

May 2016

therascreen[®] RAS Extension Pyro[®] кит Наръчник



Версия 1

IVD

За ин витро диагностична употреба

За детекция на мутации в 3 и 4 на човешкия KRAS онкоген и екзони 2, 3 и 4 на човешкия NRAS онкоген

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ГЕРМАНИЯ

R2 **MAT**

1085873EN



Съдържание

Предназначение.....	5
Обобщение и обяснение	5
Принцип на процедурата	7
Контроли	8
Осигурени материали.....	9
Съдържание на кита	9
Необходими материали, които не се съдържат в кита.....	10
Предупреждения и предпазни мерки	13
Основни предпазни мерки	13
Съхранение и работа с реагентите	14
Вземане на проби, подготовка за анализ и съхранение.....	15
Процедура	17
ДНК изолиране	17
Протокол 1: Стартиране на система PyroMark Q24	17
Протокол 2: PCR с използване на PCR реагенти, осигурени с <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro кита	20
Протокол 3: Имобилизация на PCR продукти със Streptavidin Sepharose High Performance топчета	23
Протокол 4: Приготвяне на пробите преди пиросеквениращ анализ с PyroMark Q24	26
Протокол 5: Пускане на PyroMark Q24	31
Протокол 6: Анализ на PyroMark Q24 run	34
Интерпретация на резултатите.....	38

Представяне на резултати	43
Инструкции за отстраняване на проблеми	46
Качествен контрол.....	48
Ограничения	48
Характеристики на изпълнението	49
Празен лимит и лимит на детекция	49
Мутации GGT >TGT и GGT > GTT в NRAS кодон 13.....	51
Линейност.....	52
Точност.....	53
Диагностична оценка.....	56
Референции.....	59
Символи.....	60
Информация за контакти	61
Приложение А: Настройка на <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro анализ.....	62
Приложение В: Изпразване на контейнера за отпадъци и улеите	67
Информация за поръчка.....	69

Предназначение

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro е инвитро диагностичен тест, базиран на технологията Pyrosequencing® за количествена детекция на мутации в кодони 59, 61, 117 и 146 на човешкия KRAS онкогени кодони 12, 13, 59, 61, 117 и 146 на човешкия NRAS онкоген, използвайки ДНК, извлечена от фиксирани във формалин, парафинирани тъканни проби (FFPE) метастатичен колоректален рак (mCRC) от човешки тъкани.

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro е предназначен да подпомогне идентифицирането на mCRC пациенти, които най-много ще се повлияят от анти-EGFR терапии като цетуксимаб и панитумумаб(1).

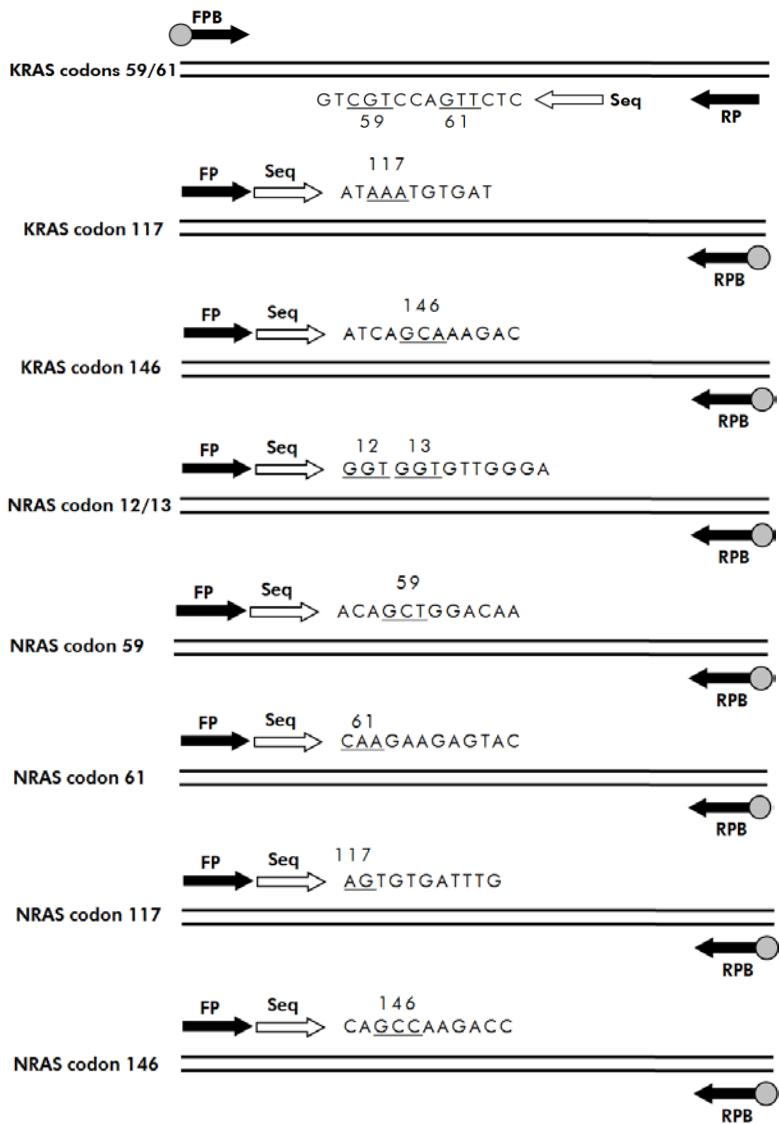
Китът *therascreen* RAS Extension Pyro се използва единствено със системата PyroMark Q24. PyroMark Q24 системата включва:

- Апарат PyroMark Q24 или апарат PyroMark Q24 MDx .
- PyroMark Q24 вакуум работна станцияили PyroMark Q24 MDx вакуум работна станция.
- PyroMark Q24 софтуер (версия 2.0) или PyroMark Q24 MDx софтуер (версия 2.0).

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro е предназначен за професионална употреба от техници и лекари, обучени за ин витро диагностичните процедури, молекулярно-биологични и системата PyroMark Q24.

Обобщение и обяснение

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro се използва за количествено измерване на мутациите в екзони 3 и 4 на човешкия KRAS гени екзони 2, 3 и 4 на човешкия NRAS ген. Китът съдържа осем изследвания (Фигура 1).



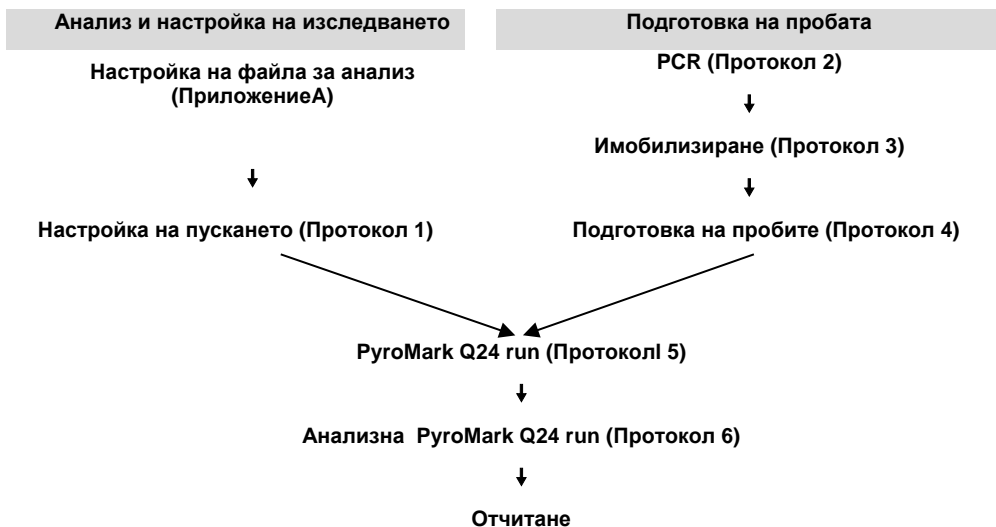
Фигура1.Анализи от *therascreen* RAS Extension Pyro кит.

Осем участъка се амплифицират по отделно чрез PCR и се секвенират в конкретно определения регион. Мутациите в обхванатия участък, ще доведат до конкретни пътища в Pyrogram[®] проследяването, които се отличават от следите, получени от дивия-тип проби. Мутациите, които могат да бъдат анализирани с PyroMark[®] Q24 софтуера са изброени в Таблица 15 (Приложение А: Приложение на *therascreen* RAS Extension Pyro анализите). Анализите на KRAS кодон 117 и 146 и NRAS кодон 12/13, 59, 61, 117 и 146 протичат в права посока, докато анализите за KRAS кодон 59/61 протичат в обратна посока. Продуктът съдържа PCR микс от праймери и секвениращ праймер за всеки анализ. Праймерите се доставят в разтвор, всяка виалка съдържа 24 µl от праймера или праймер микса.

Принцип на процедурата

Фигура 2 (на следващата страница) илюстрира работния път на процедурата за анализ. След провеждането на PCR праймерите са прикрепени към търсения участък, а ампликоните са имобилизирани върху Streptavidin Sepharose[®] High Performance топчета. Едноверижна ДНК е получена и съответните последователности праймери са прикрепени към ДНК. След това пробите се анализират от PyroMark Q24, като се използват файлове за съответния анализ и реакция.

“Последователност за анализ” може да бъде адаптирана за детекцията на различни мутации след провеждането на реакция. (виж “Протокол 6: Анализ на PyroMark Q24 run”, страница 34 и “Приложение А: Провеждане на *therascreen* RAS Extension PyroАнализи”, страница 60).



Фигура 2. Работна схема на процедурата на кит *therascreen* RAS Extension Pyro Kit.

Контроли

Неметилирана контрола ДНК е включена в кита като положителна контрола за PCR и секвениращи реакции. Тази ДНК контрола съдържа див-тип генотип в последователните участъци, съдържащи се в кита. Включвайте проба от контролната ДНК за всеки анализ при всяко пиросеквениращо пускане. Това изискване е, за да бъдат адекватни резултатите на интерпретиране и идентифициране на мутации с ниска честота (виж “Протокол 6: Анализ на PyroMark Q24 run”, страница 34).

В допълнение, негативна контрола (без ДНК матрица) трябва да бъде включена при всяко провеждане на PCR, поне за един анализ.

