjában, 351A>T a KRAS 117. kodonjában, 436G>C a KRAS 146. kodonjában, 34G>A az NRAS 12. kodonjában, 37G>A az NRAS 13. kodonjában, 175G>A az NRAS 59. kodonjában, 182A>G az NRAS 61. kodonjában, 351G>C az NRAS 117. kodonjában és 437C>T az NRAS 146. kodonjában. A plazmidokat négy mutációs szintnek (5, 10, 30 és 50%) megfelelő arányban keverték ki. Minden egyes keveréket elemeztek a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit három különböző szarszával, 3 Pyrosequencing futtatással, egyenként három párhuzamossal.

Az eredményeket (n = 9 mindegyik mutációs szint esetén) a CLSI EP6-A2 jelű, „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline” (A mennyiségi mérési eljárások linearitásának kiértékelése: statisztikai megközelítés; jóváhagyott irányelv) című irányelvének ajánlásai szerint, a 2.21-es verziójú Analyse-it® szoftverrel elemezték. Az eredményeket a 16. ábra tartalmazza.

Az eredmények az 5–50%-os mutációs szintek vizsgált tartományában lineárisak voltak, 5 % egységnyi megengedett nem linearitással. A KRAS 59., 117. és 146. kodonjában és az NRAS 12., 13., 59., 61., 117. és 146. kodonjában az összes lefedett mutációra hasonló eredmények születtek.



16. ábra: A KRAS 59. kodonjában lévő 176C>G mutáció linearitása.

A KRAS 59., 117. és 146. kodonjában és az NRAS 12., 13., 59., 61., 117. és 146. kodonjában az összes lefedett mutációra hasonló eredmények születtek.

Precizitás

A három különböző koncentrációban, a fent említett plazmidkeverékek elemzésével, egyenként három párhuzamossal kapott precizitási adatokkal meghatározható a tesztek teljes variabilitása.

A megismételhetőség (teszten belüli és sarzsok közötti variabilitás) számítása a linearitás meghatározására szolgáló adatok alapján történt (ugyanazon a napon három futtatás, a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit különböző sarzsainak használatával). A laboratóriumon belüli precizitás (laboratóriumon belüli variabilitás) meghatározása egy laboratóriumon belül három különböző napon végzett három futtatással történt. A futtatásokat különböző kezelők végezték PyroMark Q24 készülékek, valamint több *therascreen* RAS Extension Pyro Kit használatával. A reprodukálhatóság (laboratóriumok közötti variabilitás) számítása két különböző laboratóriumon végzett két futtatásból történt, különböző *therascreen* RAS Extension Pyro Kit sarzsok használatával.

A precizitásbecslések % egységben megadott, a mért mutációgyakoriságtól való standard eltérésként vannak megadva (11. táblázat).

11. táblázat: Mutációk precizitása*

% Mutálódott plazmid†	Megismételhetőség		Laboratóriumon belüli precizitás		Reprodukálhatóság	
	Átlag	SD	Átlag	SD	Átlag	SD
176C>G a KRAS 59. kodonjában						
5	4,0	0,7	3,8	0,6	4,2	1,1
10	8,4	1,2	8,5	1,0	8,4	1,4
30	26,1	1,2	26,3	1,1	26,8	1,2
50	43,9	1,5	44,0	0,7	43,7	1,3
351A>T a KRAS 117. kodonjában						
5	5,5	1,6	5,5	2,2	7,1	2,0
10	11,0	1,7	10,8	1,4	12,5	2,9
30	30,6	1,7	30,6	2,0	31,9	2,7
50	52,8	2,0	53,5	1,3	54,5	1,6
436G>C a KRAS 146. kodonjában						
5	4,2	0,6	4,1	0,5	3,7	1,2
10	9,6	0,9	9,1	0,9	8,6	1,3
30	29,0	0,9	28,8	1,0	28,1	1,1
50	47,5	1,5	46,8	0,7	45,6	1,9
34G>A az NRAS 12. kodonjában†						
5	7,5	1,2	7,3	1,0	6,7	1,3
10	14,6	1,3	13,5	1,1	13,7	1,3
30	37,8	1,9	37,9	1,5	36,1	2,9
50	59,8	1,7	60,4	2,0	57,5	3,1
175G>A az NRAS 59. kodonjában						
5	7,8	0,9	7,3	0,5	7,1	1,3
10	11,9	1,0	11,6	2,0	12,5	1,7
30	29,5	1,1	29,6	1,2	29,9	1,9
50	49,0	1,1	48,3	1,3	48,9	1,4
182A>G az NRAS 61. kodonjában						
5	6,4	0,9	6,8	0,7	7,2	1,0

