

Instrukcja Zestawu *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]



Wersja 1

IVD

Do użytku diagnostycznego in vitro



REF

971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R2

MAT

1075556EN



Technologie Badań i Analiz Firmy QIAGEN

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

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:

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

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

Spis treści

Przeznaczenie Zestawu	5
Streszczenie i Wyjaśnienia	5
Zasada Procedury	7
Kontrole	8
Materiały Dostarczone	9
Zawartość zestawu	9
Materiały Wymagane, ale Niedostarczone	10
Ostrzeżenia i Uwagi	13
Informacje bezpieczeństwa	13
Uwagi ogólne	13
Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami	14
Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami	14
Procedura	15
Izolacja DNA	15
Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24	16
Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	19
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)	22
Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24	24
Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24	28
Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24	30
Interpretacja Wyników	34
Interpretacja wyników detekcji i analizy mutacji występujących na niskim poziomie	34
Rozwiązywanie problemów	38
Kontrola Jakości	41
Ograniczenia	41
Charakterystyka Wydajności	41
Limit dla próby ślepej (LOB) oraz limit detekcji (LOD)	41

Liniowość	43
Precyzja	44
Ocena diagnostyczna	45
Literatura	47
Symbole	48
Informacje Kontaktowe	48
Dodatek A: Przygotowanie reakcji <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	49
Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory	52
Informacje Dotyczące Zamawiania	53

Przeznaczenie Zestawu

Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro jest testem *in vitro* opartym na detekcji sekwencji kwasów nukleinowych i wykorzystującym technologię pirosekwencjonowania[®] do ilościowej detekcji mutacji w eksonie 9 ludzkiego genu *KIT* oraz w eksonie 18 ludzkiego genu *PDGFRA* w DNA genomowym pozyskanym z tkanek ludzkich.

Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro ma na celu dostarczenie klinicystom informacji pomocnych w postępowaniu z pacjentami ze zdiagnozowanym nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (ang. gastrointestinal stromal tumour; GIST), którzy mogą skorzystać z terapii lekami modulującymi szlaki sygnalizacyjne, jak na przykład imatinib. Do użytku diagnostycznego *in vitro*.

Wyłącznie do użytku na aparacie PyroMark[®] Q24. Systemy PyroMark Q24 zawierają:

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

Produkt ten jest przeznaczony dla wykwalifikowanych użytkowników, takich jak technicy oraz lekarze przeszkoleni w tematyce procedur diagnostycznych *in vitro*, technik biologii molekularnej oraz obsługi aparatu PyroMark Q24.

Ten produkt nie jest przeznaczony do użytku z próbkami tkanek płucnych.

Streszczenie i Wyjaśnienia

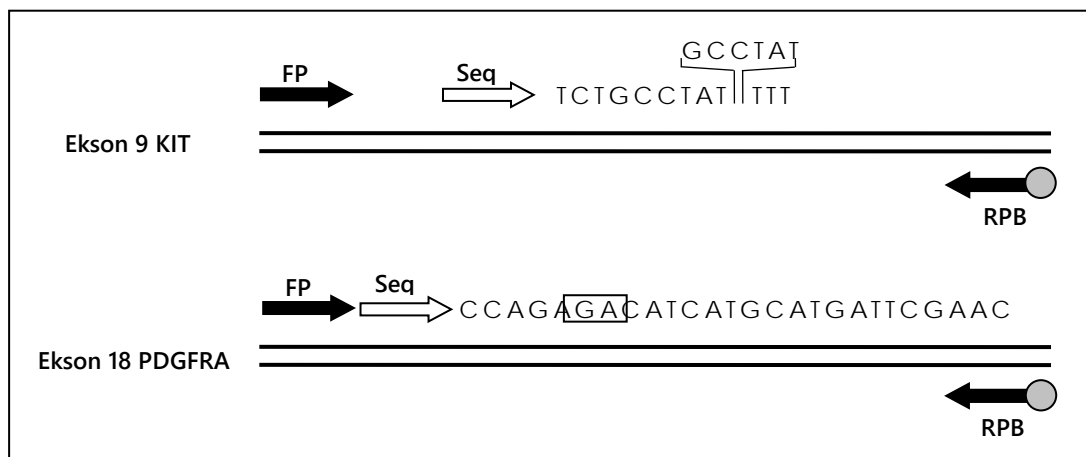
Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro służy ilościowej ocenie mutacji w eksonie 9 genu *KIT* oraz eksonie 18 genu *PDGFRA* (patrz Rysunek 1). Detekcja mutacji w eksonie 9 genu *KIT* pozwala na zastosowanie odpowiedniej dawki leku imatinib, natomiast detekcja mutacji w eksonie 18 genu *PDGFRA* ułatwia wykluczanie mniej wrażliwych lub opornych genotypów (1–3).

Ekson 9 <i>KIT</i>	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTG GAAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATGGCACGGTTGAA TGTAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCC TAT TTTAACTTTGCATTTAAAGGTAA CAACAAAG
Ekson 18 <i>PDGFRA</i>	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGAT CTGTGACTTTGGCCTGGCCAGAG GAC ATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

Rysunek 1. Kontekst genomowy sekwencjonowanych rejonów ludzkich genów *KIT* oraz *PDGFRA* (Identyfikatory (ID) Ensembl: ENSG00000157404 oraz ENSG00000134853). Kodon 503 w genie *KIT* oraz kodon 842 w genie *PDGFRA* są zaznaczone prostokątami.

Na zestaw składają się dwie analizy: jedna do detekcji mutacji w eksonie 9 genu *KIT* exon 9 oraz druga do detekcji mutacji w eksonie 18 genu *PDGFRA* (patrz Rysunek 2). Te dwa rejony są amplifikowane oddzielnie przy pomocy PCR, a następnie sekwencjonowane w zdefiniowanym obszarze. Sekwencje otaczające zdefiniowany obszar służą jako sygnały (piki) referencyjne i normalizacyjne do oceny jakościowej i ilościowej analizy.

Uwaga: Sekwencjonowanie dla obu analiz przebiega w kierunku do przodu.



Rysunek 2. Schemat analiz dla *KIT* oraz *PDGFRA*. Oznaczona sekwencja jest rejonem analizowanym dla próbki dzikiej. Pozycja i sekwencja duplikatu 6 pz w eksonie 9 *KIT* jest zaznaczona. Prostokąt wskazuje kodon 842 eksonu 18 *PDGFRA*. **FP**: Startery PCR przednie; **RPB**: Startery PCR wsteczne (B oznacza biotynylację); **Seq**: Startery sekwencyjne.

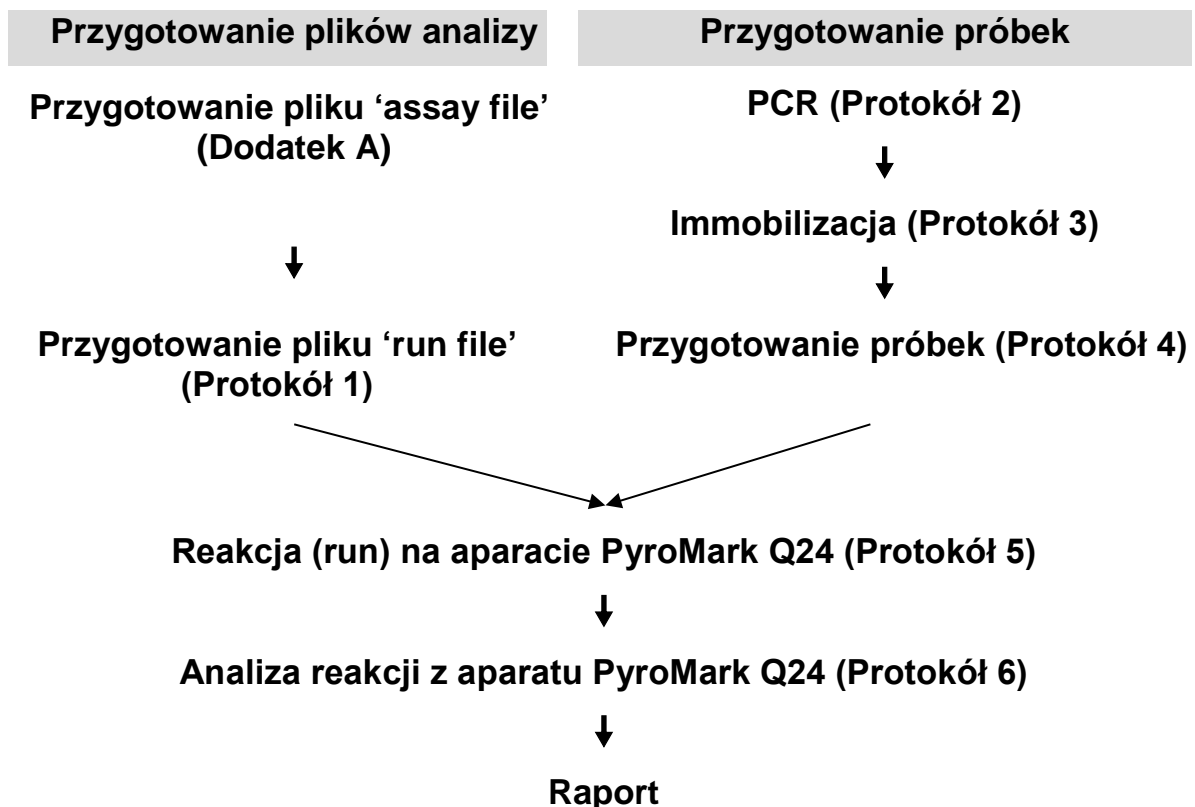
Produkt składa się z mieszaniny starterów PCR oraz startera sekwencyjnego dla każdej reakcji. Startery są dostarczane jako roztwór, gdzie każda probówka zawiera 32 µl każdego ze starterów lub mieszaniny starterów.

Zasada Procedury

Poniższy schemat ilustruje przebieg procedury. Po reakcji PCR z użyciem starterów dla eksonu 9 *KIT* oraz eksonu 18 *PDGFRA*, amplikony zostają immobilizowane na kulkach sefarozy opłaszczonych streptawidyną (Streptavidin Sepharose® High Performance beads). Przygotowane zostaje jednoniciowe DNA, do którego przyłączają się odpowiednie startery sekwencyjne. Następnie próbki zostają sekwencjonowane na aparacie PyroMark Q24 przy pomocy zaprogramowanych wcześniej protokołów ('assay setup files' oraz 'run file').

Zaleca się korzystanie z możliwości analizowania wyniku przy pomocy wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report, którą można otrzymać drogą mailową poprzez kontakt z pyro.plugin@qiagen.com. Przebieg procesu można analizować również z wykorzystaniem zintegrowanego narzędzia do analizy, będącego częścią systemu PyroMark Q24. Sekwencja 'Sequence to Analyze' (sekwencja do analizy) może wtedy zostać przystosowana do wykrycia rzadkich mutacji po zakończonej reakcji (patrz 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 30 oraz 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* GIST RapidScreen Pyro', strona 49).