Осигурени материали

Съдържание на кита

Кутия 1/2

therascreen RAS Extension Pyro кит	(24)
Каталожен ном.	971590
Брой реакции	24
Seq Primer KRAS 59/61 (Секв. праймер 59/61)	24 µl
Seq Primer KRAS 117 (Секв. праймер 117)	24 µl
Seq Primer KRAS 146 (Секв. праймер 146)	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13 (Секв. праймер 12/13)	24 µl
Seq Primer NRAS 59 (Секв. праймер 59)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (Секв. праймер 61)	24 µl
Seq Primer NRAS 117 (Секв. праймер 117)	24 µl
Seq Primer NRAS 146 (Секв. праймер 146)	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61 (PCR праймер 59/61)	24 µl
PCR Primer KRAS 117 (PCR праймер 117)	24 µl
PCR Primer KRAS 146 (PCR праймер 146)	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13 (PCR праймер 12/13)	24 µl
PCR Primer NRAS 59 (PCR праймер 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (PCR праймер 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (PCR праймер 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (PCR праймер 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (PCR мастър микс, 2x)	4 x 850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x (CoralLoad [®] концентрат)	1.2 ml
H ₂ O (вода)	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Немет. контр. ДНК, 10 ng/µl)	3 x 100 µl

Кутия 2/2

Buffers and reagents	Volume
PyroMark Binding Buffer (свързващ буфер)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (сдвояващ буфер)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (денатуриращ разтвор)	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (промиващ буфер)	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (ензимна смес)	2 vials
Substrate Mixture (субстратна смес)	2 vials
dATP α S (дАТФалфаС)	2 x 1180 μ l
dCTP (дЦТФ)	2 x 1180 μ l
dGTP (дГТФ)	2 x 1180 μ l
dTTP (дТТФ)	2 x 1180 μ l
therascreen RAS Extension Pyro Kit Handbook (English) (therascreen RAS Extension Pyro Kit наръчник)	1 pc

* Съдържа натриев хидроксид.

Необходими материали, които не се съдържат в кита

При работа с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация, консултирайте се със съответните инструкции за безопасност (SDSs), предоставяне от производителя.

Реагенти

- Кит за изолация на ДНК (виж “изолиране на ДНК”, **cFehler! Textmarke nicht definiert.**)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, cat. no. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Високо пречистена вода (Milli-Q[®] 18.2 M Ω x cm или еквивалентно)

Забележка: Необходимата вода е осигурена с кита за PCR, ДНК имобилизиране, и за разреждане на ензимната проба и субстратната проба; допълнително високо пречистена вода се изисква за разреждане на PyroMark Wash Buffer, 10x.

- Етанол (70%)*

Консумативи

- Стерилни типчета за пипети (с филтър за провеждане на PCR)
- 24-ямкови PCR плаки (виж “Препоръчителни 24-ямковиплаки”, страница12)
- Адхезиращо фолио
- PyroMark Q24 плака (cat. no. 979301)[†]
- PyroMark Q24 касета (cat. no. 979302)[†]

Оборудване

- Пипети (регулируеми)[‡]
- Настолна микроцентрифуга[‡]
- PCR aparat[‡] и подходящи PCR епруветки
- PyroMark Q24 MDx или PyroMark Q24 (cat. no.9001513 or 9001514)[‡]
- PyroMark Q24 MDx или PyroMark Q24 вакуум работна станция (cat. no. 9001515 или 9001516 или 9001518 или 9001519)[‡]
- Клатачка за плаки за имобилизиране с магнитни (виж “Препоръчителни клатачки за плаки”, страница11)
- Нагриващ блок [‡]способен да достигне 80°C

* Не използвайте денатуриран алкохол, съдържащ други съставки като метанол или метил етил кетон.

[†] CE-IVD-маркировката е в съответствие с ЕС директива 98/79/ЕС. Всички други продукти не са CE-IVD-маркирани, съгласно ЕС директива 98/79/ЕС.

[‡] Подсигурява, че инструментите са проверени и калибрани съгласно препоръките на работодателя.

Орбиталните клатачки за плаки в Таблица 1 се препоръчват за употреба с кита *therascreen* RAS Extension Pyro.

Таблица 1. Клатачки за плаки, препоръчани за употреба с *therascreen* RAS Extension Pyro кит

Производител	Продукт	Кат. номер
Eppendorf	ThermoMixer® C (базово устройство)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, термоблок за PCR плаки 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Препоръчителни 24-ямкови плаки

24-ямковите плаки в Таблица 2 се препоръчват при употребата на *therascreen* RAS Extension Pyro кит.

Таблица 2. 24-ямкови плаки, препоръчвани при употребата на *therascreen* RAS Extension Pyro кит

Производител	Продукт	Кат. номер
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR плака, 24-ямкова	AB0624
Corning	Axygen® 24 ямкова полипропиленова PCR микроплака	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 ямки, прозрачни епруветки	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR плаки без рамка	G030

Предупреждения и предпазни мерки

За ин витро диагностична употреба

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация, моля, консултирайте се със съответните инструкции за безопасност(SDSs). Те са достъпни онлайн в удобен и компактен PDF формат на адрес www.qiagen.com/safety където може да ги намерите и принтирате за всеки един кит на QIAGEN® и компоненти на кита.

Основни предпазни мерки

Винаги внимавайте за следното:

- Компонентите на този продукт са достатъчни за осъществяването на 24 реакции при всяко изследване.
- Използвайте стерилни връхчета за пипети(с филтър за провеждане на PCR).
- Съхранението и екстракцията на положителен материал (проби, позитивни контролии ампликони) се извършват отделно от другите реагенти, като ги добавяте към реакционния микс в отделно помещение.
- Извадете всички компоненти на стайна температура (15–25°C) преди да стартирате изследването.
- Когато се темперират, смесете компонентите (чрез повтарящо се пипетиране надолу-нагоре или вортексиране)и центрофугирайте за кратко.
- Несполучливи резултати не могат да се използват за основа на оценка на мутационния статус.

Съхранение и работа с реагентите

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro се транспортира в две кутии. Китът *therascreen* RAS Extension Pyro (кутия 1/2) се транспортира със сух лед. PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Концентрат, неметирана контрола ДНК и всички праймери трябва да се съхраняват при -15 to -25°C до пристигането си.

Pyro Буферите и Реагенти (кутия 2/2) съдържа буфери, ензимен комплекс, субстратен комплекс, dATP α S, dCTP, dGTP, и dTTP (реагентите за пиросеквениращ анализ) се транспортират с охладители. Тези компоненти трябва да се съхраняват при 2 – 8°C до пристигането си. За да се минимализира загубата на активност, се препоръчва да съхранявате както ензимния концентрат, така и субстратния в осигурените епруветки.

Реконституираните ензими и субстрат са стабилни за следващите поне 10 дни, при 2 – 8°C . Реконституираните ензими и субстрат могат да бъдат замразени и съхранени в епруветките си при -15 to -25°C . Замразените реагенти не трябва да се подлагат на повече от шест цикъла замразяване - размразяване.

Забележка: Нуклеотидите не трябва да се замразяват.

Когато се съхранява при тези условия, китът *therascreen* RAS Extension Pyro е стабилен до изтичане на срока на годност.

Вземане на проби, подготовка за анализ и съхранение

Забележка: Всички проби трябва да се третират като потенциално инфекциозни материали.

Пробите трябва да са материал от човешка геномна ДНК, извлечена от FFPE тъкан. Материалите трябва да бъдат транспортирани според стандартната патологична методология, за да се подсигури тяхното качество.

Туморните проби са хетерогенни и информацията от една проба от тумор може да не е същата като от други сектори на същия тумор. Туморните проби могат също да съдържат и нетуморна тъкан. ДНК от не туморна тъкан не би трябвало да се очаква да съдържа мутации, детектирани от кита *therascreen* RAS Extension Pyro.

Подготовка на тъканни проби

Забележка: Използвайте сух скалпел. Не изпълнявайте тази стъпка в ламинарен бокс или камина.

- Отрежете туморната тъкан от съответните участъци в надписани микроцентрифужни епруветки, използвайки нов скалпел за всяка проба.

Подготовка на тъканните проби за ДНК екстракция

- Използвайте стандартни материали и методи, фиксирайте тъканната проба в 10% неутрален буфер с формалин (НБФ) и запечатайте с парафин. Използвайте микротом, отрежете 5 µm поредни парчета от парафиновия блок и ги поставете върху предметни стъкла.

- Опитен специалист (напр. патолога) трябва да определи Хематоксилин&Еозин (H&E)-оцветения участък за състава на тумора и определяне на зоната. Маркира се оцветеният слайд, за да се отличи туморна от нормална тъкан. Използват се серия от участъци за ДНК екстракция.
- Използват се участъци с >20% туморен състав големина за обработка без макродисекция (виж следващата точка).
- За участъци <20% туморна зона, макродисектирайте един или няколко участъка. Отстранете не туморната тъкан.
- За участъци с площ <4 mm², използвайте два или повече участъка, за да повишите тоталната туморна площ до поне 4 mm² (поставете ги заедно върху пробата с или без макродисекция). Отстранете не туморната тъкан.
- Остържете излишния парафин от тъканта, като използвате нов, стерилен скалпел.

Съхранение

Съхранявайте FFPE блокчетата и слайдовете на стайна температура. Слайдовете могат да се съхраняват на стайна температура до 4 седмици преди ДНК екстракцията.

Геномната ДНК може да се съхранява при 2–8°C за 1 седмица след екстракцията, след което – при –15 to –25°C до 8 седмици преди използване.

Процедура

ДНК изолиране

Китът на QIAGEN, показан в Таблица 3, се препоръчва за ДНК пречистване за съответния тип човешка проба, както и за употреба с *therascreen* RAS Extension Pyro кит. За да използвате този кит, следвайте инструкциите за пречистване на ДНК в съответния наръчник на кита.

Таблица2. Кит за пречистване на ДНК, препоръчителен за употреба с *therascreen* RAS Extension Pyro кит


Тип проба	Кит за пречистване на НК	Кат. номер (QIAGEN)
Парафиново блокче	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404


Протокол 1: Стартиране на система PyroMark Q24

Подготовка преди стартиране

- Създайте стартиране на анализа, както е описано в “ПриложениеА: Стартиране на *therascreen* RAS Extension Pyro анализ”на страница60. Изготвя сееднократно, преди стартирането на RAS Extension Pyro анализа за първи път.
- Избягвайте да поставяте проби с висок интензитет на сигнала до „ празни контроли“ и ямки с очаквано нисък сигнал.Това може да доведе до кръстосване на сигнали между съседни ямки, като сигналът от една ямка, да се отчете в съседната.

Процедура

1. Натиснете  в менюто.
Създали сте нов рънфайл.

