

# Příručka k soupravě *therascreen*<sup>®</sup> GIST RapidScreen Pyro<sup>®</sup> Kit



Verze 1

**IVD**

Pro diagnostiku in vitro



**REF** 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2 **MAT** 1075556CS



# Technologie QIAGEN pro zpracování a analýzu vzorků

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru vzorku až po výsledek.

**QIAGEN určuje standardy pro:**

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

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Obsah

Účel použití	5
Shrnutí a vysvětlení	5
Princip postupu	7
Kontroly	8
Dodávané materiály	9
Obsah soupravy	9
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	10
Upozornění a bezpečnostní opatření	13
Bezpečnostní informace	13
Obecná ustanovení	14
Skladování činidel a manipulace s nimi	14
Manipulace se vzorkem a jeho skladování	15
Postup	15
Izolace DNA	15
Protokol	
■ 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24	17
■ 2: PCR s PCR činidly dodanými v soupravě <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit	20
■ 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance	23
■ 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24	25
■ 5: Spuštění systému PyroMark Q24	29
■ 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24	32
Interpretace výsledků	36
Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu	36
Návod na řešení potíží	40
Kontrola kvality	43
Omezení	43

Charakteristiky funkčních vlastností analýz	43
Mez slepého vzorku a mez detekce	43
Linearita	45
Přesnost	46
Diagnostické vyhodnocení	47
Odkazy	49
Symboly	50
Kontaktní údaje	50
Příloha A: Nastavení pyrosekvenční analýzy <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	52
Příloha B: Vyprázdnění odpadního zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami	56
Informace pro objednávky	58

## Účel použití

Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit je test pro detekci in vitro a slouží pro kvantitativní detekci mutací v exonu 9 lidského genu *KIT* a v exonu 18 lidského genu *PDGFRA* v genomové DNA získané ze vzorků lidské tkáně. Princip je založen na sekvenování nukleových kyselin s využitím technologie Pyrosequencing®.

Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit slouží k tomu, aby poskytovala klinickým lékařům informace, které pomohou při léčbě pacientů s diagnostikovaným gastrointestinálním stromálním tumorem (GIST) tak, aby měli možnost lépe využít léky zacílené na signální dráhy, například imatinib. Pro diagnostiku in vitro.

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

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

Tento výrobek je určen k použití pouze pro profesionální uživatele, jako jsou laboranti nebo lékaři vyškolení v postupech pro diagnostiku in vitro, molekulárně biologických metodách a obsluze systému PyroMark Q24.

Tento produkt není určen k použití se vzorky plicní tkáně.

## Shrnutí a vysvětlení

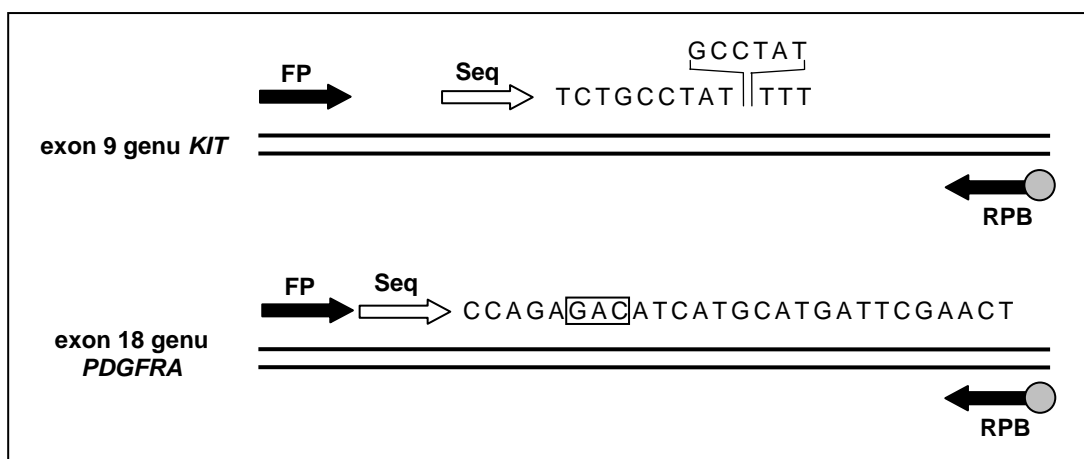
Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit se používá pro kvantitativní měření mutací v exonu 9 genu *KIT* a exonu 18 genu *PDGFRA* (viz obrázek 1). Detekce mutací v exonu 9 genu *KIT* umožňuje použití vhodné dávky imatinibu a detekce mutací v exonu 18 genu *PDGFRA* pomáhá vyřadit méně citlivé nebo odolné genotypy (1–3).

<i>KIT</i> exon 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCAC CGTTTGGAAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATG GCACGGTTGAATGTAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTTAACT TTGCATTTAAAGGTAACAACAAAG
<i>PDGFRA</i> exon 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTG TGAAGATCTGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCGAACTATGTG TCGAAAGGCAGT

Obrázek 1. Genomový obsah sekvenovaných oblastí lidského genu *KIT* a *PDGFRA* (Ensembl ID ENSG00000157404 a ENSG00000134853). Kodon 503 v genu *KIT* a kodon 842 v genu *PDGFRA* jsou označeny čtverečky.

Souprava obsahuje dvě analýzy: jednu k detekci mutací v exonu 9 genu *KIT* a jednu k detekci mutací v exonu 18 genu *PDGFRA* (viz obrázek 2). Pomocí PCR se tyto dvě oblasti odděleně amplifikují a definované oblasti se sekvenují. Sekvence v okolí daných poloh slouží jako normalizační a referenční píky pro kvantifikaci a stanovení kvality analýzy.

**Poznámka:** Obě analýzy jsou sekvenovány v přímém směru.



Obrázek 2. Ilustrace analýzy genu *KIT/PDGFRA*. Označená sekvence je analyzovaná sekvence u vzorku divokého typu. Je znázorněna pozice a sekvence duplikace 6 bp v exonu 9 genu *KIT*. Čtverec označuje kodon 842 exonu 18 genu *PDGFRA*. FP: přímé PCR primery; RPB: zpětné PCR primery (B označuje biotinylation); Seq: sekvenační primery.

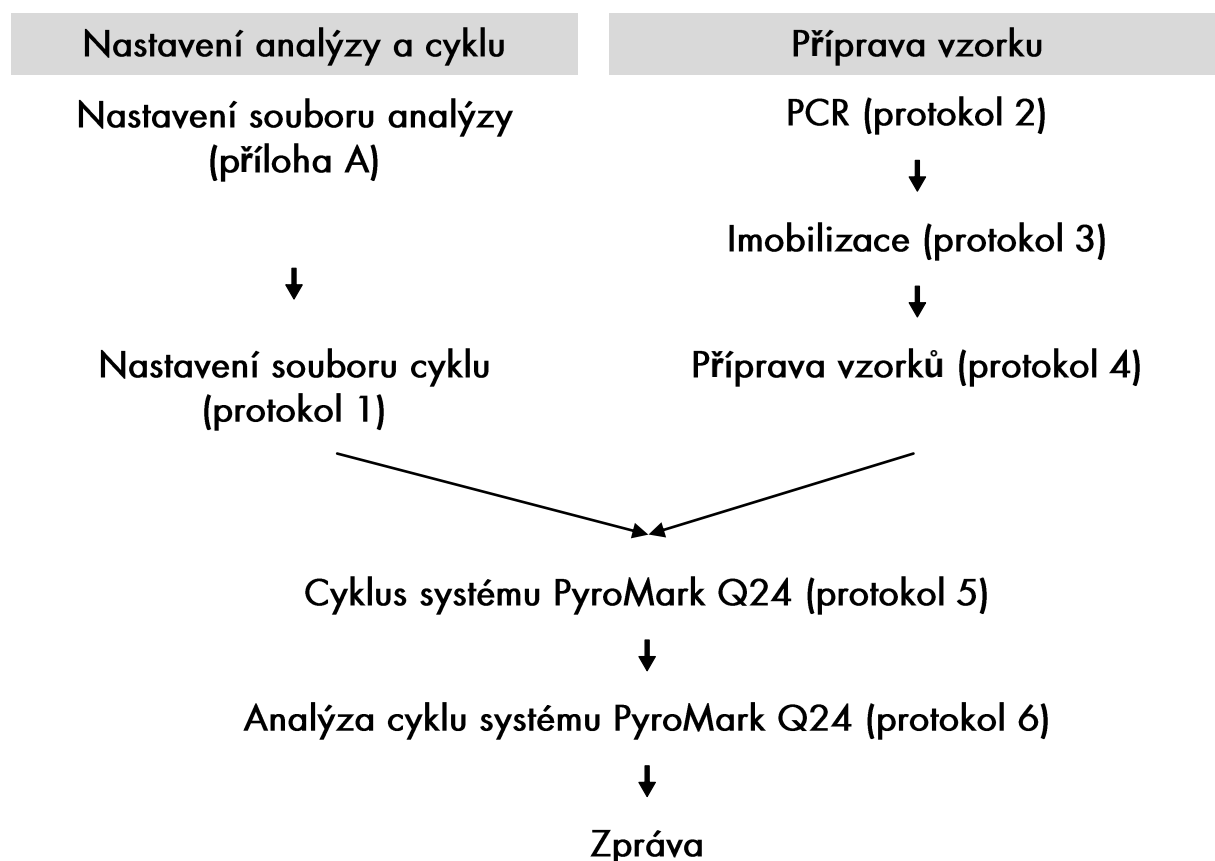
Výrobek obsahuje pro každou analýzu směs PCR primerů a sekvenační primer. Primery jsou dodány v roztoku. Každá lahvička obsahuje 32 µl každého primeru nebo směsi primerů.

## Princip postupu

Na schématu pracovního postupu je zobrazen průběh analýzy. Po PCR s použitím primerů vymezujících exon 9 genu *KIT* a exon 18 genu *PDGFRA* se amplikony imobilizují na kuličky Streptavidin Sepharose® High Performance. Připraví se jednořetězcová DNA a dojde k hybridizaci příslušných sekvenačních primerů a DNA. Vzorky se pak analyzují na zařízení PyroMark Q24 prostřednictvím souborů pro nastavení analýzy a souboru cyklu.

K analýze cyklu je doporučeno použít modul GIST RapidScreen Plug-in Report. Modul GIST RapidScreen Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). K analýze cyklu však lze použít i analytický nástroj, který je součástí systému PyroMark Q24. Po ukončení cyklu lze upravit analyzovanou sekvenci i pro detekci vzácných mutací (viz „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“, strana 32, a „Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro“, strana 52).

### Schéma pracovního postupu analýzy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



## Kontroly

Součástí soupravy je nemethylovaná kontrolní DNA jako pozitivní kontrola pro PCR a sekvenační reakce. Tato kontrolní DNA má v oblastech sekvenovaných pomocí této soupravy genotypy divokého typu a je vyžadována k interpretaci adekvátních výsledků a identifikaci nízkoúrovňových mutací (viz „Interpretace výsledků“, strana 32). Zahrnuje vzorek s nemethylovanou kontrolní DNA pro každou analýzu ve všech cyklech pyrosekvenování.