Zarys procedury *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



Kontrole

Niemetylowane DNA kontrolne będące częścią zestawu służy jako kontrola pozytywna reakcji PCR i sekwencjonowania. Jest to DNA o genotypie typu dzikiego w rejonach sekwencjonowanych z wykorzystaniem zestawu; jego zastosowanie jest konieczne do prawidłowej interpretacji wyników i identyfikacji niskopoziomowych mutacji (patrz 'Interpretacja Wyników', strona 34). Próbkę z niemetylowanym DNA kontrolnym należy uwzględnić dla każdej analizy i dla każdej reakcji pirosekwencjonowania.

Dodatkowo należy umieścić kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) w każdym nastawieniu reakcji PCR i w co najmniej jednej analizie.

Materiały Dostarczone

Zawartość zestawu

Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (pudełko 1/2)

Zestaw <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro (24)	(24)
Numer katalogowy	971510
Ilość reakcji	24
Seq Primer KIT exon 9 (starter sekwencyjny)	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (starter sekwencyjny)	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (starter PCR)	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (starter PCR)	32 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (mieszanina do PCR)	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA (Niemetylowane DNA kontrolne) 10 ng/µl	100 µl

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

Bufory i odczynniki <i>therascreen</i>	
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (roztwór denaturujący)	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (bufor płuczający)	25 ml
Enzyme Mixture (mieszanina enzymów)	1 probówka
Substrate Mixture (mieszanina substratów)	1 probówka
dATP α S	1180 μ l
dCTP	1180 μ l
dGTP	1180 μ l
dTTP	1180 μ l
<i>Instrukcja Zestawu therascreen GIST RapidScreen Pyro</i> (anglojęzyczna)	1

* Zawiera wodorotlenek sodu.

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

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

Odczynniki

- Zestaw do izolacji DNA (patrz 'Izolacja DNA', strona 15)
- Sefaroza opłaszczona streptawidyną (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Woda o wysokiej czystości (Milli-Q[®] 18.2 M Ω x cm lub ekwiwalent)
Uwaga: Zestaw zawiera ilość wody wystarczającą do PCR, immobilizacji DNA oraz do rozpuszczania mieszanin enzymów i substratów. Dodatkowa ilość wody o wysokiej czystości jest potrzebna do rozcieńczania buforu PyroMark Wash Buffer, 10x
- Etanol (70%)*

* Nie używaj alkoholu denaturowanego, który zawiera niepożądane substancje, takie jak metanol czy metyloketony.

Materiały zużywalne

- Sterylne końcówki do pipet (do PCR, z filtrami)
- 24-dołkowe płytki PCR (patrz 'Zalecane płytki 24-dołkowe' strona 12)
- Folia samoprzylepna

Sprzęt

- Pipety (nastawne)*
- Mikrowirówka stołowa†
- Termocykler† oraz odpowiednie probówki PCR
- Aparat PyroMark Q24 (nr kat. 9001513 lub 9001514)††
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (nr kat. 9019063 lub 9019062)‡
- Płytki PyroMark Q24 (nr kat. 979301)‡
- Kartridże PyroMark Q24 (nr kat. 979302)‡
- Pompa próżniowa PyroMark Q24 (Vacuum Workstation; nr kat. 9001515 lub 9001517)†‡
- Wytrząsarka do płytek† do immobilizacji na sefarozie (patrz 'Zalecane wytrząsarki płytek', strona 12)
- Blok grzejny† zdolny do osiągnięcia 80°C

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

† Oznakowanie CE-IVD zgodne z Dyrektywą Unii Europejskiej (EU Directive 98/79/EC). Wszystkie pozostałe wymienione produkty nie posiadają certyfikacji CE-IVD opartej na Dyrektywie UE 98/79/EC.

Zalecane płytki 24-dołkowe

Płytki 24-dołkowe przedstawione w Tabeli 1 są rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Tabela 1. Zalecane płytki 24-dołkowe rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Producent	Produkt	Numer kat.
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Zalecane wytrząsarki płytek

Orbitalne wytrząsarki płytek przedstawione w Tabeli 2 są rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Tabela 2. Wytrząsarki płytek rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit

Producent	Produkt	Numer kat.
	Thermomixer comfort (Basic device)	5355 000.011
Eppendorf	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Ostrzeżenia i Uwagi

Do użytku diagnostycznego in vitro

Informacje bezpieczeństwa

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

Następujące oświadczenia ostrzegawcze odnoszą się do komponentów Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro:

PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący)



Uwaga! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. Może powodować korozję metali. Wycieraj wycieki, aby zapobiec uszkodzeniom materiałów. Przechowuj wyłącznie w oryginalnych opakowaniach. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

Uwagi ogólne

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę jak następuje:

- Ścisłe przestrzeganie instrukcji użytkowania jest wymagane dla optymalnych wyników. Rozcieńczanie odczynników inne niż podane w niniejszej instrukcji nie jest zalecane i może powodować spadek wydajności.
- Komponenty tego zestawu wystarczają na wykonanie 24 reakcji podzielonych na maksymalnie 5 niezależnych analiz.
- Używaj sterylnych końcówek (z filtrami) do pipet (do przygotowania PCR).
- Przechowuj i izoluj materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) odseparowane od innych odczynników i dodawaj ich do mieszanin reakcyjnych w specjalnie do tego celu przeznaczonym osobnym pomieszczeniu.
- Przed przystąpieniem do procedury dobrze rozmroź wszystkie komponenty w temp. pokojowej (15–25°C).
- Po rozmrożeniu wymieszaj komponenty przez pipetowanie lub wortexowanie, a następnie krótko zwiruj.
- Wyniki nieudanej analizy nie mogą być podstawą do oceny statusu mutacji.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami

Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro jest dostarczany w dwóch pudełkach. Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (pudełko 1/2) dostarczane jest w suchym lodzie. Po otrzymaniu PyroMark Master Mix do PCR, koncentrat CoralLoad, niemetylowane DNA kontrolne i wszystkie startery powinny być przechowywane w temperaturze od -30°C do -15°C .

Bufory i Odczynniki *therascreen* Pyro (pudełko 2/2) zawierające bufor, mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydy (dATP α S, dCTP, dGTP oraz dTTP) – odczynniki do analizy pirosekwencjonowaniem – są dostarczane z wkładami chłodzącymi. Te komponenty powinny być przechowywane po dostarczeniu w $2-8^{\circ}\text{C}$. Aby zminimalizować ryzyko spadku aktywności, zaleca się przechowywanie mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów w oryginalnych probówkach.

Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów są stabilne przez co najmniej 10 dni w $2-8^{\circ}\text{C}$. Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów mogą być zamrażane i przechowywane w -30°C do -15°C . Zamrożone odczynniki nie powinny być poddawane więcej niż 6 cyklom zamrażania-rozmrażania.

Uwaga: Nukleotydy nie powinny być zamrażane.

Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro jest stabilny do końca terminu przydatności pod warunkiem przechowywania w zalecanych powyżej warunkach.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Wszystkie próbki muszą być traktowane jako materiał potencjalnie zakaźny.

Materiał próbek stanowi ludzkie DNA wyizolowane ze skrawków tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE – ang. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded).

Próbki od osób poddawanych terapii heparynowej nie powinny być używane w tym teście. Próbki krwi pobranej do probówek z heparyną jako antykoagulantem nie powinny być używane w tym teście. Heparyna zaburza reakcję PCR.

Procedura

Izolacja DNA

Wydajność systemu została określona przy wykorzystaniu zestawów EZ1[®] DNA Tissue i QIAamp[®] DNA FFPE Tissue do pozyskania ludzkiego DNA z próbek guza utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). W przypadku zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini, wydajność została określona z wykorzystaniem próbek krwi zdrowego dawcy, częściowo z dodatkiem komórek nowotworowych.

Zestawy QIAGEN pokazane w Tabeli 3 są zwalidowane do izolacji DNA ze wskazanych rodzajów próbek pochodzenia ludzkiego do użytku z Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Oczyszczanie DNA należy przeprowadzić zgodnie ze wskazówkami zawartymi w instrukcji danego zestawu.

Tabela 3. Zestawy od izolacji DNA zalecane do użytku z Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

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

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

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

Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24



Ważna informacja przed rozpoczęciem

- Jeśli jest to wymagane, LOB (limit próby ślepej) może zostać potwierdzony przez użycie próbki dzikiej i wygenerowanie całej płytki wyników. Więcej znajdziesz w publikacji CLSI Guideline EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protokół do określania limitów detekcji i limitów pomiaru ilościowego; zatwierdzony przewodnik).

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Jeśli nie zainstalowano wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report należy stworzyć ustawienia analiz (Assay Setups; patrz 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* GIST RapidScreen Pyro', strona 49). Należy zrobić to tylko raz, przed pierwszym uruchomieniem analiz *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. W przypadku, gdy wtyczka GIST RapidScreen Plug-in Report została wcześniej zainstalowana, w przeglądarce skrótów oprogramowania PyroMark Q24 znajdziesz uprzednio zdefiniowane ustawienia analiz (Assay Setups) (ścieżka dostępu: Example Files/PyroMark Setups/GIST). Wtyczkę GIST RapidScreen Plug-in Report można uzyskać drogą mailową kontaktując się z pyro.plugin@qiagen.com.

Procedura

1. **Na pasku narzędzi wybierz .**
Stworzony zostaje nowy plik 'run file'.
2. **Wprowadź parametry analizy (patrz 'Parametry analiz', strona 17).**
3. **Zaprogramuj układ płytki przez dodawanie analiz dla eksonu 9 *KIT* oraz eksonu 18 *PDGFRA* do studzienek korespondujących z próbkami do analizy.**
Uwaga: Kontrola negatywna (bez matrycy DNA) powinna być uwzględniona w każdej reakcji PCR, przynajmniej dla jednej reakcji.
Uwaga: Kontrola z niemetylowanym kontrolnym DNA powinna być uwzględniona w każdej analizie każdej reakcji pirosekwencjonowania (patrz 'Kontrole', strona 8).
4. **Gdy reakcja jest zaprogramowana i gotowa do rozpoczęcia na aparacie PyroMark Q24, wydrukuj listę potrzebnych objętości mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydów oraz ustawień dla płytki. Wybierz 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) z menu 'Tools' (narzędzia), a gdy pojawi się raport, celem wydrukowania wybierz .**

5. Zamknij 'run file' (plik reakcji) i skopiuj na nośnik USB (dostarczony wraz z aparatem) używając narzędzia Windows® Explorer.

Wydrukowana 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) może być użyta jako szablon do przygotowania reakcji (patrz 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 22).

Aby rozpocząć reakcję na aparacie PyroMark Q24 - patrz 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 28.

