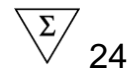


therascreen[®] KRAS Pyro[®] rinkinio vadovas



1 versija



In vitro diagnostiniam naudojimui



971460



1061825LT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R3



1061825LT



QIAGEN mėginių ir bandymų technologijos

QIAGEN yra inovacinių mėginių ir bandymų technologijų, leidžiančių izoliuoti ir aptikti bet kokio biologinio mėginio turinį, lyderis. Mūsų pažangūs, aukštos kokybės produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio paėmimo iki rezultato gavimo.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų išgryninimas
- Nukleino rūgščių ir baltymų bandymai
- microRNR ir RNRi tyrimai
- Mėginių ir bandymų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas yra padėti jums pasiekti didžiulės sėkmės ir laimėjimų. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, apsilankykite adresu www.qiagen.com.

Turinys

Numatomas naudojimas	5
Santrauka ir paaiškinimas	5
Procedūros principas	6
Tiekiamos medžiagos	8
Rinkinio turinys	8
Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos	10
Perspėjimai ir atsargumo priemonės	11
Saugumo informacija	11
Bendros atsargumo priemonės	12
Reagentų laikymas ir apdorojimas	13
Mėginių apdorojimas ir laikymas	13
Procedūra	14
DNR išskyrimas	14
1 protokolas: PyroMark Q24 sistemos procedūros nustatymas	15
2 protokolas: PGR naudojant PGR reagentus, tiekiamus su theascreen KRAS Pyro rinkiniu	17
3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas su streptavidino sefarozės aukšto atlikimo rutuliukais	20
4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš Pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24	22
5 protokolas: Procedūra su PyroMark Q24	26
6 protokolas: PyroMark Q24 procedūros analizė	28
Rezultatų interpretavimas	31
Analizės rezultatų interpretavimas ir žemo lygio mutacijų aptikimas	31
Trikčių šalinimo vadovas	35
Kokybės kontrolė	37
Apribojimai	37
Veikimo charakteristikos	38
Tuščio šulinėlio ir detekcijos aptikimo riba	38
Linijškumas	40
Tarpinis preciziškumas	40
Diagnostinis vertinimas	41

Nuorodos	42
Simboliai	43
Kontaktinė informacija	43
A priedas: <i>therascreen</i> KRAS Pyro bandymų nustatymas	44
B priedas: Atliekų indo ir latakų ištuštinimas	47
Užsakymų informacija	48

Numatomas naudojimas

therascreen KRAS Pyro rinkinys yra in vitro nukleino rūgščių sekos pagrindu aptikimo testas, paremtas Pirosekvenavimo[®] technologija, kad būtų galima kiekybiškai aptikti mutacijas žmogaus genomine DNR KRAS geno 12, 13 ir 61 kodonuose, išgautose iš žmogaus audinių mėginių.

therascreen KRAS Pyro rinkinys turi būti naudojamas kaip pagalba nustatant kolorektaliniu vėžiu sergantiems pacientams bus naudingesnė anti-EGFR terapija, pvz., panutumumabas ir cetuksimabas. Jis skirtas in vitro diagnostiniam naudojimui.

Rinkinį galima naudoti tik su PyroMark[®] Q24 sistema. Į PyroMark Q24 sistemą įeina šie dalykai:

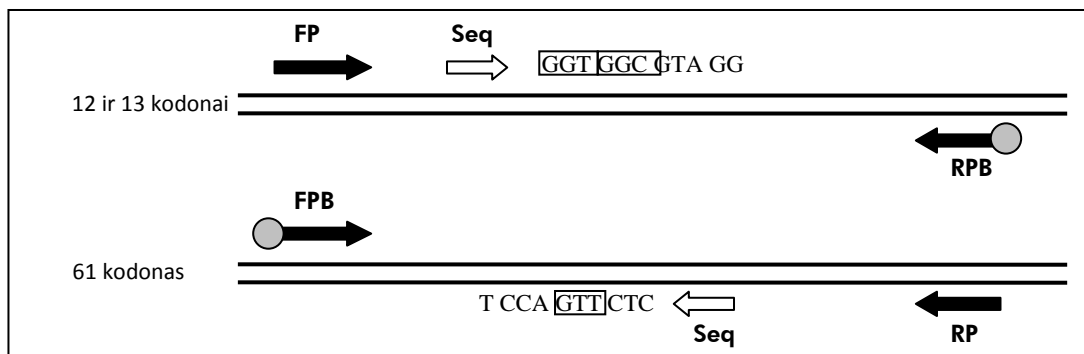
- PyroMark Q24 instrumentas ir PyroMark Q24 MDx instrumentas.
- PyroMark Q24 vakuuminė darbo vieta ir PyroMark Q24 MDx vakuuminė darbo vieta.
- PyroMark Q24 programinė įranga (2.0 versija) ir PyroMark Q24 MDx programinė įranga (2.0 versija).

Produktą turi naudoti profesionalūs vartotojai, pvz., technikai ir gydytojai, apmokyti atlikti in vitro diagnostikos procedūras, naudoti molekulinės biologijos technikas ir PyroMark Q24 sistemą.

Santrauka ir paaiškinimas

Europoje daug dėmesio skiriama KRAS mutacijos analizei, kadangi Europos Komisija suteikė sąlyginį leidimą leisti į rinką panitumumabą ir cetuksimabą, skirtus gydyti metastazuojantį gaubtinės žarnos vėžį, jeigu pacientai turi nemutavusį (neapibrėžto tipo) KRAS geną. Tai reiškia, kad panitumumabą ir cetuksimabą galima skirti tik tiems pacientams, kurie buvo tiriami dėl KRAS mutacijos.

CE-IVD pažymėtas *therascreen* KRAS Pyro rinkinys yra skirtas kiekybiniam žmogaus KRAS geno 12, 13 ir 61 kodonų mutacijų matavimams. Produktą sudaro su bandymai: vienas skirtas mutacijų aptikimui 12 ir 13 kodonuose, o kitas – 61 kodono mutacijų aptikimui (1 pav.). Dvi sritys atskirai išplėtojamoms per PGR ir atliekama jų seka nustatytoje srityje. Sekos, apimančios nustatytas padėtis, tarnauja kaip analizės kiekio nustatymo ir kokybės vertinimo normalizavimo ir nuorodos viršūnės.



1 pav. KRAS bandymo iliustracija. Rodoma seka yra išanalizuota neapibrėžto tipo mėginio seka. FP ir FPB: Priekiniai PCR pradmenys (B rodo biotininilaciją); RP ir RPB: Atvirkštiniai PCR pradmenys (B rodo biotininilaciją); Seq: Sekos atlikimo pradmenys.

Pastaba: 12 ir 13 kodonų seka atliekama judant į priekį, o 61 kodono seka – judant atgal.

Produktą sudaro PCR pradmenų mišinys ir sekos atlikimo pradmenys, skirti kiekvienam bandymui. Pradmenys tiekiami tirpale. Kiekviename buteliuke yra 24 µl kiekvieno pradmens arba pradmenų mišinio.

Procedūros principas

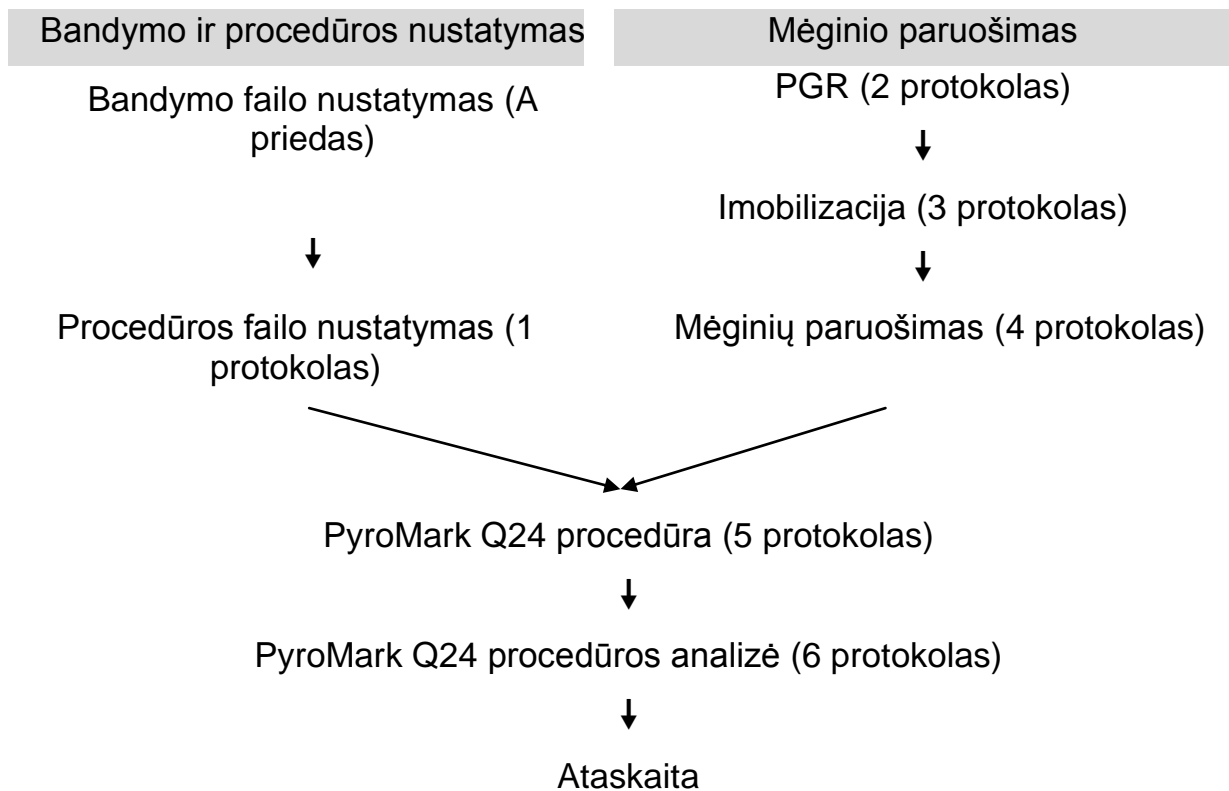
Žemiau parodyta darbo eiga vaizduoja bandymo procedūrą. Po to, kai PGR panaudoja pradmenis, nukreiptus į 12/13 ir 61 kodonus, ampliconai imobilizuojami ant Streptavidin Sepharose® aukšto atlikimo rutuliukų. Paruošiamos vienos grandinės DNR ir atitinkami sekos atlikimo pradmenys atkaitinami prie DNR. Tada mėginiai analizuojami su PyroMark Q24 sistema naudojant procedūros nustatymo failą ir procedūros failą. Analizuojant procedūrą, rekomenduojama naudoti KRAS įjungiamą ataskaitą. KRAS įjungiamą ataskaitą gausite kreipęsi elektroniniu paštu pyro.plugin@qiagen.com.

Tačiau procedūrą galima išanalizuoti ir naudojantis analizės įrankiu, įtrauktu į PyroMark Q24 sistemą. Tada galima pritaikyti „Analizavimo seką“ retų mutacijų aptikimui po procedūros (žr. „6 protokolą: PyroMark Q24 procedūros analizė“, 28 psl.).

Pastaba: Palyginus su theascreen KRAS Pyro rinkinio vadovo R1 peržiūra, darbo eiga buvo truputį modifikuota (žr. „4 protokolą: Mėginių paruošimas prieš Pyrosequencing analizę su PyroMark Q24“, 22 psl.).

Pastaba: Darbo eiga buvo truputį modifikuota, palyginti su *PyroMark KRAS rinkinio vadovu* ir theascreen *KRAS Pyro rinkinio vadovo* peržiūra R1 (žr. “2 protokolą: , 17 psl., ir “4 protokolą: Mėginių paruošimas prieš Pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24”, 22 psl.).

therascreen KRAS Pyro procedūros darbo eiga



Kontrolės

Nedenatūruota kontrolinė DNR įeina į rinkinį kaip PGR ir sekos nustatymo reakcijų teigiama kontrolė. Ši kontrolinė DNR turi neapibrėžtą genotipą tose srityse, kuriose atliekama seka su šiuo rinkiniu, ir yra reikalinga norint tinkamai interpretuoti rezultatą bei identifikuoti žemo lygio mutacijas (žr. „Rezultatų interpretavimą“, 31 psl.). Kiekvienam bandymui per kiekvieną Pirosekvenavimo procedūrą įtraukite mėginį su neddenatūruota kontroline DNR.