2. Стартирайте параметрите на ръна (виж “Параметри на ръна”, страница **Fehler! Textmarke nicht definiert.**).
3. Пригответе плаката, като добавите анализи за осемте анализа на *therascreen* RAS Extension Pyro кита към ямките, кореспондиращи с пробите за анализ.
Забележка: Негативна контрола (без примерна ДНК) трябва да бъде включена при всяко провеждане на PCR, поне за едно изследване.
Забележка: Включете проба от неметилирана контрола ДНК като див-тип контрола за всеки анализ при провеждане на пиросеквенирането (виж Фигура 2, страница8).
4. Когато процесът е настроен и готов за стартиране на системата PyroMark Q24, принтирайте лист с необходимите обеми ензимен микс, субстратен микс и нуклеотиди и изготвянето на плаката. Изберете „ Pre Run информация“от меню „ Инструменти“. Когато се появи съобщението, .
5. Затворете рън файла и го копирайте на USB стик (осигурен със системата), използвайки Windows® Explorer.
Забележка: Принтираната пре-рън информация може да се използва като шаблон за обработката на пробата(виж “Протокол 3: Имобилизирание на PCR продукти със Streptavidin Sepharose High Performance топчета”,страница23).
Забележка: За да пуснете плаката на системата PyroMark Q24, вижте “Протокол 5: Пускане на PyroMark Q24”, страница 31.

Параметри на процеса

- **Име на пускането:** Името на процеса се дава, когато фалът е запазен. Преименуването на файла също променя името на пускането.
- **Инструментален метод:** Изберете подходящия метод, според касетата, която ще се използва за процеса; вижте инструкциите, които са осигурени с продуктите.
- **ID на плаката (по желание):** Въведете ID на плаката в PyroMark Q24.

- **Бар код (по желание):** Въведете бар код номер за плаката или, ако имате бар код четец, свързан с вашия компютър, поставете курсора на мишката върху „ Баркод“ текст бокса (като натиснете иконката) и сканирайте бар кода.
- **Кит и реагент ID (по желание):** Въведете партидния номер на кита *therascreen* RAS Extension Pyro, който ще се използва. Партидният номер може да бъде открит на етикета на продукта.

Забележка: Препоръчваме да се въведат и двата партидни номера, за да може всеки непредвиден проблем с кита *therascreen* RAS Extension Pyro да се проследи.

- **Бележка за пускането (по желание):** Въведете бележка за състава и целта на процеса.

Добавяне на файлове за анализ

За да добавите анализ към ямка, трябва да въведете:

- Десен-клик върху ямката и изберете „Зареждане на анализ“ от съдържанието на менюто.
- Изберете анализ от шорткъта на браузъра, натиснете и провлачете до ямката.

Ямката е цветно-кодирана, в зависимост от заложения анализ.

Въведете ID на пробата и бележки.

За да въведете ID на пробата или бележка, изберете клетка и въведете текста.

За да промените ID на пробата или бележка, изберете или клетката (наличното съдържание ще бъде избрано) или двоен-клик върху полето.

Протокол 2: PCR с използване на PCR реагенти, осигурени с *therascreen* RAS Extension Pyro кита

Този протокол включва PCR амплификация на осем отделни региона в екзони 3 и 4 от човешки KRAS ген и екзони 2,3 и 4 от човешки NRAS ген, чрез употреба на *therascreen* RAS Extension Pyro кит.

Важни забележки преди започване

- HotStarTaq® ДНК полимеразата в PyroMark PCR мастер микса изисква етап на активиране за 15 минути при 95°C.
- Приготвянето на всички компоненти на реакцията в зона, различна от тази за пречистване на ДНК, добавяне на примерна проба към PCR и PCR продуктовия анализ или подготовката на пробите е приоритетно за пиросеквениращия анализ.
- Използвайте типчета за еднократна употреба, с хидрофобни филтри за минимализиране на крос-контaminaцията.

Процедури преди стартиране

- Преди да отворите епруветките с PCR праймерите, центрофугирайте за кратко, за да се събере цялото съдържание от дъното на епруветката.
- Изравнете концентрацията на контролата и пробата ДНК, ако е необходимо, до 0.4–2 ng/μl.

Процедура

1. Размразете всички необходими компоненти (Таблица 4).
Разклатете добре преди употреба.
2. Пригответе реакционна смес за всеки сет PCR праймери според Таблица 4.
Реакционната смес нормално съдържа всички компоненти, необходими за PCR с изключение на пробата.

Пригответе по-голямо количества реакционна смес от необходимото за цялото количество PCR анализи.

Таблица 3. Подготовка на реакционен микс за всяка смес от праймери

Компонент	Обем/реакция (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 or PCR Primer KRAS 117 or PCR Primer KRAS 146 or PCR Primer NRAS 12/13 or PCR Primer NRAS 59 or PCR Primer NRAS 61 or PCR Primer NRAS 117 or PCR Primer NRAS 146	1
Water (H ₂ O, включена)	4
Общ обем	20

3. Разбъркайте реакционната смес добре и поставете по 20 µl във всяка PCR епруветка.

Не е необходимо да държите PCR епруветките в лед, след като HotStarTaq ДНКполимеразата е инактивирана на стайна температура.

4. Добавете 5 µl примерна ДНК (2–10 ng геномна ДНК) до всяка епруветка PCR (Таблица 5) и разбъркайте добре.

Забележка: Негативна контрола (без примерна ДНК) трябва да се прилага при всяко пускане на PCR поне при едно изследване.

Забележка: Включете проба с неметилирана ДНК като див-тип контрола за всяко изследване, при всяко пускане на пиро-секвенирането. (виж “Контроли”, страница **Fehler! Textmarke nicht definiert.**).

Таблица4. Подготовка на PCR

Компонент	Обем/реакция (µl)
Реакционен микс	20
ДНК проба	5
Общ обем	25

5. Програмирайте PCR апарата според инструкциите на производителя, прилагайки условията, посочени в Таблица 6.

Таблица5. Оптимизиран протокол на цикъла

	Време	Температура	Коментари
Първоначална активация:	15 min	95°C	HotStarTaq DNA полимеразата с активира при това нагряване
3-стъпкови цикли:			
Денатурация	20 s	95°C	
Сдвояване	30 s	53°C	
Удължаване	20 s	72°C	
Брой цикли	42	–	
Финално удължаване:	5 min	72°C	

6. Поставете PCR епруветките в PCR апарата и стартирайте цикъла.

7. След амплификацията, продължете с “Протокол 3”, страница23.

PCR пробите могат да се съхраняват при 2–8°C for до 3 дни.

Протокол 3: Имобилизация на PCR продукти със Streptavidin Sepharose High Performance топчета

Този протокол е за имобилизиране на примерна ДНК Streptavidin Sepharose High Performance приоритетно за анализ със системата PyroMark Q24.

Процедури преди стартиране

- Оставете всички необходими реагенти и разтвори на стайна температура (15–25°C) преди започване.
- Включете PyroMark Q24 поне 30 минути преди да стартирате процеса. Бутонът за включване се намира на задната страна на инструмента.
- Поставете PyroMark Q24 държача за плаки върху предварително загрят нагряващ блок на 80°C. Оставете втори PyroMark Q24 държач за плаки на стайна температура (15–25°C).

- PyroMark Wash Buffer е доставен в концентрация 10x. Преди да го използвате за първи път, разреждете го до 1x работен разтвор, като добавите 225 ml високо пречистена вода 25 ml 10x PyroMark Wash Buffer (краен обем от 250 ml).

Забележка : 1x PyroMark Wash Buffer работен разтвор е стабилен при 2–8°C преди отбелязания срок на годност.

- Подгответе PyroMark Q24 вакуум работната станция за подготовка на пробите, както е описано в *Наръчника на PyroMark Q24*.

Процедура

1. Внимателно разклатете бутилката, съдържаща Streptavidin Sepharose High Performance до хомогенизиране на разтвора.
2. Пригответе мастър микс за ДНК имобилизиране, спрямо Таблица 7.
3. Пригответе обем, по-голям от необходимия за целия обем реакции (за броя реакции + още една).

Таблица 6. Мастър микс за имобилизиране на ДНК

Компонент	Обем/реакция (µl)
PyroMark Binding Buffer	40
Water (H ₂ O, включена)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Общ обем	70

4. Добавете 70 µl от мастър микс към ямките на 24-ямковата PCR плака, както е определено в определението за процеса (виж “Протокол 1: Провеждане на изследване със система PyroMark Q24”, страница 17).
Топчетата сефароза се утаяват бързо. За да подсигурите хомогенността на мастър микса, разбърквайте често, използвайки пипета или кратко вортексиране. Не центрофугирайте мастър микса.
5. Добавете 10 µl от биотинизирания PCR продукт от Протокол 2 към всяка ямка, съдържаща мастър микс, както е определено в определението за процеса (виж “Протокол 2: PCR използвани PCR реагенти, осигурени в кита *therascreen* RAS Extension Pyro”, страница 20).
Крайният обем във всяка ямка трябва да е 80 µl след добавяне на мастър микса и PCR продукта.
6. Фолирайте PCR плаката като използвате адхезивно фолио.
Убедете се, че няма опасност да протече между отделните ямки.

Оставете PCR плаката на клатачка, на стайна температура (15–25°C) за 5–10 минути при 1400 rpm.

По време на тази стъпка, продължете веднага “Протокол 4: Подготовка на пробите преди пиросеквениращия анализ с PyroMark Q24”, страница 26.

Протокол 4: Приготвяне на пробите преди пиросеквениращ анализ с PyroMark Q24

Този протокол е за приготвяне на едноверижна ДНК и прилепване на праймерите към темплейта, преди пиросеквениращия анализ с PyroMark Q24.

Важни стъпки преди стартиране

- Преди отваряне на епруветките с праймери, центрофугирайте за кратко, за да се събере съдържанието от дъното на епруветката.
- Добавете различните по дължина праймери по същия начин, описан в протокола за изследването. (виж “Протокол 1: Провеждане на изследване със система PyroMark Q24”, страница 17), в зависимост от участъка на анализ.
- Провеждайте редовно функционален тест за филтриране на пробите, както е описано в *наръчника на PyroMark Q24* и подменяйте филтърните проби, когато е необходимо.

Процедура

1. Разрежете достатъчно количество от всеки праймер с PyroMark Annealing буфер, както е показано в Таблица 8.

Пригответе количество, по-голямо от необходимото за цялото количество реакции (колкото е броят на пробите, плюс още едно).

Не разреждайте и съхранявайте повече праймери от необходимото.

Таблица 7. Пример за разреждане на секвениращите праймери

Компонент	Обем/проба (µl)	Обем за 9 + 1 реакции (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 or Seq Primer KRAS 117 or Seq Primer KRAS 146 or Seq Primer NRAS 12/13 or Seq Primer NRAS 59 or Seq Primer NRAS 61 or Seq Primer NRAS 117 or Seq Primer NRAS 146	0.8	8
Общ обем	25	250

- Добавете 25 µl от разредения праймер към всяка ямка на PyroMark Q24 плаката, според протокола за работа (виж "Протокол 1: Провеждане на изследване със системата PyroMark Q24", страница 17).

