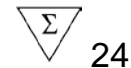


Instrukcja Zestawu *therascreen*[®] KRAS Pyro[®]



Wersja 1

IVD

Do użytku diagnostycznego in vitro

CE

REF

971460

HB

1061825EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3

MAT

1061825EN



Technologie Badań i Analiz firmy QIAGEN

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

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:

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

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

Spis Treści

Przeznaczenie Zestawu	5
Streszczenie i Wyjaśnienia	5
Zasada Procedury	6
Materiały Dostarczone	8
Zawartość zestawu	8
Materiały Wymagane, ale Niedostarczone	10
Ostrzeżenia i Uwagi	11
Informacje bezpieczeństwa	11
Uwagi ogólne	12
Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami	13
Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami	13
Procedura	14
Izolacja DNA	14
Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24	15
Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie <i>therascreen</i> KRAS Pyro	18
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)	21
Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24	23
Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24	27
Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24	29
Interpretacja Wyników	32
Interpretacja wyników detekcji i analizy mutacji występujących na niskim poziomie	32
Rozwiązywanie problemów	36
Kontrola Jakości	39
Ograniczenia	39
Charakterystyka Wydajności	40
Limit dla próby ślepej (LOB) oraz limit detekcji (LOD)	40
Liniowość	42
Precyzja uśredniona	42

Ocena diagnostyczna	43
Literatura	44
Symbole	45
Informacje Kontaktowe	45
Dodatek A: Przygotowanie reakcji <i>therascreen</i> KRAS Pyro	46
Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory	49
Informacje Dotyczące Zamawiania	51

Przeznaczenie Zestawu

Zestaw *therascreen* KRAS Pyro jest testem *in vitro* opartym na detekcji sekwencji kwasów nukleinowych i wykorzystującym technologię pirosekwencjonowania[®] do ilościowej detekcji mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu KRAS w DNA genomowym pozyskanym z tkanek ludzkich.

Zestaw *therascreen* KRAS Pyro ma na celu pomoc w identyfikacji pacjentów z rakiem jelita grubego, którzy mogą skorzystać z terapii anty-EGFR z zastosowaniem leków takich jak np. cetuximab oraz panitumumab.

Do użytku diagnostycznego *in vitro*

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

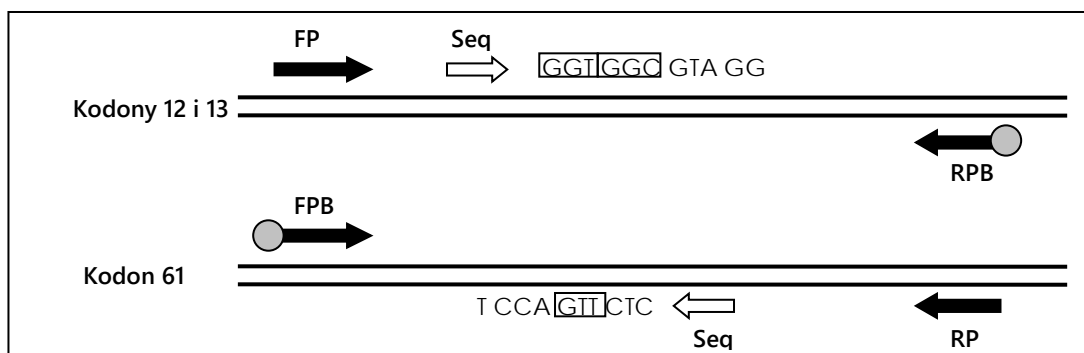
- Urządzenie PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Stacja próżniowa (Vacuum Workstation) PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (wersja 2.0) oraz PyroMark Q24 MDx (wersja 2.0).

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

Streszczenie i Wyjaśnienia

W Europie kładzie się duży nacisk na analizę mutacji w genie KRAS, co jest związane z warunkową autoryzacją marketingową Komisji Europejskiej dla cetuximabu oraz panitumumabu celem prowadzenia terapii przerzutującego raka jelita u pacjentów z niezmutowanym (dzikim) genem KRAS. Oznacza to, że panitumumab oraz cetuximab mogą zostać podawane tylko pacjentom przebadanym pod kątem statusu mutacji dla genu KRAS.