% Mutálódott plazmid†	Megismételhetőség		Laboratóriumon belüli precizitás		Reprodukálhatóság	
	Átlag	SD	Átlag	SD	Átlag	SD
10	11,7	0,9	11,8	1,1	11,8	1,0
30	34,1	1,3	34,6	1,7	33,8	2,5
50	53,1	1,5	53,3	1,8	53,1	2,0
351G>C az NRAS 117. kodonjában						
5	4,9	0,2	5,0	0,3	4,5	0,8
10	9,4	0,4	10,3	1,5	9,4	0,5
30	28,7	0,9	28,8	0,7	28,3	1,3
50	48,5	0,4	48,8	0,6	48,8	0,6
437C>T az NRAS 146. kodonjában						
5	4,4	0,7	4,6	0,5	4,1	0,9
10	8,8	0,9	8,7	0,8	9,1	0,8
30	28,4	1,1	27,9	0,6	28,4	0,8
50	47,9	1,1	48,1	1,4	48,0	1,1

* Minden érték % egységként van megadva. SD: standard deviation (standard eltérés) (a megismételhetőség és a laboratóriumon belüli precizitás esetén n = 9, a reprodukálhatóság esetén n = 12).

† Fluometriás mérés alapján, az NRAS 12. kodonjában lévő 34G>A esetén, OD₂₆₀ alapján.

Diagnosztikai kiértékelés

A *therascreen* RAS Extension Pyro Kitet két különböző vizsgálat során, a Sanger szekvenálással összehasonlítva értékelték ki.

Előzetesen elvégeztek egy vizsgálatot, amely során a *therascreen* NRAS Pyro kitet értékelték a Sanger szekvenálással összehasonlítva. A DNS-t 100, formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE), csontvelőből nyert tumormintából vonták ki, és a 12./13. kodonban és a 61. kodonban lévő mutációkra elemezték.

Mivel a *therascreen* NRAS Pyro kit NRAS 12./13. és 61. kodonját lefedő tesztjei a *therascreen* RAS Extension Pyro Kitben módosítás nélkül található meg, a *therascreen* NRAS Pyro Kit kiértékeléséből származó eredményeket mutatjuk be.

A második vizsgálatban a DNS-t 110, formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mCRC tumormintából vonták ki, és a humán KRAS gén 59., 61., 117. és 146. kodonjának és a humán NRAS gén 59., 117. és 146. kodonjának mutációjára elemezték. A kis gyakoriságú mutációkat vad típusú FFPE DNS-sel preparált plazmid DNS-sel elemezték.

A DNS-t mindkét vizsgálatban a QIAamp DNA FFPE Tissue Kittel izolálták, majd a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit tesztjeivel, a PyroMark Q24 rendszeren elemezték. A Sanger szekvenálást az Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer készülékkel végezték.

Az NRAS 12., 13. és 61. kodonjának kiértékelése

A Sanger szekvenálással elemzett 100 minta közül a mutációs állapotot 97 mintában azonosították mind a 12./13., mind a 61. kodon esetén. A 100 minta közül négyben a 12. vagy a 13. kodon mutációját kimutatták Sanger szekvenálással.

A 100 minta közül kettőben reprodukálták a mutációs állapotot a *therascreen* NRAS Pyro Kit használatával, és nem jelentettek mutációt. Az eredményeket a 12. táblázat tartalmazza. A 61. kodonban nem mutattak ki mutációt.