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



## Dodávané materiály

### Obsah soupravy

#### *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit (krabice 1/2)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	(24)
Katalogové č.	971510
Počet reakcí	24
Seq Primer KIT exon 9	32 $\mu$ l
Seq Primer PDGFRA exon 18	32 $\mu$ l
PCR Primer Mix KIT exon 9	32 $\mu$ l
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18	32 $\mu$ l
PCR master mix PyroMark, 2x	850 $\mu$ l
CoralLoad <sup>®</sup> Concentrate (Koncentrát CoralLoad <sup>®</sup> ), 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA (Nemethylovaná kontrolní DNA), 10 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l

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

Pufry a činidla <i>therascreen</i> Pyro	
PyroMark Binding Buffer (Vazebný pufr PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Hybridizační pufr PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Denaturační roztok PyroMark)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer (Promývací pufr PyroMark), 10x	25 ml
Enzyme Mixture (Směs enzymů)	1 lahvička
Substrate Mixture (Směs substrátů)	1 lahvička
dATP $\alpha$ S	1 180 $\mu$ l
dCTP	1 180 $\mu$ l
dGTP	1 180 $\mu$ l
dTTP	1 180 $\mu$ l
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (anglicky)	1

\* Obsahuje hydroxid sodný.

## Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

### Činidla

- Souprava na izolaci DNA (viz „Izolace DNA“, strana 15)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat. č. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))

- Vysoce čištěná voda (Milli-Q® 18,2 M $\Omega$  x cm nebo ekvivalent)

**Poznámka:** Součástí dodávky je dostatečný objem vody pro PCR, imobilizaci DNA a k rozpuštění směsi enzymů a směsi substrátů. Další vysoce čištěná voda je nutná na ředění promývacího pufru PyroMark, 10x.

- Ethanol (70%)\*

### Spotřební materiál

- Sterilní špičky na pipety (s filtry pro nastavení PCR)
- Destičky pro PCR s 24 jamkami (viz „Doporučené destičky s 24 jamkami“, strana 12)
- Zalepovací fólie

### Vybavení

- Pipety (nastavitelné)†
- Stolní mikrocentrifuga\*
- Termocykler\* a příslušné PCR zkumavky
- PyroMark Q24 (kat. č. 9001513 nebo 9001514)\*‡
- Software PyroMark Q24 (kat. č. 9019063 nebo 9019062)†
- Destičky PyroMark Q24 (kat. č. 979201)†
- Kazeta PyroMark Q24 (kat. č. 979202)†
- Vakuová stanice PyroMark Q24 (kat. č. 9001515 nebo 9001517)\*†
- Mísič destiček\* pro imobilizaci na kuličky (viz „Doporučené míchačky destiček“, strana 12)
- Topný blok\* s dosažitelnou teplotou 80 °C

\* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje jiné látky, například metanol nebo metyletylketon.

† Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

‡ Označení CE-IVD je v souladu se směrnicí Evropské unie 98/79/ES. Všechny ostatní uvedené výrobky nemají označení CE-IVD podle směrnice Evropské unie 98/79/ES.

## Doporučené destičky s 24 jamkami

Destičky s 24 jamkami doporučené k použití se soupravou *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1. Destičky s 24 jamkami doporučené k použití se soupravou *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

Výrobce	Výrobek	Katalogové číslo
ABgene (Thermo Scientific)	Destička Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate (Mikrodestička s 24 jamkami pro PCR)	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes (96 jamek, bezbarvé zkumavky)	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame (bezrámové PCR destičky)	G030

## Doporučené míchačky destiček

Orbitální míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2. Míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

Výrobce	Výrobek	Katalogové číslo
Eppendorf	Thermomixer comfort (základní zařízení)	5355 000.011
	Termoblok pro MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates (adaptační destička na PCR zkumavky 96 x 0,2 ml ke vložení do bloků pro mikrotitrační destičky)	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro.

### Bezpečnostní informace

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

Na komponenty soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit se vztahují následující bezpečnostní věty a bezpečnostní opatření:

#### PyroMark Denaturation Solution



Varování! Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Může být korozivní pro kovy. Uniklý produkt absorbujte, aby se zabránilo materiálnímu škodám. Uchovávejte pouze v původním obalu. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

## Obecná ustanovení

Uživatel musí vždy věnovat pozornost následujícím okolnostem:

- Pro dosažení optimálních výsledků je nutné přísně dodržovat pokyny v návodu pro uživatele. Jiné ředění činidel než to, které je popsáno v této příručce, se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu.
- Součástí tohoto produktu stačí k provedení 24 reakcí v až 5 nezávislých cyklech.
- Používejte sterilní špičky na pipety (s filtry pro PCR).
- Pozitivní materiály (vzorky, pozitivní kontroly a amplikony) se musí skladovat a extrahovat odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Před zahájením analýzy důkladně rozmrazte všechny složky na pokojovou teplotu (15 až 25 °C).
- Po rozmrazení složky promíchejte (opakovaným pipetováním nahoru a dolů nebo na pulsní třepačce) a krátce odstředte.
- Na základě nezdařených výsledků nelze posuzovat stav mutací.

## Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit se dodává ve dvou krabicích. Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit (krabice 1/2) se dodává v suchém ledu. PCR master mixy PyroMark, koncentrát CoralLoad, nemethylovaná kontrolní DNA a všechny primery musí být při dodání uloženy při teplotě -15 až -30 °C.

Krabice s pufrů a činidly *therascreen* Pyro (krabice 2/2) obsahuje pufrů, směs enzymů, směs substrátů, dATP $\gamma$ S, dCTP, dGTP a dTTP (činidla na pyrosekvenční analýzu) a dodává se v chladičím obalu. Při dodání by měly být uvedené součásti uloženy při teplotě 2 až 8 °C. Z důvodu minimalizace ztráty aktivity se doporučuje uchovávat směs enzymů i substrátů v dodaných lahvičkách.

Rekonstituované směsi enzymů nebo substrátů jsou stabilní po dobu nejméně 10 dnů při teplotě 2 až 8 °C. Rekonstituované směsi enzymů nebo substrátů lze zamrazit a uložit v původních lahvičkách při teplotě -15 až -30 °C. Zmražená činidla by neměla prodělat opakované zmražení/rozmražení více než třikrát.

**Poznámka:** Nukleotidy se nesmí zamrazovat.

Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit je stabilní až do doby použitelnosti soupravy, uchovává-li se za stanovených podmínek.

## Manipulace se vzorkem a jeho skladování

Všechny vzorky jsou potenciálně infekční a podle toho se s nimi musí zacházet.

Materiál vzorků tvoří lidská DNA extrahovaná z krve nebo vzorků tkání fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE).

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

## Postup

### Izolace DNA

Funkční parametry systému pro extrakci lidské DNA ze vzorků tumorů fixovaných formalinem zalitých v parafinu byly stanoveny pomocí souprav EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit a QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit. U systému QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit byla funkčnost stanovena u vzorků krve od zdravých dárců s přidavkem nádorových buněk.

K purifikaci DNA z daných typů lidských vzorků pro účely soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit jsou validovány soupravy QIAGEN uvedené v tabulce 3. Purifikaci DNA provádějte podle pokynů v příručkách k daným soupravám.

**Tabulka 3. Doporučené soupravy na purifikaci DNA pro účely soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

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

\* Postupujte dle protokolu pro použití tkání zalitých v parafinu. Souprava EZ1 DNA Tissue Kit je určena k použití společně se stanicí EZ1 Advanced (kat. č. 9001410 nebo 9001411) a kartou EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9018298), se stanicí EZ1 Advanced XL (kat. č. 9001492) a kartou EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card

(kat. č. 9018700) nebo se stanicí BioRobot® EZ1 (kat. č. 9000705; již není v nabídce) a kartou EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9015862).

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



# Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24



## Důležitý bod před zahájením

- V případě potřeby lze získat celý rozsah výsledků ověřením meze vzorku divokého typu na normálním vzorku. Bližší informace naleznete v pokynech CLSI EP17-A „Protokol pro určení mezí detekce a mezí kvantifikace, schválené pokyny“.

## Úkony před zahájením

- Pokud nebyl nainstalován modul GIST RapidScreen Plug-in Report, vytvořte nastavení analýzy (viz „Příloha A: Nastavení pyrosekvenční analýzy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro“, strana 52). To je třeba provést pouze jednou před prvním spuštěním pyrosekvenčních analýz *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Pokud byl nainstalován modul GIST RapidScreen Pyro Plug-in Report, jsou v prohlížeči zkratk software PyroMark Q24 ve složce „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ k dispozici předem definovaná nastavení analýz. Modul GIST RapidScreen Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Postup

1. Klikněte na tlačítko  na panelu nástrojů.  
Vytvořil se nový soubor cyklu.
2. Zadejte parametry cyklu (viz část „Parametry cyklu“ na straně 18).
3. Nastavte destičku přiřazením analýzy exonu 9 genu KIT i exonu 18 genu PDGFRA k jamkám odpovídajícím daným testovaným vzorkům.  
**Poznámka:** Pro alespoň jednu analýzu lze zahrnout do každého nastavení PCR i negativní kontrolní vzorek (bez templátu DNA).  
**Poznámka:** Zahrnuje vzorek s nemetylovanou kontrolní DNA pro každou analýzu ve všech cyklech pyrosekvenování („Kontroly“, strana 8).
4. Jakmile je cyklus nastaven a systém PyroMark Q24 připraven ke spuštění, vytiskněte si seznam požadovaných objemů směsi enzymů, směsi substrátů, nukleotidů a uspořádání destičky. Z nabídky „Tools“ (Nástroje) vyberte položku „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním cyklu) a po zobrazení zprávy klikněte na tlačítko .
5. Zavřete soubor cyklu a pomocí Průzkumníku Windows® jej zkopírujte na jednotku USB dodanou se systémem.

Vytištěnou zprávu s informacemi před spuštěním cyklu použijte jako šablonu při nanášení vzorků (viz „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ na straně 23).

Spuštění analýzy destičky na systému PyroMark Q24 viz „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 29.

## Parametry cyklu

„Run name“ (Název cyklu):	Název cyklu je dán uložením souboru. Přejmenováním souboru dojde i ke změně názvu cyklu.
„Instrument method“ (Metoda přístroje):	Vyberte metodu přístroje podle kazety, která se bude pro daný cyklus používat. Viz pokyny dodané s výrobky.
„Plate ID“ (ID destičky):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte ID destičky PyroMark Q24.
„Bar code“ (Čárový kód):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte číslo čárového kódu destičky. Máte-li případně k počítači připojenou čtečku čárových kódů, kód přečtete čtečkou. Ukazatel myši nastavte (a klikněte) do textového pole „Barcode“ (Čárový kód) a sejměte čárový kód.
„Kit and Reagent ID“ (ID soupravy a činidla):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte číslo šarže soupravy <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit krabice 1 a krabice 2, která bude použita. Číslo šarže je uvedeno na štítku výrobku.  <b>Poznámka:</b> Doporučuje se zadávat čísla šarží, aby bylo možné v případě potřeby vysledovat neočekávané problémy se soupravou <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit.
„Run note“ (Poznámky k cyklu):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte poznámku k obsahu nebo účelu cyklu.