Parametry analizy

Nazwa reakcji (Run name)	Nazwa reakcji zostaje wyświetlona po zapisaniu pliku. Zmiana nazwy pliku zmienia także nazwę reakcji.
Metoda aparatu (Instrument method)	Wybierz metodę aparatu zgodnie z kartridżem, który ma zostać użyty do reakcji. Patrz instrukcje dotyczące poszczególnych produktów.
Nazwa płytki (Plate ID)	Opcjonalnie: Wprowadź nazwę płytki dla PyroMark Q24.
Kod kreskowy (Bar code)	Opcjonalnie: Wprowadź dane kodu kreskowego dla płytki lub, jeśli dysponujesz czytnikiem kodów kreskowych podłączonym do komputera, kliknij na pole tekstowe dla kodu kreskowego i zeskanuj kod kreskowy.
Identyfikatory zestawu i odczynników (Kit and Reagent ID)	Opcjonalnie: Wprowadź numer partii (lot) używanego Zestawu <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro dla pudełek 1 oraz 2. Numery partii znajdują się na etykietach produktów. Uwaga: Zaleca się wprowadzanie ID zestawu oraz ID odczynnika, co może być pomocne przy rozwiązywaniu ewentualnych problemów związanych z używaniem Zestawu <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro.
Notatka reakcji (Run note)	Opcjonalnie: Wprowadź notatkę dotyczącą zawartości i celu danej reakcji.

Przypisywanie plików analizy

Aby przypisać plik analizy do dołka reakcyjnego należy:

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

Każdemu polu studzienki zostaje przyporządkowany kolor odpowiadający określonej analizie.

Wprowadzanie nazw próbek oraz notatek

Aby wprowadzić nazwę próbki lub notatkę, wybierz odpowiednie pole i wpisz pożądane informacje.

Celem dalszej edycji wybierz pole (bierząca zawartość zostanie zaznaczona) lub kliknij dwukrotnie odpowiednie pole.

Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Niniejszy protokół dotyczy amplifikacji PCR obszaru zawierającego ekson 9 *KIT* oraz osobnej amplifikacji PCR obszaru zawierającego ekson 18 *PDGFRA* przy użyciu Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Polimeraza HotStarTaq[®] zawarta w zestawie PyroMark PCR Master Mix wymaga etapu aktywacji przez 15 minut w 95°C.
- Przygotuj wszystkie mieszaniny reakcyjne w obszarze odseparowanym fizycznie od tego, gdzie izoluje się DNA, dodaje matrycy DNA, analizuje produkty PCR oraz przygotowuje próbki do analizy pirosekwencjonowaniem.
- Używaj jednorazowych końcówek pipet z filtrami hydrofobowymi, aby zminimalizować ryzyko kontaminacji krzyżowej.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek ze starterami do PCR, zwiruj je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Jeśli potrzeba, doprowadź stężenie DNA kontrolnego oraz próbek do wartości 0,4–2 ng/μl.

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne odczynniki (patrz Tabela 4).

Przed użyciem dobrze wymieszaj.

2. Przygotuj mieszaninę reakcyjną dla każdego zestawu starterów zgodnie z Tabelą 4.

Typowo, mieszanina reakcyjna zawiera wszystkie składowe niezbędne do PCR, poza próbką.

Przygotuj mieszaninę reakcyjną w objętości nieco większej niż potrzebna do wykonania wymaganej ilości reakcji PCR.

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdej mieszaniny starterów PCR

Składowa	Objętość/reakcję (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5 µl
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5 µl
PCR Primer <i>KIT</i> Exon 9 (starter PCR) lub PCR Primer <i>PDGFRA</i> Exon 18 (starter PCR)	1 µl
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	4 µl
Objętość całkowita	20 µl

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

Z uwagi na brak aktywności polimerazy HotStarTaq DNA w temperaturze pokojowej, trzymanie próbek PCR na lodzie nie jest konieczne.

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

Uwaga: Próbką stanowiącą kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) powinna być uwzględniona w każdej reakcji PCR, przynajmniej dla jednej analizy.

Uwaga: W każdej analizie opartej na pirosekwencjonowaniu należy umieścić próbkę zawierającą niemetylowane DNA kontrolne (patrz 'Kontrolne', strona 8).

Tabela 5. Przygotowanie PCR

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

5. Zaprogramuj termocykler zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu parametrów opisanych w Tabeli 6.

Tabela 6. Zoptymalizowany protokół PCR

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

6. Umieść próbki PCR w termocyklerze i rozpocznij program.
7. Po zakończonej amplifikacji przejdź do 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 22.

Próbki z produktem PCR mogą być przechowywane do 3 dni w temperaturze 2–8°C.

Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)

Niniejszy protokół ma na celu immobilizację matrycowego DNA do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare) przed rozpoczęciem analizy na systemie PyroMark Q24.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem pozwól wszystkim niezbędnym odczynnikom osiągnąć temperaturę pokojową (15–25°C).
- Włącz aparat PyroMark Q24 przynajmniej 30 minut przed rozpoczęciem reakcji. Włącznik główny znajduje się w tylnej części aparatu.
- Umieść jeden statyw na płytce 'PyroMark Q24 Plate Holder' na nagrzanym do 80°C bloku grzejnym. Drugi statyw na płytce 'PyroMark Q24 Plate Holder' pozostaw w temp. pokojowej (15–25°C).
- Bufor płuczący (PyroMark Wash Buffer) jest dostarczany jako koncentrat (10x). Przed pierwszym użyciem rozcieńcz go do stężenia roboczego (1x) poprzez dodanie 225 ml wody o wysokiej czystości do 25 ml koncentratu (10x PyroMark Wash Buffer) – do uzyskania końcowej objętości 250 ml.

Uwaga: Bufor płuczący (PyroMark Wash Buffer) o stężeniu roboczym 1x jest stabilny w 2–8°C do końca oznaczonego terminu ważności.

- Przygotuj stację próżniową 'PyroMark Q24 Vacuum Workstation' do pracy z próbkami zgodnie z *Instrukcją Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Procedura

- 1. Delikatnie wstrząśnij butelką zawierającą 'Streptavidin Sepharose High Performance' do momentu uzyskania homogennego roztworu.**
- 2. Przygotuj mieszaninę 'master mix' do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 7.**

Przygotuj objętość większą niż wymagana dla planowanej ilości reakcji (ilość planowanych reakcji + jedna dodatkowo).

Tabela 7. Mieszanina ‘master mix’ do immobilizacji DNA

Składowa	Objętość/reakcję (μl)
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)	40
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	29
Objętość całkowita	70

Uwaga: Ten protokół odnosi się do Streptavidin Sepharose High Performance o numerze partii (lot) 10057037 lub wyższym. Używając Sepharose High Performance Beads z numerem partii (lot) niższym od 10057037, objętość cząsteczek sefarozy musi zostać zwiększona do 2 μl, a objętość wody odpowiednio zmniejszona.

- 3. Dodaj 70 μl mieszanki ‘master mix’ do dołków 24-dołkowej płytki PCR zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24’, strona 16).**

Cząsteczki sefarozy szybko sedymentują. Zapewnij homogenność ‘master mix’ przez częste mieszanie pulsacyjne na wortexie lub pipetowanie. Nie wiruj.

- 4. Do każdego dołka zawierającego mieszankę ‘master mix’ dodaj 10 μl biotynylowanego produktu PCR z Protokołu 2 zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie theascreen GIST RapidScreen Pyro’, strona 19).**

Po dodaniu mieszanki ‘master mix’ oraz produktu PCR, całkowita objętość mieszanki reakcyjnej w każdym dołku powinna wynosić 80 μl.

- 5. Zaklej płytkę PCR przy użyciu folii samoprzylepnej.**

Upewnij się, że przeciekanie pomiędzy dołkami nie jest możliwe.

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

Podczas tego etapu przejdź niezwłocznie do ‘Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24’, strona 24.

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

Niniejszy protokół służy do preparatyki jednoniciowego DNA oraz hybrydyzacji starterów sekwencyjnych do matrycy przed rozpoczęciem analizy pirosekwencjonowaniem na aparacie PyroMark Q24.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem próbek ze starterami sekwencyjnymi zwiń je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Dodaj 2 różne startery sekwencyjne w kolejności zgodnej ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy (run setup) dla używanej płytki (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 16) i w zależności od analizowanego regionu (ekson 9 *KIT* lub ekson 18 *PDGFRA*).
- Nie należy skracać czasu schładzania próbek po uprzedniej inkubacji w 80°C.
- Przeprowadzaj test funkcjonowania końcówek filtrujących (filter probes) oraz wymieniaj je na nowe zgodnie z zaleceniami zawartymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Procedura

- 1. Rozcieńcz wystarczającą ilość każdego ze starterów sekwencyjnych (Seq Primer) dla eksonu 9 KIT oraz eksonu 18 PDGFRA w buforze hybrydyzacyjnym (PyroMark Annealing Buffer) jak przedstawiono w Tabeli 8.**

Przygotuj rozcieńczone startery sekwencyjne w objętościach większych od wymaganych dla liczby analizowanych próbek (dla wymaganej ilości próbek + jednej dodatkowo).

Nie rozcieńczaj ani nie przechowuj większej ilości starterów sekwencyjnych.

Tabela 8. Przykładowe rozcieńczanie starterów sekwencyjnych

Składowa	Objętość/próbkę (μl)	Objętość dla 9 + 1 reakcji (μl)
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny)	24,2	242
Seq Primer KIT ekson 9 lub Seq Primer PDGFRA ekson 18	0,8	8
Objętość całkowita	25	250

- 2. Dodaj 25 μ l rozcieńczonego startera sekwencyjnego do każdego dołka na płytce (PyroMark Q24 Plate) zgodnie ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy 'run setup' (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 16).**
Miej przygotowany jeden ze statywów do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) dostarczony wraz ze stacją próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) w temp. pokojowej (15–25°C) i używaj jako statywu podczas przygotowywania i przenoszenia płytki.
- 3. Włącz ssanie w narzędziu próżniowym przy pomocy znajdującego się na nim włącznika.**
- 4. Umieść płytkę PCR przygotowane w Protokole 3 oraz płytkę PyroMark Q24 Plate na stole roboczym stacji próżniowej (Rysunek 3).**
Sprawdź dołki na płytce PCR i upewnij się, że cząsteczki sefarozy znajdują się w roztworze. Upewnij się, że płytka jest w tej samej orientacji, jak podczas dodawania próbek.



Rysunek 3. Umieszczanie płytki PCR oraz płytki PyroMark Q24 na stacji próżniowej.

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

Cząsteczki sefarozy szybko opadają (sedymentują) i ich pobranie musi nastąpić natychmiast po ich wcześniejszym wymieszaniu. Jeśli od wytrząsania płytki (pasków) minęła więcej niż 1 minuta – wytrząsaj dodatkowo przez 1 minutę i natychmiast przejdź do pobrania cząsteczek sefarozy.

Sprawdź dołki na płytce PCR i upewnij się, że narzędzie próżniowe pobrało całość wszystkich próbek.

7. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 40 ml 70% etanolu (wanienska 1, Rysunek 3). Płucz końcówki filtrujące przez 5 sekund.**
8. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 40 ml roztworu denaturującego (Denaturation Solution; wanienska 2, Rysunek 3). Płucz końcówki filtrujące przez 5 sekund.**
9. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 50 ml buforu płuczającego (Wash Buffer; wanienska 3, Rysunek 3). Płucz końcówki filtrujące przez 10 sekund.**
10. **Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunku 4, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**



Rysunek 4. Narzędzie próżniowe uniesione celem odessania całego płynu z filtrów.

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

próżniowym na boki celem uwolnienia cząsteczek sefarozy do roztworu.

Uważaj, aby nie uszkodzić/zarysować powierzchni płytki końcówkami filtrującymi.

- 13. Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki z wodą o wysokiej czystości (wanienka 4, Rysunek 3) i wytrząsaj delikatnie przez 10 sekund.**
- 14. Przepłucz końcówki filtrujące poprzez ich zanurzenie w wodzie o wysokiej czystości (wanienka 5, Rysunek 3) i włączenie ssania (próżni). Przepłucz końcówki ok. 70 ml wody o wysokiej czystości.**
- 15. Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunku 4, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**
- 16. Wyłącz ssanie na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off') i umieść je w miejscu spoczynkowym (Parking (P) position).**
- 17. Wyłącz pompę próżniową.**

Na koniec dnia roboczego, wszystkie wykorzystane płyny powinny zostać usunięte, a stacja próżniowa (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) sprawdzona pod kątem zanieczyszczeń (patrz 'Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory', strona 52).
- 18. Inkubuj płytkę (PyroMark Q24 Plate) z próbkami w 80°C przez 2 minuty na nagrzanym statywie do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder).**
- 19. Usuń płytkę PyroMark Q24 Plate z podgrzanego statywu i umieść na drugim statywie znajdującym się w temp. pokojowej (15–25°C) i pozostaw w takich warunkach przez 10–15 minut celem ostudzenia.**
- 20. Przejdź do 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 28.**

Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół przedstawia przygotowanie i dodawanie odczynników PyroMark Gold Q24 do kartridża (PyroMark Q24 Cartridge) oraz rozpoczęcie i zakończenie reakcji na aparacie PyroMark Q24. Więcej szczegółów w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Raport przed-reakcyjny (pre run information report) znajdujący się w menu narzędzi (Tools) dla ustawień reakcji (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 16) dostarcza informacji dotyczących objętości nukleotydów, mieszanin enzymów, substratów oraz buforów wymaganych dla danej reakcji.
- Celem zapewnienia prawidłowego funkcjonowania kartridża, dodawaj do niego odczynników przy użyciu jednorazowych końcówek do pipetowania bez filtrów hydrofobowych.

Procedura

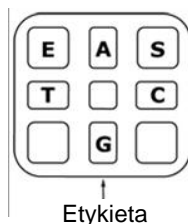
- 1. Rozpuść zliofilizowane mieszaniny enzymów i substratów w 620 µl (każdy) wody (H₂O, zawarta w zestawie).**
- 2. Wymieszaj delikatnie.**

Nie mieszaj przez worteksowanie!

Celem pełnego rozpuszczenia mieszanin, pozostaw je w temp. pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut. Przed użyciem upewnij się, że roztwory nie są mętne przed ich dodaniem do kartridża PyroMark Q24. Jeśli odczynniki nie mają zostać użyte natychmiast, umieść je na lodzie* lub w lodówce.

- 3. Przed użyciem, zarówno odczynniki, jak i kartridż PyroMark Q24 powinny osiągnąć temp. pokojową (20–25°C).**
- 4. Postaw kartridż PyroMark Q24 etykietą w swoją stronę.**
- 5. Dodaj do kartridża PyroMark Q24 odpowiednie objętości nukleotydów oraz mieszanin enzymów i substratów, zgodnie z Rysunkiem 5.**

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




Rysunek 5. Widok kartridża PyroMark Q24 z góry. Widoczne oznaczenia korespondują z oznaczeniami na etykietach odczynników. Dodaj mieszaniny enzymów (E), mieszaniny substratów (S) oraz nukleotydów (A, T, C, G) zgodnie z informacjami zawartymi w raporcie przed-reakcyjnym (pre run information report) w menu 'Tools' ustawień reakcji.

6. Otwórz bramkę kartridża w aparacie PyroMark Q24 i wstaw napełniony odczynnikami z etykietą zwróconą w kierunku operatora. Wsuń kartridż do końca, a następnie dociśnij w dół.
7. Upewnij się, że z przodu kartridża jest widoczna linia, po czym zamknij bramkę.
8. Otwórz ramkę do blokowania płytki i umieść płytkę PyroMark Q24 Plate na bloku grzejnym aparatu.
9. Zamknij ramkę do blokowania płytki oraz pokrywę aparatu.
10. Do znajdującego się w przedniej części urządzenia portu USB podłącz nośnik pamięci USB zawierający plik reakcyjny 'run file'. Nie usuwaj nośnika pamięci USB przed zakończeniem reakcji.
11. W menu głównym wybierz 'Run' (używając przycisków ▲ oraz ▼) i wciśnij 'OK'.
12. Wybierz plik reakcyjny 'run file' (używając przycisków ▲ oraz ▼). Celem podglądu zawartości folderu, zaznacz go i wybierz 'Select'. Aby wrócić do poprzedniego widoku wybierz 'Back'.
13. Aby rozpocząć reakcję zaznacz plik 'run file', a następnie wybierz 'Select'.
14. Po skończonej reakcji, gdy aparat wyświetli informację o zapisaniu całej analizy na nośniku pamięci USB, wybierz 'Close'.
15. Usuń nośnik pamięci USB z aparatu.
16. Otwórz pokrywę aparatu.
17. Otwórz bramkę zabezpieczającą kartridża i wyjmij kartridż - należy go pociągnąć lekko w górę, a następnie na zewnątrz (do siebie).
18. Zamknij bramkę kartridża.
19. Otwórz ramkę zabezpieczającą płytkę PyroMark Q24 Plate i usuń płytkę z bloku grzejnego.
20. Zamknij ramkę zabezpieczającą płytkę oraz pokrywę aparatu.
21. Usuń płytkę i umyj kartridż zgodnie z zaleceniami zawartymi w instrukcji załączonej do kartridża.
22. Dokonaj analizy reakcji zgodnie z opisem w Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24, strona 30.

Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół przedstawia analizę mutacji po zakończonej reakcji dla GIST RapidScreen przy użyciu oprogramowania PyroMark Q24.

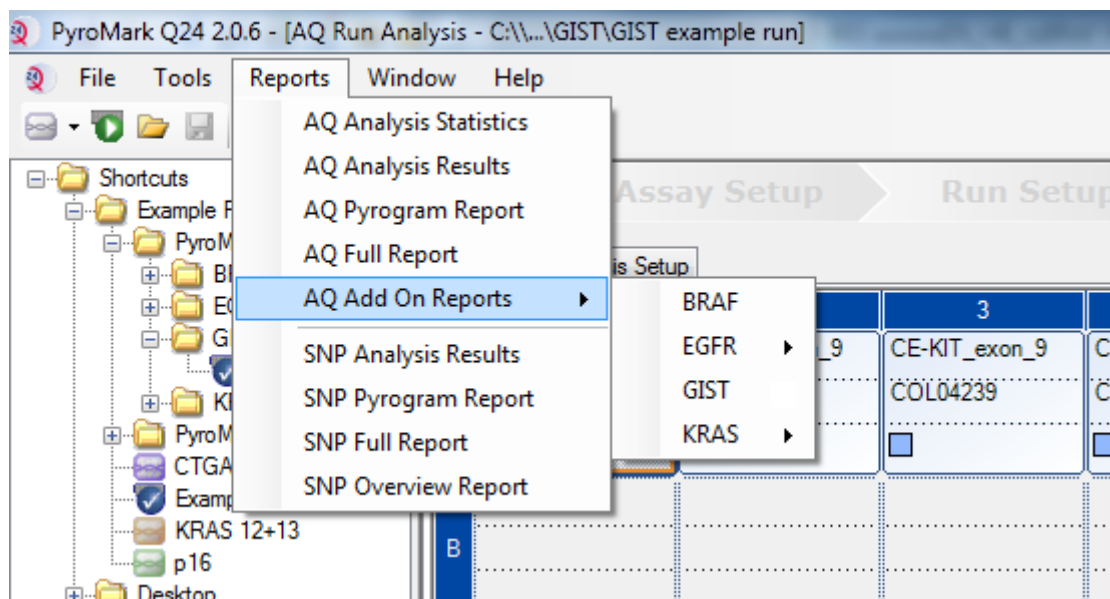
Procedura

1. Podłącz nośnik pamięci USB (zawierający plik reakcyjny 'run file' po zakończonej reakcji) do portu USB komputera.
2. Przenieś plik 'run file' z nośnika USB do wybranej lokalizacji na komputerze przy użyciu Windows Explorer.
3. Otwórz plik 'run file' w trybie AQ w oprogramowaniu PyroMark Q24 wybierając 'Open' w menu 'File' lub klikając dwukrotnie ikonę  na głównym pasku narzędzi.
4. Wynik reakcji może być przeanalizowany na dwa sposoby. W przypadku używania wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report, przejdź do punktu 5. W przypadku używania zintegrowanej z aparatem PyroMark Q24 analizy AQ, przejdź do punktu 6.

Uwaga: Rekomendowaną metodą analizy i interpretacji wyniku jest użycie wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report. Wtyczkę GIST RapidScreen Plug-in Report można otrzymać pisząc na adres pyro.plugin@qiagen.com. Ten raport zapewnia użycie odpowiednich wartości LOD (Tabela 9) oraz wykorzystanie różnych sekwencji 'Sequence to Analyze' do automatycznej detekcji wszystkich mutacji.

Uwaga: Dwie złożone mutacje dla eksonu 18 *PDGFRA* (2526_2538>G oraz 2524_2526 GAC>TAT) nie mogą zostać przeanalizowane przy użyciu analizy AQ w oprogramowaniu PyroMark Q24. Celem analizy złożonych mutacji eksonu 18 *PDGFRA* zalecamy użycie wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report.

5. **Używanie wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report:**
Aby wygenerować raport, wybierz 'AQ Add On Reports/GIST' z menu 'Reports' (patrz Rysunek 6).



Rysunek 6. Menu wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report.

Wyniki dla poszczególnych próbek (dołków) zostaną automatycznie przeanalizowane dla wszystkich mutacji z LOD jak podano w Tabeli 9. Wyniki zostaną przedstawione w tabeli, tak jak pokazano na Rysunku 7, a następnie również pozostałe wyniki wraz z pyrogramami i analizą jakości.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		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.

Rysunek 7. Wynik GIST RapidScreen Plug-in Report.

6. Użycie analizy AQ:

Celem dokonania analizy reakcji i otrzymania kliknij na jeden z przycisków 'Analize'.