Be to, per kiekvieną PGR nustatymą mažiausiai vienam bandymui reikia įtraukti neigiamą kontrolę (be šabloninių DNR).


Tiekiamos medžiagos

Rinkinio turinys

therascreen KRAS Pyro rinkinys (1/2 dėžė)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro rinkinys	(24)
Katalogo nr.	971460
Reakcijų skaičius	24
Sekos nustatymo pradmuo KRAS 12/13	24 µl
Sekos nustatymo pradmuo KRAS 61	24 µl
PGR pradmuo KRAS 12/13	24 µl
PGR pradmuo KRAS 61	24 µl
PyroMark PGR pagrindinis mišinys, 2x	850 µl
CoralLoad [®] koncentratas, 10x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1.9 ml
Nedenatūruota kontrolinė DNR, 10 ng/µl	100 µl

therascreen buferiai ir reagentai (2/2 dėžė)

<i>therascreen</i> buferiai ir reagentai		
PyroMark rišamasis buferis		10 ml
PyroMark atkaitinimo buferis		10 ml
PyroMark denatūracijos tirpalas*		250 ml
PyroMark plovimo buferis, 10x		25 ml
Fermento mišinys		1 buteliukas
Substrato mišinys		1 buteliukas
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Vadovas		1

* Sudėtyje yra natrio hidroksido.

Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, vienkartinės pirštines ir apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose Safety Data Sheets (saugos duomenų lapuose) (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas. DNR izoliavimo rinkinys (žr. „DNR izoliavimą“, 14 psl.)

- Pipetės (reguliuojamos)*
- Sterilūs pipečių galiukai (su filtrais PCR nustatymui)
- Darbastalio mikrocentrifuga*
- Šiluminis ciklo atlikimo prietaisas* ir atitinkami PGR mėgintuvėliai
- Streptavidino sefrozė, aukšto atlikimo (GE Healthcare, katalogo nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (katalogo nr. 9001513 arba 9001514)*†
- PyroMark Q24 programinė įranga (katalogo nr. 9019063 arba 9019062)†
- PyroMark Q24 plokštelė (katalogo nr. 979301)†
- PyroMark Q24 kasetė (katalogo nr. 979302)†
- PyroMark Q24 vakuuminė darbo vieta (katalogo nr. 9001515 arba 9001517)*†
- Plokštelių maišytuvas* rutuliukų imobilizavimui
- Kaitinimo blokas*, galintis pasiekti 80°C
- 24 šulinėlių PGR plokštelė arba juostelės
- Juostelių gaubtukai
- Labai švarus vanduo (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm arba jo atitikmuo).
Pastaba: Rinkinyje yra pakankamai vandens PGR, DNR imobilizavimui bei fermento mišinio ir substrato mišinio ištirpinimui; papildomas labai švarus vanduo yra reikalingas norint 10x atskiesti PyroMark plovimo buferį.
- Etanolis (70%)‡

* Įsitikinkite, kad instrumentai buvo patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

† Pažymėtas CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EB. Visi kiti į sąrašą įtraukti produktai nėra pažymėti CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EB.

‡ Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų substancijų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

Rekomenduojami plokštelių maišytuvai

1 lentelėje parodyti plokštelių maišytuvai yra rekomenduojami naudojimui su thescreen KRAS Pyro rinkiniu.

1 lentelė. Plokštelių maišytuvai, kuriuos rekomenduojama naudoti su thescreen KRAS Pyro rinkiniu

Gamintojas	Produktas	Katalogo nr.
Eppendorf	Komfortiškas šiluminis maišytuvas (pagrindinis įrenginys)	5355 000.011
	Šiluminis blokas, skirtas MTP	5363 000.012
	Adapterio plokštelė, skirta 96 x 0.2 ml PCR mėgintuvėliams, įdedamiems į mikrotitrinių plokštelių blokus	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

In vitro diagnostiniam naudojimui.

Saugumo informacija

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, vienkartinės pirštines ir apsauginius akinius. Dar žr. atitinkamus Safety Data Sheets (saugos duomenų lapus) (SDS). Juos gausite patogiu ir kompaktišku PDF formatu internetinėje svetainėje www.qiagen.com/safety, kur galėsite susirasti, peržiūrėti ir atsispausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir rinkinio komponento SDS.

therascreen KRAS Pyro komponentams taikomos toliau išvardytos pavojingumo ir atsargumo frazės.

PyroMark Denaturation Solution



Atsargiai! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Gali ėsdinti metalus. Absorbuoti išsiliejusią medžiagą, siekiant išvengti materialinės žalos. Laikyti tik originalioje talpykloje. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

PyroMark Enzyme Mixture



Sudėtyje yra: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Pavojinga! Dirgina odą. Smarkiai pažeidžia akis. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: Skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš juos vėl apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

PyroMark Substrate Mixture



Sudėtyje yra: acetic acid. Atsargiai! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš juos vėl apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Bendros atsargumo priemonės

Pastaba: Vartotojas visada privalo atkreipti dėmesį į šiuos dalykus.

- Norėdami gauti optimalius rezultatus, visada griežtai laikykitės vartotojo vadove pateiktų nuorodų. Nerekomenduojama skiesti reagentų kitaip negu aprašyta šiame vadove, nes pablogės jų eksploatacinės savybės.
- Darbo eiga buvo truputį modifikuota, palyginti su *PyroMark KRAS rinkinio vadovu* ir *therascreen KRAS Pyro rinkinio vadovo* peržiūra R1 (žr. “2 protokolas: , 17 psl., ir “4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš Pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24”, 22 psl.).
- Šio produkto komponentų pakanka 24 reakcijoms atliekant 5 atskiras procedūras.

- Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais (PCR nustatymui).
- Laikykite ir ištraukite teigiamas medžiagas (mėginius, teigiamas kontroles ir amplikonus) atskirai nuo visų kitų reagentų ir sulašinkite jas į reakcijos mišinį naudodami erdvės atžvilgiu atskirtą įrangą.
- Prieš pradėdami bandymą, gerai atitirpinkite visus komponentus kambario temperatūroje (18-25°C).
- Atitirpinę išmaišykite komponentus (pakartotinai lašindami aukštyn ir žemyn arba atlikdami impulsų sukuriavimą) ir trumpai centrifuguokite.
- Nepavykę rezultatai nėra priežastis spręsti apie mutacinę būklę.

Reagentų laikymas ir apdorojimas

therascreen KRAS Pyro rinkinys yra gabenamas dviejose dėžėse. therascreen KRAS Pyro rinkinys (1/2 dėžė) yra gabenamas ant sauso ledo. Atvežti PyroMark PCR pagrindinis mišinys, CoralLoad koncentratas, nedenatūruota kontrolinė DNR ir visi pradmenys turi būti laikomi nuo –30 °C iki –15 °C.

therascreen buferiai ir reagentai (2/2 dėžė), į kuriuos įeina buferiai, fermento mišinys, substrato mišinys, dATP α S, dCTP, dGTP ir dTTP (Pyrosequencing® analizei skirti reagentai) yra gabenami vėsiose pakuotėse. Atvežti šie komponentai turi būti laikomi 2-8°C. Norint iki minimumo sumažinti aktyvumo praradimą, patartina fermento mišinį ir substrato mišinį laikyti tiekiamuose buteliukuose.

Atstatyti fermento mišinys ir substrato mišinys yra stabilūs mažiausiai 10 dienų, jeigu bus laikomi 2-8°C. Atstatytus fermento mišinį ir substrato mišinį galima užšaldyti ir laikyti buteliukuose nuo –30 °C iki –15 °C. Šaldytų reagentų negalima užšaldyti ir atitirpinti daugiau kaip 3 kartus.

Pastaba: Nukleotidų šaldyti negalima.

therascreen KRAS Pyro rinkinys yra stabilus iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, jeigu bus laikomas nurodytomis sąlygomis.

Mėginių apdorojimas ir laikymas

Visus mėginius reikia traktuoti kaip potencialiai užkrečiamas medžiagas.

Mėginių medžiaga yra žmogaus DNR, ištrauktos iš kraujo arba formalinu fiksuotų ir parafinu sustiprintų (FFPE) mėginių.

Negalima naudoti heparinu gydomų žmonių mėginių. Negalima naudoti kraujo mėginių, kurie buvo paimti į mėgintuvėlius su heparinu kaip antikoaguliantu. Heparinas įtakoja PGR.

Procedūra

DNR išskyrimas

Sistemos veikimas buvo nustatytas naudojant EZ1® DNR audinio rinkinį ir QIAamp® DNR FFPE audinių rinkinį, skirtą žmogaus DNR išskyrimui iš formalinu fiksuotų ir į parafiną įterptų auglio mėginių. QIAamp DSP DNR kraujo mini rinkinio sistemos veikimas buvo nustatytas naudojant sveikų donorų kraujo mėginius, dalinai papildytus auglio ląstelėmis.

2 lentelėje parodyti QIAGEN® rinkiniai yra rekomenduojami DNR išgryninimui iš nurodyto tipo žmogaus mėginių ir yra skirti naudojimui su theascreen KRAS Pyro rinkiniu. Išgryninkite DNR pagal instrukcijas rinkinių vadovuose.

2 lentelė. DNR išgryninimo rinkiniai, kuriuos rekomenduojama naudoti su theascreen KRAS Pyro rinkiniu

Mėginio medžiaga	Nukleino rūgšties izoliavimo rinkinys	Katalogo nr. (QIAGEN)
Į parafiną įterptas audinys	QIAamp DNR FFPE audinio rinkinys (50)	56404
	EZ1 DNR audinio rinkinys (48)*	953034
Kraujas	QIAamp DSP DNR kraujo mini rinkinys†	61104

* Laikykitės parafinu sustiprinto audinio naudojimo protokolo. EZ1 DNR audinio rinkinys turi būti naudojamas kartu su EZ1 Advanced (katalogo nr. 9001410 arba 9001411) ir EZ1 Advanced DNR parafino dalies kortele (katalogo nr. 9018298), su EZ1 Advanced XL (katalogo nr. 9001492) ir EZ1 Advanced XL DNR parafino dalies kortele (katalogo nr. 9018700) arba BioRobot® EZ1 (katalogo nr. 9000705; jo daugiau nebėra) ir EZ1 DNR parafino dalies kortele (katalogo nr. 9015862).

† Pažymėtas CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EC.

1 protokolas: PyroMark Q24 sistemos procedūros nustatymas



Svarbios nuorodos prieš pradėdant

- Prireikus galima patvirtinti LOB su neapibrėžto tipo mėginiu, kad būtų generuota pilna rezultatų plokštelė. Smulkmenas rasite CLSI potvarkyje EP17-A „Aptikimo ribų ir kiekio apskaičiavimo ribų nustatymo protokolas; patvirtintas potvarkis“.

Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Jeigu neinstaliuota KRAS įjungiamo ataskaita, sukurkite bandymo nustatymą (žr. A priedą, 44 psl.). Tai turi būti padaryta prieš pirmą kartą atliekant thescreen KRAS Pyro bandymus. Jeigu KRAS įjungiamo ataskaita buvo instaliuota, iš anksto sudarytus bandymų nustatymus rasite PyroMark Q24 programinės įrangos trumpųjų šaukinių naršyklėje, takelyje „Example Files/PyroMark Setups/KRAS“. KRAS įjungiamą ataskaitą galima gauti elektroniniu paštu pyro.plugin@qiagen.com.

Procedūra

1. Įrankių juostoje spustelkite .
Bus sukurtas naujas procedūros failas.
2. Įveskite procedūros parametrus (žr. „Procedūros parametrai“, 16 psl.).
3. Nustatykite plokštelę, priskirdami 12/13 ir 61 kodonų bandymus šulinėliams, atitinkantiems analizuojamus mėginius.
Pastaba: Bent į vieną bandymą reikia įtraukti neigiamos kontrolės mėginį (be šabloninės DNR) į kiekvieną PGR nustatymą.
Pastaba: Į kiekvieną bandymą kiekvienoje Pirosekvenavimo procedūroje įtraukite mėginį su nedenatūruota kontroline DNR (žr. „Kontrolės“, 7 psl.).
4. Kai procedūra jau nustatyta ir galima ją atlikti su PyroMark Q24 sistema, išspausdinkite reikiamų fermento mišinio, substrato mišinio ir nukleotidų kiekių sąrašą ir plokštelės nustatymą. Meniu „Tools“ pasirinkite „Pre Run Information“, o kai pasirodys ataskaita, spustelkite .
5. Uždarykite procedūros failą ir nukopijuokite jį į USB atmintinę (tiekiamą su sistema), naudodami Windows® Explorer.
Pastaba: Išspausdintą ikiprocedūrinę informaciją galima naudoti kaip mėginių nustatymo šabloną (žr. 3 protokolą: PGR produktų imobilizavimas su streptavidino sefarozės aukšto atlikimo rutuliukais, 20 psl.).
Norėdami išnagrinėti plokštelę su PyroMark Q24, žr. 5 protokolą: Procedūra su PyroMark Q24, 26 psl.