Дръжте единия държач за плаки PyroMark Q24 (осигурен с PyroMark Q24 вакуумната работна станция) на стайна температура (15–25°C) и го използвайте при подготовка и пренасяне на плаката.

- Включете вакуум помпата на PyroMark Q24 вакуум работната станция.
- Поставете PCR плаката от Протокол 3 и PyroMark Q24 плаката на вакуум работната станция (Фигура 3).

Проверете плаката и се уверете, че сефарозните топчета за в разтвора. Уверете се, че PCR плаката е в същата позиция, както, когато са поставени пробите.



Фигура3. Поставяне на PCR плаката и PyroMark Q24 плаката върху вакуумната работна станция.

- Осигурете вакуум, като включите устройството.
- Бавно поставете филтриращите сонди на вакуум устройството в PCR плаката, за да се хванат топчетата, съдържащи се в имобилизирания темплейт. Задръжте сондите на едно място за 15 с. Бъдете внимателни при повдигането на вакуум устройството.

Забележка: Сефарозните топченца бързо се утаяват. Хващането на топчетата трябва да се случи непосредствено след разклащането. Ако е минала повече от 1 минута след като плаката не се е разклащала, отново я разклатете за 1 минута, преди да отделите топчетата.

Проверете PCR плаката за това дали всички проби са обработени с вакуум устройството.

- Прехвърлете вакуум устройството в улей , съдържащ 40 ml 70% етанол (улей 1; Фигура 3). Промийте филтриращите сонди за 5 с.

8. Прехвърлете вакуум устройството в улей, съдържащ 40 ml денатуриращ разтвор (улей 2; Фигура 3). Промийте филтриращите сонди за 5 s.
9. Прехвърлете вакуум устройството в улей, съдържащ 50 ml Wash Buffer (улей 3; Фигура 3). Промийте филтриращите сонди за 10 s.
10. Повдигнете вакуум устройството на опаки, под ъгъл от 90° за 5 s за да се изсушат филтриращите сонди. (Фигура 4).



Фигура 4. Иллюстрация на вакуумния инструмент повдигнат повече от 90° вертикален ъгъл.

11. Докато вакуумното устройство е над PyroMark Q24 плаката, изключете вакуума.
12. Освободете топчетата в плаката PyroMark Q24 като потопите филтриращите сонди в разтвора от праймери и движете вакуум устройството от едната до другата страна.
Забележка: Бъдете внимателни, да не повредите повърхността на плаката PyroMark Q24 като я одраскате с филтриращите сонди.
13. Преместете вакуумното устройство в улей, съдържащ високо пречистена вода (улей 4 4; Фигура 3), и разклатете устройството за 10 s.
14. Промийте филтриращите сонди като ги потопите в улея с високо пречистена вода (улей 5; Фигура 3) и пуснете вакуума. Промийте сондите с 70 ml високо пречистена вода.

15. Повдигнете вакуум устройството на опаки, подгълот 90° за 5 s
за да се изсушат филтриращите сонди. (Фигура 4).

16. Изключете вакуум устройството и го поставете в паркинг (P) позиция.

17. Изключете вакуум помпата.

Забележка: В края на работа, течния отпадък и останалите разтвори трябва да се изхвърлят, а PyroMark Q24 вакуум работната станция да се провери за напращаване и протичане. Виж “Приложение В: Изпразване на контейнера за отпадъци и улеите”, страница 67.

18. Нагрейте плаката PyroMark Q24 с пробите до 80°C за 2 min като използвате предварително загорения PyroMark Q24 държач за плака.

19. Отстранете плаката PyroMark Q24 от горещия държач за плаки и я поставете върху втория държач PyroMark Q24, държан на стайна температура (15–25°C), за да се охладят пробите на стайна температура 10–15 min.

Продължете директно с “Протокол 5: Пускане на PyroMark Q24”, страница 31.

Протокол 5: Пускане на PyroMark Q24

Този протокол описва подготовката и зареждането на реагентите PyroMark Gold Q24 в касетата PyroMark Q24 и стартиране и приключване на едно пускане на PyroMark Q24. За детайно описание как да проведете изследване, вижте *Ръководството за потребители на PyroMark Q24*.

Важни моменти преди стартиране

- Предварителния протокол, който се намира в меню „Инструменти“ (виж “Протокол 1: Run setup for the PyroMark Q24 system”, страница 17) осигурява информация за обема нуклеотиди, ензими и субстратен буфер, необходими за дадения процес.
- Напълнете касетата с типчета за еднократна употреба (без хидрофобни филтри), за да подситеgurите правилното ѝ функциониране.

Процедура

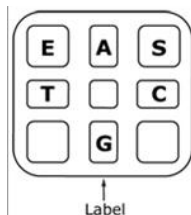
1. Разтворете замразените ензими и субстрат в 620 µl вода (H₂O, осигурена).
2. Разбъркайте като внимателно завъртите епруветката.

Забележка: Не вортексирайте!

За да сте сигурни, че е напълно разтворено, оставете течността на стайна температура (15–25°C) за 5–10 min. Бъдете сигурни, че разтворът не е мътен преди да заредите PyroMark Q24 касетата. Ако няма да използвате реагентите веднага, дръжте ги в лед или в хладилник.

3. Оставете реагентите и PyroMark Q24 касетата да достигнат обкръжаващата ги температура (20–25°C).
4. Поставете PyroMark Q24 касетата в етикета към вас.
5. Заредете касетата PyroMark Q24 със съответния обем нуклеотиди, ензими и субстрат, според Фигура 5.

Бъдете сигурни, че не са попаднали въздушни балончета от пипетата в касетата.



Фигура 5. Илюстрация на PyroMark Q24 касетата погледната отгоре. Означенията съответстват на етикетите на епруветките с реагент. Добавете ензимна смес (E), субстратна смес (S) и нуклеотиди (A, T, C, G) според информацията за обема в пре-рън информационния документ, който се намира в меню "Tools" при настройване на опита.

6. Отворете вратичката на мястото за касетата и я поставете с надписа навън.
Натиснете я максимално и бутнете надолу.
7. Бъдете сигурни, че линията е видима пред касетата и затворете вратичката.
8. Отворете рамката за плака и поставете плаката върху загряващия блок.
9. Затворете рамката, държаща плаката и капака на инструмента.
10. Поставете USB стика (съдържащ файла за процеса) в USB порта в предната част на инструмента.
Не премахвайте USB стика, преди да е приключил процеса.
11. Изберете "Run" в главното меню (използвайки ▲ и ▼ бутони на екрана) и натиснете "OK".
12. Изберете run файл, използвайки ▲ и ▼ бутони на екрана.
За да видите съдържанието на папката, изберете папка и натиснете „Избери“. За да се върнете на предишния файл, натиснете „Назад“.
13. Когато е избран run файла, натиснете "Избери", за да стартирате процеса.
14. Когато процесът приключи и инструментът потвърди, че файлът е запазен на USB стика, натиснете "Затвори".

-
15. Извадете USB стика.
 16. Отворете капака на инструмента.
 17. Отворете вратичката на мястото за касетата и извадете касетата с реагенти, като я повдигнете и изтеглите.
 18. Затворете вратичката.
 19. Отворете рамката, държаща плаката и извадете плаката от нагриващия блок.
 20. Затворете рамката и капака на инструмента.
 21. Изхвърлете плаката и почистете касетата, както е описано в инструкциите на продукта, осигурени с касетата.
 22. Анализирайте процеса според “Протокол 6: Анализ на PyroMark Q24 run”, страница 34.

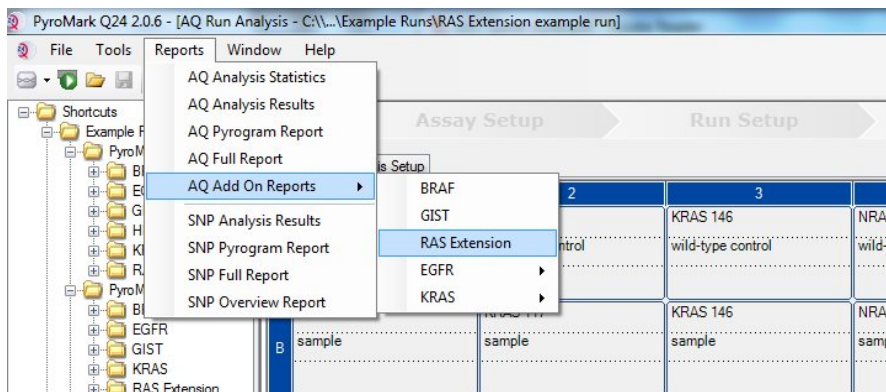
Протокол 6: Анализ на PyroMark Q24 run

Този протокол описва мутационния анализ на проведения *therascreen* RAS Extension Pyro run, използвайки PyroMark Q24 Software.

Процедура

1. Поставете USB стика, съдържащ файл с осъществения run, в USB порта на вашия компютър.
2. Преместете run файла от USB стика към желана от вас локация на компютъра, използвайки Windows Explorer.
3. Отворете файла в AQ форма на PyroMark Q24 Software чрез избиране на „Отвори“ във „Файл“ менюто или чрез двойно натискане на (👉) в shortcut browser.
4. Използвайки RAS разширение Plug-In Report за да се генерира Plug-in report, изберете “AQ Add On Reports/RAS Extension”от “Reports” в менюто (Фигура 6).

Забележка: Мутациите в KRAS кодон 61 трябва допълнително да се анализират с отделен KRAS plug-in, като се избере “AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61” от “Reports” в менюто.



Фигура6. RAS Extension Plug-In Report меню.

Ямките автоматично ще се анализират за всички мутации, за които е даден LOD в Таблица 9, страница 41. Резултатите ще се представят в обща таблица (Фигура 7), последвани от детайлни резултати, с включени пирограми и качествен анализ.

Summary

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

⚠ See detailed results below.

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

Фигура 7. RAS Extension Plug-In Report.

5. Използвайки AQ анализ:

За да анализирате процеса и да получите обобщение на резултатите, натиснете “Анализирай” бутона.



Анализирай всички ямки.

Анализирай избраната ямка.

Анализираните резултати (честота на алелите) и качествената оценка се отчитат при различни позиции на пирограмното проследяване. За повече детайли относно как да анализирате процеса, *PyroMark Q24 Ръководство за потребителя*.

Зада генерирате съобщение, изберете “AQ Full Report” или “AQ Analysis Results” в “Reports” менюто.