Analiza wszystkich próbek (dołków).



Analiza wybranych próbek (dołków).

Wyniki analizy (częstość występowania alleli) oraz ocena jakościowa są przedstawiane powyżej zmiennej pozycji na wykresie pyrogramu. Więcej informacji znajduje się w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Aby wygenerować raport, wybierz opcję 'AQ Full Report' lub 'AQ Analysis Results' w menu 'Reports'.

Uwaga: Dla uzyskania wiarygodnych wyników rekomendowana jest analiza pojedynczych pików o wysokości przynajmniej 30 RLU (relative light units). Ustaw 30 RLU jako 'required peak height for passed quality' w ustawieniach analizy (assay setup) (patrz 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* GIST RapidScreen Pyro' oraz *Instrukcja Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*).

Uwaga: Wyniki z raportu 'AQ Analysis' powinny zostać użyte w celu dokumentacji i interpretacji częstości występowania alleli. Wyniki numeryczne przedstawione w pyrogramie są zaokrąglone i nie pokazują dokładnych wyników ilościowych.

Uwaga: Pyrogram powinien być zawsze porównywany z histogramem, który może być wyświetlony po wybraniu odpowiedniej opcji po kliknięciu prawym przyciskiem myszy w oknie pyrogramu. Wysokości pików pyrogramu powinny korespondować z wysokościami słupków histogramu.

Reanaliza próbek, w których nie wykryto mutacji z użyciem standardowej sekwencji 'Sequence to analyze' lub z notami jakościowymi 'Check' (sprawdź) lub 'Failed' (niepowodzenie)

Standardowa sekwencja 'Sequence to Analyze' zdefiniowana w ustawieniach analizy (Analysis Setup) dotyczy duplikacji 6 pz w eksonie 9 *KIT* oraz najczęstszej mutacji punktowej w kodonie 842 (GAC>GTC) eksonu 18 *PDGFRA* (patrz Dodatek A, strona 49). Jeśli próbka zawiera rzadszą mutację w eksonie 18 *PDGFRA*, sekwencja 'Sequence to Analyze' może zostać zmieniona tak, aby możliwa była analiza statusu tej mutacji, jak opisano w Dodatku A.

Dwie złożone mutacje dla eksonu 18 *PDGFRA* (2526_2538>G oraz 2524_2526 GAC>TAT) nie mogą zostać przeanalizowane przy użyciu analizy AQ w oprogramowaniu PyroMark Q24. Celem analizy złożonych mutacji eksonu 18 *PDGFRA* zalecamy użycie wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report.

Zdecydowanie zalecamy reanalizę wszystkich próbek bez wykrytej mutacji z użyciem standardowej sekwencji 'Sequence to Analyze', a także dla próbek z

notami jakościowymi 'Check' lub 'Failed'. Noty jakościowe 'Check' lub 'Failed' mogą wskazywać na obecność rzadkiej mutacji, która nie jest uwzględniona w standardowej sekwencji 'Sequence to Analyze', co może skutkować pojawianiem się nieoczekiwanych pików referencyjnych.

Celem reanalizy i wykrycia rzadszych mutacji przejdź do ustawień analizy (Analysis Setup) i zmień sekwencję 'Sequence to Analyze' z uwzględnieniem wariantów opisanych w Dodatku A lub wariantów dla innych rzadkich i nieoczekiwanych mutacji. Wybierz 'Apply', a następnie 'To All', gdy pojawi się okno 'Apply Analysis Setup'.

Zaktualizowane częstotliwości mutacji w ludzkich genach *KIT* oraz *PDGFRA* są dostępne na stronie Sanger Institute:
www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Uwaga: Po zmianie sekwencji 'Sequence to Analyze', upewnij się, że próg odcięcia (threshold) dla pojedynczego pików jest ustawiony na 30 RLU.

Uwaga: Dodatkowe rzadkie lub nieoczekiwane mutacje mogą być obecne w sekwencjonowanym rejonie i mogą być zanalizowane z użyciem alternatywnej sekwencji 'Sequence to Analyze' uwzględniającej te nieoczekiwane mutacje.

Uwaga: Gdy wysokość pików nie odpowiada wysokości słupków histogramu i nie może być wytłumaczona obecnością rzadkich lub nieoczekiwanych mutacji, zaleca się powtórzenie reakcji pirosekwencjonowania.

Interpretacja Wyników

Interpretacja wyników detekcji i analizy mutacji występujących na niskim poziomie

Zdecydowanie zaleca się uwzględnienie kontroli z niemetylowanym DNA w każdym eksperymencie dla celów porównawczych oraz jako kontrola poziomu tła. Zmierzona częstotliwość dla próbki kontrolnej powinna być mniejsza lub równa wartości LOB (limit próby ślepej). Wartości LOB oraz LOD (limit detekcji) podane w instrukcjach mogą być używane przy określaniu obecności mutacji. Wartości te zostały uzyskane z wykorzystaniem mieszanin plazmidów niosących sekwencję typu dzikiego lub korespondującą sekwencję zmutowaną.

Po analizie z użyciem oprogramowania PyroMark Q24 Software lub wtyczki Plug-in Reports, możliwe są 3 wyniki.

- Częstotliwość mutacji < LOD: Mutacja nie wykryta
- Częstotliwość mutacji > LOD + 3 %: Mutacja
- Częstotliwość mutacji \geq LOD oraz \leq LOD + 3 %: Potencjalnie mutacja niskiej częstotliwości

Uwaga: W przypadku używania wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report (patrz krok 5 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 30) i otrzymania takiego wyniku wyświetlone zostanie ostrzeżenie.

Zakres LOD do LOD + 3 % pozwala na czułą i optymalną detekcję mutacji na niskim poziomie. Zmierzona częstotliwość powyżej LOB w niemetylowanej próbce kontrolnej wskazuje na wyższy niż zazwyczaj poziom tła w korespondującej reakcji, co może mieć wpływ na pomiar częstotliwości występowania alleli, szczególnie dla mutacji na niskim poziomie. Dlatego wyniki opatrzone ostrzeżeniem 'Potential low level mutation' (potencjalna mutacja na niskim poziomie) powinny zostać uważnie przestudiowane.

Próbki raportowane jako zawierające potencjalnie mutacje na niskim poziomie mogą być uznane za pozytywne dla mutacji tylko po powtórzeniu reakcji w duplikacie i razem z niemetylowanym kontrolnym DNA. Oba wyniki dla danego duplikatu powinny wskazywać tą samą mutację o wartościach \geq LOD, podczas gdy próbka kontrolna powinna być raportowana jako 'No mutation detected' (brak wykrytej mutacji). W przeciwnym razie próbka badana powinna być uznana jako 'No mutation detected' (brak wykrytej mutacji).

Zwiększony poziom tła dla mutacji może zostać wykryty przez porównanie wartości LOB wymienionych w instrukcji do pomiarów uzyskanych z użyciem niemetylowanego DNA kontrolnego. Próbki z raportowaną mutacją na niskim poziomie mogą być uznane jako 'No mutation detected' (brak wykrytej mutacji) bez powtarzania, jeśli zmierzona częstotliwość dla niemetylowanego DNA kontrolnego jest wyższa niż wartość LOB dla danej mutacji wymieniona w

instrukcji. Dlatego właśnie dla raportowanych potencjalnych mutacji na niskim poziomie możliwe są 3 różne sytuacje.

1. Zmierzona częstotliwość dla niemetylowanego DNA kontrolnego >LOB dla tej mutacji: Próbkę może być uznana jako 'No mutation detected' (brak wykrytej mutacji) bez powtarzania.
2. Wynik nie został odtworzony w ramach jednego duplikatu: Uznaj próbkę jako 'No mutation detected' (brak wykrytej mutacji).
3. Wynik został odtworzony w ramach jednego duplikatu oraz wynik dla próbki typu dzikiego <LOB dla danej mutacji: Mutacja wykryta.

Uwaga: Pyrogram powinien być zawsze porównywany z histogramem, który może być wyświetlony po wybraniu odpowiedniej opcji po kliknięciu prawym przyciskiem myszy w oknie pyrogramu. Wysokości pików pyrogramu powinny korespondować z wysokością słupków histogramu. Pyrogramy powinny zostać zweryfikowane pod kątem obecności nieoczekiwanych pików. Jeśli wysokość zmierzonych pików nie koresponduje z wysokością słupków histogramu i nie może być wyjaśniona obecnością rzadkich nieoczekiwanych mutacji, zaleca się powtórzenie reakcji dla danej próbki. Wynik nieudanej reakcji nie może być podstawą do oceny statusu mutacji. Dla ważnej (pozytywnej) mutacji, zmiana wysokości pików jest zawsze powiązana z korespondującą zmianą wysokości kolejnego pików. Zmiana wysokości pojedynczego pików nie powinna być uznawana jako wskazująca na obecność mutacji.

Uwaga: Do interpretacji wyników zaleca się używanie wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report. Celem bliższej analizy próbek z raportowaną potencjalną mutacją na niskim poziomie zaleca się wykonanie dodatkowej analizy próbki ręcznie przy użyciu oprogramowania aplikacyjnego (np. dla porównania częstotliwości występowania mutacji dla próbki kontrolnej).

Uwaga: Decyzje dotyczące terapii pacjentów nowotworowych nie powinny być podejmowane wyłącznie na podstawie statusu mutacji dla eksonu 9 *KIT* oraz eksonu 18 *PDGFRA*.

Tabela 9. Wartości LOB oraz LOD ustalone dla konkretnych mutacji

Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V58)
ekson 9KIT				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
ekson 18 PDGFRA				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535 del12 lub [‡]	D842_H845del lub [‡]	2,2	5,2	737 lub [‡]
2526_2537 del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538 del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539 del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541 del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532 del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526 delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538 >G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

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

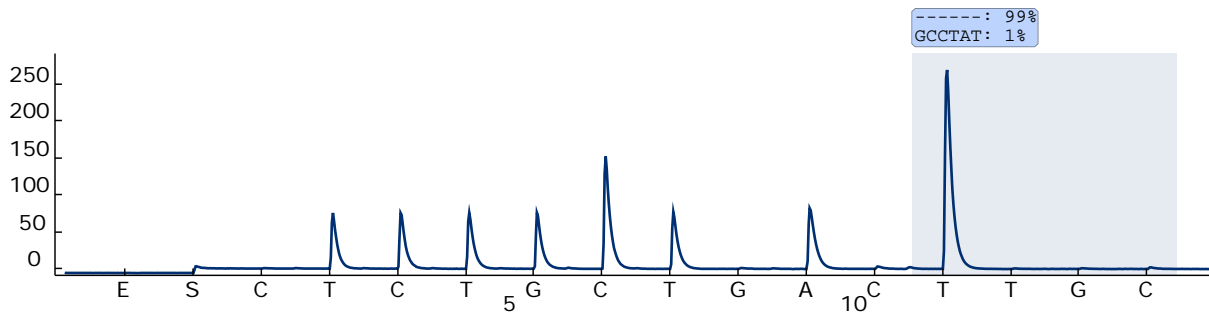
[†] Mutacje 2524G>T oraz 2524_2526 GAC>TAT oraz 2526_2537 del12 oraz 2527_2538 del12 skutkują taką samą substytucją aminokwasową, odpowiednio.