## Přidání souborů analýz

Analýzu lze k jamce připojit některým z těchto způsobů:

- Klikněte na jamku pravým tlačítkem a z místní nabídky vyberte položku „Load Assay“ (Načíst analýzu).
- Vyberte analýzu v prohlížeči zkratk, klikněte na ni a přetáhněte na jamku. Jamka se označí barevně podle zvolené načtené analýzy.

## Zadání ID vzorků a poznámek

Chcete-li zadat ID vzorku nebo poznámku, vyberte buňku a zadejte text.

Chcete-li ID vzorku nebo poznámku upravit, vyberte buňku (stávající obsah se označí) nebo na buňku dvakrát klikněte.

## Protokol 2: PCR s PCR činidly dodanými v soupravě *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit

Tento protokol popisuje amplifikace PCR oblasti obsahující exon 9 genu *KIT* a samostatnou amplifikaci PCR oblasti obsahující exon 18 genu *PDGFRA* s použitím soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit.

### Důležité body před zahájením

- DNA polymeráza HotStarTaq® v master mixu PyroMark PCR vyžaduje aktivační krok **15 min při 95 °C**.
- Všechny reakční směsi připravujte před zahájením pyrosekvenační analýzy v prostoru odděleném od prostoru určeného na purifikaci DNA, přidávání templátu do PCR, analýzy PCR produktů nebo přípravy vzorků.
- Používejte jednorázové špičky obsahující hydrofobní filtry z důvodu minimalizace křížové kontaminace.

### Úkony před zahájením

- Zkumavky s PCR primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Upravte koncentraci kontroly a DNA vzorku dle potřeby na 0,4–2 ng/μl.

### Postup

1. **Všechny potřebné složky rozmrazte (viz tabulka 4).**  
Před použitím řádně promíchejte.
2. **Pro každou sadu PCR primerů připravte reakční směs podle tabulky 4.**  
Reakční směs obvykle obsahuje všechny složky nutné pro provedení PCR kromě vzorku.  
Reakční směs připravte v objemu vyšším než je nutné pro provedení celkového počtu PCR analýz.

**Tabulka 4. Příprava reakční směsi pro každou směs PCR primerů**

Složka	Objem na reakci
PCR master mix PyroMark, 2x	12,5 µl
Koncentrát CoralLoad, 10x	2,5 µl
PCR Primer KIT exon 9 <b>nebo</b> PCR Primer PDGFRA exon 18	1 µl
Voda (H <sub>2</sub> O, součást dodávky)	4 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>20 µl</b>

**3. Reakční směs řádně promíchejte a naneste 20 µl do každé PCR zkumavky.**

Není nutné mít PCR zkumavky uložené v ledu, neboť HotStarTaq DNA polymeráza je při laboratorní teplotě neaktivní.

**4. Do jednotlivých PCR zkumavek přidejte 5 µl templátu DNA (2–10 ng genomové DNA) (tabulka 5) a důkladně promíchejte.**

**Poznámka:** Pro alespoň jednu analýzu lze zahrnout do každého nastavení PCR i negativní kontrolní vzorek (bez templátu DNA).

**Poznámka:** Zahrnuje vzorek s nemetylovanou kontrolní DNA pro každou analýzu ve všech cyklech pyrosekvenování (viz „Kontroly“, strana 8).

**Tabulka 5. Příprava PCR**

Složka	Objem na reakci
Reakční směs	20 µl
Vzorek DNA	5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>25 µl</b>

5. Termocykler naprogramujte podle pokynů výrobce na podmínky uvedené v tabulce 6.

Tabulka 6. Optimalizovaný protokol cyklování

			Poznámky
Iniciační aktivační krok:	15 minut	95 °C	Tento zahřívací krok slouží k aktivaci HotStarTaq DNA polymerázy.
Cyklování ve 3 krocích:			
Denaturace	20 sekund	95 °C	
Hybridizace	30 sekund	53 °C	
Polymerizace	20 sekund	72 °C	
Počet cyklů	42		
Konečná hybridizace:	5 minut	72 °C	

6. Uložte PCR zkumavky do termocykleru a spusťte cyklovací program.
7. Po ukončení amplifikace pokračujte částí „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ na straně 23.

Tyto vzorky PCR lze uchovávat teplotě 2–8 °C až 3 dny.

## Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance

Tento protokol popisuje imobilizaci templátu DNA na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare), která musí předcházet analýze na systému PyroMark Q24.

### Úkony před zahájením

- Před zahájením imobilizace nechte všechna požadovaná činidla a roztoky temperovat na laboratorní teplotu (15–25 °C).
- Zapněte systém PyroMark Q24 alespoň 30 minut před zahájením cyklu. Hlavní vypínač je umístěn na zadní straně přístroje.
- Jeden stojan na destičky PyroMark Q24 uložte na topný blok předehřátý na teplotu 80 °C. Druhý stojan na destičky PyroMark Q24 ponechte v prostředí s laboratorní teplotou (15–25 °C).
- Promývací pufr PyroMark je dodáván v 10x koncentrované formě. Před prvním použitím naředěte 1 dávku pracovního roztoku: k 25 ml 10x koncentrovaného promývacího pufru PyroMark přidejte 225 ml vysoce čištěné vody (konečný objem bude 250 ml).

**Poznámka:** Pracovní roztok promývacího pufru 1x PyroMark je stabilní při 2–8 °C až do vyznačené doby použitelnosti.

- Nachystejte vakuovou stanici PyroMark Q24 na přípravu vzorku podle návodu v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24.

### Postup

1. Jemně protřepejte lahvičku obsahující Streptavidin Sepharose High Performance, aby byl roztok homogenní.
2. Připravte master mix pro imobilizaci DNA podle tabulky 7.  
Připravte větší objem než je požadované množství pro celkový počet reakcí (počet reakcí + jedna dávka navíc).

**Tabulka 7. Master mix pro imobilizaci DNA**

Složka	Objem na vzorek
Vazebný pufr PyroMark	40 µl
Streptavidin Sepharose High Performance	1 µl
Voda (H <sub>2</sub> O, součást dodávky)	29 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>70 µl</b>

**Poznámka:** Tento protokol platí pro Streptavidin Sepharose High Performance s číslem šarže 10057037 nebo vyšším. Při použití kuliček Streptavidin Sepharose High Performance Beads s číslem šarže nižším než 10057037 musí být objem kuliček na vzorek zvýšen na 2 µl, a zároveň je nutné ve stejném poměru snížit objem vody.

- 3. Naneste 70 µl master mixu do jamek na 24jamkové PCR destičce podle předem definovaného nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 17).**

Sepharosové kuličky rychle sedimentují. Zajistěte homogenitu činidla master mix častým promícháním pomocí pipety nebo pulzní třepačky. Pracovní master mix neodstřeďujte.

- 4. Do každé jamky obsahující master mix přidejte 10 µl biotinylovaného PCR produktu z protokolu 2 podle předem definovaného nastavení cyklu (viz „Protokol 2: PCR s PCR činidly dodanými v soupravě *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit“ na straně 20).**

Po nanesení master mixu i PCR produktu by celkový objem v jamce měl být 80 µl.

- 5. Pomocí zalepovací fólie zalepte PCR destičku.**

Zkontrolujte, zda nemůže dojít k přetékání kapaliny mezi jamkami.

- 6. Míchejte PCR destičku při laboratorní teplotě (15–25 °C) po dobu 5–10 min při 1400 ot./min.**

Při tomto kroku pokračujte ihned částí „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenanční analýzou na systému PyroMark Q24“, strana 25.



## Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosequenční analýzou na systému PyroMark Q24

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

### Důležité body před zahájením

- Zkumavky se sekvenačními primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Podle toho, kterou oblast chcete analyzovat (exon 9 genu *KIT* nebo exon 18 genu *PDGFRA*), naneste 2 různé sekvenační primery podle stejného vzoru, který byl definován v nastavení cyklu pro danou destičku (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 17).
- Dobu chlazení vzorků po jejich zahřátí na 80 °C nezkracujte.
- Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24, a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.

### Postup

1. Nařed'te dostatečné množství každého sekvenačního primeru, Seq Primer KIT exon 9 a Seq Primer PDGFRA exon 18, hybridizačním pufrem PyroMark podle tabulky 8.

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

Neřed'te a uložte více sekvenačních primerů.

Tabulka 8. Příklad ředění sekvenačních primerů

Složka	Objem na vzorek	Objem na 9 + 1 reakcí
Hybridizační pufr PyroMark	24,2 $\mu$ l	242 $\mu$ l
Seq Primer KIT exon 9 <b>nebo</b> Seq Primer PDGFRA exon 18	0,8 $\mu$ l	8 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>250 <math>\mu</math>l</b>

- Do každé jamky na destičce PyroMark Q24 naneste 25  $\mu$ l naředěného sekvenačního primeru podle vzoru v nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 17).

Jeden stojan na destičky PyroMark Q24 (součást dodávky vakuové stanice PyroMark Q24) uchovávejte při laboratorní teplotě (15–25 °C) a používejte jej jako pomůcku při přípravě a přenášení destičky.

- Zapněte vývěvu vakuové stanice PyroMark Q24.
- Uložte PCR destičku z protokolu 3 a destičku PyroMark Q24 na podtlakovou pracovní stanici (obrázek 3).

Prohlédněte PCR destičku a ujistěte se, že se v roztoku nachází kuličky Sepharose. Zkontrolujte, zda je PCR destička otočena stejně, jako při nanášení vzorků.



Obrázek 3. Uložení PCR destičky a destičky PyroMark Q24 do vakuové stanice.

5. Otevřete přívod vakua a zaveďte vakuum do vakuové hlavice.
6. Pomalu spustíte filtrační sondy vakuové hlavice do PCR destičky a odeberte kuličky obsahující imobilizovaný templát. Sondy ponechejte na místě po dobu 15 sekund. Při zvedání vakuové hlavice postupujte velmi opatrně.

Sepharosové kuličky rychle sedimentují. Kuličky je nutné odebrat okamžitě po míchání. Pokud od míchání destiček uplyne více než 1 minuta, promíchejte je před odběrem kuliček znovu po dobu 1 minuty.

Prohlédněte PCR destičku, zda obsahuje všechny vzorky z vakuové hlavice.

7. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml 70% ethanolu (vanička 1, obrázek 3). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
8. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml denaturačního roztoku (vanička 2, obrázek 3). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
9. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 50 ml promývacího pufru (vanička 3, obrázek 3). Proplachujte filtrační sondy po dobu 10 sekund.
10. Zvedněte vakuovou hlavici nahoru, naklopte ji svisle přes 90° a po dobu 5 sekund nechte tekutinu na filtračních sondách oschnout (obrázek 4).



Obrázek 4. Zobrazení vakuové hlavice naklopené svisle přes 90°.

11. Podržte vakuovou hlavici nad destičkou PyroMark Q24 a zavřete přívod vakua na hlavici (poloha Off).
12. Ponořte filtrační sondy do rozředěného sekvenačního primeru a jemným pohybem vakuové hlavice do stran uvolněte kuličky do destičky PyroMark Q24.  
Dbejte na to, aby nedošlo ke zničení povrchu destičky PyroMark Q24 poškrábáním filtračními sondami.
13. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující vysoce čištěnou vodu (vanička 4, obrázek 3) a po dobu 10 sekund hlavici míchejte.

14. Promyjte filtrační sondy tak, že je ponoříte do vysoce čištěné vody (vanička 5, obrázek 3) a zavedete vakuum. Opláchněte sondy 70 ml vysoce čištěné vody.
15. Zvedněte vakuovou hlavici nahoru, naklopte ji svisle přes 90° a po dobu 5 sekund nechte tekutinu na filtračních sondách oschnout (obrázek 4).
16. Zavřete přívod vakua na hlavici (poloha Off) a uložte vakuovou hlavici do zajištěné polohy (P).
17. Vypněte vakuovou pumpu.  
Na konci pracovního dne je potřeba zlikvidovat odpadní a zbytkové roztoky a zkontrolovat vakuovou stanici PyroMark Q24, zda není znečištěna prachem a potřísněna tekutinami. Viz „Příloha B: Vyprázdnění odpadního zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami“, strana 56).
18. Ohřejte destičku PyroMark Q24 se vzorky na 80 °C po dobu 2 minut s využitím předehřátého stojanu na destičky PyroMark Q24.
19. Odeberte destičku PyroMark Q24 z horkého stojanu, položte ji na druhý stojan PyroMark Q24 umístěný v prostředí s laboratorní teplotou (15–25 °C) a nechte vzorky vychladnout na laboratorní teplotu po dobu 10–15 minut.
20. Pokračujte částí „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 29.

## Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24

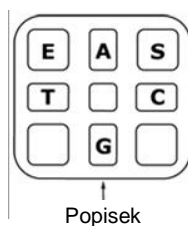
Tento protokol popisuje přípravu a nanesení činidel PyroMark Gold Q24 na kazetu PyroMark Q24 a zahájení a ukončení cyklu systému PyroMark Q24. Podrobnější popis uvádějící nastavení cyklu naleznete v *příručce pro uživatele systému PyroMark Q24*.

### Důležité body před zahájením

- Ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním cyklu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení cyklu (viz „Protokol 1: Nastavení cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 17), jsou uvedeny informace o objemu nukleotidů, enzymů, substrátů a pufrů nutných pro provedení daného cyklu.
- Pro plnění kazety použijte jednorázové špičky bez hydrofobních filtrů, aby byla zajištěna správná funkce kazety.

### Postup

1. **Rozpusťte každou lyofilizovanou směs enzymů a směs substrátů vždy v 620 µl vody (H<sub>2</sub>O, součást dodávky).**
2. **Míchání proveďte mírným kroužením lahvičkou.**  
Nepoužívejte třepačku!  
Aby bylo zajištěno úplné rozpuštění směsi, ponechte ji v prostředí s laboratorní teplotou (15–25 °C) po dobu 5–10 minut. Před započítáním plnění kazety PyroMark Q24 se přesvědčte, že roztok není zakalený. Pokud nemají být činidla bezprostředně použita, uložte lahvičky s činidly na led nebo do ledničky.
3. **Umožněte činidlům a kazetě PyroMark Q24 získat okolní teplotu (20–25 °C).**
4. **Umístěte kazetu PyroMark Q24 tak, aby byla natočena štítkem k vám.**
5. **Naneste na kazetu PyroMark Q24 příslušné objemy nukleotidů, směsi enzymů a směsi substrátů podle obrázku 5.**  
Přesvědčte se, že se z pipety nepřenesly do kazety žádné vzduchové bubliny.



Obrázek 5. Obrázek kazety PyroMark Q24 shora. Popisy odpovídají štítkům na lahvičkách s činidly. Přidejte směs enzymů (E), směs substrátů (S) a nukleotidy (A, T, C, G) podle údajů o objemech uvedených ve zprávě Pre Run information (Informace před spuštěním cyklu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení cyklu.

6. Otevřete dvířka kazety a vložte kazetu naplněnou činidly štítkem ven. Kazetu zcela zasuňte a zatlačte dolů.
7. Zkontrolujte, zda je vidět linka na přední straně kazety, a zavřete dvířka.
8. Otevřete rámeček na upevnění destičky a umístěte destičku na topný blok.
9. Zavřete rámeček na upevnění destičky a víko přístroje.
10. Do USB portu na přední straně přístroje zasuňte USB jednotku (obsahující soubor cyklu).  
USB jednotku nechte zasunutou až do ukončení cyklu.
11. Z hlavní nabídky vyberte příkaz „Run“ (Spustit) pomocí tlačítek ▲ a ▼ na obrazovce a stiskněte tlačítko „OK“.
12. Pomocí tlačítek ▲ a ▼ na obrazovce vyberte soubor cyklu.  
Chcete-li si prohlédnout obsah složky, vyberte danou složku a stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat). Chcete-li se vrátit zpět na předchozí zobrazení, stiskněte tlačítko „Back“ (Zpět).
13. Máte-li vybraný požadovaný cyklus, stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat).
14. Jakmile se cyklus dokončí a přístroj potvrdí, že soubor cyklu byl uložen na USB jednotku, stiskněte tlačítko „Close“ (Zavřít).
15. Vyjměte USB jednotku.
16. Otevřete víko přístroje.
17. Otevřete dvířka kazety a kazetu s reagenty nadzdvihněte a vytáhněte ven.
18. Zavřete dvířka.
19. Otevřete rámeček na upevnění destičky a odeberte destičku z topného bloku.
20. Zavřete rámeček na upevnění destičky a víko přístroje.
21. Destičku zlikvidujte a kazetu vyčistěte podle návodu k výrobku, který je součástí dodávky kazety.

22. Proveďte analýzu cyklu, jak je popsáno v tématu „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“ na straně 32.

## Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24

Tento protokol popisuje analýzu mutací po dokončeném cyklu GIST RapidScreen pomocí softwaru PyroMark Q24.

### Postup

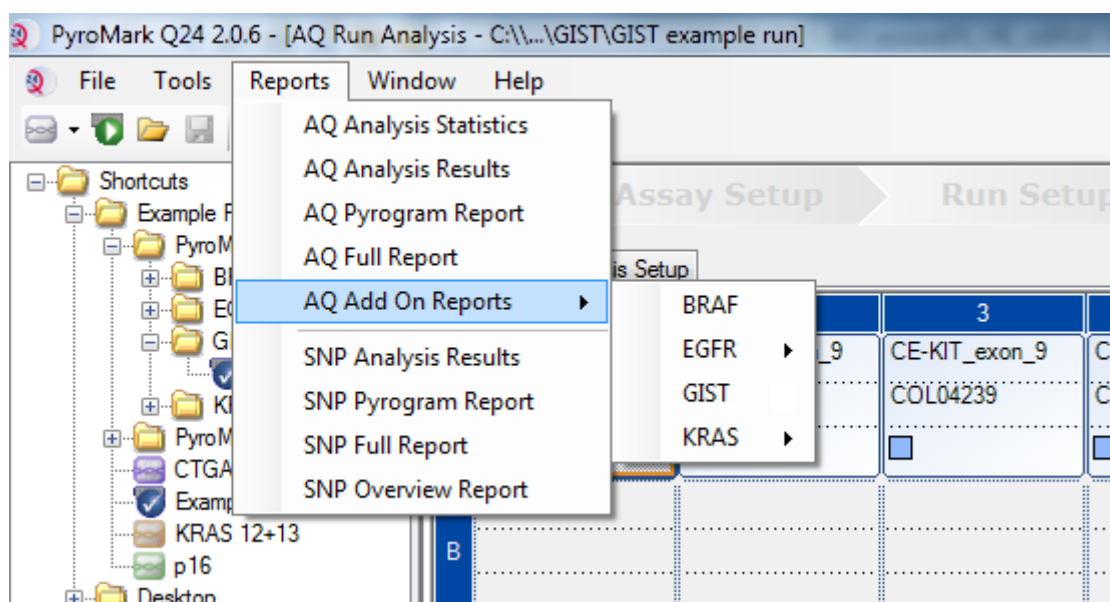
1. Zasuňte USB jednotku obsahující vytvořený soubor cyklu do USB portu počítače.
2. Pomocí Průzkumníku Windows přesuňte soubor cyklu z USB jednotky do požadovaného umístění v počítači.
3. Otevřete soubor cyklu v režimu AQ softwaru PyroMark Q24 buď zvolením možnosti „Open“ (Otevřít) v nabídce „File“ (Soubor) nebo dvojitým kliknutím na soubor (👉) v prohlížeči zkratk.
4. Existují 2 metody analýzy cyklu. Pokud používáte modul GIST RapidScreen Plug-in Report, přejděte ke kroku 5. Pokud používáte AQ analýzu, která je součástí softwaru PyroMark Q24, přejděte ke kroku 6.

**Poznámka:** Pro dokumentaci a interpretaci výsledků důrazně doporučujeme použít modul GIST RapidScreen Plug-in Report. Modul GIST RapidScreen Plug-in Report lze obdržet e-mailem po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). V této zprávě je zajištěno, aby byly jednotlivé hodnoty LOD (tabulka 9) a různé analyzované sekvence použity k automatické detekci všech mutací.

**Poznámka:** Pomocí analýzy AQ v softwaru PyroMark Q24 není možné analyzovat dvě složité mutace v exonu 18 genu *PDGFRA* (2526\_2538>G a 2524\_2526 GAC>TAT). Pro analýzu složitých mutací exonu 18 genu *PDGFRA* doporučujeme použít modul GIST RapidScreen Plug-in Report.

5. Použití modulu GIST RapidScreen Plug-in Report:  
Chcete-li vytvořit zprávu, zvolte „AQ Add On Reports/GIST“ z „Reports“ (Zprávy) v nabídce (viz obrázek 6).





Obrázek 6. Nabídka GIST RapidScreen Plug-in Report.

V jamkách automaticky proběhne analýza všech mutací, pro které je dána mez detekce (LOD) v tabulce 9. Výsledky se zobrazí v přehledné tabulce (viz obrázek 7) a následují i podrobné výsledky, které zahrnují například pyrogramy a kvalitu analýzy.