Забележка: За надеждни резултати, препоръчваме единични пикове, с дължина над 30 RLU. Въведете 30 RLU като “необходима височина на пик, за да отговаря на качеството” в подготовката на анализи се уверете, че А-пикредуциращият фактор е заложен при 0.86 за анализ на NRAS кодон 61 (виж ПриложениеА: Setting Up *therascreen* RAS Extension Pyro Assays”, страница60, and the *PyroMark Q24 Ръководство за потребителя*).

“AQ анализ на резултатите” протокол, трябва да се използва за документиране и интерпретиране на оценката на алелите. Цифрите, от пирограмите, трябва да се закръглят, а не да се показва точната цифра.

Забележка: Пирограмата трябва винаги да се сравнява с хистограмата, която може да се покаже чрез десен клик върху пирограм прозореца. Измерваните пикове трябва да съвпадат с височината на хистограмните колонки. Виж също така „Интерпретиране на резултатите“, страница 37.

Повторен анализ на проби, при които не е засечена мутация със стандартния “Sequence to analyze” или с “Check” или “Failed” качествена оценка.

Стандартният “Sequence to Analyze” както е определен в Analysis Setup, е адресиран към най - често срещаните точкови мутации при *therascreen* RAS Extension Pyro анализ.

Препоръчваме мануалното реанализиране на всички проби, при които не са отчетени мутации със стандартния “Sequence to Analyze”, както и проби, които получават “Check” или “Failed” качествена оценка. “Check” и “Failed” качествените оценки могат да индикират мутации, които не са отчетени при стандартното

изследване “Sequence to Analyze”, проявяващи се в неочаквани референтни пикове.

За да анализирате и таргетирайте други мутации, отидете до “Създаване на анализ” и променете “Последователност за анализ” на варианти, описани в Таблица 16 и Таблица 17 в Приложение А или варианти на други редки или неочаквани мутации. Натиснете „Добавям” и след това „Към всички”, когато се появи прозорецът „Добавяне не създаване на анализ”.

Променените честоти на мутации в човешки KRAS и NRAS гени се предлагат онлайн от Sanger Институт на www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Забележка: След променяне на “Секвенция за анализ”, се уверете че прага на височина на пиковете е настроен на 30 RLU и , че А-пик редуциращият фактор е нагласен на 0.86 за анализиране на NRAS кодон 61 (виж “Приложение А: Създаване на *therascreen* RAS Extension Pyro анализи”, страница 60).

Забележка: Допълнителни редки и неочаквани мутации могат да присъстват в секвенирания регион и да бъдат анализирани алтернативно чрез “Последователност за анализ”, имайки предвид неочаквани мутации.

Забележка: В случай, че измерваните пикове не съвпадат с височината на хистограмните колони и не могат да се обяснят чрез редки или неочаквани мутации, резултатът не е база за оценка на мутационния статус. Препоръчва се да се изследва на ново пробата.

Интерпретация на резултатите

Интерпретация на резултатите и детекция на нискочестотни мутации

Включвайте проба от контролната ДНК при всяко изследване на всяко пиросеквениращо пускане. Това е изискване за адекватно интерпретиране на резултатите и идентифициране на ниски нива на мутации и като контрола за фоновите нива. Измерената честота на контролната проба трябва да е по-малка или равна на празния лимит (LOB). Стойностите на LOB (празен лимит) и LOD (лимит на детекция) дадени в наръчника, могат да се използват при определяне на откритите мутации. Тези стойности са получени чрез използване на плазмидни миксове, съдържащи див-тип или съответна мутационна последователност.

След анализа, използвайте PyroMark Q24 софтуер или Plug-In Reports, три са възможните резултата. За LOD информация, виж Таблица 9.

- Мутационна честота < LOD: Не е отчетена мутация
- Мутационна честота > LOD + 3 % единици: Мутация
- Мутационна честота \geq LOD and \leq LOD + 3 % единици: Потенциална ниско ниво мутация

Забележка: Ако използвате RAS Extension Plug-In Report (виж стъпка 5 от “Протокол 6: Анализ на PyroMark Q24 пускане”, страница 34) и се появи това, означава предупреждение, че нещо не е наред.

Диапазонът от LOD до LOD + 3 % единици позволява чувствителна детекция на ниски нива мутации при оптимални условия. Измерени честоти над LOB в неметилираната контролна проба, показват по-високо от обикновено ниво на фона

при конкретното пускане, което може да повлияе на оценката на алелите, особено при ниски нива на мутациите. По тази причина резултати с предупреждение „Потенциално ниско ниво мутация“ трябва да бъдат внимателно оценени.

Проби с установено ниско ниво мутации трябва да се разглеждат като позитивни за мутации, ако се потвърдят при следващото пускане, заедно с неметилираната контрола ДНК. Резултатите от двете повторения трябва да отчетат същите мутационни стойности \geq LOD, а контролната проба трябва да отчете „Не е отчетена мутация“. В противен случай пробата трябва да се определи като „Не е отчетена мутация“.

Повишен фон за мутация може да бъде отчетен чрез сравнение на LOB стойностите, описани в наръчника с измерванията, получени при неметилирана контрола ДНК. Проби с потенциално установени ниски нива мутации могат да бъдат определени като „Мутация не е отчетена“ без повторение, ако измерената честота за неметилираната контрола ДНК е по-висока от стойността на LOB, описана в наръчника за съответната мутация. По тази причина са възможни три различни сценария с отчетени потенциални ниски нива мутации.

1. Измерена честота с неметилирана контролна $>$ LOB за тази мутация: Пробата може да се определи като „Мутация не е отчетена“ без повторение.
2. Резултат, който не се повтаря при повторение е същият резултат : Пробата се определя като „Мутация не е отчетена“.
3. Един и същ резултат, получен при повторение и неметилирана контрола ДНК $<$ LOB за сходна мутация : Мутация е отчетена.

Забележка: Пирограмата трябва винаги да се сравнява с хистограмата , която може да се появи с кликане на десен бутон върху прозореца на пирограмата. Измерените пикове трябва да съвпадат с височината на хистограмните колони. Пирограмата трябва да се изследва за присъствие на неочаквани пикове. Ако измерените пикове не съвпадат с височината на хистограмните колони и не могат да се обяснят с редки

или неочаквани мутации, се препоръчва да изследвате отново пробата. Провалени резултати не са основа за определяне на мутационен статус. За да е валидна мутацията, промяна във височината на пика винаги е свързана с промяна във височината на още един пик. Промяната във височината само на един пик не трябва да се смята за индикация на мутация.

Забележка: Препоръчва се употребата на RAS Extension Plug-in Report за интерпретация на резултатите. За по-подробно изследване на проби с отчетен потенциал за ниски нива мутации, препоръчваме допълнително да се изследва пробата ръчно със съответния софтуер (напр. за сравнение с мутационната честота на контролната проба).

Забележка: Решението за лечение на пациенти болни от рак не трябва да се базира единствено на KRAS и NRAS мутационния статус.

Таблица 8. LOB и LOD определени за специфични мутации

Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	LOB (% единици)	LOD (% единици)	COSMIC ID* (V70)
KRAS кодон 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS кодон 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS кодон 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS кодон 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS кодон 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS кодон 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

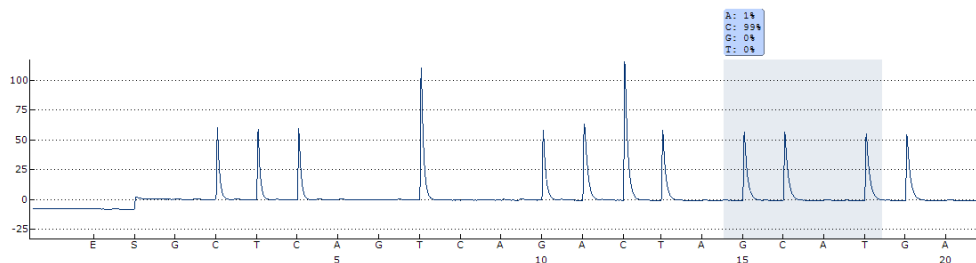
Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	LOB (% единици)	LOD (% единици)	COSMIC ID* (V70)
NRAS кодон 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS кодон 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS кодон 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS кодон 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* От Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, наличен онлайн е Sanger Institute на www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

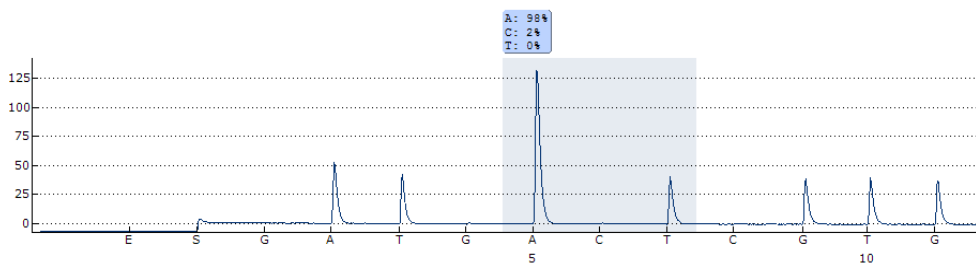
† Най-ниската мутационна честота в проба, даваща резултат от измерена честота \geq LOD.

Представяне на резултати

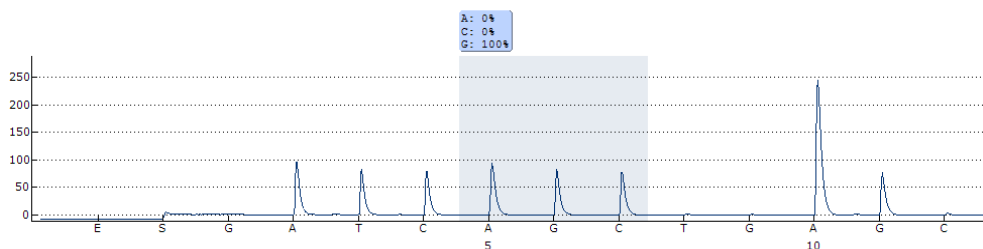
Представените резултатиот пирограмата са посочени от Фигура 8 до Фигура 15.



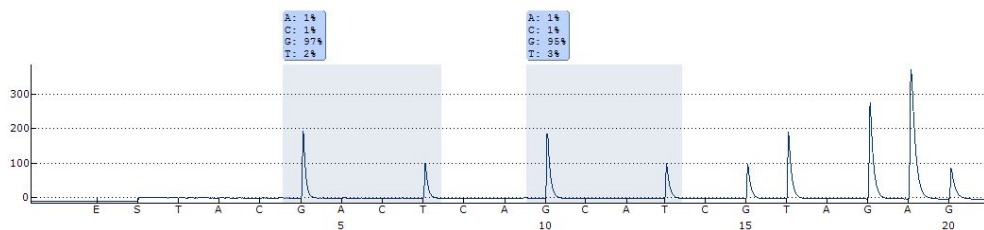
Фигура 8. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с KRAS 59/61 теста.