Procedūros parametrai

Run name:	Procedūros pavadinimas duodamas išsaugojus failą. Pervardinus failą, pasikeičia ir procedūros pavadinimas.
Instrument method:	Pasirinkite instrumento metodą pagal kasetę, kurią naudosite per procedūrą. Žr. su produktais tiekiamas instrukcijas.
Plate ID:	Pasirinktis: Įveskite PyroMark Q24 plokštelės ID.
Bar code:	Pasirinktis: Įveskite plokštelės brūkšninį kodą, o jeigu turite brūkšninių kodų skaitytuvą, prijungtą prie kompiuterio, patalpinkite pelės žymeklį tekstiniame laukelyje „Barcode“ (spusteldami laukelį) ir nuskenuokite brūkšninį kodą.
Kit ID:	Pasirinktis: Įveskite naudojamo thescreen KRAS Pyro rinkinio partijos numerį. Partijos numerį rasite ant produkto etiketės. Pastaba: Mes rekomenduojame įvesti ir reagento ID, ir rinkinio ID, kad neatsirastų netikėtų problemų su reagentais.
Run Pastaba:	Pasirinktis: Įveskite pastabą apie procedūros turinį ar tikslą.

Bandymo failų pridėjimas

Norėdami priskirti bandymą šulinėliui, jūs galite:

- Spustelti ant šulinėlio dešinį pelės klavišą ir kontekstiniame meniu pasirinkti „Load Assay“.
- Pasirinkti bandymą trumpųjų šaukinių naršyklėje, spustelti ir tempti bandymą į šulinėlį.

Šulinėlis yra užkoduotas pagal spalvą priklausomai nuo į jį įkeliamo bandymo.

Mėginio ID ir pastabų įvedimas

Norėdami įvesti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite elementą ir įveskite tekstą. Norėdami redaguoti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite elementą (bus pasirinktas tuometinis turinys) arba du kartus spustelkite elementą.

2 protokolą: PGR naudojant PGR reagentus, tiekiamus su *therascreen* KRAS Pyro rinkiniu

Šis protokolą yra skirtas srities su 12 ir 13 kodonu PGR amplifikavimui ir atskiram srities su 61 kodonu PGR amplifikavimu naudojant *therascreen* KRAS Pyro rinkinj.

Svarbios nuorodos prieš pradędant

- Darbo eiga buvo truputį modifikuota, palyginus su *PyroMark* KRAS rinkinio vadovu (5 punktą).
- HotStarTaq® DNR polimerazei su *PyroMark* pagrindiniu mišiniu reikalingas 15 minučių 95°C aktyvavimo veiksmas.
- Nustatykite visus reakcijos mišinius tokiame plote, kuris būtų atskirtas nuo naudojamo DNR išskyrimui, įtraukdami šablonines DNR į PGR, PGR produktų analizę ar mėginių paruošimą prieš Pirosekvenavimo analizę.
- Naudokite vienkartinius antgalius su hidrofobiniais filtrais, kad iki minimumo sumažintumėte kryžminį užteršimą.

Ką reikia padaryti prieš pradędant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su PGR pradmenimis, trumpai juos centrifuguokite, kad surinktumėte turinį mėgintuvėlių dugne.
- Pritaikykite kontrolės ir mėginio DNR koncentraciją iki 0.4-2 ng/μl, jeigu to reikia.

Procedūra

1. Atitirpinkite visus reikiamus komponentus (žr. 3 lentelę).
Prieš naudojimą gerai išmaišykite.
2. Pagal 2 lentelę paruoškite reakcijos mišinį kiekvienam PGR pradmenų rinkiniui.
Į reakcijos mišinį paprastai įeina visi komponentai, kurių reikia PGR, išskyrus mėginį.
Paruoškite didesnj negu reikia visam atliekamų PGR bandymų skaičiui reakcijos mišinio kiekį.

3 lentelė. Reakcijos mišinio paruošimas kiekvienam PGR pradmenų mišiniui

Komponentas	Kiekis/reakcija (µl)
PyroMark PCR pagrindinis mišinys, 2x	12.5
CoralLoad koncentratas, 10x	2.5
PCR pradmuo KRAS 12/13 arba PCR pradmuo KRAS 61	1.0
Vanduo (H ₂ O, tiekiamas)	4.0
Visas kiekis	20.0

3. Kruopščiai išmaišykite reakcijos mišinį ir įlašinkite 20 µl į kiekvieną PGR mėgintuvėlį.
PGR mėgintuvėlių nereikia laikyti ant ledo, nes HotStarTaq DNR polimerazė kambario temperatūroje nėra aktyvi.
4. Įlašinkite į atskirus PGR mėgintuvėlius (pagal 4 lentelę) 5 µl šabloninės DNR (2-10 ng genomines DNR) ir gerai išmaišykite.
Pastaba: Bent į vieną bandymą reikia įtraukti neigiamos kontrolės mėginį (be šabloninės DNR) į kiekvieną PGR nustatymą.
Pastaba: Į kiekvieną bandymą kiekvienoje Pirosekvenavimo procedūroje įtraukite mėginį su nedematūruota kontroline DNR (žr. „Kontrolės“, 7 psl.).

4 lentelė. PCR paruošimas

Komponentas	Kiekis/reakcija (µl)
Reakcijos mišinys	20
Mėginio DNR	5
Visas kiekis	25

- Užprogramuokite PGR aparatą pagal gamintojo instrukcijas, laikydamiesi 5 lentelėje aprašytų sąlygų.

5 lentelė. Optimizuotas ciklo atlikimo protokolas

			Komentariai
Pradinis aktyvavimo veiksmas:	15 minučių	95°C	HotStarTaq DNR polimerazė aktyvuojama per šį kaitinimo veiksmą.
3 veiksmy ciklo atlikimas:			
Denatūravimas	20 sekundžių	95°C	
Atkaitinimas	30 sekundžių	53°C	
Išplėtimas	20 sekundžių	72°C	
Ciklų skaičius	42		
Galutinis išplėtimas:	5 minutės	72°C	

- Sudėkite PGR mėgintuvėlius į PGR aparatą ir paleiskite ciklo atlikimo programą.
- Po amplifikacijos pereikite prie „3 protokolo: PGR produktų imobilizavimas su streptavidino sefarozės aukšto atlikimo rutuliukais“, 20 psl.

3 protokolą: PGR produktų imobilizavimas su streptavidino sefarozės aukšto atlikimo rutuliukais

Šis protokolą skirtas šabloninių DNR imobilizavimui prie streptavidino sefarozės aukšto atlikimo (GE Healthcare) rutuliukų prieš analizuojant su PyroMark Q24 sistema.

Ką reikia padaryti prieš pradędant

- Leiskite visiems reikiamiems reagentams ir tirpalams prieš pradędant naudoti, pasiekti kambario temperatūrą (15-25°C).

Procedūra

1. Švelniai suplakite buteliuką su streptavidino sefarozės aukšto atlikimo rutuliukais, kol išgausite homogeninį tirpalą.
2. Paruoškite pagrindinį mišinį DNR imobilizavimui, kaip aprašyta 6 lentelėje. Paruoškite 10 proc. didesnį kiekį negu reikia visų reakcijų atlikimui.

6 lentelė. Pagrindinis mišinys DNR imobilizavimui

Komponentas	Kiekis/mėginys (μl)
Streptavidino sefarozės aukšto atlikimo rutuliukai	2
PyroMark rišamasis buferis	40
Vanduo (H ₂ O, tiekiamas)	28
Visas kiekis	70

3. Įlašinkite 70 μl pagrindinio mišinio į 24 šulinėlių PGR plokštelės ar juostelių šulinėlius, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „1 protokolą: PyroMark sistemos procedūros nustatymas“, 15 psl.).
4. Įlašinkite 10 μl biotilinto PGR produkto iš 2 protokolo į kiekvieną šulinėlį su pagrindiniu mišiniu, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „1 protokolą: PyroMark sistemos procedūros nustatymas“, 15 psl.).

Pastaba: Visas kiekis šulinėlyje turi būti 80 μl po pagrindinio mišinio ir PGR produkto įlašinimo.

5. Užsandarinkite PGR plokštelę (arba juosteles) su juostelių gaubtukais.
Pastaba: Įsitikinkite, kad skystis neištekės iš vieno šulinėlio į kitą.

6. 5-10 minučių sukite PGR plokštelę kambario temperatūroje (15-25°C) 1400 apsukų/min. greičiu.

Pastaba: Per šį veiksmą paruoškite PyroMark Q24 vakuuminę darbo vietą mėginių paruošimui, kaip aprašyta PyroMark Q24 vartotojo vadove.

7. Tuoju pat pereikite prie „4 protokolo: Mėginių paruošimas prieš Pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24“, 22 psl.

Pastaba: Sefarozės rutuliukai greitai nusėda. Rutuliukai turi būti užfiksuoti iš karto po sukimo.

Jeigu nuo plokštelės (juostelių) sukimo praėjo daugiau kaip 1 minutė, prieš užfiksuodami rutuliukus, dar 1 minutę juos pasukite.

4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš Pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24

Šis protokolas yra skirtas vienos grandinės DNR paruošimui ir sekos nustatymo pradmenis atkaitinimui iki šablono prieš atliekant Pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24.

Svarbios nuorodos prieš pradėdant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su sekos nustatymo pradmenimis, trumpai juos centrifuguokite, kad surinktumėte turinį mėgintuvėlių dugne.
- Sulašinkite 5 skirtingus sekos nustatymo pradmenis pagal tą patį pavyzdį, kaip nurodyta plokštelės procedūros nustatyme (žr. „1 protokolą: PyroMark sistemos procedūros nustatymas“, 15 psl.), priklausomai nuo analizės srities (12 ir 13 arba 61 kodonai)
- Palyginus su theascreen KRAS Pyro rinkinio vadovo R1 peržiūra, darbo eiga buvo truputį modifikuota (18 punktas). Netrumpinkite mėginių aušinimo laiko, kai įkaitinsite iki 80°C.
- Reguliariai atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta PyroMark Q24 vartotojo vadove ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta.

Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Patalpinkite vieną PyroMark Q24 plokštelės laikiklį ant iš anksto įkaitinto 80°C kaitinimo bloko, kad panaudotumėte per 17 punktą. Palikite antrą PyroMark Q24 plokštelės laikiklį kambario temperatūroje (15-25°C), kad panaudotumėte per 18 punktą.
- PyroMark plovimo buferis yra tiekiamas kaip 10x koncentratas. Prieš panaudodami jį pirmą kartą, atskieskite iki 1x darbinio tirpalo, įlašindami 225 ml labai švaraus vandens į 25 ml 10x PyroMark plovimo buferio (galutinis kiekis 250 ml).

Pastaba: 1x PyroMark plovimo buferio darbinis tirpalas yra stabilus 2-8°C iki pažymėtos galiojimo datos pabaigos.

Procedūra

1. Atskieskite pakankamą kiekį kiekvieno sekos nustatymo pradmenis, sekos pradmenis KRAS 12/13 ir sekos pradmenis KRAS 61 PyroMark atkaitinimo buferyje, kaip parodyta 7 lentelėje.

Paruoškite didesnę skiesto sekos nustatymo pradmenis kiekį negu reikia visam mėginių skaičiui, su kuriais bus atliekamas sekos nustatymas (mėginių skaičiui + vieną papildomą).

7 lentelė. Sekos nustatymo pradmenų pavyzdinis skiedimas

Komponentas	Kiekis/mėginys (μ l)	Kiekis 9 + 1 reakcijoms (μ l)
Sekos pradmuo KRAS 12/13 arba sekos pradmuo KRAS 61	0.8	8
PyroMark atkaitinimo buferis	24.2	242
Visas kiekis	25	250

- Įlašinkite 25 μ l skiesto sekos nustatymo pradmens į kiekvieną PyroMark Q24 plokštelės šulinėlį pagal procedūros nustatymą (žr. „1 protokolą: PyroMark sistemos procedūros nustatymas“, 15 psl.).