### 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.

Obrázek 7. GIST RapidScreen Plug-in Report.

## 6. Použití AQ analýzy:

Chcete-li provést analýzu cyklu a získat přehled výsledků, klikněte na jedno z tlačítek analýzy.



Analyzovat všechny jamky.



Analyzovat vybranou jamku.

Výsledky analýzy (četnost alel) a stanovení kvality se zobrazí nad pozicí proměnné v záznamu Pyrogram®. Bližší informace o analýze cyklu najdete v příručce pro uživatele systému PyroMark Q24.

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

**Poznámka:** Za spolehlivé se doporučuje považovat výsledky, kde výška píku přesahuje 30 RLU. V nastavení analýzy určete hodnotu 30 RLU jako „required peak height for passed quality“ (požadovanou výšku píku pro uznání kvality výsledku) (viz „Příloha A: Nastavení pyrosekvenční analýzy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro“ a *uživatelská příručka systému PyroMark Q24*).

**Poznámka:** Zpráva s výsledky AQ analýzy by se měla použít jako dokumentace a interpretace kvantitativního vyhodnocení alel. Čísla uváděná v pyrogramu jsou zaokrouhlena a neudávají zcela přesnou kvantitativní hodnotu.

**Poznámka:** Pyrogram by měl být vždy porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Naměřené píky by měly výškově odpovídat sloupcům histogramu.

**Opakování analýzy vzorků, u nichž nebyla detekována mutace při použití standardu „Sequence to analyze“ (Analyzovaná sekvence), nebo s hodnocením kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo).**

Standardní (analyzovaná sekvence) dle definice v nastavení analýzy pokrývá 6 bp duplikaci v exonu 9 genu *KIT* a nejčastější bodovou mutaci v kodonu 842 (GAC>GTC) exonu 18 genu *PDGFRA* (viz příloha A, strana 52). Pokud vzorek obsahuje méně častou mutaci v exonu 18 genu *PDGFRA*, je možné analyzovanou sekvenci změnit tak, aby byla také provedena analýza stavu mutace této mutace, jak je popsáno v příloze A.

Pomocí analýzy AQ v softwaru PyroMark Q24 není možné analyzovat dvě složité mutace v exonu 18 genu *PDGFRA* (2526\_2538>G a 2524\_2526GAC>TAT). Pro analýzu složitých mutací exonu 18 genu *PDGFRA* doporučujeme použít modul GIST RapidScreen Plug-in Report.

Analýzu všech vzorků, u kterých nebyla detekována mutace ve standardní analyzované sekvenci, a vzorků, u kterých bylo u hodnocení kvality uvedeno „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo), je důrazně doporučeno zopakovat.

Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) a „Failed“ (Selhalo) může poukazovat na vzácnou mutaci, kterou nepostihuje standardní analyzovaná sekvence poskytující neočekávané referenční píky.

Chcete-li zopakovat analýzu a zaměřit se na méně časté mutace, přejděte na „Analysis Setup“ (Nastavení analýzy) a změňte položku „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) z na některou z variant popsanych v Příloze A nebo na jiné vzácné či neočekávané mutace. Klikněte na tlačítko „Apply“ (Použít) a po zobrazení okna „Apply Analysis Setup“ (Použít nastavení analýzy), klikněte na možnost „To All“ (Na všechny).

Aktualizované četnosti mutací lidského genu *KIT/PDGFR*A jsou dostupné online na stránkách Sangerova ústavu [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

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

**Poznámka:** V sekvenované oblasti mohou být přítomny další vzácné nebo neočekávané mutace a mohou být analyzovány pomocí alternativní položky „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) beroucí v potaz neočekávané mutace.

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

# Interpretace výsledků

## Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu

Je důrazně doporučeno, aby každý cyklus zahrnoval i kontrolní nemethylovanou DNA pro srovnání a jako kontrolu úrovní v pozadí. Naměřená frekvence kontrolního vzorku by měla být menší nebo rovna mezi slepého vzorku (LOB, limit of blank). Při stanovení přítomnosti mutace je možné použít hodnoty LOB (mez slepého vzorku (limit of blank)) a LOD (mez detekce (limit of detection)) uvedené v příručkách. Tyto hodnoty byly stanoveny pomocí směsí plazmidů, které nesly sekvenci divokého typu nebo příslušnou mutovanou sekvenci.

Po provedení analýzy pomocí softwaru PyroMark Q24 nebo modulu Plug-in Report jsou možné 3 výsledky.

- Frekvence mutace < LOD: Mutace nebyla detekována.
- Frekvence mutace > LOD + 3 % jednotek: Mutace
- Frekvence mutace  $\geq$  LOD a  $\leq$  LOD + 3 % jednotek: Potenciální mutace s nízkou úrovní výskytu

**Poznámka:** Pokud tato situace nastane při používání modulu GIST RapidScreen Plug-in Report (viz krok 5, „Protokol 6: Analýza cyklu na systému PyroMark Q24“, strana 32) zobrazí se upozornění.

Rozsah LOD až LOD + 3 % jednotek dovoluje citlivou detekci mutací s nízkou hladinou za optimálních podmínek. Změřená frekvence převyšující LOD v nemethylovaném kontrolním vzorku indikuje v daném cyklu vyšší než běžnou hladinu pozadí, což může ovlivnit kvantifikaci alel zvláště u mutací s nízkou hladinou. Proto výsledky s varováním „Potenciální mutace s nízkou hladinou“ je nutné pečlivě vyhodnotit.

Vzorky s vyhodnocenou potenciální mutací s nízkou hladinou budou pokládány za pozitivní na výskyt mutace jen při potvrzení v novém cyklu analýzy v duplikátu s nemethylovanou kontrolní DNA. Výsledek obou duplikátů by měl vykázat stejnou mutaci s hodnotami  $\geq$  LOD a výsledek kontrolního vzorku by měl být „No mutation detected“ (Mutace nebyla detekována). V opačném případě by měl být vzorek posouzen jako „Mutace nebyla detekována“.

Zvýšené pozadí pro mutaci lze určit srovnáním hodnot LOB uvedených v příručce s měřeními získanými s nemethylovanou kontrolní DNA. Vzorky s vyhodnocenou potenciální mutací s nízkou hladinou je možné bez opakování vyhodnotit jako „Mutation not detected“ (Mutace nebyla detekována) v případě, že změřená frekvence nemethylované kontrolní DNA je vyšší než hodnota LOB

uvedená v příručce pro příslušnou mutaci. U vyhodnocené potenciální mutace s nízkou hladinou mohou tedy nastat tři různé scénáře.

1. Frekvence měření s nemethylovanou kontrolní DNA > LOB pro tuto mutaci: Vzorek lze bez opakování označit jako „Mutation not detected“ (Mutace nebyla detekována).
2. Výsledek nebyl v duplikátu zopakován se shodným výsledkem: Vyhodnoťte vzorek jako „Mutation not detected“ (Mutace nebyla detekována).
3. V duplikátu vyhodnoceno se stejným výsledkem a vzorek divokého typu < LOB: Mutation detected (Detekovaná mutace).

**Poznámka:** Pyrogram by měl být vždy porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Naměřené píky by měly výškově odpovídat sloupcům histogramu. Pyrogramy je nutné zkontrolovat, zda se nevyskytují neočekávané píky. Pokud naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a nelze tento jev vysvětlit vzácnými nebo neočekávanými mutacemi, je doporučeno provést novou analýzu vzorku. Na základě nezdařeného výsledku nelze posuzovat stav mutace. U platné mutace je změna výšky píku vždy spojena s odpovídající změnou výšky jiného píku. Změna výšky jediného píku by neměla být vyhodnocena jako znak mutace.

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

**Poznámka:** Rozhodnutí o léčbě pacientů s nádorovým onemocněním nelze zakládat výhradně na analýze stavu mutací exonu 9 genu *KIT* a exonu 18 genu *PDGFRA*.

Tabulka 9. LOB a LOD určené pro specifické mutace

Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LoB (% jednotek)	LoD (% jednotek)	COSMIC ID* (v58)
<i>KIT</i> exon 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<i>PDGFRA</i> exon 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y <sup>†</sup>	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 nebo <sup>‡</sup>	D842_H845del nebo <sup>‡</sup>	2,2	5,2	737 nebo <sup>‡</sup>
2526_2537del12	I843_D846del <sup>‡</sup>			96892
2527_2538del12	I843_D846del <sup>†</sup>	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G <sup>§</sup>	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y <sup>†</sup>	0,9	3,9	12397

\* Podle Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) dostupného online na stránkách Sangerova ústavu [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

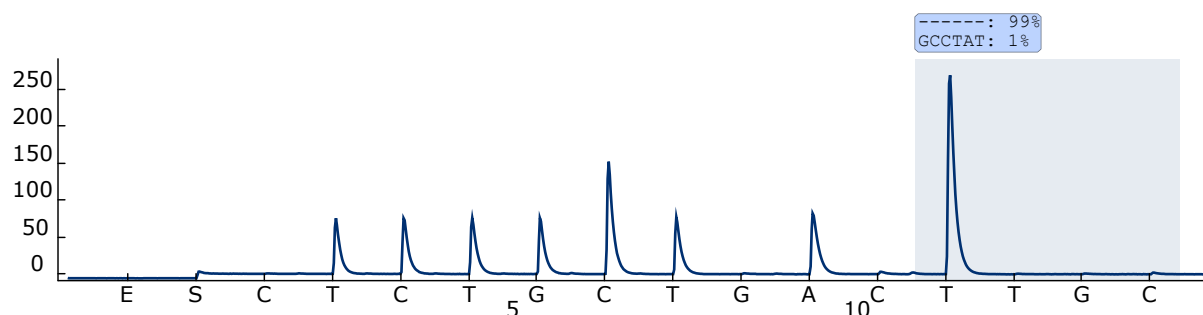
<sup>†</sup> Mutace 2524G>T a 2524\_2526GAC>TAT, respektive 2526\_2537del12 a 2527\_2538del12 mají za následek stejnou změnu aminokyseliny.

<sup>‡</sup> Mutace 2524\_2535del12 a 2526\_2537del12 mají za následek stejnou změnu nukleové kyseliny.