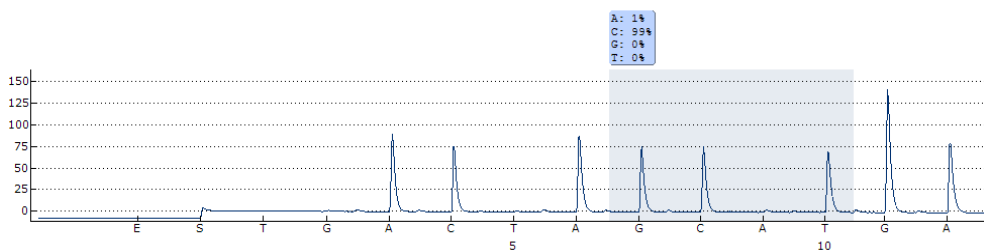
Фигура 9. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с KRAS 117 теста.



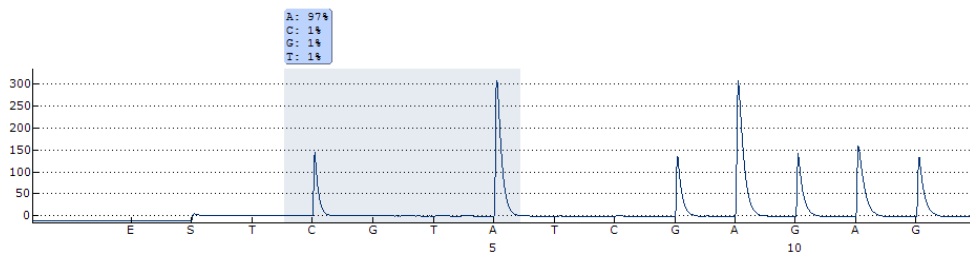
Фигура 10. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с KRAS 146 теста.



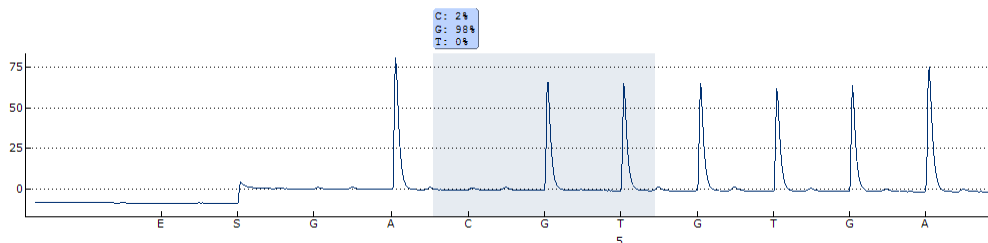
Фигура 11. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с NRAS 12/13 теста.



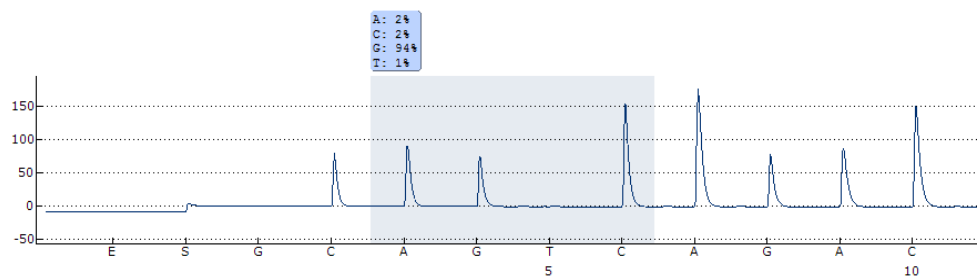
Фигура 12. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с NRAS 59 теста.



Фигура 13. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с NRAS 61 теста.



Фигура 14. Руюграм графика получена след анализ на проба с див генотип с NRAS 117 теста.



Фигура 15. графика получена след анализ на проба с див генотип с NRAS 146 теста.

Инструкции за отстраняване на проблеми

Инструкции за отстраняване на проблеми могат да ви помогнат за решаването на проблеми, които могат да възникнат. За повече информация, вижте също и страницата Frequently Asked Questions на центъра за Техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Специалистите от центъра за Техническа поддръжка на QIAGEN с охота ще ви отговорят на всякакви въпроси свързани с информацията и протоколите в наръчника или с пробата и технологията на анализ (за контакти, вижте корицата или посетете www.qiagen.com).

Коментари и предложения

“Проверка” или “провален” резултат

- | | |
|---|---|
| a) Ниска височина на пиковите | Работните грешки при настройка на PCR или подготовка на пробите преди Пирокеквениране могат да доведат до ниски пикове. Направете функционален тест на филтрираните проби, както е описано в наръчника <i>PyroMark Q24 User Manual</i> регулярно или сменете филтърните проби, когато е необходимо.

В случай на предупреждение “Check”, внимателно сравнете Pyrogram с хистограмата, която може да видите като кликнете с десния бутон на прозореца Pyrogram. Ако измерените пикове съвпадат с тези на хистограмата, резултатът е валиден. В противен случай повторете анализа на пробата. |
| b) Мутации недефинирани в “Секвенция за анализ” | Нагласете “Секвениране за анализ” в основното меню (виж “Приложение A: Създаване на <i>therascreen</i> RAS Extension Pyrogram”, страница 60) и стартирайте процеса. Мутации, които не се покриват от “Секвениране за анализ” могат да се идентифицират чрез инструмента за модел на симулация. |
| c) Неочаквано редки мутации | “Check” or “Failed” качествената оценка може да предизвика неочаквана поява на пикове. Това може да индикира неочаквана мутация, която не може да се анализира от наличното “Секвениране за анализ”. Тези проби трябва да се анализират чрез алтернативно “Секвениране за анализ”, като се има предвид неочакваните мутации. Мутациите, които не се покриват със “Секвениране за анализ” може да се идентифицират чрез симулиращия инструмент (pattern simulation too) |
| d) Високите върхове са предупреждение за отклонение в разпределението | Pyrogram може внимателно да бъде сравнена с хистограмата, която се показва като кликнете с десния бутон на прозореца Pyrogram. В случай, че измерените пикове не съвпадат с тези на хистограмата и не могат да бъдат определени като редки мутации, пробата се анализира повторно . |

Коментари и предложения

Високи фонове

- | | |
|---|--|
| a) Неправилно съхранение на нуклеотидите | Съхранявайте нуклеотидите на 2–8°C. Съхранението на –15 to –30°C може да доведе до високи фонове. |
| b) Кратко охлаждане на пробите преди Пиросеквенционния анализ | Оставете пробите в PyroMark Q24 Plate държача на стайна температура за 10–15 минути. Не скъсявайте времето за охлаждане. |
| c) Замърсяване на касетата | Внимателно почиствайте касетата, както е описано. Съхранявайте касетата защитена от светлина и прах. |

Няма сигнал в позитивната контрола (неметилирана ДНК контрола)

- | | |
|---|--|
| a) Недостатъчно количество от ензимната и субстратната смес | a) Недостатъчно количество от ензимната и субстратната смес |
| b) Реактивите са неправилно съхранявани или разреждени | Подгответе PyroMark Q24 Gold реактивите, според инструкциите за употреба на производителя. |
| c) Погрешно подготвени PCR или проба | Внимателно почистете касетата, както е описано в инструкцията към продукта. Съхранявайте касетата далеч от слънчева светлина и прах. |

Качествен контрол

В съответствие с ISO-сертификата, на Системата за управление на качеството на QIAGEN, всяка партида от кита *therascreen* KRAS Pyro Kit се тества за предварително определени спецификации за осигуряване на постоянно качество на продукта.

Ограничения

Тестът е създаден за детекция на 37 мутации в KRAS или NRAS гени. Проби с резултати, отчетени като “Не е отчетена мутация” може да носят KRAS или NRAS мутации, не включени в анализа.

Детекцията на мутации зависи от вида на пробата и количеството амплификационна ДНК, присъстващо в пробата.

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro се използва при процедура, включваща полимеразна верижна реакция (PCR). Както при всички производители на PCR, пробите могат да се контаминират от външни източници на ДНК по време на тестването и от ДНК в позитивната контрола. Използвайте предпазни мерки, за да избегнете замърсяването на пробите и реакционните реагенти.

Всеки диагностичен резултат, който бъде получен, трябва да се интерпретира съвместно с останалите клинични и лабораторни резултати.

Потребителят е отговорен за валидирането на системата за всяка процедура, провеждана в лабораторията, която не се покрива от проведените изследвания QIAGEN.

Характеристики на изпълнението

Празен лимит и лимит на детекция

Празният лимит (LOB) и лимитът на детекция (LOD) са установени за редица мутации, използвайки смес от плазмиди (Таблица 10). LOB и LOD са установени според препоръките на Институт за Клинични и Лабораторни (CLSI), Наръчник EP17 A2 "Протокол за определяне на лимити на детекция и количествени лимити; одобрен наръчник ". α - и β -грешки (съответно-фалшиво положителни и фалшиво отрицателни) сведени до 5%. LOB стойностите представят измерена честота, получена с див-тип проба. LOD стойностите представят най-ниския сигнал (измерена честота), който може да бъде за положителен за съответната мутация.

Таблица 9. LOB и LOD установени за специфични мутации

Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	LOB (% единици)	LOD (% единици)	COSMIC ID* (V70)
KRAS кодон 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS кодон 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS кодон 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS кодон 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS кодон 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS кодон 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	LOB (% единици)	LOD (% единици)	COSMIC ID* (V70)
NRAS кодон 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS кодон 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS кодон 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS кодон 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* От Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, наличен онлайн в Sanger Institute на www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Най-ниската мутационна честота в проба, даваща резултат от измерена честота \geq LOD.

Мутации GGT >TGT и GGT > GTT в NRAS кодон 13

За тези мутации, празни изследвания са повечето 0 процента единици, получени при негаусово разпространение. LOD все пак се определя, като се използва различен метод, според препоръките на CLSI Наръчник EP17-A. Най-ниският сигнал, индикиращ присъствието на мутация (LOD) при тези позиции е сведен до 2 процента над очакваното базисно ниво, както е определено при 95 процента от празните изследвания. Когато се анализира проба с мутационно ниво, дадено в скобите в

Таблица 9, 95% от резултатите (n=72) дават сигнал, който може да се приеме за положителен (\geq LOD). За LOB/LOD виж Таблица 10.