[‡] Mutacje 2524_2535del12 oraz 2526_2537del12 skutkują taką samą substytucją w kwasie nukleinowym.

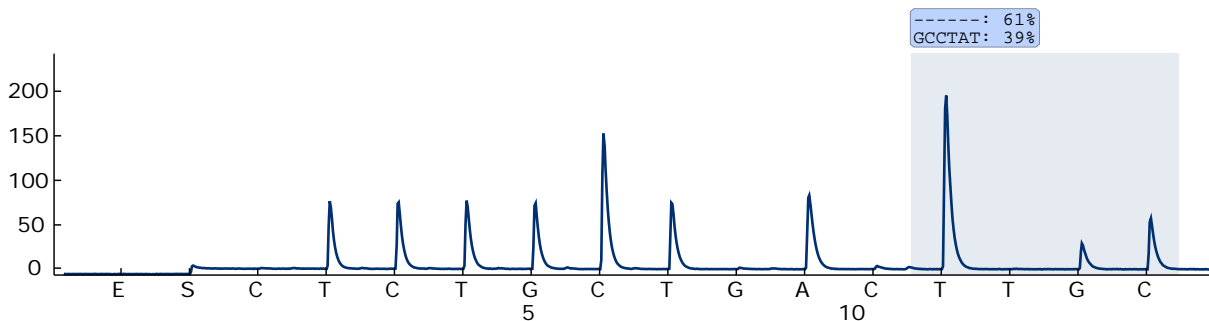
[§] Mutacje 2526_2538 >G oraz 2524_2526GAC>TAT nie mogą być analizowane przy pomocy opcji 'AQ mode' w oprogramowaniu PyroMark Q24.

Reprezentatywne wyniki

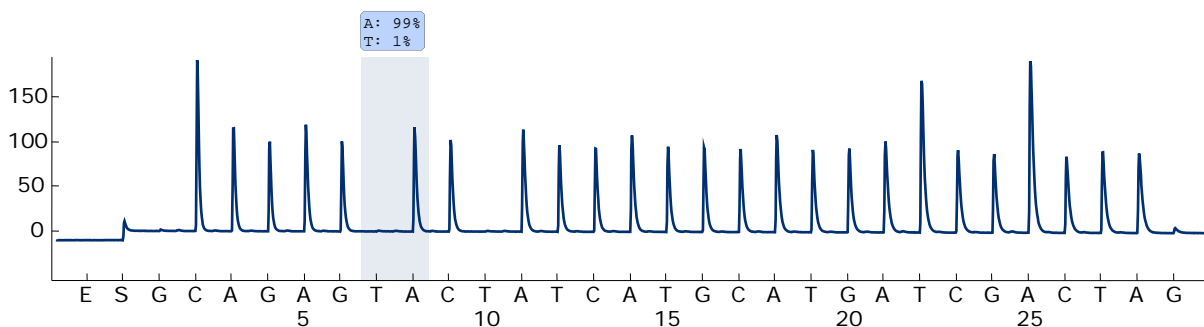
Reprezentatywne wyniki w postaci pyrogramów – Rusunki 8–11.



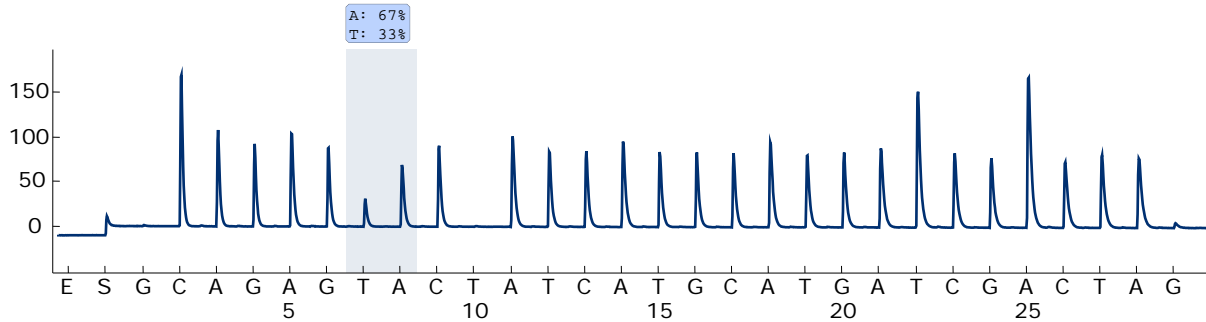
Rysunek 8. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie typu dzikiego dla eksonu 9 *KIT* z sekwencją 'Sequence to Analyze' *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* odnoszącą się do duplikacji dla fragmentu 6 pz za kodonem 503.



Rysunek 9. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki z duplikacją *GCCTAT* za kodonem 503 dla eksonu 9 *KIT* z sekwencją 'Sequence to Analyze' *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.



Rysunek 10. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie typu dzikiego dla eksonu 18 *PDGFRA* z sekwencją 'Sequence to Analyze' *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* odnoszącą się do mutacji *GAC>GTC* w kodonie 842 (nukleotyd 2525).



Rysunek 11. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki z mutacją GAC>GTC w kodonie 842 (nukleotyd 2525) dla eksonu 18 *PDGFRA* z sekwencją ‘Sequence to Analizie’ CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

Rozwiązywanie problemów

Ten przewodnik może być pomocny w przypadku potrzeby rozwiązywania problemów. Więcej informacji dotyczących rozwiązywania problemów można znaleźć na stronie internetowej ‘Frequently Asked Questions’ (często zadawane pytania) w centrum pomocy technicznej:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Specjaliści w centrum pomocy technicznej QIAGEN są zawsze gotowi udzielić wszelkich informacji dotyczących zarówno treści niniejszej instrukcji, jak i innych problemów związanych z rozwiązaniami QIAGEN – od próbki do wyniku. Więcej informacji kontaktowych dostępnych jest na ostatniej stronie niniejszej instrukcji oraz pod adresem: www.qiagen.com.

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

Komentarze i sugestie

Sygnal dla kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

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

Komentarze i sugestie

Sekwencja niespodziewana lub o niskiej jakości

DNA genomowe o niskiej jakości

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

Komunikat 'Check' (sprawdź) lub 'failed' (niepowodzenie)

a) Niskie piki

Błędy w przygotowaniu PCR lub przygotowaniu próbek do pirosekwencjonowania mogą prowadzić do powstawania zbyt małych pików.

Istotnym jest całkowite pobranie próbek przez narzędzie próżniowe. Upewnij się, że jest ono opuszczane powoli do próbek i że geometria płytki PCR lub pasków używanych do immobilizacji pozwala na całkowite pobranie próbek.

Przeprowadź test funkcjonowania końcówek filtrujących oraz wymieniaj je na nowe zgodnie z zaleceniami opisanymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

W przypadku pojawienia się komunikatu 'Check', uważnie porównaj pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecana jest powtórna analiza próbki.

b) Mutacja nie zdefiniowana w 'Sequence to Analyze'

Dopasuj analizowaną sekwencję 'Sequence to Analyze' w ustawieniach reakcji (patrz 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* GIST RapidScreen Pyro', strona 49) i ponownie przeprowadź reakcję.

Komentarze i sugestie

- c) Niespodziewana rzadka mutacja
Nota jakościowa wyniku 'Check' lub 'Failed' może być spowodowana niespodziewanym wzorem wykresu. Może to wskazywać na obecność niespodziewanej mutacji, która nie jest analizowana w ramach zadanej sekwencji do analizy 'Sequence to Analyze'. Takie próbki powinny być analizowane z użyciem alternatywnej sekwencji do analizy uwzględniającej niespodziewane mutacje.
- d) Ostrzeżenie sygnalizujące duże odchylenie wysokości piku 'High peak height deviation' dla dozowania (dispensation)
Pyrogram powinien zostać uważnie porównany z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). W przypadku, gdy zmierzona wysokość pików nie odpowiada wysokości słupków histogramu i nie może to być przypisane rzadkim mutacjom, to zalecane jest powtórzenie reakcji dla danej próbki.

Wysoki poziom tła

- a) Niewłaściwe przechowywanie nukleotydów
Nukleotydy przechowuj w 2–8°C. Przechowywanie w –15 do –25°C może powodować wzrost poziomu tła.
- b) Krótki czas schładzania próbek przed rozpoczęciem analizy pirosekwencjonowaniem
Trzymaj próbki na statywie 'PyroMark Q24 Plate Holder' w temp. pokojowej przez 10–15 minut. Nie skracaj czasu schładzania.
- c) Zanieczyszczenie kartridża
Ostrożnie oczyść kartridż zgodnie z wytycznymi w instrukcji kartridży. Przechowuj kartridż zabezpieczony przed światłem i kurzem.

Brak sygnałów dla kontroli pozytywnej (niemetylowane DNA kontrolne)

- a) Niewystarczająca dla wszystkich próbek ilość mieszaniny enzymów lub substratów
Upewnij się, że kartridż aparatu PyroMark Q24 jest napełniony odczynnikami zgodnie z protokołem pre-reakcyjnym (Pre Run Information) z menu 'Tools'.
- b) Nieprawidłowe przechowywanie lub rozcieńczanie odczynników
Przygotuj odczynniki zgodnie z instrukcją w 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 28.

Komentarze i sugestie

- | | |
|---|--|
| c) Niepowodzenie w przygotowaniu PCR lub próbki | Błędy w przygotowaniu reakcji PCR, programowaniu termocyklera lub przygotowaniu próbki do analizy pirosekwencjonowaniem mogą skutkować brakiem sygnału. Przeprowadź test funkcyjny końcówek filtrujących zgodnie z wytycznymi zawartymi w <i>Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24</i> i wymień je na nowe jeśli zachodzi taka potrzeba. Powtórz PCR oraz analizę pirosekwencjonowaniem. |
|---|--|

Kontrola Jakości

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

Ograniczenia

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

Celem uzyskiwania optymalnych wyników PCR wymagane jest ściśle stosowanie się do zaleceń instrukcji użytkowania. Należy zwracać uwagę na daty przydatności do użycia umieszczone na etykietach pudełek oraz poszczególnych komponentów zestawu. Nie używaj przeterminowanych odczynników.

Charakterystyka Wydajności

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

Wartości LOB oraz LOD zostały ustalone dla szeregu mutacji przy pomocy mieszanin plazmidów (Tabela 9). LOB oraz LOD zostały ustalone zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protokół ustalania limitów detekcji oraz limitów pomiarów ilościowych; zaaprobowany poradnik). Błędy α oraz β (odpowiednio, fałszywie pozytywne i fałszywie negatywne) zostały ustalone na 5%. Wartości LOD dla niektórych rzadkich delecji w eksonie 18 *PDGFRA* zostały ustalone przez dodanie 3 odchyłeń standardowych z pomiarów próbek ślepych do wartości LOB. Wartości LOD zostały ustawione przynajmniej 3 % powyżej wartości LOB.