Azokat a mintákat kizárva, amelyek eredménye egyik vagy mindkét módszerrel sikertelen volt, a *therascreen* NRAS Pyro Kit és a Sanger szekvenálás 98%-os, illetve 100%-os konkordanciát mutatott a 12./13. és a 61. kodon eredményeit illetően; lásd 12. táblázat).

12. táblázat: Az NRAS 12., 13. és 61. kodonjához elemzett minták eredményei

		Sanger szekvenálás				Összesen
		Mutáns a 12./13. kodonban	Mutáns a 61. kodonban	Vad típus	Ismeretlen	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutáns a 12./13. kodonban	2	–	–	–	2
	Mutáns a 61. kodonban	–	–	–	–	–
	Vad típus	2	–	90	3	95
	Ismeretlen	–	–	3	–	3
	Összesen	4	–	93	3	100

A KRAS 59., 61., 117. és 146., valamint az NRAS 59., 117. és 146. kodonjának kiértékelése

A DNS-t 110, formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mCRC tumormintából vonták ki, és a humán KRAS gén 59., 61., 117. és 146. kodonjának és a humán NRAS gén 59., 117. és 146. kodonjának mutációjára elemezték. A klinikai minták esetén várható alacsony gyakoriság miatt a *therascreen* RAS Extension Kit által lefedett összes mutációt további 56, vad típusú FFPE DNS-sel preparált plazmid DNS mintában is elemezték. Minden mutációt mind a Pyrosequencing, mind a Sanger szekvenálás megtalált.

A 166 elemzett mintából a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit és a Sanger szekvenálás között 137 mintánál találtak egyező eredményeket (83%).

A nem egyező eseteket számos tényező magyarázhatja.

A magas háttérték miatt az NRAS 59. kodonjára a Sanger szekvenálás elemzése 20 minta esetén lett sikertelen.

A Sanger szekvenálás nem mutatta ki a KRAS 59. és a KRAS 61. kodonjának mutációit az egy, illetve három mintában. A Pyrosequencing mind a négy mutációra kis gyakorisági eredményt mutatott (7,5–13,1%). Ez azzal magyarázható, hogy a Sanger szekvenálásnak alacsonyabb a szenzitivitása (15–20%) a Pyrosequencing szenzitivitásához képest (5%) (2). Minden más érvényes minta mindkét technika esetén vad típusú volt.

Egy mintát a Pyrosequencing két detektált mutáció miatt (KRAS 59–61) ismeretlennek értékelt.

Négy, hozzáadott plazmid DNS-t tartalmazó minta a KRAS 350. szekvenálási pozíciójában további A>G mutációt mutatott, amelyet a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit nem képes kimutatni. A mutációkat manuális elemzéssel mutatták ki.

13. táblázat: A KRAS 59., 61., 117. és 146. kodonjaira, valamint az NRAS 59., 117. és 146. kodonjaira elemzett minták eredményei

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	wt	UK	Összesen	
iTherascreeen RAS Extension Pyro Kit	KRAS 59	8	–	–	–	–	–	1	9	
	KRAS 61	–	6	–	–	–	2	1	9	
	KRAS 117	–	–	4	–	–	–	–	4	
	KRAS 146	–	–	–	3	4	–	–	7	
	KRAS ^a	–	–	–	–	16	–	–	16	
	NRAS ^b	–	–	–	–	–	28	–	28	
	wt	–	–	–	–	–	–	71	16	87
	UK	1	–	–	–	–	–	3	2	6
	Összesen	9	6	4	3	20	28	76	20	166

UK: ismeretlen; vt: vad típus.

^a Mind a KRAS 117., mind a 146. mutációját hordozó preparált KRAS minták.

^b az NRAS 59., 117. és 146. mutációját hordozó preparált NRAS minták.

* Egy mintában a rendszer mutációt mutatott ki a KRAS 146. esetén, de az NRAS 117. esetén érvénytelen eredményt adott.

A tesztek kodononkénti szenzitivitását és specifikitását a 14. táblázat tartalmazza.