Pastaba: Laikykite vieną iš PyroMark Q24 plokštelės laikiklių (tiekiamų su PyroMark Q24 vakuumine darbo vieta) kambario temperatūroje (15-25°C) ir naudokite kaip pagalbą, kai ruošite ir perkelsite plokštelę.

- Patalpinkite PCR plokštelę (arba juosteles) iš 3 protokolo ir PyroMark Q24 plokštelę ant darbastalio (2 pav.).

Pastaba: Įsitikinkite, kad plokštelė pakreipta ta pačia kryptimi, kaip ir sudedant mėginius.



2 pav. PGR plokštelės (arba juostelių) ir PyroMark Q24 plokštelės patalpinimas vakuuminėje darbo vietoje.

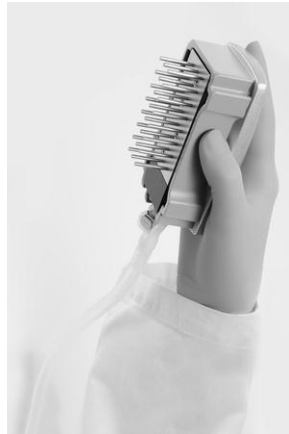
- Įleiskite vakuumą į įrankį, įjungdami vakuumą.
- Atsargiai nuleiskite vakuuminio įrankio filtravimo zondus į PGR plokštelę (arba juosteles), kad užfiksuotumėte rutuliukus su imobilizuotu šablonu.

Laikykite zondus vietoje 15 sekundžių. Keldami vakuuminį įrankį, būkite labai atsargūs.

Pastaba: Sefarozės rutuliukai greitai nusėda. Rutuliukai turi būti užfiksuoti iš karto po sukimo.

Jeigu nuo plokštelės (juostelių) sukimo praėjo daugiau kaip 1 minutė, prieš užfiksuodami rutuliukus, dar 1 minutę juos pasukite.

6. Perkelkite vakuuminį įrankį į lataką su 40 ml 70 proc. etanolio (2 pav.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.
7. Perkelkite vakuuminį įrankį į lataką su 40 ml denatūravimo tirpalo (2 pav.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.
8. Perkelkite vakuuminį įrankį į lataką su 50 ml plovimo buferio (2 pav.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.
9. 5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyn ir atgal, daugiau kaip 90° vertikaliai, kad ištuštintumėte skystį iš filtravimo zondų (3 pav.).



3 pav. Daugiau kaip 90° vertikaliai pakelto vakuuminio įrankio vaizdas

10. Kol vakuuminis įrankis laikomas virš PyroMark Q24 plokštelės, uždarykite vakuuminį jungtuką virš įrankio (į padėtį Off).
11. Išleiskite rutuliukus PyroMark Q24 plokštelėje, nuleisdami filtravimo zondus į skiestą sekos nustatymo pradmenį ir švelniai kilnodami įrankį iš vienos pusės į kitą.
Pastaba: Elkitės atsargiai, kad nepažeistumėte PyroMark Q24 plokštelės paviršiaus, subraižydami su filtravimo zondais.
12. Perkelkite vakuuminį įrankį į lataką su labai švariu vandeniu (2 pav.) ir sukite 10 sekundžių.
13. Išplaukite filtravimo zondus, nuleisdami juos į labai švarų vandenį (2 pav.) ir naudodami vakuumą. Praplaukite zondus su 70 ml labai švaraus vandens.
14. 5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyn ir atgal, daugiau kaip 90° vertikaliai, kad ištuštintumėte skystį iš filtravimo zondų (3 pav.).
15. Uždarykite vakuuminį jungtuką ant įrankio (į padėtį Off) ir patalpinkite vakuuminį įrankį stovėjimo padėtyje (P).
16. Išjunkite vakuuminę pompą.

Pastaba: Darbo dienos pabaigoje reikia išpilti skysčio atliekas ir likusius tirpalus bei patikrinti PyroMark Q24 vakuuminę darbo vietą, ar joje nėra dulkių ir skysčio likučių (žr. B priedą, 47 psl.).

17. 2 minutes kaitinkite PyroMark Q24 plokštelę su mėginiais 80°C, naudodami iš anksto įšildytą PyroMark Q24 plokštelės laikiklį.
18. Nuimkite PyroMark Q24 plokštelę nuo karšto plokštelės laikiklio ir patalpinkite ant antro PyroMark Q24 plokštelės laikiklio, kuris buvo laikomas kambario temperatūroje (15-25°C), kad mėginiai 10-15 minučių būtų aušinami kambario temperatūroje.
19. Pereikite prie „5 protokolo: Procedūra su PyroMark Q24“, 26 psl.

5 protokolas: Procedūra su PyroMark Q24

Šiame protokole aprašytas PyroMark Gold Q24 reagentų paruošimas ir sudėjimas į PyroMark Q24 kasetę bei procedūros su PyroMark Q24 pradžia ir pabaiga. Detalesnį aprašymą, kaip nustatyti procedūrą, rasite PyroMark Q24 vartotojo vadove.

Svarbios nuorodos prieš pradėdant

- Iki procedūrinės informacijos ataskaitoje, kurią rasite meniu „Tools“ per procedūros nustatymą (žr. „1 protokolą: PyroMark sistemos procedūros nustatymas“, 15 psl.), pateikta informacija apie tam tikrai procedūrai reikalingų nukleotidų, fermento ir substrato buferio kieki.

Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Įjunkite PyroMark Q24. Elektros jungtukas yra instrumento užpakalyje.

Procedūra

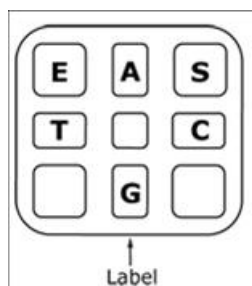
1. Ištirpinkite šaldyto-džiovinoto fermento ir substrato mišinius, kiekvienam naudodami po 620 µl vandens (teikiama H₂O).
2. Sukiodami švelniai išmaišykite buteliuką.

Pastaba: Nesūkuriuokite!

Pastaba: Norėdami įsitikinti, kad mišinys pilnai ištirpo, 5-10 minučių palaikykite jį kambario temperatūroje (15-25°C). Prieš pripildydami PyroMark Q24 kasetę, įsitinkite, kad tirpalas nėra drumstas. Jeigu reagentų tuoj pat nepanaudosite, patalpinkite reagentų buteliukus ant ledo* arba šaldytuve.

3. Leiskite reagentams ir PyroMark Q24 kasetei pasiekti aplinkos temperatūrą (20-25°C).
4. Patalpinkite PyroMark Q24 kasetę, atsukę etiketę į save.
5. Sudėkite į PyroMark Q24 kasetę atitinkamus nukleotidų, fermento ir substrato mišinius, kaip parodyta 4 pav.
Įsitinkite, kad iš pipetės neperkelsite į kasetę oro burbuliukų.

* Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, vienkartinės pirštines ir apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose Safety Data Sheets (saugos duomenų lapuose) (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.



4 pav. PyroMark Q24 kasetės vaizdas iš viršaus. Anotacijos atitinka etiketę ant reagentų buteliukų. Įlašinkite fermento mišinį (E), substrato mišinį (S) ir nukleotidus (A, T, C, G) pagal kiekio informaciją, pateiktą ikiprocedūrinės informacijos ataskaitoje, kurią rasite meniu „Tools“ per procedūros nustatymą.

6. Atidarykite kasetės vožtuvą ir įdėkite pripildytą reagento kasetę, atsukę etiketę į išorę. Pilnai įstumkite kasetę ir stumkite žemyn.
7. Įsitikinkite, kad matosi linija kasetės priekyje, ir uždarykite vožtuvą.
8. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir patalpinkite plokštelę ant kaitinimo bloko.
9. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.
10. Įdėkite USB atmintinę (su procedūros failu) į USB jungtį instrumento priekyje.
Pastaba: Neišimkite USB atmintinės, kol nesibaigs procedūra.
11. Pagrindiniame meniu pasirinkite „Run“ (naudodamiesi ▲ ir ▼ ekrano mygtukais) ir spauskite „OK“.
12. Pasirinkite procedūros failą, naudodamiesi ▲ ir ▼ ekrano mygtukais.
Pastaba: Norėdami pamatyti aplanko turinį, pasirinkite aplanką ir spauskite „Select“. Norėdami grįžti į ankstesnį vaizdą, spauskite „Back“.
13. Pasirinkę procedūros failą, spauskite „Start“, kad pradėtumėte procedūrą.
14. Kai baigsite procedūrą ir instrumentas patvirtins, kad procedūros failas išsaugotas USB atmintinėje, spauskite „Close“.
15. Išimkite USB atmintinę.
16. Atidarykite instrumento dangtį.
17. Atidarykite kasetės vožtuvą ir išimkite reagento kasetę, keldami ją aukštyn ir traukdami lauk.
18. Uždarykite vožtuvą.
19. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir nuimkite plokštelę nuo kaitinimo bloko.
20. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.
21. Išmeskite plokštelę ir išvalykite kasetę, kaip aprašyta su kasete tiekiamo produkto lapo instrukcijose.
22. Išanalizuokite procedūrą pagal „6 protokolą: PyroMark Q24 procedūros analizė“, 28 psl.

6 protokolas: PyroMark Q24 procedūros analizė

Šiame protokole aprašyta baigtinės KRAS procedūros mutacijos analizė naudojant PyroMark Q24 programinę įrangą.

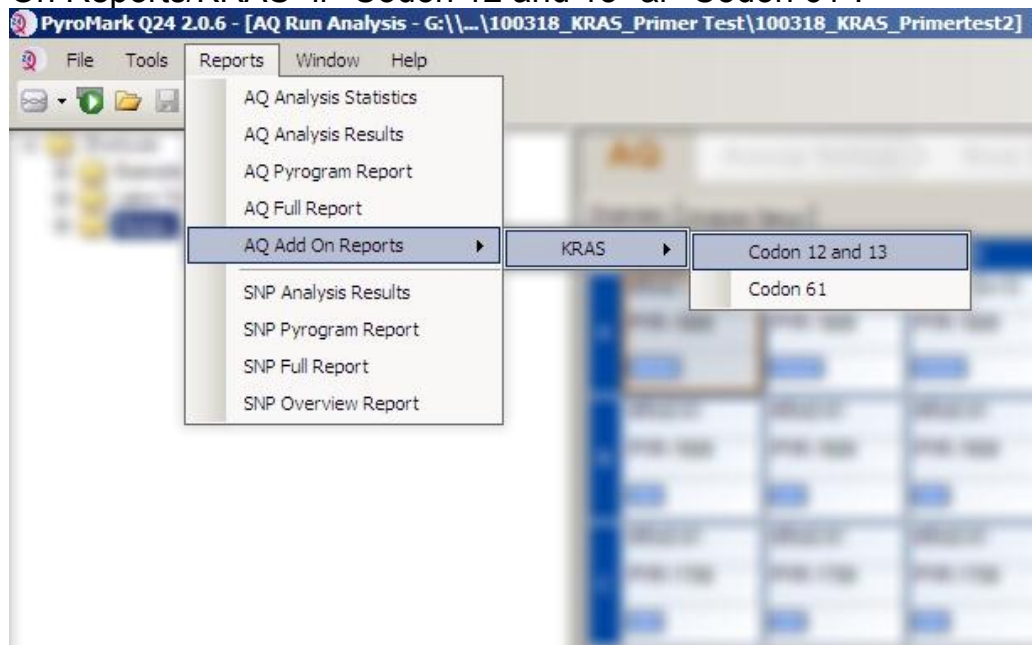
Procedūra

1. Įdėkite USB atmintinę su apdorotos procedūros failu į kompiuterio USB jungtį.
2. Perkelkite procedūros failą iš USB atmintinės į norimą vietą kompiuteryje, naudodami Windows Explorer.
3. Atidarykite procedūros failą PyroMark Q24 programinės įrangos AQ režimu, meniu „File“ pasirinkdami „Open“ arba du kartus spusteldami failą (☑) trumpųjų šaukinių naršyklėje.
4. Procedūrą galima išanalizuoti dviem būdais. Jeigu naudojate KRAS įjungiamą ataskaitą, pereikite prie 5 punkto. Jeigu naudojate AQ analizės integralą į PyroMark Q24, pereikite prie 6 punkto.