Wartości LOB odzwierciedlają zmierzoną częstotliwość otrzymaną dla próbek dzikiej. Wartości LOD odzwierciedlają najniższy sygnał (mierzonej częstotliwości) mogący być uznany, jako pozytywny dla danej mutacji.

Tabela 10. LOB oraz LOD ustalone dla specyficznych mutacji

Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V58)
Ekson 9 <i>KIT</i>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Ekson 18 <i>PDGFRA</i>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535 del12 lub [‡]	D842_H845del lub [‡]	2,2	5,2	737 lub [‡]
2526_2537 del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538 del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539 del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541 del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532 del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526 delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538 >G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

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

[†] Mutacje 2524G>T oraz 2524_2526 GAC>TAT oraz 2526_2537 del12 oraz 2527_2538 del12 skutkują taką samą substytucją aminokwasową, odpowiednio.

[‡] Mutacje 2524_2535del12 oraz 2526_2537del12 skutkują taką samą substytucją w kwasie nukleinowym.

[§] Wartości LOD dla tych delecji w eksonie 18 *PDGFRA* zostały ustalone przez dodanie 3 odchyłeń standardowych z pomiarów próbek ślepych do wartości LOB.

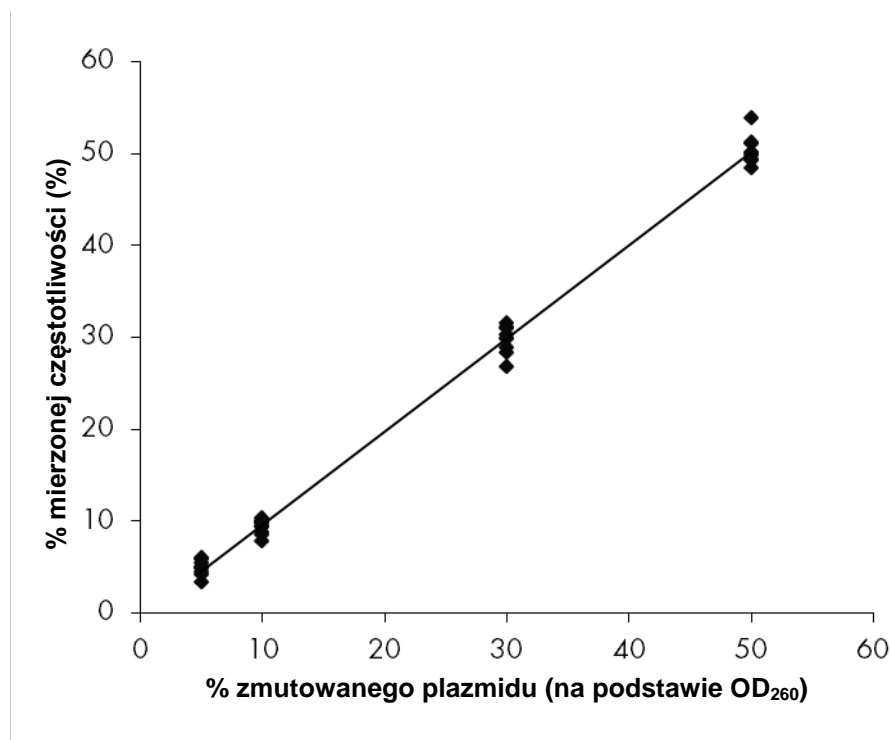
[¶] Mutacja 2526_2538 >G nie może być analizowana przy pomocy trybu AQ w oprogramowaniu PyroMark Q24.

Liniowość

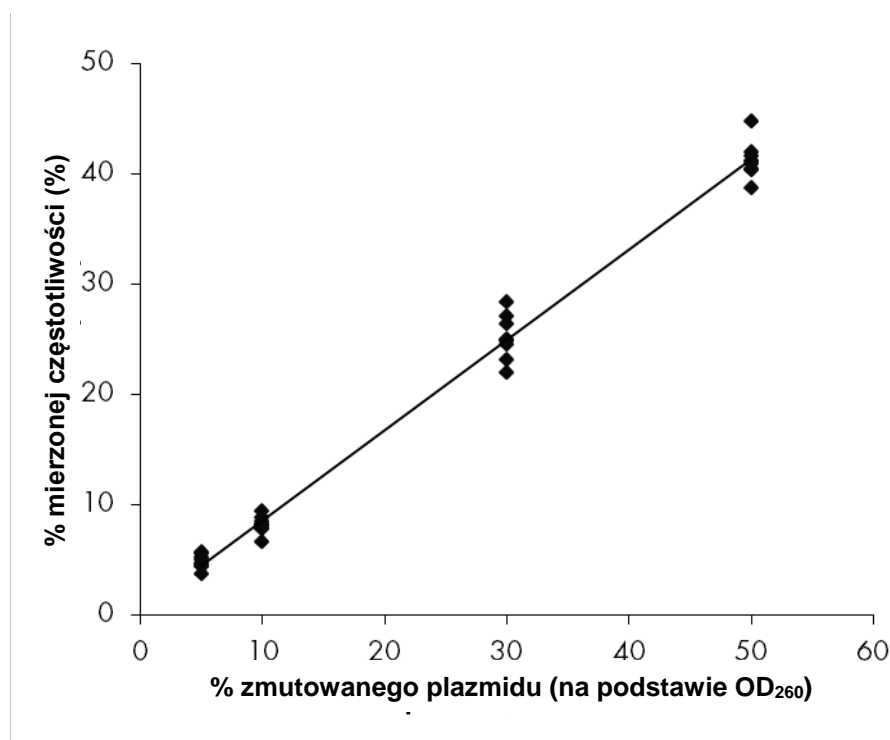
Liniowość została zmierzona z użyciem mieszanin plazmidów niosących sekwencję typu dzikiego lub zmutowaną dla duplikacji 1509_1510insGCCTAT dla eksonu 9 *KIT* oraz dla mutacji 2525A>T dla eksonu 18 *PDGFRA*. Plazmidy zostały zmieszane w proporcjach odpowiadających 4 poziomom mutacji (5, 10, 30 i 50%). Każda mieszanina została przeanalizowana z wykorzystaniem 3 różnych partii Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro w 3 reakcjach pirosekwencjonowania, każda w 3 powtórzeniach.

Wyniki (n = 9 dla każdego poziomu mutacji) zostały przeanalizowane zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP6-A 'Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline' (Ocena liniowości w procedurach pomiarów ilościowych: podejście statystyczne; zaaprobowany poradnik) z użyciem oprogramowania Analyse-it® Software v2.21 (patrz Rysunki 13 i 14).

Wyniki były liniowe w zakresie dopuszczalnej nielineowości 5 % w testowanym zakresie poziomu mutacji 5 - 50%.



Rysunek 12. Liniowość dla duplikacji 1509_1510insGCCTAT dla eksonu 9 *KIT*.



Rysunek 13. Liniowość dla mutacji 2525A>T dla eksonu 18 *PDGFRA*.

Precyzja

Dane dotyczące precyzji pozwalają na określenie całkowitej zmienności analiz i zostały uzyskane na trzech różnych poziomach poprzez analizę wyżej wymienionych mieszanin plazmidów w trzech powtórzeniach dla każdego.

Powtarzalność (w ramach jednego zestawu oraz jako zmienna pomiędzy partiami) była obliczona na podstawie danych określających liniowość (trzy analizy tego samego dnia przy użyciu różnych partii zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Uśredniona precyzja (precyzja wewnątrzlaboratoryjna) była określona podczas trzech analiz w tym samym laboratorium w trzech różnych dniach i wykonanych przez różnych operatorów, na różnych aparatach PyroMark Q24 i różnych partiach Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Odtwarzalność (zmienność wewnątrzlaboratoryjna) była obliczona na podstawie danych z dwóch analiz z każdego z laboratoriów – wewnętrznego jak i zewnętrznego – przy użyciu różnych partii Zestawów *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Szacunkowa precyzja jest wyrażona, jako odchylenie standardowe zmierzonej częstotliwości mutacji w % (Tabela 11). Powtarzalność, uśredniona precyzja oraz odtwarzalność dla duplikacji 1509_1510insGCCTAT dla eksonu 9 *KIT* wyniosła odpowiednio 0,8–1,6, 0,5–1,5 oraz 0,7–1,9 % w testowanym zakresie poziomu mutacji 5 - 50%. Powtarzalność, uśredniona precyzja oraz odtwarzalność dla mutacji 2525A>T dla eksonu 18 *PDGFRA* wyniosła odpowiednio 0,6–1,9, 0,6–3,7 oraz 0,5–2,4 % w testowanym zakresie poziomu mutacji 5 - 50%.

Tabela 11. Precyzja dla duplikacji 1509_1510insGCCTAT dla eksonu 9 *KIT**

% plazmidów zmutowanych [†]	Powtarzalność		Uśredniona precyzja		Odtwarzalność	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

* Wszystkie wartości podane są w jednostkach procentowych [%]. SD: odchylenie standardowe (n=9).

[†] Na podstawie pomiarów OD₂₆₀.

Tabela 12. Precyzja dla mutacji 2525A>T dla eksonu 18 *PDGFRA*[‡]

% plazmidów zmutowanych [†]	Powtarzalność		Uśredniona precyzja		Odtwarzalność	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

[‡] Wszystkie wartości podane są w jednostkach procentowych [%]. SD: odchylenie standardowe (n=9).

[§] Na podstawie pomiarów OD₂₆₀.

Ocena diagnostyczna

Zestaw *therascreen* GIST RapidScreen Pyro został przetestowany w porównaniu do sekwencjonowania Sangera. DNA zostało wyizolowane ze 100 próbek nowotworowych GIST zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE), a następnie przetestowane pod kątem mutacji dla eksonu 9 *KIT* oraz dla eksonu 18 *PDGFRA*.

DNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue. Analiza pirosekwencjonowaniem została przeprowadzona przy pomocy Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro i aparatu PyroMark Q24 oraz sekwencjonowaniem Sangera na aparacie ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Na 100 przeanalizowanych próbek, status mutacji został określony we wszystkich przypadkach dla eksonu 9 *KIT* (Rysunek 13) oraz dla eksonu 18 *PDGFRA* (Rysunek 14) przy użyciu obu metod.