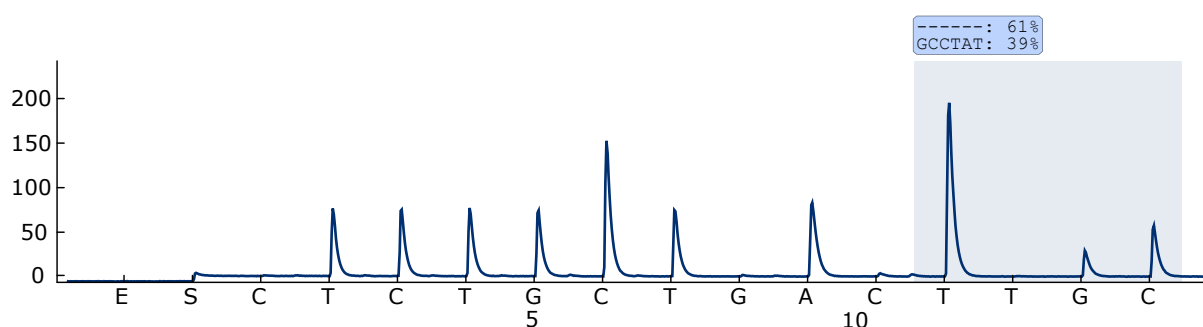
<sup>§</sup> Mutace 2526\_2538>G a 2524\_2526GAC>TAT není možné analyzovat v režimu AQ softwaru PyroMark Q24.

## Reprezentativní výsledky

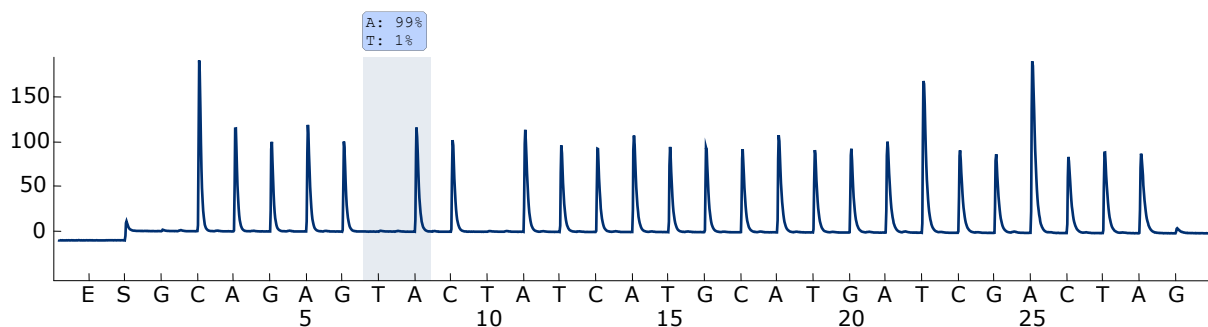
Na obrázcích 8–11 jsou uvedeny ukázkové výsledky pyrogramu.



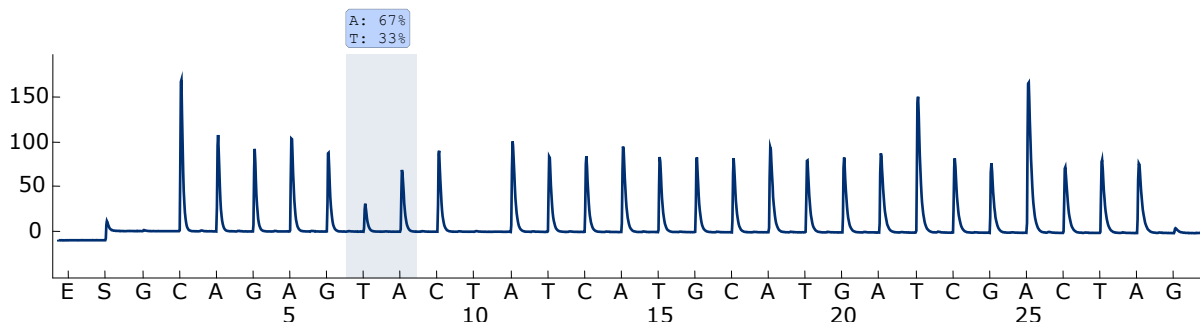
Obrázek 8. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s genotypem divokého typu v exonu 9 genu *KIT* s analyzovanou sekvencí *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* pokrývá 6 bp duplikaci za kodonem 503.



Obrázek 9. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s duplikací GCCTAT za kodonem 503 v exonu 9 genu *KIT* s analyzovanou sekvencí *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTA*.



Obrázek 10. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s genotypem divokého typu v exonu 18 genu *PDGFRA* s analyzovanou sekvencí *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* pokrývá mutaci GAC>GTC v kodonu 842 (nukleotid 2525).



Obrázek 11. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vzorku s mutací GAC>GTC v kodonu 842 (nukleotid 2525) exonu 18 genu *PDGFRA* s analyzovanou sekvencí CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

## Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologií přípravy vzorků či zpracování analýz (kontaktní informace najdete na zadní straně obálky nebo na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

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

### Komentáře a návrhy

#### Signály u kontroly bez templátu (negativní kontroly)

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| a) Vzájemné signály susedních jamek | Signál z jedné jamky je detekován v sousední jamce. Neumisťujte vzorky s vysokou intenzitou signálu vedle kontrolních jamek bez templátu.           |
| b) Kontaminace PCR                  | Používejte sterilní pipetovací špičky s filtry. Materiál, jako jsou vzorky, kontroly a amplikony, uchovávejte a extrahujte odděleně od činidel PCR. |

#### Slabá nebo neočekávaná sekvence

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| Nízká kvalita genomové DNA | Nízká kvalita genomové DNA může být příčinou selhání PCR. Provedte analýzu PCR vzorků elektroforézou (například na systému QIAxcel® nebo elektroforézou na agarózovém gelu). |
|----------------------------|--|



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

- a) Malá výška píku Příčinou nízkých píků mohou být chyby při přípravě PCR nebo vzorku před zahájením pyrosekvenování.
- Je důležité, aby všechny vzorky byly vakuovou hlavicí plně uchopeny. Dbejte, aby se vakuová hlavice zanořovala do vzorků pomalu a aby geometrie PCR destičky nebo proužku, použité imobilizaci DNA, umožňovala kompletní zachycení vzorků.
- Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v *příručce pro systém PyroMark Q24*, a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.
- V případě upozornění „Check“ (Ověřit) pečlivě porovnejte pyrogram s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Pokud naměřené píky odpovídají výškám sloupců histogramu, výsledek je platný. V jiném případě je doporučeno provést novou analýzu vzorku.
- b) Mutace není definována v poli „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) V nastavení analýzy upravte analyzovanou sekvenci (viz Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy *therascreen GIST RapidScreen Pyro*, strana 52) a analýzu cyklu zopakujte.
- c) Neočekávaná vzácná mutace Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) může být vyvoláno neočekávaným uspořádáním píků. To může poukazovat na přítomnost neočekávané mutace, která není součástí analýzy podle poskytnuté „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence). Tyto vzorky by se měly analyzovat pomocí alternativní analyzované sekvence s ohledem na možnost přítomnosti neočekávaných mutací.

## Komentáře a návrhy

---

- d) Upozornění na odchylku výšky vysokého píku pro přidání
- Pyrogram by měl být pečlivě porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. V případě, že naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a nelze tento jev vysvětlit vzácnými mutacemi, je doporučeno provést novou analýzu vzorku.

### Výrazné pozadí

- a) Nesprávné skladování nukleotidů
- Nukleotidy skladujte při teplotě 2 až 8 °C. Uchovávání při teplotách -15 až -30 °C může zvyšovat šum pozadí.
- b) Krátká doba chlazení vzorků před pyrosekvenační analýzou
- Vzorky uložte na držáku destiček PyroMark Q24 na 10 až 15 minut do prostoru s laboratorní teplotou. Dobu chlazení nezkracujte.
- c) Kontaminace kazety
- Kazetu pečlivě vyčistěte, jak je popsáno v návodu k výrobku. Uložte kazetu na místě chráněném před světlem a prachem.

### Pozitivní kontrola (kontrolní nemetylovaná DNA) nevykazuje signál.

- a) Nedostatečné množství směsi enzymů nebo substrátů ve všech jamkách
- Zkontrolujte, že jste správně naplnili kazetu PyroMark Q24 podle zadání ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním cyklu) v nabídce „Tools“ (Nástroje).
- b) Činidla nebyla správně uskladněna nebo naředěna.
- Připravte činidla podle pokynů v části „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 29.
- c) Chyba při přípravě PCR nebo vzorku.
- Manipulační chyby při nastavení PCR, programování cyklu PCR nebo přípravě vzorku před zahájením pyrosekvenování mohou mít za následek ztrátu signálu. Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v *příručce pro systém PyroMark Q24*, a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte. Zopakujte PCR a pyrosekvenační analýzu.

## Kontrola kvality

K zajištění stálé kvality produktu je v souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobků společnosti QIAGEN každá výrobní šarže souprav *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit testována podle předem stanovených specifikací.

## Omezení

Všechny získané diagnostické výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými nebo laboratorními nálezy.

Pro dosažení optimálních výsledků PCR je nutné přísně dodržovat pokyny v návodu pro uživatele. Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti po datu expirace.

## Charakteristiky funkčních vlastností analýz

### Mez slepého vzorku a mez detekce

Mez slepého vzorku (LOB, limit of blank) a mez detekce (LOD, limit of detection) byly stanoveny pro určitý počet mutací pomocí směsi plazmidů (tabulka 10). LOB a LOD byly stanoveny podle doporučení v pokynech Ústavu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A „Protokol pro určení mezí detekce a mezí kvantifikace, schválené pokyny“.  $\alpha$  a  $\beta$  chyby (falešně pozitivní a falešně negativní) byly nastaveny na 5 %. Hodnoty LOD byly pro určité vzácné delece v exonu 18 genu *PDGFRA* stanoveny přidáním 3 standardních odchylek měření slepého vzorku k hodnotě LOB. Hodnoty LOD byly nastaveny alespoň 3 % jednotek nad úroveň LOB.

Hodnoty LOB představují frekvenci naměřenou u standardních vzorků divokého typu. Hodnoty LOD představují nejnižší signál (naměřenou frekvenci), který lze pro danou mutaci považovat za pozitivní.

Tabulka 10. LOB a LOD určené pro specifické mutace

Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	COSMIC ID* (v58)
<i>KIT</i> exon 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<i>PDGFRA</i> exon 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y <sup>†</sup>	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 nebo <sup>‡</sup>	D842_H845del nebo <sup>‡</sup>	2,2	5,2	737 nebo <sup>‡</sup>
2526_2537del12	I843_D846del <sup>†</sup>			96892
2527_2538del12	I843_D846del <sup>†</sup>	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 <sup>§</sup>	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 <sup>§</sup>	12406
2526_2538>G <sup>¶</sup>	D842_D846>E	0,3	3,3 <sup>§</sup>	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y <sup>†</sup>	0,9	3,9 <sup>§</sup>	12397

\* Podle Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) dostupného online na stránkách Sangerova ústavu [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

<sup>†</sup> Mutace 2524G>T a 2524\_2526GAC>TAT, respektive 2526\_2537del12 a 2527\_2538del12 mají za následek stejnou změnu aminokyseliny.

<sup>‡</sup> Mutace 2524\_2535del12 a 2526\_2537del12 mají za následek stejnou změnu nukleové kyseliny.

<sup>§</sup> Hodnoty LOD byly pro tyto delece v exonu 18 genu *PDGFRA* stanoveny přidáním 3 standardních odchylek měření slepého vzorku k hodnotě LOB.