Pastaba: Mes primygtinai rekomenduojame rezultatų interpretavimui naudoti KRAS įjungiamą ataskaitą. KRAS įjungiamą ataskaitą gausite elektroniniu paštu pyro.plugin@qiagen.com. Ši ataskaita užtikrins, kad atitinkamos LOD vertės ir įvairios „analizuojamos sekos“ bus naudojamos norint automatiškai aptikti visas mutacijas.

5. KRAS įjungiamos ataskaitos naudojimas:

Norėdami generuoti ataskaitą, meniu dalyje „Reports“ pasirinkite “AQ Add On Reports/KRAS” ir “Codon 12 and 13” ar “Codon 61”.





5 pav. Ekranas AQ Run Analysis.

Bus automatiškai išanalizuoti visi šulinėliai, susiję su mutacijomis, kurioms priskirta LOD, kaip parodyta 8 lentelėje. Rezultatai bus pateikti peržiūros lentelėje (6 pav.), o po to seks detalūs rezultatai, į kuriuos įeina pirogramos ir analizės kokybė.

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.

6 pav. Rezultatų santraukos lentelė

6. AQ analizės naudojimas:

Norėdami išanalizuoti KRAS procedūrą ir gauti rezultatų apžvalgą, spustelkite vieną iš mygtukų Analize.



Analizuoti visus šulinėlius.



Analizuoti pasirinktą šulinėlį.

Analizės rezultatai (alelių dažniai) ir kokybės vertinimas parodomi virš kintamojo padėties pirogramos įrašė. Daugiau detalių, kaip analizuoti procedūrą, rasite PyroMark Q24 vartotojo vadove.

Norėdami generuoti ataskaitą, meniu „Reports“ pasirinkite „AQ Full Report“ arba „AQ Analysis Results“.

Pastaba: Dažniausios KRAS mutacijos randamos ties 35 nukleotidu (antra 12 kodono baze). Todėl standartinė analizuojama seka „Sequence to Analyze“, nurodyta analizės nustatyme, yra skirta šios padėties mutacijoms (žr. A priedą, 44 psl.). Jeigu į mėginį įeina 34 nukleotido mutacija (pirma 12 kodono bazė), galima pakeisti analizuojamą seką, kad būtų išanalizuota ir mutacijos būseną šioje padėtyje, kaip aprašyta A priede. Panašiai galima pakeisti KRAS 61 kodono bandymo analizuojamą seką, kaip aprašyta A priede.

Atnaujintus mutacijos dažnius žmogaus KRAS gene, 12/13 ir 16 kodone, internetu pateikia Sanger institutas www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Pastaba: Jeigu norite gauti patikimus rezultatus, mes rekomenduojame, kad vienos viršūnės aukštis viršytų 30 RLU. Nustatykite 30 RLU bandymo nustatyme kaip „reikiamą tinkamos kokybės viršūnės aukštį“ (žr. PyroMark Q24 vartotojo vadovą ir A priedą).

Pastaba: Ataskaita „AQ Analysis Results“ turi būti naudojama alelių kiekio nustatymo dokumentavimui ir interpretavimui. Pirogramoje pateikiami skaičiai suapvalinami ir nerodo tikslaus kiekio nustatymo.

Pastaba: Pirogramą visada reikia palyginti su histograma, ir jūs galite ją pamatyti spustelėję dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Išmatuotos viršūnės turi derėti prie histogramos juostų aukščio.

Pakartotinė mėginių, kuriuose neaptikta mutacija 35 nukleotide (12 kodone) arba 183 nukleotide (61 kodone) standartinė „Sequence to Analyze“ arba pateiktas kokybės vertinimas „Check“ ar „Failed“, analizė.

Mes primygtinai rekomenduojame peranalizuoti visus mėginius, kuriuose neaptikote mutacijos su standartine „Sequence to Analyze“, bei tokius mėginius, kuriems pateiktas kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“. Kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ gali rodyti mutaciją kitoje padėtyje, o ne 35 ar 183 nukleotide, todėl nuorodinėse vietose gali atsirasti nukrypimai nuo viršūnių aukščio.

Norėdami peranalizuoti ir skirti dėmesį 34 nukleotido mutacijoms, eikite į „Analysis Setup“ ir pakeiskite „Sequence to Analyze“ iš *GNTGRCGTAGGC* į *NGTGRCGTAGGC*. Kai pasirodys langas „Apply Analysis Setup“, spustelkite „Apply“, o po to „To All“

Norėdami peranalizuoti ir skirti dėmesį 183 nukleotido mutacijoms (antrai 61 kodono padėčiai), pakeiskite 61 kodono bandymo „Sequence to Analyze“ į šią seką: *CTCTHGACCTG*

Norėdami peranalizuoti ir skirti dėmesį 181 nukleotido mutacijoms (pirmai 61 kodono padėčiai), pakeiskite 61 kodono bandymo „Sequence to Analyze“ į šią seką: *CTCTTSACCTG*

Pastaba: Pakeitę „Sequence to Analyze“, įsitikinkite, kad pavienės viršūnės riba nustatyta ant 30 RLU.

Pastaba: Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir to negalima paaiškinti retomis ar netikėtomis mutacijomis, rezultatas netinka mutacijos būsenos apsprendimui. Rekomenduojama iš naujo išanalizuoti mėginį.

Rezultatų interpretavimas

Analizės rezultatų interpretavimas ir žemo lygio mutacijų aptikimas

Primygtinai rekomenduojama palyginimui ir kaip foninių lygių kontrolę įtraukti į kiekvieną procedūrą nedematūruotą kontrolinę DNR. Išmatuotas kontrolinio mėginio dažnis turi būti žemesnis ar lygus tuščio šulinėlio ribai (LOB).

Visus mėginius reikia iširti ryšium su aptikimo riba (LOD, žr. 8 lentelę) ir interpretuoti tokiu būdu.

- Mutacijos dažnis $< \text{LOD}$: neapibrėžtas tipas
- Mutacijos dažnis $\geq \text{LOD}$ ir $\leq \text{LOD} + 3 \text{ proc. vnt.}$: potenciali žemo lygio mutacija

Pastaba: Jeigu naudojate įjungiamą ataskaitą (žr. „6 protokolo: PyroMark Q24 procedūros analizė“, 28 psl., 5 punktą) ir taip nutinka, bus išleistas perspėjimas.

Mėginiai, kuriuose pranešama potenciali žemo lygio mutacija, turi būti laikomi teigiamais mutacijos atžvilgiu tik tokiu atveju, jeigu ji patvirtinama peranalizuojant juos dviem egzemplioriais kartu su mėginiu su nedematūruota kontroline DNR. Abiejų dublikatų rezultatas turi būti $\geq \text{LOD}$ ir skirtis nuo kontrolinio mėginio. Priešingu atveju mėginys bus laikomas neapibrėžto tipo mėginiu.

- Mutacijos dažnis $> \text{LOD} + 3 \text{ proc. vnt.}$: mutacija

Jeigu naudojate KRAS įjungiamą ataskaitą, tai atliekama automatiškai.

Pastaba: Rezultatų interpretavimui rekomenduojama naudoti KRAS įjungiamą ataskaitą. Norint geriau iširti mėginius, kuriuose pranešama potenciali žemo lygio mutacija, mes rekomenduojame papildomai išanalizuoti mėginį rankiniu būdu su taikomąja programine įranga (pvz., norint palyginti kontrolinio mėginio mutacinį dažnį).

Pastaba: Išmatuotas didesnis nei LOB kontrolinio mėginio dažnis rodo, kad tos procedūros fono lygis yra aukštesnis nei įprastinis, kas gali paveikti alelių kiekio nustatymą, ypač žemos mutacijos lygiams. Tokiu atveju intervale nuo LOB iki $\text{LOD} + 3 \text{ proc. vnt.}$ išmatuoti dažniai (8 lentelė) negali būti naudojami mutacijos būsenos apsprendimui. Rekomenduojama peranalizuoti mėginius su potencialia žemo lygio mutacija.

Pastaba: KRAS įjungiamos ataskaitos algoritmas buvo naudojamas LOB ir LOD duomenų generavimui. Rankinė analizė, atliekama naudojant PyroMark taikomąją programinę įrangą, kaip aprašyta 6 protokole (28 psl.), gali parodyti truputį kitokias vertes.

Pastaba: Norint nuspręsti, kaip gydyti vėžiu sergančius pacientus, negalima remtis tik KRAS mutacijos būseną.

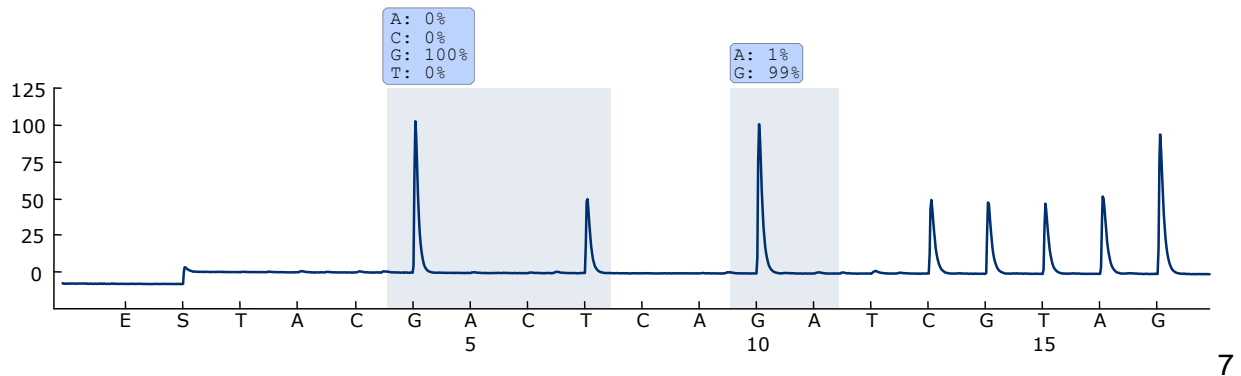
8 lentelė. Tam tikroms mutacijoms nustatyti LOB ir LOD

Nukleino rūgšties pakaitalas	Aminorūgšties pakaitalas	LOB proc. vnt.)	LOD (proc. vnt.)	COSMIC ID* (V42)
12 kodonas (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
13 kodonas (GGC)				
GAC	G13D	0.3	1.9	532
61 kodonas (CAA), ištirtas atvirkštine kryptimi (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

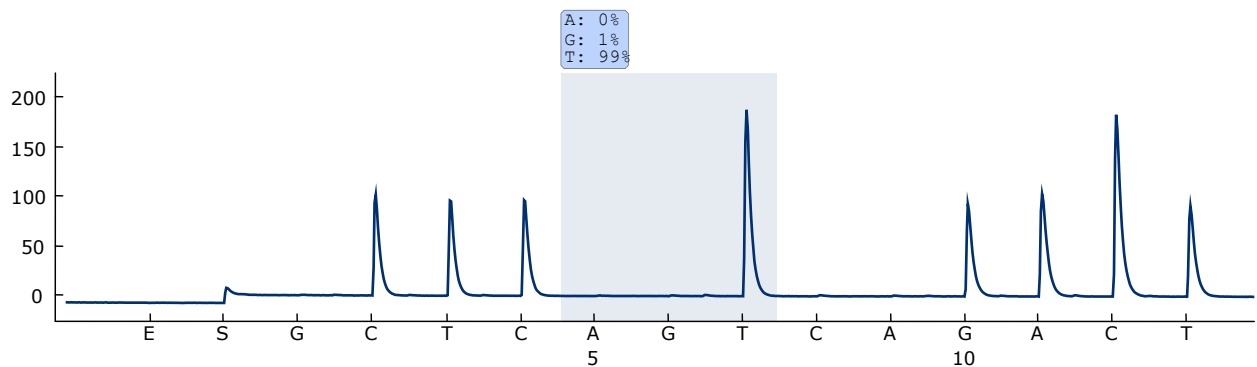
* Somatinių vėžio mutacijų katalogas, kurį rasite Sanger instituto tinklalapyje www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Žemiausias mutacijos lygis mėginyje, gautas kaip išmatuotas dažnis \geq LOD.