Tabela 13. Wyniki analizy próbek nowotworowych GIST dla eksonu 9 *KIT*

Ekson 9 <i>KIT</i>		Sekwencjonowanie Sangera		
		Nie wykryto mutacji	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Razem
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Nie wykryto mutacji	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Razem	92	8	100

Tabela 14. Wyniki analizy próbek nowotworowych GIST dla eksonu 18 *PDGFRA*

Ekson 18 <i>PDGFRA</i>		Sekwencjonowanie Sangera				Razem
		WT	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Nie wykryto mutacji	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Razem	93	2	3	2	100

WT: typ dziki

Uwaga: We wszystkich analizach oceniających charakterystykę wydajności, sygnał wynosił ponad 30 RLU, co odpowiada rutynowym wynikom dla 10 ng DNA wyizolowanego z tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE). Dane pirosekwencjonowania zostały przeanalizowane przy użyciu wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report.

Literatura

QIAGEN prowadzi dużą i aktualną bazę danych publikacji naukowych zawierających dane dotyczące produktów QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania pozwalają na znalezienie pożądaných publikacji i informacji z wykorzystaniem słów kluczowych lub przez określenie zastosowania, obszaru badawczego, tytułu etc.

Kompletną listę literatury można znaleźć w bazie danych 'QIAGEN Reference Database' pod adresem www.qiagen.com/RefDB/search.asp albo kontaktując się z pomocą techniczną QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem.

Cytowana literatura

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 23 (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* 28, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* 17 (Supplement 10), x280.

Symbole

Następujące symbole mogą pojawić się na opakowaniach i etykietach:



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające na <N> ilość testów



Użyj do



Do medycznego użytku diagnostycznego in vitro



Numer katalogowy



Numer partii (lot)



Numer materiału



Komponenty (składowe)



Zawiera



Numer



Globalny Numer Handlowy Produktu (Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe



Ograniczenia temperaturowe



Zapoznaj się z instrukcją użytkowania



Uwaga!

Informacje Kontaktowe

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

Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* GIST RapidScreen Pyro


Jeśli wtyczka GIST RapidScreen Plug-in Report została zainstalowana, predefiniowane ustawienia analiz (Assay Setups) dla eksonu 9 *KIT* oraz eksonu 18 *PDGFRA* są dostępne w menu oprogramowania PyroMark Q24 (ścieżka dostępu: Example Files/PyroMark Setups/GIST). Następujące kroki nie muszą zostać wykonane. Wtyczkę GIST RapidScreen Plug-in Report można otrzymać pisząc na adres pyro.plugin@qiagen.com.

Zdecydowanie zaleca się korzystanie z wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report, a nie z analizy ręcznej. Złożone mutacje dla eksonu 18 *PDGFRA* exon 18 nie mogą zostać dodane ręcznie do sekwencji do analizy (Sequence to Analyze) i muszą być analizowane przy pomocy wtyczki GIST RapidScreen Plug-in Report. Po zainstalowaniu wtyczki lub nowej instalacji oprogramowania PyroMark Q24 należy sprawdzić jej prawidłowe funkcjonowanie, zgodnie z instrukcją wtyczki GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide.

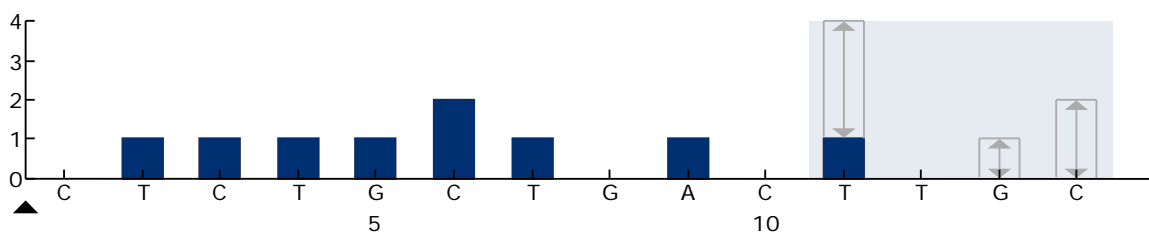
Jeśli wtyczka GIST RapidScreen Plug-in Report nie została zainstalowana, przed przystąpieniem do analizy przy użyciu Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro po raz pierwszy, analiza musi zostać zaprogramowana ręcznie. Zaprogramuj analizę dla eksonu 9 *KIT* oraz eksonu 18 *PDGFRA* przy pomocy oprogramowania PyroMark Q24, jak to opisano poniżej.

Procedura

Ekson 9 *KIT*

- A1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New AQ Assay'.
- A2. Ręcznie wprowadź następującą kolejność dozowania (Dispensation Order):
CTCTGCTGACTTGC
- A3. W oknie 'Sequence to Analyze' wpisz poniższą sekwencję:
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTAA

Duplikacja 6 pz GCCTAT za kodonem 503 dla eksonu 9 *KIT* zostanie wykryta na podstawie tej sekwencji 'Sequence to Analyze'.



Rysunek 14. Histogram dla eksonu 9 *KIT* z sekwencją 'Sequence to Analyze' **TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTAA** uwzględniającą duplikację 6 pz za kodonem 503.

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

A5. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę jako ‘Ekson 9 KIT’.

Ekson 18 *PDGFRA*

A1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz ‘New AQ Assay’.

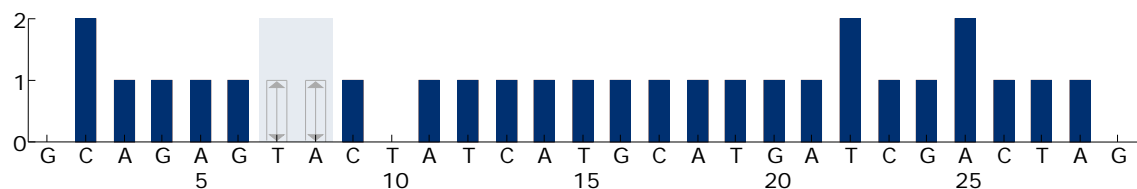
A2. Ręcznie wprowadź następującą kolejność dozowania (Dispensation Order):

GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG

A3. W oknie ‘Sequence to Analyze’ wpisz poniższą sekwencję.

CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT

Najczęstsza mutacja GAC>GTC w kodonie 842 (nukleotyd 2525) dla eksonu 18 *PDGFRA* zostanie wykryta na podstawie tej sekwencji ‘Sequence to Analyze’.



Rysunek 15. Histogram dla eksonu 18 *PDGFRA* z sekwencją ‘Sequence to Analyze’ *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* uwzględniającą mutację GAC>GTC w kodonie 842 (nukleotyd 2525).

Sekwencja ‘Sequence to Analyze’ może zostać zmieniona po reakcji celem dodatkowej analizy dla mutacji nukleotydu 2524 (kodon 842) jak również 9 delecji i złożonych mutacji w rejonie kodonów 842 do 847.

Aby sprawdzić czy następujące mutacje są obecne, zmień sekwencję ‘Sequence to Analyze’ zgodnie z Tabelą 15.

Uwaga: Ostrzeżenie ‘Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations’ (Ocena ilościowa może nie być wiarygodna: zmienna pozycja wymaga ponad 5 dozowań) podczas programowania analizy może zostać zignorowane.

Uwaga: Upewnij się, że próg odcięcia (threshold) dla wysokości pojedynczego piku jest ustawiony na 30 RLU.

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


A5. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę jako ‘Ekson 18 *PDGFRA*’.

Tabela 15. Częste mutacje wykrywane Zestawem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro przy użyciu różnych sekwencji ‘Sequence to Analyze’

Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	Sekwencja ‘Sequence to Analyze’
Ekson 9 <i>KIT</i>		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA*
Ekson 18 <i>PDGFRA</i>		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGCATGATTTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCATGATTTCGAACTAT
2524_2535 del12 lub [‡] 2526_2537 del12	D842_H845del lub [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGCATGA]TTCGAACTAT
2527_2538 del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGCATGAT]TCGAACTAT
2528_2539 del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGCATGATT]CGAACTAT
2530_2541 del12	M844_S847del	CCAGAGACATC[ATGCATGATTTCG]AACTATGTGT
2524_2532 del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG]CATGATTTCGAACTAT
2524_2526 delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATGCATGATTTCGAACTAT
2526_2538 >G	D842_D846>E	–§
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [†]	–§


* Standardowa sekwencja ‘Sequence to Analyze’.

[†] Mutacje 2524G>T oraz 2524_2526 GAC>TAT oraz 2526_2537 del12 oraz 2527_2538 del12 skutkują taką samą substytucją aminokwasową, odpowiednio.

[‡] Mutacje 2524_2535del12 oraz 2526_2537del12 skutkują taką samą substytucją w kwasie nukleinowym i są analizowane na podstawie tej samej sekwencji ‘Sequence to Analyze’.

§ Mutacje 2526_2538 >G oraz 2524_2526 GAC>TAT nie mogą być analizowane w trybie AQ oprogramowania PyroMark Q24.

Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory

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

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

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

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

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

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Niniejszy protokół wymaga użycia wody o wysokiej czystości (Milli-Q 18.2 MΩ x cm, www.millipore.com lub ekwiwalent).

Procedura

- B1. Upewnij się, że narzędzie próżniowe ma wyłączone ssanie (próżnię; pozycja 'Off') i pompa próżniowa jest wyłączona.**
- B2. Usuń wszystkie roztwory pozostałe w wanienkach.**
- B3. Umyj wanienkę wodą o wysokiej czystości lub jeśli konieczne wymień na nową.**
- B4. Opróżnij butlę na odpady płynne.**
Pokrywa może zostać odkręcona bez potrzeby odłączania wężyków.
- B5. Jeśli stacja próżniowa musi zostać umyta (np. z powodu kurzu lub wycieków), postępuj zgodnie z wytycznymi zawartymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.**

Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Na 24 reakcje dla systemów PyroMark Q24: Seq Primers (startery sekwencyjne), PCR Primers (startery PCR), Human Control DNA (DNA kontrolne), PyroMark PCR Master Mix (mieszanka do PCR), CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący), PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny), PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący), PyroMark Wash Buffer (bufor płuczący), Enzyme Mixture (mieszanka enzymów), Substrate Mixture (mieszanka substratów), dATPαS, dCTP, dGTP, dTTP i H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001513
PyroMark Q24	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Oprogramowanie aplikacyjne	9019063
PyroMark Q24 Software	Oprogramowanie analityczne	9019062
Akcesoria		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-dołkowa płytki reakcyjna	979301

* Tylko UK.

† Reszta świata.

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

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

Strona celowo pozostawiona pustą

Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation); FrameStar® (4titude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

Ograniczona Umowa Licencyjna dla Zestawu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Produktu można używać wyłącznie zgodnie z *Instrukcją obsługi zestawu theascreen UGT1A1* i tylko razem z elementami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników, które nie zostały dołączone do tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w instrukcji produktu oraz dodatkowych protokołów dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre z tych dodatkowych protokołów zostały dostarczone przez użytkowników QIAGEN dla innych użytkowników QIAGEN. Protokoły te nie zostały sprawdzone ani zoptymalizowane przez QIAGEN. QIAGEN nie gwarantuje ewentualnego nienaruszania praw stron trzecich.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodjęcie ani niepozwolenie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

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

HB-1547-002 © 2013–2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