Zestaw *therascreen* KRAS Pyro posiada certyfikat CE-IVD i służy ilościowej ocenie mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu KRAS. Na produkt składają się dwie analizy: jedna do detekcji mutacji w kodonach 12 i 13 oraz druga do detekcji mutacji w kodonie 61 (Rysunek 1). Te dwa rejony są amplifikowane oddzielnie przy pomocy PCR, a następnie sekwencjonowane w zdefiniowanym obszarze. Sekwencje otaczające zdefiniowany obszar służą jako sygnały (piki) referencyjne dla oceny ilościowej i jakościowej przeprowadzanej analizy.



Rysunek 1. Schemat analizy dla KRAS. Oznaczona sekwencja jest rejonem analizowanym dla próbki dzikiej. **FP i FPB:** Startery przednie PCR (B oznacza biotynylację); **RP i RPB:** Startery wsteczne PCR (B oznacza biotynylację); **Seq:** Startery sekwencyjne.

Uwaga: Kodony 12 i 13 są sekwencjonowane w kierunku do przodu, a kodon 61 w kierunku wstecznym.

Produkt składa się z mieszaniny starterów PCR oraz startera sekwencyjnego dla każdej reakcji. Startery są dostarczane jako roztwór, gdzie każda probówka zawiera 24 µl każdego ze starterów lub mieszaniny starterów.

Zasada Procedury

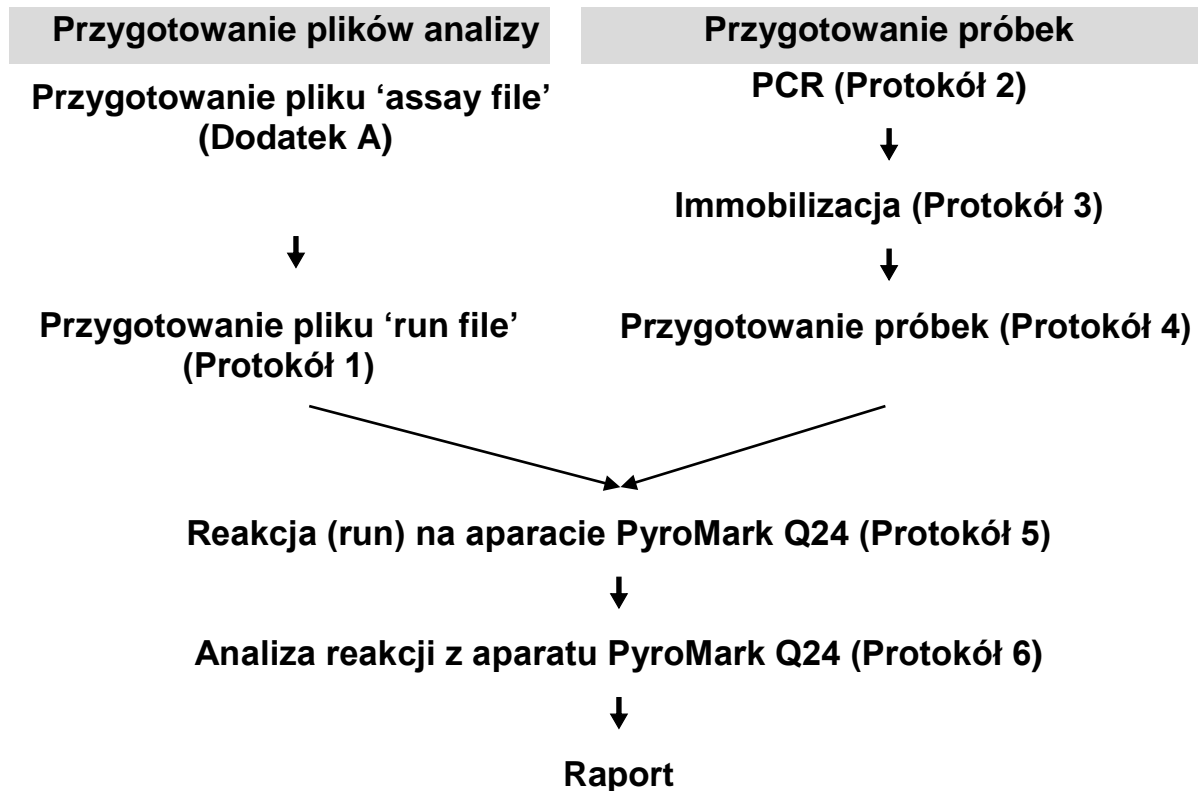
Poniższy schemat ilustruje przebieg procedury. Po reakcji PCR z użyciem starterów dla kodonów 12/13 oraz kodonu 61, amplikony zostają immobilizowane na kulkach sefarozy opłaszczonych streptawidyną (Streptavidin Sepharose® High Performance beads). Przygotowane zostaje jednoniciowe DNA, do którego przyłączają się odpowiednie startery sekwencyjne. Następnie próbki zostają sekwencjonowane na aparacie PyroMark Q24 przy pomocy zaprogramowanych wcześniej protokołów ('assay setup files' oraz 'run file').