14. táblázat: A KRAS 59., 61., 117. és 146. kodonjára, valamint az NRAS 59., 117. és 146. kodonjára végzett tesztek szenzitivitása és specifikitása

	Szenzitivitás	Specifikitás	Lefedett mutáció
Mutáció – KRAS 59.	100%	99%	175G>A / 176C>G
Mutáció – KRAS 61.	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Mutáció – KRAS 117.	100%	100%	351A>C / 351A>T
Mutáció – KRAS 146.	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Mutáció – NRAS 59.	100%	100%	175G>A / 176C>G
Mutáció – NRAS 117.	100%	100%	351G>C / 351G>T
Mutáció – NRAS 146.	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T








Megjegyzés: A teljesítményjellemzők meghatározására használt minden futtatás esetén a jel 30 RLU felett volt, és 10 ng formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetből izolált DNS-ből, rutinszerűen nyerték ki. A Pyrosequencing adatokat RAS Extension Plug-in Report használatával elemezték a KRAS 59., 117., 146. és az NRAS 59., 117. és 146. kodonjaira.










Irodalomjegyzék

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

Szimbólumok

A csomagoláson és a címkéken a következő szimbólumok szerepelhetnek:

Szimbólum	Szimbólum definíciója
 Σ <N>	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Lejárati dátum
	In vitro diagnosztikai alkalmazásra szolgáló orvostechnikai eszköz
	
	Katalógusszám
	Sarzsorszám
	Anyagszám

Szimbólum	Szimbólum definíciója
 <N>	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Komponensek
	Tartalom
	Szám
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám
	Hőmérséklet-korlátozás
	Gyártó
	Lásd a használati útmutatót
	Figyelem!

Kapcsolatfelvételi adatok

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki ügyfélszolgálatunk weblapját a **www.qiagen.com/Support** címen, hívja a 00800-22-44-6000 telefonszámot, vagy forduljon a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a www.qiagen.com webhelyen).

„A” függelék: A *therascreen* RAS Extension Pyro tesztek beállítása

Az RAS Extension Plug-in Report telepítése után a KRAS 59./61., 117. és 146. kodonjának és az NRAS 12./13., 59., 61., 117. és 146. kodonjának előre meghatározott tesztbeállításai elérhetővé válnak a PyroMark Q24 szoftver hivatkozásokat tartalmazó böngészőfelületén. Kövesse az „Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension” (Mintafájlok / PyroMark beállítások / RAS Extension) útvonalat. Ekkor az alábbi lépéseket nem kell végrehajtani.


Az RAS Extension Plug-in Report letölthető a www.qiagen.com weboldal megfelelő katalógusoldaláról, a Protocol Files (Protokollfájlok) rész „Product Resources” (Termékdokumentáció) lapjáról.

Kifejezetten javasoljuk az RAS Extension Plug-in Report használatát manuális elemzés helyett.

A beépülő modul telepítése után, vagy bármikor, amikor új szoftvert telepítenek vagy frissítenek a számítógépen, az RAS Extension Plug-In rövid útmutatójában ismertetett módon ellenőrizni kell a beépülő modul helyes működését.

Ha nem telepítették az RAS Extension Plug-in Report beépülő modult, a tesztfájlt a *therascreen* RAS Extension Pyro teszt első alkalommal történő futtatása előtt manuálisan kell beállítani. A PyroMark Q24 szoftver használatával az alábbiakban ismertetett módon állítsa be a KRAS 59./61., 117. és 146., valamint az NRAS 12., 13., 59., 61., 117. és 146. kodonjának tesztjeit.

Eljárás

1. Kattintson a  ikonra az eszköztárban, és válassza ki a „New AQ Assay” (Új AQ teszt) opciót.


2. A 15. táblázat tartalmazza a „Sequences to Analyze” (Elemzendő szekvencia) ismertetését mind a nyolc RAS Extension Pyro teszt elemzéséhez. Írja be a tesztspecifikus szekvenciát a „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) mezőbe.
3. A „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) érték a futtatás után is módosítható a mutációk különböző pozíciókban történő elemzése érdekében (lásd „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése”, 32. oldal).