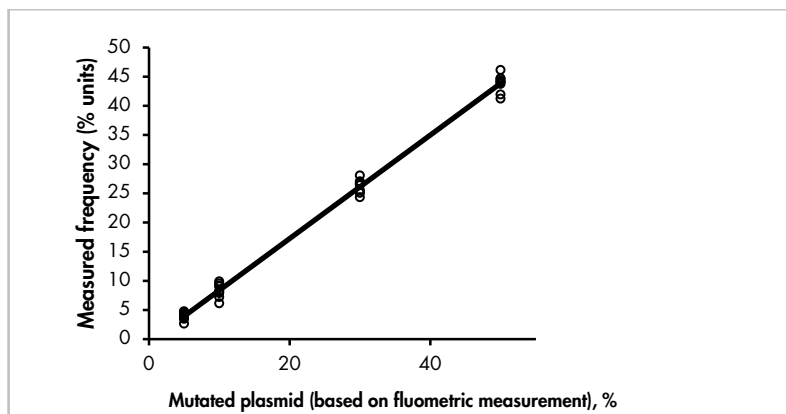
Забележка: PCR и пиросеквениращите праймери за NRAS кодони 12, 13 и 61 се взимат без промяна от *therascreen* NRAS Pyro кита (cat. no. 971530). Информацията за анализна NRAS кодон остава непроменена.

Линейност

Линейността се определя като се използват плазмидни миксове, съдържащи див-тип или мутационна последователност на мутации 176C>G в KRAS кодон 59, 351A>T в KRAS кодон 117, 436G>C в KRAS кодон 146, 34G>A в NRAS кодон 12, 37G>A в NRAS кодон 13, 175G>A в NRAS кодон 59, 182A>G в NRAS кодон 61, 351G>C в NRAS кодон 117 и 437C>T в NRAS кодон 146. Плазмидите са смесени в пропорция да достигнат четири нива мутации (5, 10, 30 и 50%). Всеки микс е анализиран с три различни партии *therascreen* RAS Extension Pyro кит в 3 пиросеквениращи пускания с по три повторения всеки.

Резултатите (n = 9 за всяко ниво мутация) се анализират според CLSI Наръчник EP6-A2 “Оценка на линейността на количественото измерване: статистически подход; утвърдено указание” като се използва Analyse-it[®] Software v2.21. Тези резултати са показани на Фигура 16.

Резултатите са линейни без допустимите нелинейни 5% единичив тестовия диапазон от 5–50% мутационни нива. Подобни резултати се получават за всички мутации на KRAS кодони 59, 117, 146, и NRAS кодони 12, 13, 59, 61, 117 и 146.



Фигура 16. Линеиност на мутацията 176С>G в KRAS кодон 59.

Подобни резултати са получени за всички мутации в KRAS кодони 59, 117, 146 и NRAS 12, 13, 59, 61, 117 и 146.

Точност

Точните данни позволяват определянето на общата променливост на анализите и се постига чрез три различни нива, като се анализира по-горе споменатият микс от плазмиди, с по три повторения всеки.

Повтаряемост (вътрешна в изследването и между партидите променлива) се калкулира спрямо данните за линеиност (три пускания в един и същ ден, като се използват различни партиди *therascreen* RAS Extension Pyro кит). Междинна точност (вътре-лабораторна променлива) се определя с три пускания в една и съща лаборатория за три отделни дни. Пусканията се провеждат от различни оператори, използвайки PyroMark Q24 инструменти, както и много *therascreen* RAS Extension Pyro кита. Повтаряемост (вътре-лабораторна променлива) се изчислява от две пускания, всяко в отделна лаборатория, използвайки различни партиди *therascreen* RAS Extension Pyro Kit .

Точността е изразена със стандартни отклонения на измерената честота на мутации в % единици (Таблица 11).

Таблица 10. Точност на мутациите *

% Мутирал плазмид [†]	Повтаряемост		Междинна точност		Възпроизводимост	
	Средно	SD	Средно	SD	Средно	SD
176C>G в KRAS кодон 59						
5	4.0	0.7	3.8	0.6	4.2	1.1
10	8.4	1.2	8.5	1.0	8.4	1.4
30	26.1	1.2	26.3	1.1	26.8	1.2
50	43.9	1.5	44.0	0.7	43.7	1.3
351A>T в KRAS кодон 117						
5	5.5	1.6	5.5	2.2	7.1	2.0
10	11.0	1.7	10.8	1.4	12.5	2.9
30	30.6	1.7	30.6	2.0	31.9	2.7
50	52.8	2.0	53.5	1.3	54.5	1.6
436G>C в KRAS кодон 146						
5	4.2	0.6	4.1	0.5	3.7	1.2
10	9.6	0.9	9.1	0.9	8.6	1.3
30	29.0	0.9	28.8	1.0	28.1	1.1
50	47.5	1.5	46.8	0.7	45.6	1.9
34G>A в NRAS кодон 12[†]						
5	7.5	1.2	7.3	1.0	6.7	1.3
10	14.6	1.3	13.5	1.1	13.7	1.3
30	37.8	1.9	37.9	1.5	36.1	2.9
50	59.8	1.7	60.4	2.0	57.5	3.1
175G>A в NRAS кодон 59						
5	7.8	0.9	7.3	0.5	7.1	1.3
10	11.9	1.0	11.6	2.0	12.5	1.7
30	29.5	1.1	29.6	1.2	29.9	1.9
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4

% Мутирал плазмид [†]	Повтаряемост		Междинна точност		Възпроизводимост	
	Средно	SD	Средно	SD	Средно	SD
182A>G в NRAS кодон 61						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
351G>C в NRAS кодон 117						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
437C>T в NRAS кодон 146						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

* Всички стойности са дадени като % единици. SD: стандартно отклонение (n=9 за повтаряемост и междинна, n = 12 за възпроизводимост).

[†] На базата на флуорометрично измерване, за 34G>A в NRAS кодон 12 на базата на OD₂₆₀.

Диагностична оценка

Китът *therascreen* RAS Extension Pyro е оценяван в сравнение със Sanger секвениране в две различни проучвания.

Първото проучване е проведено, за да се оцени *therascreen* NRAS Pyro кита в сравнение със Sanger секвениране. ДНК се екстрахира от 100 формалин фиксирани и парафинирани (FFPE) туморни проби от костен мозък и се изследва за мутации в кодони 12/13 и кодон 61.

Анализи, покриващи NRAS кодон 12/13 и 61 в *therascreen* NRAS Pyro кита са включени в *therascreen* RAS Extension Pyro кита без промени, резултатите са получени от оценката на *therascreen* NRAS Pyro кита.

При второто изследване, ДНК е екстрахирана от 110 формалин фиксирани, парафинирани (FFPE) mCRC туморни проби и анализирана за мутации в кодони 59, 61, 117 и 146 на човешкия KRAS и кодони 59, 117 и 146 за човешкия NRAS ген. Ниско честотните мутации са анализирани, чрез употребата на плазмидна ДНК, с добавена див-тип FFPE ДНК.

И при двете изследвания, ДНК е изолирана, чрез кита QIAamp DNA FFPE Tissue Kit и след това анализирана чрез анализите, включени в *therascreen* RAS Extension Pyro, на PyroMark Q24. Sanger секвенирането е извършено с апарата на Applied Biosystems- The Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer.

Оценка на NRAS кодон 12, 13 и 61

От 100 проби, анализирани чрез Sanger секвениране, мутационният статус се определя при 97 проби за кодони 12/13 и кодон 61. При четири от 100 проби, мутация в кодон 12 или кодон 13 се открива чрез Sanger секвениране.

При две от 100 проби, мутационният статус се потвърждава чрез *therascreen* NRAS Pyro Kit и не се отчитат мутации. Резултатите са илюстрирани в Таблица 12. Неса отчетени мутации в кодон 61.

Изключвайки несполучливите пробите и при единия, и при другия метод, *therascreen* NRAS Pyro кита и Sanger секвенирането показват 98% и 100% съвпадение в резултатите за кодони 12/13 и респективно за кодон 61; виж Таблица 12).

Таблица 11. Резултати от анализирани проби за NRAS 12, 13, и 61

		Sanger секвениране				Общо
		Мутант в кодон 12/13	Мутант в кодон 61	Див тип	Неизв.	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro кит	Мутант в кодон 12/13	2	–	–	–	2
	Мутант в кодон 61	–	–	–	–	–
	Див тип	2	–	90	3	95
	Неизв.	–	–	3	–	3
	Общо	4	–	93	3	100

Оценка на KRAS кодон 59, 61, 117, 146, и NRAS кодон 59, 117, 146

ДНК е извлечена от 110 формалин фиксирани, парафинирани (FFPE) mCRC туморни проби и анализирана за мутации в кодони 59, 61, 117 и 146 от човешки KRAS ген и 59, 117 и 146 от човешки NRAS ген. Във връзка с очакваното ниско присъствие в клиничните проби, всички мутации, покрити от *therascreen* RAS Extension китаса анализирани в 56 допълнителни проби плазмидна ДНК, свързана с див-тип FFPE ДНК. Всички мутации са открити и с двата метода – пиро и Sanger-секвениране.

От 166 анализирани проби, съвпадение на резултатите между *therascreen* RAS Extension Pyro кита и Sanger секвенирането е открито при 137 проби (83%).

Случаите на не съвпадение се обясняват с няколко фактора.

Във връзка с високи фонове, 20 проби се провалят при NRAS 59 Sanger секвениращ анализ.

Sanger секвенирането не открива мутации в KRAS 59 и KRAS 61 съответно в 1 и 3 проби. Всичките четири мутации имат ниска честота от пиросеквенирането (7.5–13.1%). Това може да се обясни с ниската чувствителност на Sanger секвенирането (15–20%) сравнена с (5%) (2). Всички други валидни проби са див-тип и при двете техники.

Една проба е обозначена като неразпозната за пиросеквенирането, поради отчитане на двойна мутация (KRAS 59 – 61).

Четири проби, съдържащи ДНК с включен плазмид, показват допълнителна A>G мутация в KRAS кодирана позиция 350, която не се покрива от *therascreen* RAS Extension Pyro кита. Мутациите са открити чрез мануален анализ.

Table 12. Results of the analyzed samples for KRAS codon 59, 61, 117, 146, and NRAS codon 59, 117, 146

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	wt	UK	Total	
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro кит	KRAS 59	8	–	–	–	–	–	1	9	
	KRAS 61	–	6	–	–	–	2	1	9	
	KRAS 117	–	–	4	–	–	–	–	4	
	KRAS 146	–	–	–	3	4	–	–	7	
	KRAS ^a	–	–	–	–	16	–	–	16	
	NRAS ^b	–	–	–	–	–	28	–	28	
	wt	–	–	–	–	–	–	71	16	87
	UK	1	–	–	–	–	–	3	2	6
	Total	9	6	4	3	20	28	76	20	166

UK: Неизв.; wt: див тип.