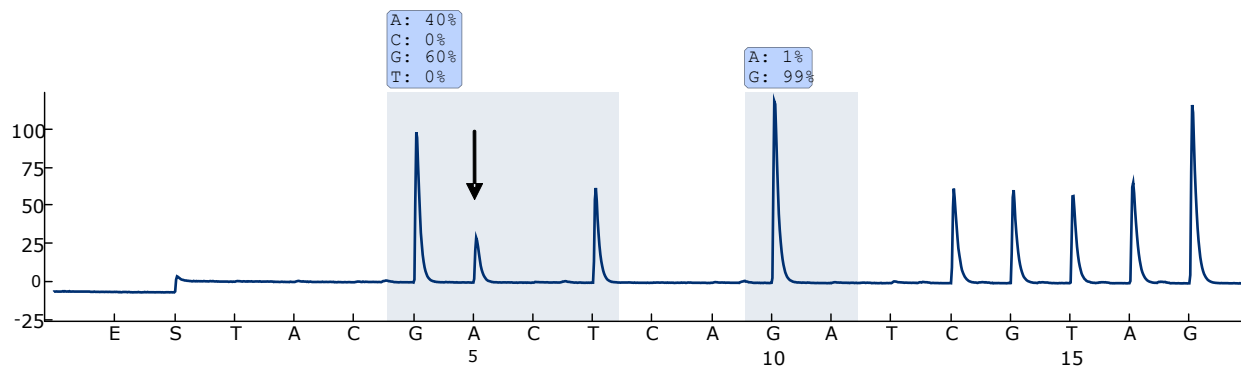
Pavyzdiniai rezultatai, gauti naudojant AQ analizę, įtrauktą į PyroMark Q24
Pavyzdiniai pirogramos rezultatai parodyti 7–11 pav.



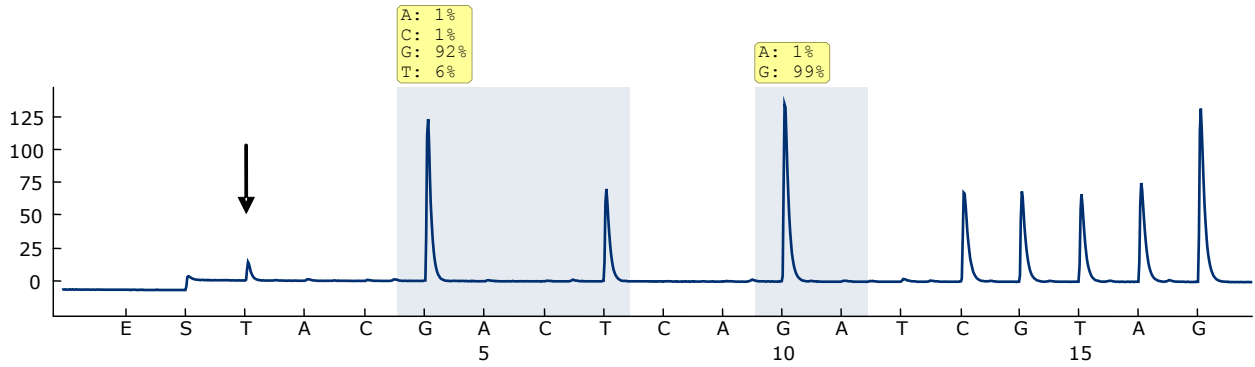
7 pav. Pirogramos įrašas, gautas po mėginio analizės su neapibrėžto tipo 12 ir 13 kodonų genotipu.



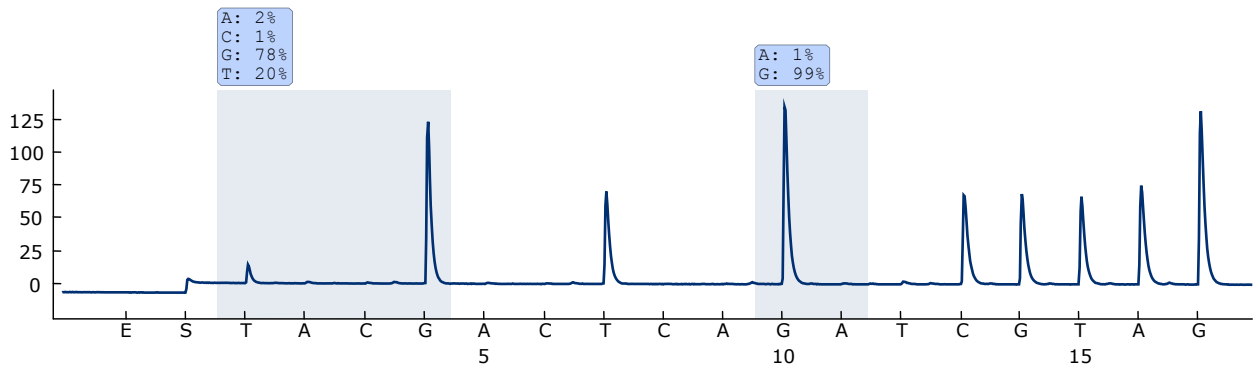
8 pav. Pirogramos įrašas, gautas po mėginio analizės su neapibrėžto tipo 61 kodono genotipu.



9 pav. Pirogramos įrašas, gautas po mėginių analizės su GGT → GAT mutacija 12 kodono 2 bazėje (35 nukleotidą rodo rodyklė).



10 pav. Pirogramos įrašas, gautas po mėginių analizės su GGT → GAT mutacija 12 kodono 1 bazėje (34 nukleotidą rodo rodyklė) su “Sequence to Analyze” GNTGRCGTAGGC, nukreipta į 12 kodono 2 bazę (35 nukleotidą). Geltona spalva rodo, kad šis nukleotidas netikėtas ir turi būti patikrintas.



11 pav. Pirogramos įrašas ir rezultatas, gautas po pakartotinės 10 pav. mėginio analizės. Mutacija GGT → TGT buvo peranalizuota su “Sequence to Analyze” NGTGRCGTAGGC, nukreipta į 12 kodono 1 bazę (34 nukleotidą).

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikdžių šalinimo vadovas gali būti naudingas sprendžiant bet kokias išskylančias problemas. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro puslapyje „Dažnai užduodami klausimai“:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. The scientists in QIAGEN techninės pagalbos mokslininkams visada malonu atsakyti į bet kokius jūsų užduodamus klausimus apie šio vadovo informaciją ir protokolus arba mėginių ir bandymų technologijas (kontaktinę informaciją rasite užpakaliniame viršelyje arba apsilankę www.qiagen.com).

Pastaba: Bendrą instrumento trikdžių šalinimą rasite PyroMark Q24 vartotojo vadove.

Komentariai ir pasiūlymai

Signalai nešabloninėje kontrolėje (neigiamoje kontrolėje)

- a) Trikdžiai šulinėliuose Signalas iš vieno šulinėlio aptinkamas gretimame šulinėlyje. Stenkitės nedėti aukštą intensyvumą skleidžiančių mėginių šalia nešabloninių kontrolinių šulinėlių.
- b) PGR užteršimas Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais. Laikykite ir ištraukite tokias medžiagas kaip mėginiai kontrolės ir amplikonai atskirai nuo PCR reagentų.

Bloga arba netikėta seka

- a) Žemos kokybės genominės DNR Žemos kokybės genominės DNR gali sugadinti PGR. Analizuokite PGR mėginius, taikydami elektroforezės techniką (pvz., QIAxcel[®] System arba agarozės gelio elektroforezę)

Rezultatas “Check” arba “failed”

- a) Žemas viršūnės aukštis Esant apdorojimo klaidoms per PGR nustatymą ar mėginių paruošimą prieš Pyrosequencing, gali susiformuoti žemos viršūnės. Reguliariai atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta *PyroMark Q24 vartotojo vadove*, ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta.

Jeigu atsiranda perspėjimas “Check”, atidžiai palyginkite pirogramą su histograma, kuri pasirodys spustelėjus dešinį pelės klavišą pirogramos lange. Jeigu išmatuotos viršūnės dera prie histogramos juostų aukščio, rezultatas yra galiojantis. Priešingu atveju rekomenduojama peranalizuoti mėginį.

Komentarai ir pasiūlymai

- b) "Sequence to Analyse" nenustatyta mutacija Bandymo nustatyme pritaikykite analizuojamą seką (žr. A priedą, 44 psl.) ir peranalizuokite procedūrą.
- c) Netikėtai reta mutacija Kokybės vertinimas "Check" arba "Failed" gali atsirasti dėl netikėto viršūnių pavyzdžio. Tai gali rodyti netikėtą mutaciją, kurios neišanalizuoja įjungtą ataskaita. Šiuos mėginius galima analizuoti rankiniu būdu, naudojant PyroMark Q24 programinę įrangą ir atsižvelgiant į netikėtas mutacijas.
- d) Aukšto viršūnės aukščio nukrypimo histograma, kuri perspėja apie paskirstymą Pirogramą reikia atidžiai palyginti su histograma, kuri pasirodys spustelėjus dešinę pelės klavišą pirogramos lange. Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir negali būti paaiškinamos retomis mutacijomis, rekomenduojama peranalizuoti mėginį.

Aukštas fonas

- a) Neteisingas nukleotidų laikymas Laikykite nukleotidus 2–8°C. Jeigu laikysite nuo –15 iki –30°C, gali padidėti fonas.
- b) Trumpas mėginių aušinimo laikas prieš Pyrosequencing analizę 10-15 minučių laikykite mėginius ant PyroMark Q24 plokštelės laikiklio kambario temperatūroje. Netrumpinkite aušinimo laiko.
- c) Kasetės užteršimas Atidžiai išvalykite kasetę, kaip aprašyta produkto lape. Laikykite kasetę saugomą nuo šviesos ir dulkių.

Nėra signalų teigiamoje kontrolėje (nedenatūruotoje kontrolinėje DNR)

- a) Fermento ar substrato mišinio nepakanka visiems šulinėliams Įsitikinkite, kad pripildėte PyroMark Q24 kasetę, kaip nurodyta meniu "Tools" "Pre Run Information".
- b) Reagentai neteisingai laikomi ar skiedžiami Paruoškite PyroMark Q24 Gold reagentus pagal su reagentais tiekiamas instrukcijas.
- c) Nepakankamas HotStarTaq DNA polimerazės aktyvavimas HotStarTaq DNA polimerazei PyroMark PGR pagrindiniame mišinyje reikalingas 15 minučių trunkantis aktyvavimo veiksmas prie 95°C.

Komentari ir pasiūlymai

- d) PCR ar mėginio paruošimo klaida
- Apdorojimo klaidos per PGR nustatymą, PGR ciklo atlikimo prietaiso programavimą ar mėginių paruošimą prieš Pirosekvenavimą gali nepasireikšti jokiais signalais. Atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta *PyroMark Q24 vartotojo vadove*, ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta. Pakartokite PGR ir Pirosekvenavimo analizę.

Kokybės kontrolė

Pagal QIAGEN ISO sertifikuotą kokybės valdymo sistemą kiekviena theascreen KRAS Pyro rinkinio partija yra testuojama pagal iš anksto nustatytas specifikacijas, kad būtų užtikrinta pastovi produkto kokybė.

Apribojimai

Bet kokie generuojami rezultatai turi būti interpretuojami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

Vartotojas atsakingas už tai, kad patvirtintų sistemos veikimą su bet kokiomis laboratorijoje naudojamomis procedūromis, kurios neįeina į QIAGEN veikimo studijas.

Veikimo charakteristikos

Tuščio šulinėlio ir detekcijos aptikimo riba

Tuščio šulinėlio riba (LOB) ir aptikimo riba (LOD) buvo nustatytos daugeliui mutacijų naudojant plazmidų mišinius (9 lentelė). LOB ir LOD buvo nustatytos pagal Klinikinių ir laboratorinių standartų instituto (CLSI) EP17-A potvarkio „Aptikimo ribų ir kiekio apskaičiavimo ribų nustatymo protokolas; patvirtintas potvarkis“ rekomendacijas. α ir β klaidos (atitinkamai klaidingi teigiami ir klaidingi neigiami rezultatai) buvo nustatytos iki 5 proc.

LOB vertės reiškia išmatuotą dažnį, gautą su neapibrėžto tipo mėginiu. LOD vertės reiškia žemiausią signalą (išmatuotą dažnį), kurį galima traktuoti kaip teigiamą tam tikros mutacijos atžvilgiu.