4. Annak vizsgálatára, hogy a nukleotidokban jelen vannak-e mutációk, módosítsa a „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) értékét a 15. táblázat szerint. A „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia) értéke a futtatás után módosítható (ha nincs zárva).

Megjegyzés: Ügyeljen rá, hogy az önálló csúcsok magassági küszöbértéke 30 RLU-ra legyen állítva. Továbbá arra is ügyeljen, hogy az NRAS 61. kodonjának elemzéséhez az A-csúcs csökkentési tényezője 0,86 legyen.

5. Manuálisan vigye be a 15. táblázat tesztspecifikus „Dispensation Order” (Diszpenzációs rend) értékét.

Megjegyzés: Ne használja a „Generate Dispensation Order” (Diszpenzációs rend létrehozása) gombot. Mind a „Sequence to Analyze” (Elemzendő szekvencia), mind a „Dispensation Order” (Diszpenzációs rend) értéket manuálisan kell bevinni.

6. Kattintson az „Analysis Parameters” (Elemzési paraméterek) lapra, és növelje meg a „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Csúcsmagasság küszöbértéke – Megfelelt minőséghez szükséges csúcsmagasság:) értéket 30-ra.
7. Kattintson az eszköztárban a  gombra, és mentse el a tesztet „KRAS 59/61” vagy „KRAS 117” vagy „KRAS 146” vagy „NRAS 12/13” vagy „NRAS 59” vagy „NRAS 61” vagy „NRAS 117” vagy „NRAS 146” néven.

15. táblázat: Tesztbeállítás: „Sequence to analyze” (Elemzendő szekvencia) és „Dispensation order” (Diszpenzációs rend) a *therascreen* RAS Extension Pyro Kit nyolc tesztjéhez

<i>therascreen</i> RAS Extension teszt	Elemzendő szekvencia	Diszpenzációs rend
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATTT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

16. táblázat: A *therascreen* RAS Extension Pyro Kit által kimutatott általános mutációk a humán KRAS génben és a vonatkozó „Sequence to analyze” (Elemzendő szekvencia) értékek

Nukleinsavcsere	Aminosavcsere	Elemzendő szekvencia	Cosmic ID (V70)*
KRAS – 59. kodon (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS – 61. kodon (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
KRAS – 117. kodon (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS – 146. kodon (GCA)			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Szomatikus rákmütációk katalógusa) értékei, amely elérhető a Sanger Institute honlapján: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.


17. táblázat: A *therascreen RAS Extension Pyro Kit* által kimutatott általános mutációk a humán NRAS génben és a vonatkozó „Sequence to analyze” (Elemzendő szekvencia) értékek

Nukleinsavcsere	Aminosavcsere	Elemzendő szekvencia	Cosmic ID (V70)*
NRAS – 12. kodon (GGT)			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAA AGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAA AGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAA AGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAA AGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAA AGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAA AGC	565
NRAS – 13. kodon (GGT)			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAA AGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAA AGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAA AGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAA AGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAA AGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAA AGC	575
NRAS – 59. kodon (GCT)			
175G>A	A59T	ACAVCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	–
NRAS – 117. kodon (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATTT	–
351G>T	K117N	ABTGTGATTT	–
NRAS – 61. kodon (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587

NRAS – 146. kodon (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Szomatikus rákmutációk katalógusa) értékei, amely elérhető a Sanger Institute honlapján: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

„B” függelék: A hulladéktartály és a vályúk ürítése

 <p>VIGYÁZAT</p>	<p>Veszélyes vegyi anyagok</p> <p>A vákuum munkaállomással használt denaturáló oldat nátrium-hidroxidot tartalmaz, amely irritálja a szemet és a bőrt.</p> <p>Minden esetben viseljen védőszemüveget, kesztyűt és laboratóriumi köpenyt.</p> <p>A felelős személyeknek (pl. laborvezető) a vonatkozó biztonsági adatlapoknak vagy az OSHA,* ACGIH† és COSHH‡ dokumentumoknak megfelelően meg kell tenniük a szükséges óvintézkedéseket annak biztosítása érdekében, hogy a munkahelyi környezet biztonságos legyen, és a készülék kezelői ne legyenek veszélyes szintű toxikus (kémiai vagy biológiai) anyagnak kitéve.</p> <p>A vegyi gőzök kiszellőztetését és a hulladékok ártalmatlanítását az összes országos és helyi egészségügyi és biztonsági előírásnak és jogszabálynak megfelelően kell elvégezni.</p>
--	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Munkavédelmi és Munkaegészségügyi Hivatal, Amerikai Egyesült Államok).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Amerikai Kormányzati Iparhigiénikusok Konferenciája, Amerikai Egyesült Államok).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Egészségre ártalmas anyagok ellenőrzése, Egyesült Királyság).