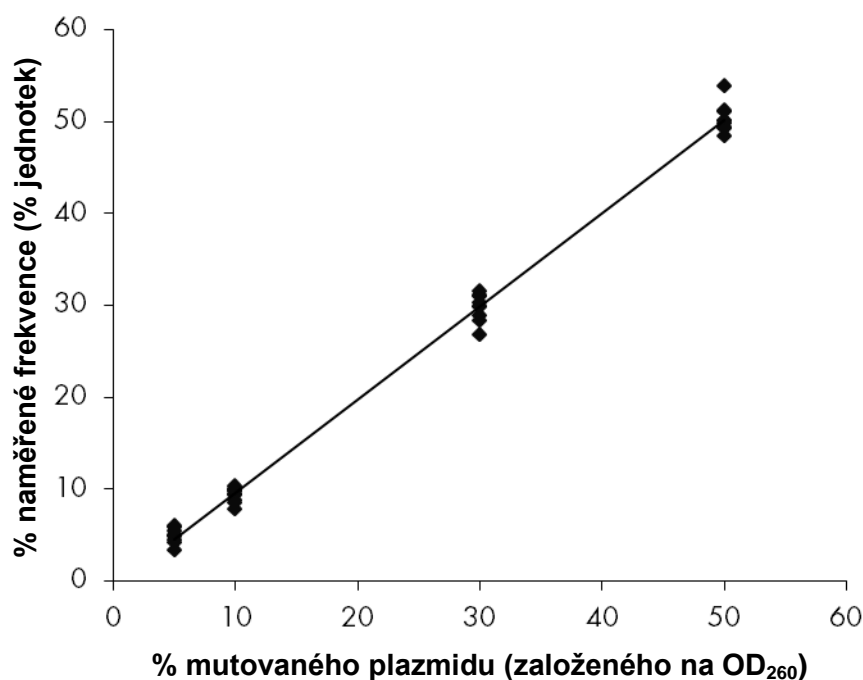
<sup>¶</sup> Mutace 2526\_2538>G není možné analyzovat v režimu AQ softwaru PyroMark Q24.

## Linearita

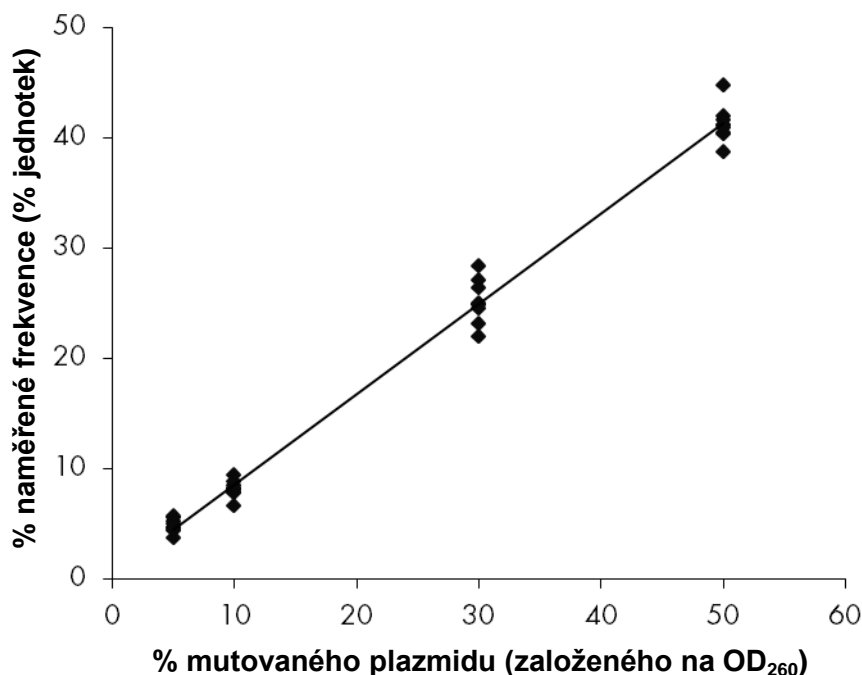
Linearita byla stanovena použitím směsi plazmidů nesoucí divoký typ nebo mutované sekvence duplikace 1509\_1510insGCCTAT v exonu 9 genu *KIT* a mutace 2525A>T v exonu 18 genu *PDGFRA*. Plazmidy byly smíchány v poměrech tak, aby poskytly 4 úrovně mutací (5, 10, 30 a 50 %). Každá směs byla analyzována třemi různými šaržemi soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit ve třech cyklech pyrosekvenování, každý se třemi opakováními.

Výsledky (n = 9 pro každou úroveň výskytu mutací) byly analyzovány podle pokynu CLSI EP6-A „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline“ (Hodnocení linearity kvantitativních měřicích postupů: statistická metoda; schválené pokyny) pomocí softwaru Analyse-it® v2.21 a jsou zobrazeny na obrázcích 12 a 13.

Výsledky byly lineární v rámci povolené nelinearity 5 % jednotek v testovaném rozmezí 5 až 50 % hladiny mutace.



Obrázek 12. Linearita duplikace 1509\_1510insGCCTAT v exonu 9 genu *KIT*.



Obrázek 13. Linearita mutace 2525A>T v exonu 18 genu *PDGFRA*.

## Přesnost

Tyto údaje o přesnosti umožňují stanovení celkové variability analýz a byly získány třikrát opakovanými analýzami výše uvedených směsí plasmidů na třech různých úrovních.

Opakovatelnost (variabilita v rámci analýzy a mezi dávkami) byla vypočítána na základě dat sloužících ke stanovení linearit (tři cykly ve stejný den s různými šaržemi soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit). Střední přesnost (variabilita v rámci laboratoře) byla stanovena ve třech cyklech v jedné laboratoři ve třech různých dnech s různými pracovníky obsluhy, přístroji PyroMark Q24 a šaržemi soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit. Reprodukovatelnost (mezilaboratorní variabilita) byla vypočítána ze dvou cyklů, jeden v interní a druhý v externí laboratoři, a při použití různých šarží soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit.

Odhady přesnosti jsou vyjádřeny jako směrodatná odchylka naměřených frekvencí mutace v % jednotkách (tabulka 11). Opakovatelnost, střední přesnost a reprodukovatelnost pro duplikaci 1509\_1510insGCCTAT exonu 9 genu *KIT* byla 0,8–1,6; 0,5–1,5 a 0,7–1,9 % jednotek v měřeném rozsahu 5 až 50 % hladiny mutace. Opakovatelnost, střední přesnost a reprodukovatelnost pro mutaci 2525A>T exonu 18 genu *PDGFRA* byla 0,6–1,9; 0,6–3,7 a 0,5–2,4 % jednotek v měřeném rozsahu 5 až 50 % hladiny mutace.

Tabulka 11. Přesnost duplikace 1509\_1510insGCCTAT exonu 9 genu *KIT*\*

% mutovaného plazmidu <sup>†</sup>	Opakovatelnost		Střední přesnost		Reprodukovatelnost	
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	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

\* Všechny hodnoty jsou dány jako % jednotky. SD: směrodatná odchylka (n = 9).

<sup>†</sup> Na základě měření OD<sub>260</sub>.

Tabulka 12. Linearita mutace 2525A>T v exonu 18 genu *PDGFRA*<sup>‡</sup>

% mutovaného plazmidu <sup>§</sup>	Opakovatelnost		Střední přesnost		Reprodukovatelnost	
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	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

<sup>‡</sup> Všechny hodnoty jsou dány jako % jednotky. SD: směrodatná odchylka (n = 9).

<sup>§</sup> Na základě měření OD<sub>260</sub>.

## Diagnostické vyhodnocení

Souprava *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit byla hodnocena porovnáním se sekvenováním Sangerovou metodou. DNA byla extrahována ze 100 vzorků nádorové tkáně GIST fixovaných formalinem a zalitých v parafinu (FFPE) a analyzována na mutace v exonu 9 genu *KIT* a exonu 18 genu *PDGFRA*.

DNA byla izolována pomocí soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Analýzy se prováděly pomocí soupravy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit na systému PyroMark Q24. Sekvenování Sangerovou metodou se provádělo na genetickém analyzátoru Applied Biosystems® 3130.

Ze 100 analyzovaných vzorků mohl být stav mutace stanoven pro všechny mutace exonu 9 genu *KIT* (obrázek 13) a exonu 18 genu *PDGFRA* (obrázek 14), a to oběma metodami.

Tabulka 13. Výsledky analyzovaných vzorků tumorů GIST na exonu 9 genu *KIT*

exon 9 genu <i>KIT</i>		Sekvenování Sangerovou metodou		
		Mutace nebyla detekována	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Celkem
therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit	Mutace nebyla detekována	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Celkem	92	8	100

Tabulka 14. Výsledky analyzovaných vzorků tumorů GIST na exonu 18 genu *PDGFRA*

exon 18 genu <i>PDGFRA</i>		Sekvenování Sangerovou metodou				Celkem
		Divoký typ	2530- 2541del12 M844_ S847del	2526- 2538>G D842_ D846>E	2525A>T D842V	
therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit	Mutace nebyla detekována	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
	Celkem	93	2	3	2	100



**Poznámka:** Ve všech cyklech použitých k determinaci výkonnostních charakteristik signál převyšoval 30 RLU při běžné analýze 10 ng DNA izolované z tkání fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE). Pyrosekvenční data byla analyzována pomocí modulu GIST RapidScreen Plugin Report.

## Odkazy

Společnost QIAGEN udržuje velkou aktuální online databázi vědeckých publikací využívajících produkty QIAGEN. Přehledné možnosti vyhledávání umožňují najít požadované články jednoduchým hledáním podle klíčových slov nebo určením aplikace, oblasti výzkumu, názvu atd.

Kompletní seznam odkazů na literaturu najdete v online referenční databázi QIAGEN na stránkách [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) nebo se můžete obrátit na technické služby společnosti QIAGEN či místního dodavatele.

## Citované reference

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.

## Symbols

Na obalu nebo štítcích se mohou objevit následující symboly:



<N>

Obsahuje činidla pro <N> testů



Datum použitelnosti



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Součásti



Obsahuje



Číslo



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



Pozor

## Kontaktní údaje

Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), nebo se obraťte telefonicky na telefonní číslo 00800-22-44-6000, nebo kontaktujte některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN Technical Service Departments

nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Příloha A: Nastavení pyrosekvenační analýzy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Pokud byl nainstalován modul GIST RapidScreen Plug-in Report, jsou v prohlížeči klávesových zkratk software PyroMark Q24 ve složce „Example Files/PyroMark Setups/GIST“ k dispozici předem definovaná nastavení analýz pro exon 9 genu *KIT* a exon 18 genu *PDGFRA*. Následující kroky není nutné provádět. Modul GIST RapidScreen Plug-in Report lze obdržet po objednání na adrese [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Důrazně se doporučuje používat raději modul GIST RapidScreen Plug-in Report než manuální analýzu. Složité mutace exonu 18 genu *PDGFRA* není možné přidat manuálně do analyzované sekvence a musí být analyzovány pomocí modulu GIST RapidScreen Plug-in Report. Po instalaci modulu plug-in nebo vždy po instalaci nového softwaru či vyšší verze softwaru na počítač na pracovišti je nutné zkontrolovat správnou funkčnost modulu plug-in dle návodu v příručce k modulu GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide.