GGT → GTT mutacija 12 kodone

Esant šiai mutacijai, tuščio šulinėlio matavimai buvo nuosekliai artimi 0 proc. vienetų (n=72), todėl pasiektas negausinis pasiskirstymas. Todėl LOD buvo nustatyta naudojant kitokį metodą ir remiantis CLSI EP17-A potvarkio rekomendacijomis. Žemiausias signalas, rodantis mutacijos buvimą (LOD) šiose padėtyse, buvo nustatytas 1 proc. vnt., esantis aiškiai virš atitinkamo 0 proc. vnt. išeities taško lygio (LOB). Analizuojant mėginį, kurį mutacijos lygis 7 proc., 95 proc. rezultatų (n – 89) parodė signalą, kurį galima laikyti teigiamu (\geq LOD, t.y., \geq 1 proc. vnt.).

9 lentelė. Tam tikroms mutacijoms nustatyti LOB ir LOD

Nukleino rūgšties pakaitalas	Amionrūgšties pakaitalas	LOB (proc. vnt.)	LOD (proc. vnt.)	COSMIC ID* (V42)
12 kodonas (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
13 kodonas (GGC)				
GAC	G13D	0.3	1.9	532
61 kodonas (CAA), iširtas priešinga kryptimi (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

* Somatinių vėžio mutacijų katalogas, kurį rasite Sanger instituto tinklalapyje www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Žemiausias mutacijos lygis mėginyje, gautas kaip išmatuotas dažnis \geq LOD.

Pastaba: Šios vertės buvo nustatytos remiantis procedūromis, kai plazmidų mišiniai su neapibrėžto tipo ar atitinkama mutacine seka buvo naudojami kaip PCR išplėtojimo šablonas.

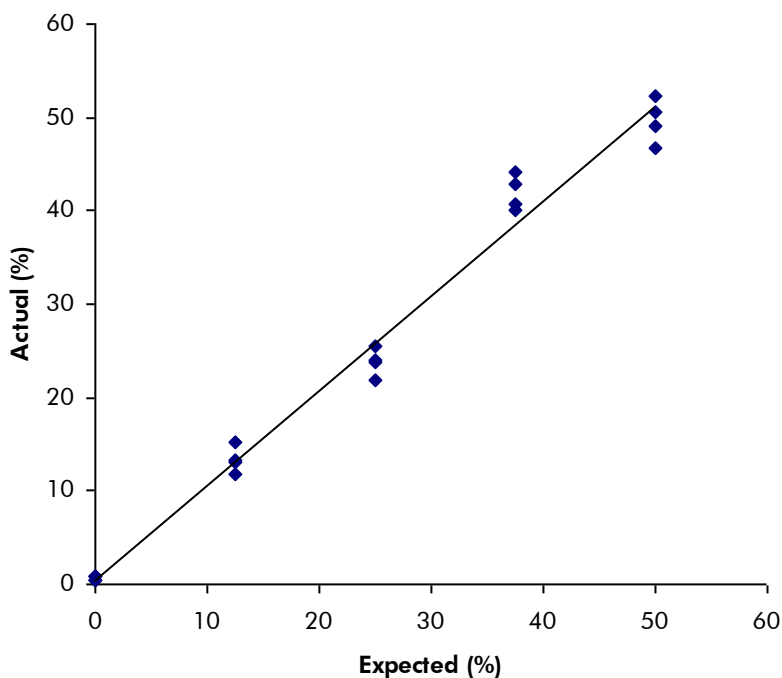
Pastaba: KRAS įjungiamos ataskaitos algoritmas buvo naudojamas LOB ir LOD duomenų generavimui. Rankinė analizė, atliekama naudojant PyroMark taikomąją programinę įrangą, kaip aprašyta 6 protokole (28 psl.), gali parodyti truputį kitokias vertes.

Pastaba: Rekomenduojama metodo veikimą patikrinti laboratorijoje.

Linijiškumas

Linijiškumas buvo išmatuotas pagal CLSI potvarkį EP6-A “Kiekybinio matavimo procedūrų linijiškumo vertinimas: statistinis metodas; patvirtintas potvarkis”.

Neapibrėžto tipo ir mutacines sekas turintys plazmidai buvo sumaišyti tokiomis proporcijomis, kad būtų gauti šie mutacijos lygiai: 0, 12.5, 25, 37.5 ir 50%. Keturi mišinių kartotiniai buvo išdėstyti atsitiktiniu pavyzdžiu ant plokštelės ir išanalizuoti. Mutacijos GGT → TGT 12 kodone rezultatai buvo išanalizuoti su Analyse-it[®] programine įranga v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) ir yra parodyti 12 pav.



12 pav. Mutacijos GGT → TGT 12 kodone linijiškumas.

Visas atkartojimas buvo 1.64 proc. vnt., o rezultatai buvo linijiniai leistiname 3 proc. vnt. nelineiškume. Panašūs rezultatai buvo gauti su mutacija GGC → GAC 13 kodone.

Tarpinis preciziškumas

Mutacijos GGT → TGT 12 kodone linijiškumo nustatymą pakartojo 3 operatoriai 3 skirtingomis dienomis, naudodami skirtingas PyroMark Q24 instrumentų ir reagentų kombinacijas. 3 procedūrų rezultatai parodyti 12 lentelėje.

12 lentelė. Tarpinis preciziškumas*

% mutavęs plazmidas [†]	1 procedūra		2 procedūra		3 procedūra		Santrauka	
	Vidurkis	SD	Vidurkis	SD	Vidurkis	SD	Vidurkis	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

* Visos vertės pateiktos proc. vnt. SD: standartinis nuokrypis.

[†] Paremta OD₂₆₀ matavimu.

Todėl tarpinio preciziškumo (SD) vertės buvo 0.6–2.0 proc. vnt. išmatuotame 0–50% mutacijos lygio intervale.

Diagnostinis vertinimas

therascreen KRAS Pyro rinkinys buvo įvertintas palyginus su DxS KRAS mutacijos rinkiniu. DNR buvo ištrauktos iš 100 formalinu užfiksuotų, parafine įtvirtintų (FFPE) perspektyvinio kolorektalinio vėžio auglių mėginių ir buvo išanalizuotos 12 ir 13 kodonų mutacijos.

Testuojamos DNR buvo izoliuotos naudojant EZ1 DNR audinio rinkinį, o analizė buvo atlikta su *therascreen* KRAS Pyro rinkiniu PyroMark Q24 ir su DxS KRAS mutacijos rinkiniu ABI PRISM[®] 7900HT SDS.

Iš 100 išanalizuotų mėginių mutacinė būseną buvo nustatyta su 91 mėginiu naudojant DxS KRAS mutacijos rinkinį. Naudojant *therascreen* KRAS Pyro rinkinį, pavyko nustatyti 94 mėginių mutacinę būseną.

Neskaitant mėginių, kurių nepavyko išanalizuoti su vienu ar abiem rinkiniais, *therascreen* KRAS Pyro rinkinio ir DxS KRAS mutacijos rinkinio rezultatai sutapo 100 proc.

therascreen KRAS Pyro rinkinio diagnostinis jautrumas buvo 100 proc., o diagnostinis specifiškumas taip pat 100 proc. (13 lentelė).

13 lentelė. 12 ir 13 kodonų išanalizuotų perspektyvinių kolorektalinio vėžio auglių mėginių rezultatai

		DxS KRAS mutacijos rinkinys			
		Mutantas	Neapibrėžto tipo	Nežinomas	Viso
<i>therascreen</i> KRAS Pyro rinkinys	Mutantas	33	0	1	34
	Neapibrėžto tipo	0	57	3	60
	Nežinomas	0	1	5	6
	Viso	33	58	9	100

61 kodono analizė

Tie patys 100 mėginių buvo išanalizuoti ieškant 61 kodono mutacijų ir naudojant *therascreen* KRAS Pyro rinkinį. Tiriant 61 kodoną, tik vieno mėginio kokybės vertinimas nepavyko. Šio mėginio nepavyko išanalizuoti ir su *therascreen* KRAS Pyro rinkiniu bei DxS bandymais ryšium su 12 ir 13 kodonu, kas rodo, kad DNR kokybė buvo prasta. Aukštesnis 61 kodono bandymo sėkmės intervalas rodo, kad jis yra mažiau priklausomas nuo DNR kokybės negu *therascreen* KRAS Pyro rinkinys ir 12 bei 13 kodonų DxS bandymai. Kadangi DxS bandymas netestuoja 61 kodono mutacijų, tiesiogiai palyginti bandymų neįmanoma.

61 kodono mutacijos buvo aptiktos 4 iš 99 mėginių. Trijose 61 kodono mutacijos buvo dažnos (CAC, CAT, CTA), o ketvirtas mėginys pasižymėjo tiek 60 kodono (GGT→GGA), tiek 61 kodono (CAA→AAA) mutacijomis.

Pastaba: Visose procedūrose, naudotose veikimo charakteristikų nustatymui, signalas viršijo 60 RLU, kuris įprastai yra gaunamas iš 10 ng DNR, izoliuotų iš formalinu užfiksuoto, parafine įtvirtinto (FFPE) audinio.

Nuorodos

QIAGEN palaiko didelę, šiuolaikinę internetinę mokslinių publikacijų duomenų bazę apie QIAGEN produktus. Išsamios paieškos galimybės leidžia jums rasti reikiamus straipsnius paprasčiausiai ieškant pagal raktažodžius arba specifikuojant programą, tyrimų sritį, pavadinimą ir t.t.

Jeigu jums reikalingas visas nuorodų sąrašas, apsilankykite QIAGEN internetinėje nuorodinėje bazėje www.qiagen.com/RefDB/search.asp arba susisiekite su QIAGEN technine pagalba ar savo vietiniu platintoju.

Simboliai



Reagentų pakanka <N> testams

<N>



Snaudokite iki



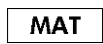
In vitro diagnostinis medicininis produktas



Katalogo numeris



Partijos numeris



Medžiagos numeris



Komponentai



Įeinančios medžiagos



Numeris



Visuotinis prekinio vieneto numeris



Temperatūros apribojimas



Gamintojas



Perskaitykite naudojimo instrukcijas

Kontaktinė informacija

Jeigu jums reikalinga techninė pagalba ir daugiau informacijos, prašom kreiptis į mūsų techninės pagalbos centrą www.qiagen.com/Support arba skambinti į vieną iš QIAGEN techninės pagalbos skyrių ar vietiniams platintojams (žr. užpakalinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com)

A priedas: *therascreen* KRAS Pyro bandymų nustatymas


Jeigu instaliuota KRAS įjungiamą ataskaita, PyroMark Q24 programinėje įrangoje, takelyje „Example Files/Pyro Mark Setups/KRAS“, rasite iš anksto sudarytus bandymo nustatymus, skirtus 12 ir 13 bei 61 kodonams. Tolesnių veiksmų nebereikia atlikti. KRAS įjungiamą ataskaitą gausite kreipęsi elektroniniu paštu pyro.plugin@qiagen.com.

Mes primygtinai rekomenduojame per rankinę analizę naudoti KRAS įjungiamą ataskaitą. Prie „Sequence to Analyze“ negalima rankiniu būdu pridėti kompleksinių mutacijų ir jos turi būti analizuojamos su įjungiamą ataskaita. Instaliavę įjungiamą ataskaitą arba kiekvieną kartą, kai instaliuojate naują programinę įrangą ar atnaujinate ją kompiuteryje, reikia patikrinti, ar įjungiamą ataskaita tiksliai veikia, kaip aprašyta KRAS įjungiamos ataskaitos trumpame vadove.

Jeigu KRAS įjungiamą ataskaita neinstaliuota, prieš pirmą kartą paleidžiant *therascreen* KRAS Pyro bandymą, reikia rankiniu būdu nustatyti bandymo failą. Nustatykite bandymą KRAS 12 ir 13 kodonui bei 61 kodonui, naudodami PyroMark Q24 programinę įrangą, kaip aprašyta žemiau.

Procedūra

KRAS 12 ir 13 kodonai

1. Įrankių juostoje  spustelkite ir pasirinkite “New AQ Assay”.
2. “Sequence to Analyze” išspausdinkite tokią seką.

GNTGRCGTAGGC

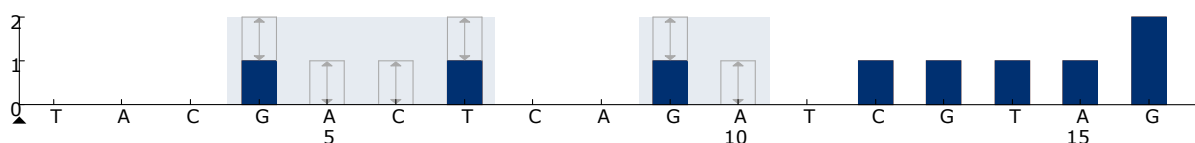
Pastaba: Dažniausios 12 kodono mutacijos bus aptiktos 35 nukleotide (2 padėtyje), naudojant šią “sequence to Analyze”. Norėdami išanalizuoti, ar 34 nukleotide (pirmoje padėtyje) yra mutacijų, pakeiskite “Sequence to Analyze” į tokią seką.