^a KRAS позитивни проби носещи KRAS 117 и 146 мутации.

^b NRAS позитивни проби носещи мутация в NRAS 59, 117 и 146.

* Една проба е детектирана като мутирала по KRAS 146 но е показала невалиден резултат по NRAS 117.

Чувствителност и специфичност на анализа за всеки кодон са отразени в Таблица 14.

Таблица 13. Чувствителност и специфичност на KRAS кодон 59, 61, 117, 146, и NRAS кодон 59, 117, 146 анализите

	Чувствителност	Специфичност	Обхванати мутации
Мутация KRAS 59	100%	99%	175G>A / 176C>G
Мутация KRAS 61	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Мутация KRAS 117	100%	100%	351A>C / 351A>T
Мутация KRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Мутация NRAS 59	100%	100%	175G>A / 176C>G
Мутация NRAS 117	100%	100%	351G>C / 351G>T
Мутация NRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T















Забележка: При всяко пускане, използвано за определяне на характеристиките на изпълнението, сигналът е над 30 RLU, като нормално се достига от 10 ng ДНК, изолирана от формалин фиксирани, парафинирани тъкани (FFPE). Пиросеквениращата информация се анализира RAS Extension Plug-in Report за KRAS кодони 59, 117 146 и NRAS кодони 59, 117 и 146.

Референции

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

СИМВОЛИ

Следните символи присъстват върху опаковките и етикетите:

Символ	Значение на символа
	Съдържа реагенти за <N> реакции
	Използвайте до
	Ин витро диагностично медицинско изделие
	
	Каталожен номер
	Партиден номер
	Материален номер
	Компоненти
	Съдържа
	Номер
	„Global Trade Item“ номер
	Температурно ограничение
	Производител
	Обърнете се към инструкциите за употреба

Символ

Значение на символа



Внимание

Информация за контакти

За техническа помощ и повече информация, свържете се с нашия Център за техническа поддръжка на www.qiagen.com/Support или се обадете на някой от Отделите за техническа поддръжка или локалния дистрибутор (вижте корицата или посетете www.qiagen.com)

Приложение А: Настройка на *therascreen* RAS Extension Pyro анализ

Ако е инсталиран RAS Extension Plug-in Report, са налични предварителни настройки за анализ на KRAS кодони 59/61, 117, и 146 и NRAS кодони 12/13, 59, 61, 117 и 146 в шорткът брауъра на PyroMark Q24 software. Следвайте пътеката “Примерни файлове/PyroMark Настройки/RAS Extension”. В този случай, следващите стъпки не е необходимо да се изпълняват.


RAS Extension Plug-in Report може да бъде свален от съответния на www.qiagen.com, в раздел „Продуктов ресурс“, секция файлове протоколи.

Препоръчваме употребата на RAS Extension Plug-in Report пред мануалния анализ.

След инсталиране на Plug-in или всеки път, когато се инсталира нов софтуер или се ъпгрейдва компютърът, трябва да се верифицира правилната функция на plug-in, както е описано в RAS Extension Plug-In Quick Guide.

Ако RAS Extension Plug-in Report не се инсталира, файлът за анализ трябва да се настрои ръчно преди разбота за първи път с *herascreen* RAS Extension Pyro. Настройте анализа за KRAS кодони 59/61, 117, и 146 и NRAS кодони 12, 13, 59, 61, 117 и 146 като използвате PyroMark Q24 Software, както е описано по-долу.

Процедура

1. Натиснете  в менюто с инструменти и изберете “Нов AQ анализ”.
2. Таблица 15 показва „Секвенция за анализ“ за анализиране на всичките осем RAS Extension Pyro анализа. Напишете специфичната секвенция на изследването в полето „Секвенция за анализ“.


3. “Секвенция за анализ” също може да бъде променена след пускането, за да се анализира мутация в друга позиция (виж “Протокол 6: Анализ на пускане на PyroMark Q24”, страница 34).
4. За да проверите дали мутациите се срещат и в други нуклеотиди, променете “Секвенция за анализ” според Таблица 15. Промяна на “Секвенция за анализ” е възможна след пускането (ако не е заключено).
Забележка: Уверете се, че трешхолда на височината на всеки пик е настроен до 30 RLU. Допълнително, уверете се, че A-пик редуциращият фактор е нагласен на 0.86 за анализа на NRAS кодон 61.
5. Ръчно въведете анализ специфичния “ред на накапване” от Таблица 15.
Забележка: Не използвайте бутон “Generate Dispensation Order”. Както “Секвенция за анализ”, така и “Dispensation Order” трябва да се напишат ръчно.
6. Натиснете “Параметри на анализа” и повишете “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” до 30.
7. Натиснете  в менюто с инструменти и запазете изследването като “KRAS 59/61” или “KRAS 117” или “KRAS 146” или “NRAS 12/13” или “NRAS 59” или “NRAS 61” или “NRAS 117” или “NRAS 146”.

Таблица 14. Настройка на анализа: “Секвенция за анализ” and “Ред на накапване” за осем анализа с *therascreen* RAS extension Pyro кит

<i>therascreen</i> RAS Extension анализ	Анализирана секвенция	Ред на накапване
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATTT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Таблица 15. Често срещани мутации в човешки KRAS ген, установени с *therascreen* RAS Extension Pyro кит със съответна “Секвенция за анализ”

Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	Анализирана секвенция	Cosmic ID (V70)*
KRAS кодон 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS кодон 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTT\$ACCTGCTGT	550
KRAS кодон 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS кодон 146 (GCA)			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAG\$AAAGA	19900

* От каталога на Соматичните Мутации в the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, available online at the Sanger на www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Таблица 16. Често срещани мутации в човешки NRAS ген, установени чрез *therascreen* RAS Extension Pyro кит, със съответна "Секвенция за анализ"

Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	Анализирана секвенция	Cosmic ID (V70)*
NRAS кодон 12 (GGT)			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	565
NRAS кодон 13 (GGT)			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	575
NRAS кодон 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACAVCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	-
NRAS кодон 117 (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATTT	-
351G>T	K117N	ABTGTGATTT	-
NRAS кодон 61 (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586

Замяна на нуклеотид	Замяна на аминок-на	Анализирана секвенция	Cosmic ID (V70)*
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS кодон 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	-
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	-

* От Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, наличен онлайн в Sanger Institute на www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Приложение В: Изпразване на контейнера за отпадъци и улеите



Внимание

Опасни химикали

Денатуриращият разтвор, който се използва за вакуумната работна станция съдържа натриев хидроксид, който дразни очите и кожата.

Винаги носете предпазни очила, ръкавици и лабораторно облекло.

Отговорното лице (например, лабораторен мениджър) трябва да вземе необходимите предпазни мерки, за да гарантира, че работното място е безопасно и че операторите на инструмента не са изложени на опасни нива на токсични вещества (химични и биологични), които са описани в Safety Data Sheets (SDSs) или OSHA,* ACGIH,† или COSHH‡ документи.

Въздуховодите за дим и изхвърлянето на отпадъците трябва да бъде в съответствие с всички национални, щатски и местни здравни разпоредби и закони.

* OSHA: Трудова безопасност и здравна администрация (United States of America)

† ACGIH: Американска конференция на правителството за индустриална хигиена (United States of America)

‡ COSHH: Контрол на веществата, опасни за здравето (United Kingdom)

Не забравяйте да спазвате федералните, щатските и местните наредби за околна среда за унищожаване на лабораторни отпадъци.

Важна стъпка преди започване

- Този протокол изисква високо пречистена вода.

Процедура

1. Уверете се, че няма вакуум в инструмента за вакуум. Уверете се, че вакуумът е спрян (Off) и вакуумната помпа е изключена.
2. Изхвърлете всички разтвори, останали в ваните.
3. Измийте ваните с високо пречистена вода или ги сменете, ако е необходимо.
4. Изхвърлете контейнера за боклук.
5. Капакът може да бъде отстранен, без да премахвате тръбопровода.

Ако вакуумната работна станция трябва да бъде почистена (например поради натрупване на прах или разливане), следвайте инструкциите PyroMark Q24 User Manual.

Информация за поръчка

Продукт	Съдържание	Cat. no.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	За 24 реакции: Sequencing Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, Buffers, and Reagents	971590
PyroMark Q24 MDx	Платформа за детекция на секвенции за паралелно Пиросеквениране на 24 проби	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Вакуумна работна станция (220 V) за едновременна подготовка на 24 проби, за PCR продукта на еднoверижната матрица	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Анализиращ софтуер	9019063
Accessories		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-ямякова секвенираща реакционна плака	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Касети за поставяне на нуклеотиди и реагенти	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Филтриращи сонди за многократна употреба за PyroMark Vacuum Workstation Q96 and Q24	979010
PyroMark Control Oligo	За инсталационна проверка на системата	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	За потвърждение на изпълнението на системата	979304

Продукт	Съдържание	Cat. no.
Свързани продукти		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	За 50 DNA проби: 50 QIAamp MinElute® Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404

За актуални лицензи и продуктово-специфични ограничения се обърнете към съответния наръчник или инструкции за употреба на QIAGEN. Наръчниците за китовете на QIAGEN и инструкциите за употреба са достъпни на www.qiagen.com или могат да бъдат изискани от QIAGEN Technical Services или от вашия локален дистрибутор.

Тази страница умишлено е оставена празна.

Търговски марки: 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).

Ограничително споразумение за *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Употребата на този продукт обозначава съгласието на всеки търговец или потребител на продукта със следните условия:

1. Продуктът може да се използва само в съответствие с наръчника кита и единствено с включените в кита компоненти. QIAGEN не присъжда никакви лицензи за инкорпориране включените в кита компоненти с компоненти, които не са част от него, с изключение на посоченото в наръчника на кита и допълнителните протоколи, налични на www.qiagen.com.
2. Освен изрично описаните лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този кит и/или неговата употреба няма да наруши правата на трети страни.
3. Китът и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват многократно, да се подновяват или препродават.
4. QIAGEN отрича всякакви други лицензи освен изрично посочените.
5. Купувачът и ползвателят на кита се съгласяват да не позволяват на трети лица по какъвто и да е начин да нарушат някоя от гореспоменатите забрани. QIAGEN може да наложи забраните на това ограничено споразумение във всеки съд и ще покрие всички разходи, свързани с разследване, съдебни такси и хонорари, необходими за налагането на това ограничено споразумение или на някое от интелектуалните му права, свързани с кита и/или неговите компоненти.

За актуални лицензни условия посетете www.qiagen.com.

May-16 NB-1882-002 © 2016 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчки www.qiagen.com/contact | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com