Pokud modul GIST RapidScreen Plug-in Report není nainstalován, je nutné před prvním spuštěním analýzy *therascreen* GIST RapidScreen Pyro nastavit soubor analýzy ručně. Nastavte analýzu pro exon 9 genu *KIT* a exon 18 genu *PDGFRA* pomocí softwaru PyroMark Q24, jak je popsáno níže.

## Postup

### Exon 9 genu *KIT*

A1. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).

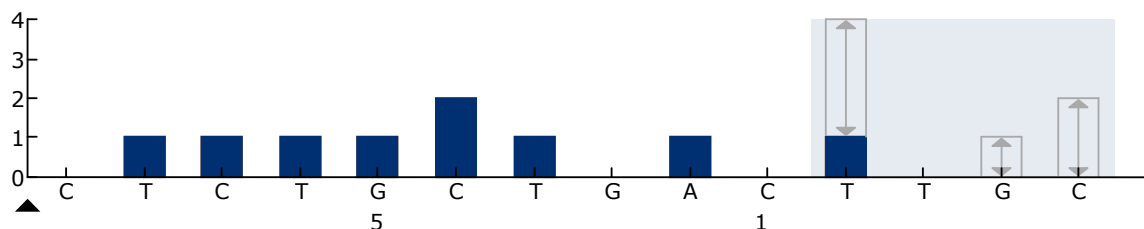
A2. Ručně zadejte následující „Dispensation Order“ (Pořadí přidávání nukleotidů):

**CTCTGCTGACTTGC**

A3. Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci:

**TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTAA**

6 bp duplikace GCCTAT za kodonem 503 v exonu 9 genu *KIT* bude detekována pomocí analyzované sekvence.



Obrázek 14. Histogram pro exon 9 genu *KIT* s analyzovanou sekvencí *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* pokrývá 6 bp duplikaci za kodonem 503.

A4. Klikněte na kartu „Analysis Parameters“ (Parametry analýzy) a u položky „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ (Prahová hodnota výšky píku – požadovaná výška píku pro uznání kvality výsledku:) zvyšte hodnotu na 30.

A5. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „KIT exon 9“.

### Exon 18 genu *PDGFRA*

A1. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).

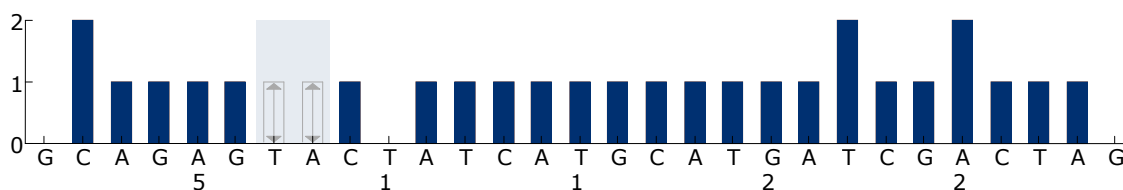
A2. Ručně zadejte následující „Dispensation Order“ (Pořadí přidávání nukleotidů).

*GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG*

A3. Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci:

*CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT*

Pomocí této analyzované sekvence budou detekovány nejčastější mutace *GAC>GTC* v kodonu 842 (nukleotid 2525) exonu 18 genu *PDGFRA*.




Obrázek 15. Histogram pro exon 18 genu *PDGFRA* s analyzovanou sekvencí *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* pokrývající mutaci *GAC>GTC* v kodonu 842 (nukleotid 2525).

Analyzovanou sekvenci je možné po dokončení cyklu změnit pro další analýzu mutací v nukleotidu 2524 (kodon 842) a také 9 delecí a složitých mutací v oblasti kodonů 842 až 847.

Chcete-li zkontrolovat, zda jsou přítomny následující mutace, změňte analyzovanou sekvenci podle tabulky 15.

**Poznámka:** Varování „Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations“ (Kvantifikace nemusí být přesná: pozice proměnné vyžaduje více než 5 přidání) během nastavení analýzy je možné ignorovat.

**Poznámka:** Zkontrolujte, zda je prahová hodnota výšky samostatného píku nastavena na 30 RLU.

- A4.** Klikněte na kartu „Analysis Parameters“ (Parametry analýzy) a u položky „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ (Prahová hodnota výšky píku – požadovaná výška píku pro uznání kvality výsledku:) zvyšte hodnotu na 30.
- A5.** Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „PDGFRA exon 18“.

Tabulka 15. Běžné mutace detekované soupravou *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit s použitím různých analyzovaných sekvencí

Změna nukleové kyseliny	Změna aminokyseliny	Anylyzovaná sekvence
<b><i>KIT</i> exon 9</b>		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTAA*
<b><i>PDGFRA</i> exon 18</b>		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y <sup>†</sup>	CCAGAKACATCATGCAT GATTCTCGAACTAT
2524_2535del12 nebo <sup>‡</sup> 2526_2537del12	D842_H845del nebo <sup>‡</sup> I843_D846del <sup>†</sup>	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del <sup>†</sup>	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	–§
2524_2526GAC>TAT	D842Y <sup>†</sup>	–§


\* Standardní analyzovaná sekvence.

<sup>†</sup> Mutace 2524G>T a 2524\_2526GAC>TAT, respektive 2526\_2537del12 a 2527\_2538del12 mají za následek stejnou substituci aminokyseliny.

<sup>‡</sup> Mutace 2524\_2535del12 a 2526\_2537del12 mají za následek stejnou substituci nukleové kyseliny a jsou analyzovány pomocí stejné analyzované sekvence.

§ Mutace 2526\_2538>G a 2524\_2526GAC>TAT není možné analyzovat v režimu AQ softwaru PyroMark Q24.

## Příloha B: Vyprázdnění odpadního zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami

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

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Úřad pro ochranu zdraví a bezpečnosti při práci) (USA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Americká konference státních průmyslových hygieniků) (USA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola látek škodlivých zdraví) (Spojené království)

Při likvidaci laboratorního odpadu zajistěte dodržování státních a místních předpisů o ochraně životního prostředí.

### Důležitý bod před zahájením

- Tento protokol vyžaduje použití vysoce čištěné vody (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com), nebo ekvivalent).

### Postup

**B1.** Zkontrolujte, že ve vakuové hlavici není vakuum. Ujistěte se, že přívod vakua je zavřený (Off) a vakuová pumpa je vypnutá.

**B2.** Zlikvidujte všechny roztoky, které zbyly ve vaničkách.



- B3. Vypláchněte vaničky vysoce čištěnou vodou, v případě potřeby je vyměňte.
- B4. Vyprázdněte zásobník s odpadními tekutinami.  
Víčko lze odejmout bez nutnosti odpojení hadiček.
- B5. Je-li nutné vakuovou stanici vyčistit (například kvůli prachu nebo potřísnění tekutinami), postupujte dle pokynů v *příručce pro uživatele systému PyroMark Q24*.

## Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Pro 24 reakcí na systémech PyroMark Q24: Seq primery, PCR primery, nemethylovaná kontrolní DNA, PCR master mix PyroMark, koncentrát CoralLoad, vazebný pufr PyroMark, hybridizační pufr PyroMark, denaturační roztok PyroMark, promývací pufr PyroMark, směs enzymů, směs substrátů, nukleotidy dATP, dCTP, dGTP, dTTP, a H <sub>2</sub> O	971510
PyroMark Q24 MDx	Detekční platforma na sekvenačním základě pro paralelní pyrosekvenování 24 vzorků	9001513
PyroMark Q24	Detekční platforma na sekvenačním základě pro paralelní pyrosekvenování 24 vzorků	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuová stanice (220 V) pro paralelní přípravu 24 vzorků jednořetězcové DNA z PCR produktu	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuová stanice pro paralelní přípravu 24 vzorků jednořetězcové DNA z PCR produktu	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Aplikační software	9019063
PyroMark Q24 Software	Software pro analýzu	9019062

\* Pouze ve Spojeném království

† Ostatní státy

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<b>Příslušenství</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24jamkové reakční destičky na sekvenování	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kazety na přidávání nukleotidů a činidel	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Opakovaně použitelné sondy s filtrem k vakuové stanici PyroMark Q96 a Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Kontroly pro ověření systému při instalaci	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Kontroly pro ověření výkonu systému	979304
<b>Související produkty</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Souprava na přípravu 50 vzorků DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute®, proteináza K, pufr, odběrné zkumavky (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Souprava pro přípravu 48 vzorků: kazety na činidla (tkáňová), jednorázové špičky s filtrem, jednorázové držáky špiček, zkumavky na odběr vzorků (2 ml), eluční zkumavky (1,5 ml), pufr G2, proteináza K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Souprava pro přípravu 50 vzorků: odstředivací kolonky QIAamp, pufr, činidla, zkumavky, přípojky na vakuum	61104

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušná příručka soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Ochranné známky: 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® (4fitude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

#### Omezená licenční smlouva pro soupravu *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmkoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporuší práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoli jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoli kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zájazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1547-002 © 2013-2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Australia ■ [techservice-au@qiagen.com](mailto:techservice-au@qiagen.com)

Austria ■ [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

Belgium ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Brazil ■ [suportetecnico.brasil@qiagen.com](mailto:suportetecnico.brasil@qiagen.com)

Canada ■ [techservice-ca@qiagen.com](mailto:techservice-ca@qiagen.com)

China ■ [techservice-cn@qiagen.com](mailto:techservice-cn@qiagen.com)

Denmark ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Finland ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

France ■ [techservice-fr@qiagen.com](mailto:techservice-fr@qiagen.com)

Germany ■ [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

Hong Kong ■ [techservice-hk@qiagen.com](mailto:techservice-hk@qiagen.com)

India ■ [techservice-india@qiagen.com](mailto:techservice-india@qiagen.com)

Ireland ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

Italy ■ [techservice-it@qiagen.com](mailto:techservice-it@qiagen.com)

Japan ■ [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

Korea (South) ■ [techservice-kr@qiagen.com](mailto:techservice-kr@qiagen.com)

Luxembourg ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Mexico ■ [techservice-mx@qiagen.com](mailto:techservice-mx@qiagen.com)

The Netherlands ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Norway ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Singapore ■ [techservice-sg@qiagen.com](mailto:techservice-sg@qiagen.com)

Sweden ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Switzerland ■ [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

UK ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

USA ■ [techservice-us@qiagen.com](mailto:techservice-us@qiagen.com)