Zaleca się korzystanie z możliwości analizowania przebiegu procesu przy pomocy wtyczki KRAS Plug-in Report, którą można otrzymać drogą mailową poprzez kontakt z pyro.plugin@qiagen.com.

Przebieg procesu można analizować również z wykorzystaniem zintegrowanego narzędzia do analizy, będącego częścią systemu PyroMark Q24. 'Sequence to Analyze' (sekwencja do analizy) może wtedy zostać przystosowana do wykrycia rzadkich mutacji po zakończonej reakcji (patrz 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 29).

Uwaga: Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Zestawu PyroMark KRAS* oraz wydania R1 *Instrukcji Zestawu theascreen KRAS Pyro* (patrz 'Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie theascreen KRAS Pyro', strona 18 oraz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', str. 23).

Zarys procedury *therascreen* KRAS Pyro



Kontrole

Niemetylowane DNA kontrolne będące częścią zestawu służy jako kontrola pozytywna reakcji PCR i sekwencjonowania. Jest to DNA o genotypie typu dzikiego w rejonach sekwencjonowanych z wykorzystaniem zestawu; jego zastosowanie jest konieczne do prawidłowej interpretacji wyników i identyfikacji mutacji na niskim poziomie (patrz 'Interpretacja Wyników', strona 32). Próbkę z niemetylowanym DNA kontrolnym należy uwzględnić dla każdej analizy i dla każdej reakcji pirosekwencjonowania.

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


Materiały Dostarczone

Zawartość zestawu

Zestaw *therascreen* KRAS Pyro (pudełko 1/2)

Zestaw <i>therascreen</i> KRAS Pyro	(24)
Numer katalogowy	971460
Ilość reakcji	24
Seq Primer KRAS 12/13 (starter sekwencyjny)	24 µl
Seq Primer KRAS 61 (starter sekwencyjny)	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13 (starter PCR)	24 µl
PCR Primer KRAS 61 (starter PCR)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (mieszanka do PCR)	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA (Niemetylowane DNA kontrolne) 10 ng/µl	100 µl

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

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

* Zawiera wodorotlenek sodu.

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

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

- Zestaw do izolacji DNA (patrz 'Izolacja DNA', strona 14)
- Pipety (nastawne)*
- Sterylne końcówki do pipet (do PCR, z filtrami)
- Mikrowirówka stołowa*
- Termocykler* oraz odpowiednie probówki PCR
- Sefaroza opłaszczona streptawidyną (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Aparat PyroMark Q24 (nr kat. 9001513 lub 9001514)*†
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (nr kat. 9019063 lub 9019062)†
- Płytki PyroMark Q24 (nr kat. 979301)†
- Kartridże PyroMark Q24 (nr kat. 979302)†
- Pompa próżniowa PyroMark Q24 (Vacuum Workstation; nr kat. 9001515 lub 9001517)*†
- Wytrząsarka do płytek* do immobilizacji na sefarozie
- Blok grzejny* zdolny do osiągnięcia 80°C
- 24-dołkowe płytki lub paski PCR (24-well plates/strips)
- Zatyczki paskowe (strip caps)
- Woda o wysokiej czystości (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm lub ekwiwalent).
Uwaga: Zestaw zawiera ilość wody wystarczającą do PCR, immobilizacji DNA oraz do rozpuszczania mieszanin enzymów i substratów. Dodatkowa ilość wody o wysokiej czystości jest potrzebna do rozcieńczenia buforu PyroMark Wash Buffer, 10x.
- Etanol (70%)‡

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

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

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

Zalecane wytrząsarki płytek

Wytrząsarki płytek przedstawione w Tabeli 1 są rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* KRAS Pyro.