NGTGRCGTAGGC

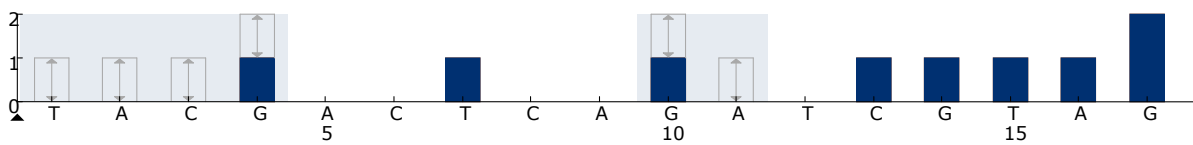
Pastaba: Įsitikinkite, kad atskiros viršūnės aukščio riba nustatyta 30 RLU.

3. Rankiniu būdu įveskite tokią “Dispensation Order”.

TACGACTCAGATCGTAG



13 pav. 12 kodono (35 nukleotido) ir 13 kodono (38 nukleotido) histograma su “Sequence to Analyze” *GNTGRCGTAGGC*.



14 pav. 12 kodono (34 nukleotido) ir 13 kodono (38 nukleotido) histograma su “Sequence to Analyze” *NGTGRCGTAGGC*.

4. Spustelkite stulpelį „Analysis Parameters“ ir padidinkite „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ iki 30.
5. Įrankių juostoje spustelkite ir išsaugokite bandymą kaip “KRAScodon 12+13”.

KRAS 61 kodonas

6. Įrankių juostoje spustelkite ir pasirinkite “New AQ Assay”.
7. Sequence to Analyze” išspausdinkite tokią seką.

CTCDTGACCTG

Dažniausios 61 kodono mutacijos bus aptiktos 182 nukleotide (3 padėtyje), naudojant šią “sequence to Analyze”. Norėdami išanalizuoti, ar 34 nukleotide (antroje padėtyje) yra mutacijų, pakeiskite “Sequence to Analyze” į tokią seką

CTCTHGACCTG

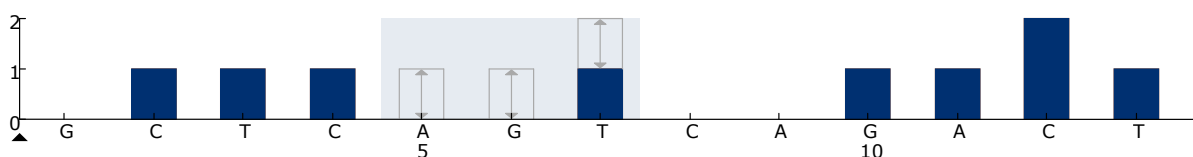
Norėdami išanalizuoti, ar 181 nukleotide (pirmoje padėtyje) yra mutacijų, pakeiskite “Sequence to Analyze” į šią seką.

CTCTTSACCTG

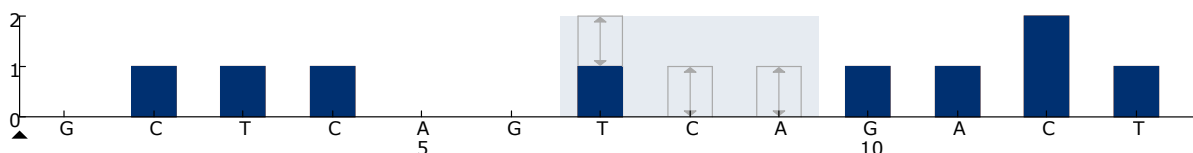
Pastaba: Įsitikinkite, kad atskiros viršūnės aukščio riba nustatyta 30 RLU.

8. Rankiniu būdu įveskite tokią “Dispensation Order”.

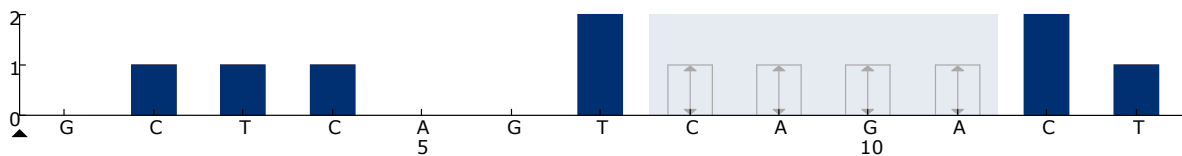
GCTCAGTCAGACT




15 pav. 61 kodono (183 nukleotido) histograma su “Sequence to Analyze” *CTCDTGACCTG*.




16 pav. 61 kodono (182 nukleotido) histograma su “Sequence to Analyze” *CTCTHGACCTG*.



17 pav. 61 kodono (182 nukleotido) histograma su "Sequence to Analyze" CTCTTSACCTG.

9. Spustelkite stulpelį „Analysis Parameters“ ir padidinkite „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ iki 30.
10. Įrankių juostoje spustelkite  ir išsaugokite bandymą kaip "KRAScodon 61".

B priedas: Atliekų indo ir latakų ištuštinimas

<p>WARNING</p> 	<p>Pavojingi chemikalai Su vakuumine darbo vieta naudojamame denatūravimo tirpale yra natrio hidroksido, kuris dirgina akis ir odą. Visada dėvėkite apsauginius akinius, pirštines ir laboratorinį chalata. Atsakingas asmuo (pvz., laboratorijos vadovas) turi imtis reikiamų priemonių ir užtikrinti, kad supanti darbinė aplinka būtų saugi, o instrumento operatoriaus nepakenks pavojingi nuodingų (cheminių ar biologinių) substancijų lygiai, kaip nurodyta atitinkamuose medžiagos saugumo duomenų lapuose (SDS) arba OSHA*, ACGIH† ar COSHH‡ dokumentuose. Išvėdinti dūmus ir išmesti atliekas reikia laikantis visų nacionalinių, valstybinių ir vietinių sveikatos ir saugumo reikalavimų bei įstatymų.</p>
--	--

* OSHA: Profesinio saugumo ir sveikatos administracija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

†ACGIH: Amerikos vyriausybės sveikatos higienistų konferencija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

‡COSHH: Sveikatai pavojingų substancijų kontrolė (Jungtinė Karalystė)

Būtinai laikykitės federalinių, valstybinių ir vietinių aplinkos reikalavimų, nustatytų laboratorinių atliekų išmetimui.

Svarbi nuoroda prieš pradėdant

- Per šį protokolą reikalingas labai švarus vanduo (Milli-Q 18.2 MΩ x cm, www.millipore.com arba jo atitikmuo).

Procedūra

1. Įsitikinkite, kad į vakuuminį įrankį netiekiamas vakuumas. Įsitikinkite, kad vakuumas uždarytas (į padėtį Off), o vakuuminė pompa išjungta.
2. Išpilkite latakuose likusius tirpalus.
3. Išskalaukite latakus su labai švariu vandeniu arba prireikus pakeiskite juos.
4. Ištuštinkite atliekų indą.
Pastaba: Gaubtuką galima nuimti ir neatjungus vamzdelio.
5. Jeigu reikia išvalyti vakuuminę darbo vietą (pvz., esant dulkėms ar išsipylusiems likučiams), laikykitės instrukcijų, aprašytų PyroMark Q24 vartotojo vadove.

Užsakymų informacija

Produktas	Turinys	Katalogo nr.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	24 reakcijoms su PyroMark Q24 sistemomis: sekos nustatymo pradmenimis, PCR pradmenimis, nedematūruotomis kontrolės DNR, PyroMark PCR pagrindiniu mišiniu, CoralLoad koncentratu, PyroMark rišamuoju buferiu, PyroMark atkaitinimo buferiu, PyroMark denatūravimo tirpalu, PyroMark plovimo buferiu, fermento mišiniu, substrato mišiniu, dATP□S, dCTP, dGTP, dTTP ir H ₂ O	971460
PyroMark Q24 MDx	Seka pagrįsta aptikimo platforma, skirta 24 mėginių lygiagrečiam Pyrosequencing	9001513
PyroMark Q24	Seka pagrįsta aptikimo platforma, skirta 24 mėginių lygiagrečiam Pyrosequencing	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vakuuminė darbo vieta (220 V), skirta 24 mėginių lygiagrečiam paruošimui iš PCR produkto į vienos vijos šabloną	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuuminė darbo vieta (220 V), skirta 24 mėginių lygiagrečiam paruošimui iš PCR produkto į vienos vijos šabloną	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Taikomoji programinė įranga	9019063
PyroMark Q24 Software	Analizavimo programinė įranga	9019062
Priedai		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 šulinėlių sekos nustatymo reakcijos plokštelė	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kasetės nukleotidų ir reagentų paskirstymui	979302

* Tik Jungtinėje Karalystėje

† Kitose pasaulio šalyse

Produktas	Turinys	Katalogo nr.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Daugkartiniai PyroMark vakuuminės darbo vietos Q96 ir Q24 filtravimo zondai	979010
PyroMark Control Oligo	Sistemos instaliavimo patikrinimui	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Sistemos veikimo patvirtinimui	979304
Susiję produktai		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR paruošimų: 50 QIAamp MinElute [®] stulpeliai, proteinazė K, buferiai, paėmimo mėgintuvėliai (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 paruošimams: reagentų kasetės (audinio), vienkartiniai filtrų antgaliai, vienkartiniai filtrų laikikliai, mėginių mėgintuvėliai (2 ml), išplovimo mėgintuvėliai (1.5 ml), buferis G2, proteinazė K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 paruošimų: QIAamp mini sukimo stulpeliai, buferiai, reagentai, mėgintuvėliai, vakuuminės jungtys	61104

Naujausią licencijavimo informaciją ir su produktais susijusius atsakomybės atsisakymus rasite atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove ar vartotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovus ir vartotojo vadovus rasite www.qiagen.com arba galite užsisakyti iš QIAGEN techninės pagalbos ar savo vietinio platintojo.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Skirta šioms šalims:

ĮSIGIJUSIAM ŠĮ PRODUKTĄ PIRKĖJUI LEIDŽIAMA NAUDOTI JĮ DIAGNOSTINIŲ PASLAUGŲ TEIKIMUI PER ŽMONIŲ IN VITRO DIAGNOSTINES PROCEDŪRAS. ŠIS DOKUMENTAS NESUTEIKIA JOKIOS RŪŠIES BENDRO PATENTO AR KITOS LICENCIJOS, BET TIK SPECIALIĄ TEISĘ NAUDOTIS PIRKINIŲ.

Prekės ženklai: 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).

Ribotos atsakomybės sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia, kad *therascreen* KRAS Pyro rinkinio pirkėjas ar vartotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. *therascreen* KRAS Pyro rinkinys gali būti naudojamas tik su *therascreen* KRAS Pyro rinkinio vadovu ir tik su į šį rinkinį įeinančiais komponentais. Turėdami intelektualinę nuosavybę, QIAGEN neleidžia naudoti ar įdiegti į prie šio rinkinio pridamus komponentus kitų komponentų, kurie neįeina į šį rinkinį, kaip aprašyta *therascreen* KRAS Pyro rinkinio vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos rasite www.qiagen.com.
2. QIAGEN nesuteikia jokios garantijos, kad šis rinkinys ir/ar jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisės, išskyrus aiškiai apibūdintą licenciją.
3. Šis rinkinys ir jo komponentai yra licencijuoti vienkartiniam naudojimui ir jų negalima naudoti pakartotinai, atnaujinti ar perparduoti.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų aiškių ar turimų omenyje licencijų, išskyrus aiškiai apibūdintąsias.
5. Rinkinio pirkėjas ir vartotojas sutinka neatlikti tokių veiksmų, kurie skatintų ar palengvintų aukščiau aprašytus draudžiamus veiksmus, ir neleisti jų atlikti kitiems. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotos atsakomybės sutarties draudimus bet kokiame teisme ir atgauti visas tyrimo bei teismo išlaidas, įskaitant mokesčius teisininkams, priverstinį ribotos atsakomybės sutarties vykdymą ir intelektualinės nuosavybės teises, susijusias su rinkiniu ir/ar jo komponentais.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

©2015. QIAGEN, visos teisės saugomos.

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)