A laboratóriumi hulladék ártalmatlanítását illetően tartson be minden helyi, állami és uniós előírást.

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempont

- Ez a protokoll nagy tisztaságú vizet igényel.

Eljárás

1. Győződjön meg arról, hogy a vákuumeszköz nincs-e vákuum alatt. Ellenőrizze, hogy a vákuum le van-e zárva (Off (Ki) pozíció), és a vákumpumpa ki van-e kapcsolva.
2. Ártalmatlanítson minden, a vályúkból maradt oldatot.
3. Öblítse át nagy tisztaságú vízzel a vályúkat, vagy szükség esetén cserélje ki őket.
4. Ürítse ki a hulladéktartályt.
5. A kupak a csövek leválasztása nélkül is eltávolítható.

Ha a vákuumos munkaállomást meg kell tisztítani (például por vagy kiömlött folyadék miatt), kövesse a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* instrukcióit.

Rendelési információk

Termék	Tartalomjegyzék	Katalógusszám
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	24 reakcióhoz: Szekvenáló primerek, PCR primerek, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad koncentrátum, pufferek és reagensek	971590
PyroMark Q24 MDx	Szekvencia-alapú detektáló platform 24 minta párhuzamos Pyrosequencing vizsgálatára	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vákuumos munkaállomás 24 minta párhuzamos előkészítésére, PCR termékektől az egyszálú templátokig	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Elemzőszoftver	9019063
Tartozékok		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 cellás lemez szekvenálási reakcióhoz	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Nukleotidok és reagensek adagolására szolgáló kazetta	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Többször használható szűrőszondák a PyroMark Vacuum Workstation Q96 és Q24 készülékhez	979010
PyroMark Control Oligo	A rendszer telepítésének ellenőrzésére	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	A rendszer teljesítményének megerősítéséhez	979304

Termék	Tartalomjegyzék	Katalóg- usszám
Kapcsolódó termékek		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNS-preparáláshoz: 50 QIAamp MinElute® oszlop, proteináz K, pufferek, gyűjtőcsövek (2 ml)	56404

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói útmutatójában található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói útmutatói a **www.qiagen.com** webhelyen érhetők el, vagy a QIAGEN Műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software Ltd); Applied Biosystems®, Variomag® (Thermo Fisher Scientific); Axxygen® (Corning Inc.); FrameStar® (4titude Ltd); Milli-Q® (Merck Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); SmartBlock™, ThermoMixer® (Eppendorf AG); Windows® (Microsoft Corporation).

Korlátozott licencszerződés a *therascreen* RAS Extension Pyro Kít használatához

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a panelhez tartozó komponensekkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a panelhez tartozó komponenseket a termékhez mellékelt protokollokban, a jelen kézikönyvben és a www.qiagen.com webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a panelhez tartozó komponensekbe beépítsék vagy azokkal együtt használják. A további protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsájtják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sértik harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licencen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a panel és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A panel és komponenseinek licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználásuk, felújításuk vagy újraértékesítésük tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A panel vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztül érvényesítésére és az azzal kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a panellel és/vagy komponenseivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárás ügyvédi költségeit.

A legújabb licencfeltételekről a www.qiagen.com oldalon tájékozódhat.

May-16 HB-1882-002 © 2016 QIAGEN, minden jog fenntartva.

Rendelés: www.qiagen.com/contact | Műszaki támogatás: support.qiagen.com | Webhely: www.qiagen.com