Tabela 1. Wytrząsarki płytek rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* KRAS Pyro

Producent	Produkt	Numer kat.
Eppendorf	Thermomixer comfort (model podstawowy)	5355 000.011
	Termoblok do MTP	5363 000.012
	Adapter płytkowy na probówki PCR (96 x 0,2 ml) oraz 96-dołkowe płytki PCR	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Ostrzeżenia i Uwagi

Do użyciu diagnostycznego in vitro

Informacje bezpieczeństwa

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

Następujące oświadczenia ostrzegawcze odnoszą się do komponentów zestawu *therascreen* KRAS Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący)



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

PyroMark Enzyme Mixture (mieszanka enzymów)



Zawiera: (R*,R*)-1,4-Dimerkaptobutano-2,3-diol; kwas octowy. Niebezpieczeństwo! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. **PO DOSTANIU SIĘ DO OCZU:** Przemycz wodą przez kilka minut. Wyjmij szkła kontaktowe (o ile są) jeśli to możliwe i nadal płucz. W przypadku kontaktu lub wątpliwości: Dzwoń do centrum zatruc lub do lekarza/szpitala. Zdejmij zanieczyszczoną odzież i oczyść przed ponownym użyciem. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

PyroMark Substrate Mixture (mieszanka substratów)



Zawiera: kwas octowy. Otrzeżenie! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. Jeśli podrażnienie oczu nie ustępuje poszukaj pomocy medycznej. Zdejmij zanieczyszczoną odzież i oczyść przed ponownym użyciem. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

Uwagi ogólne

Uwaga: Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę jak następuje.

- Ścisłe przestrzeganie instrukcji użytkownika jest wymagane dla optymalnych wyników. Rozcieńczanie odczynników inne niż podane w niniejszej instrukcji nie jest zalecane i może powodować spadek wydajności.
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana (patrz 'Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie *therascreen* KRAS Pyro', strona 18 oraz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 23) względem *Instrukcji Zestawu PyroMark KRAS* oraz edycji R1 *Instrukcji Zestawu therascreen KRAS Pyro*.
- Komponenty tego zestawu wystarczają na wykonanie 24 reakcji podzielonych na maksymalnie 5 niezależnych analiz.
- Używaj sterylnych końcówek (z filtrami) do pipet (do przygotowania PCR).

- Przechowuj i izoluj materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) odseparowane od innych odczynników i dodawaj ich do mieszanin reakcyjnych w specjalnie do tego celu przeznaczonym pomieszczeniu.
- Przed przystąpieniem do procedury dobrze rozmroź wszystkie komponenty w temp. pokojowej (15–25°C).
- Po rozmrożeniu wymieszaj komponenty przez pipetowanie lub wortexowanie, a następnie krótko zwiruj.
- Wyniki nieudanej analizy nie mogą być podstawą do oceny statusu mutacji.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami

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

Pudełko 2/2 z buforami i odczynnikami *therascreen* zawierające bufor, mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydy (dATPαS, dCTP, dGTP oraz dTTP) – odczynniki do analizy pirosekwencjonowaniem – są dostarczane z wkładami chłodzącymi. Te komponenty powinny być przechowywane po dostarczeniu w 2–8°C. Aby zminimalizować ryzyko spadku aktywności, zaleca się przechowywanie mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów w oryginalnych probówkach.

Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów są stabilne przez co najmniej 10 dni w 2–8°C. Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów mogą być zamrażane i przechowywane w –30°C do –15°C. Zamrożone odczynniki nie powinny być poddawane więcej niż trzem cyklom zamrażania-rozmrażania.

Uwaga: Nukleotydy nie powinny być zamrażane.

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

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Wszystkie próbki muszą być traktowane, jako materiał potencjalnie zakaźny.

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

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

Procedura

Izolacja DNA

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

W Tabeli 2 przedstawiono zalecane zestawy QIAGEN[®] służące do oczyszczania DNA ze wskazanych rodzajów próbek pochodzenia ludzkiego, które można wykorzystać w pracy z Zestawem *therascreen* KRAS Pyro. Oczyszczanie DNA należy przeprowadzić zgodnie ze wskazówkami zawartymi w instrukcji danego zestawu.

Tabela 2. Sugerowane zestawy do oczyszczania DNA, które można wykorzystać w pracy z Zestawem *therascreen* KRAS Pyro

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

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

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

Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24



Ważna informacja przed rozpoczęciem

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

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Jeśli nie zainstalowano wtyczki KRAS Plug-in Report, należy przygotować ustawienia analizy (Assay Setups; patrz 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* KRAS Pyro', strona 46). Należy zrobić to jedynie raz, przed pierwszym uruchomieniem analiz z *therascreen* KRAS Pyro. W przypadku, jeśli wtyczka KRAS Plug-in Report została wcześniej zainstalowana, w przeglądarce skrótów oprogramowania PyroMark Q24 znajdziesz uprzednio zdefiniowane ustawienia analizy (Assay Setups) (ścieżka dostępu: 'Example Files/PyroMark Setups/KRAS'). Wtyczkę KRAS Plug-in Report można uzyskać drogą mailową przez kontakt z pyro.plugin@qiagen.com.

Procedura

1. **Na pasku narzędzi wybierz .**
Stworzony zostaje nowy plik 'run file'.
2. **Wprowadź parametry analizy (patrz 'Parametry analizy', strona 16).**
3. **Zaprogramuj układ płytki przez dodawanie analiz dla obu kodonów 12/13 oraz kodonu 61 do studzienek (kratek) korespondujących z próbkami do analizy.**
Uwaga: Kontrola negatywna (bez matrycy DNA) powinna być uwzględniona w każdej reakcji PCR, przynajmniej dla jednej reakcji.
Uwaga: Kontrola z niemetylowanym kontrolnym DNA powinna być uwzględniona w każdej analizie każdej procedury pirosekwencjonowania (patrz 'Kontrole', strona 7).
4. **Gdy reakcja jest zaprogramowana i gotowa do rozpoczęcia na aparacie PyroMark Q24, wydrukuj listę potrzebnych objętości mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydów oraz ustawień dla płytki. Wybierz 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) z menu 'Tools' (narzędzia), a gdy pojawi się raport, celem wydrukowania wybierz .**

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

Wydrukowane 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) może być użyte jako szablon do przygotowania reakcji - patrz 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 21).

Aby rozpocząć reakcję na aparacie PyroMark Q24 - patrz 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 27.

Parametry analizy

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

Przypisywanie plików analizy

Aby przypisać plik analizy dla dołka należy:

- Kliknąć kratkę odpowiadającą wybranemu dołkowi prawym przyciskiem myszy i wybrać 'Load Assay' (załaduj analizę) z menu kontekstowego.
LUB
- Wybrać odpowiednią reakcję poprzez menu oprogramowania, a następnie zaznaczyć i przeciągnąć ją do wybranej kratki odpowiadającej dołkowi.

Każdej kratce studzienki zostaje przyporządkowany kolor odpowiadający określonej analizie.

Wprowadzanie nazw próbek oraz notatek

Aby wprowadzić nazwę próbki lub notatkę, wybierz odpowiednią kratkę i wpisz pożądane informacje.

Celem dalszej edycji wybierz lub kliknij dwukrotnie odpowiednią kratkę.

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

Niniejszy protokół dotyczy amplifikacji PCR obszaru zawierającego kodony 12 i 13 oraz osobnej amplifikacji PCR obszaru zawierającego kodon 61 przy użyciu Zestawu *therascreen* KRAS Pyro.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem Instrukcji Zestawu *PyroMark* KRAS (krok 5).
- Polimeraza HotStarTaq[®] zawarta w zestawie *PyroMark* PCR Master Mix wymaga etapu aktywacji przez 15 minut w 95°C.
- Przygotuj wszystkie mieszaniny reakcyjne w obszarze odseparowanym fizycznie od tego, gdzie izoluje się DNA, dodaje matrycy DNA, analizuje produkty PCR oraz przygotowuje próbki do analizy pirosekwencjonowaniem.
- Używaj jednorazowych końcówek pipet z filtrami hydrofobowymi, aby zminimalizować ryzyko kontaminacji krzyżowej.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

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

Procedura

1. Rozmroź wszystkie niezbędne odczynniki (patrz Tabela 3).

Przed użyciem dobrze wymieszaj.

2. Przygotuj mieszaninę reakcyjną dla każdego zestawu starterów zgodnie z Tabelą 3.

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

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

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdej mieszaniny starterów PCR

Składowa	Objętość/reakcję (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 12/13 (starter PCR) lub PCR Primer KRAS 61 (starter PCR)	1,0
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	4,0
Objętość całkowita	20,0

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

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

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

Uwaga: Próbka stanowiąca kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) powinna być uwzględniona w każdej reakcji PCR, przynajmniej dla jednego typu analizy.

Uwaga: Dla każdego typu analizy opartej na pirosekwencjonowaniu należy uwzględnić próbkę zawierającą niemetylowane DNA kontrolne (patrz 'Kontrole', strona 7).

Tabela 4. Przygotowanie PCR

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

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

Tabela 5. Zoptymalizowany protokół PCR

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

6. Umieść probówki PCR w termocyklerze i rozpocznij program.
7. Po zakończonej amplifikacji przejdź do 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 21.

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

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

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem pozwól wszystkim niezbędnym odczynnikom na osiągnięcie temperatury pokojowej (15–25°C).

Procedura

1. Delikatnie wstrząśnij butelką zawierającą ‘Streptavidin Sepharose High Performance’ do momentu uzyskania homogennego roztworu.
2. Przygotuj mieszaninę ‘master mix’ do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 6. Przygotuj objętość o 10 % większą niż wymagana dla planowanej ilości reakcji.

Tabela 6. Mieszanina ‘master mix’ do immobilizacji DNA

Składowa	Objętość/reakcję (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)	40
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	28
Objętość całkowita	70

3. Dodaj 70 µl mieszaniny ‘master mix’ do dołków 24-dołkowej płytki PCR lub pasków zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24’, strona 15).
4. Dodaj 10 µl biotynylowanego produktu PCR z Protokołu 2 do każdego dołka zawierającego ‘master mix’ jak zdefiniowano w ustawieniach reakcji (run setup) (patrz ‘Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie *therascreen* KRAS Pyro’, strona 18).

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

5. Zamknij płytkę PCR (lub paski) przy użyciu zamknięć paskowych.
Uwaga: Upewnij się, że przeciekanie pomiędzy dołkami nie jest możliwe.

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

Uwaga: Podczas tego etapu przygotuj stację próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) do pracy z próbkami zgodnie z opisem zawartym w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

- 7. Przejdź niezwłocznie do ‘Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24’, strona 23.**

Uwaga: Cząsteczki sefarozy szybko opadają (sedymentują) – ich pobranie powinno nastąpić natychmiast po zakończeniu wytrząsania płytki (lub pasków).

Jeśli od wytrząsania minęła więcej niż 1 minuta – wytrząsaj dodatkowo przez 1 minutę i natychmiast przejdź do pobrania cząsteczek sefarozy.

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

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

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem próbek ze starterami sekwencyjnymi zwiń je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Dodaj 2 różne startery sekwencyjne w takiej samej kolejności zgodnej ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy (run setup) dla używanej płytki (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 15) i w zależności od analizowanego rejonu (kodony 12 i 13 lub kodon 61)
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* (krok 18). Nie należy skracać czasu schładzania próbek po uprzedniej inkubacji w 80°C.
- Regularnie przeprowadzaj test funkcjonowania końcówek filtrujących (filter probes) oraz wymieniaj je na nowe tak jak to opisano w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Umieść jeden statyw do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) na nagrzanym do 80°C bloku grzejnym – do użytku w kroku 17. Drugi statyw do płytek pozostaw w temp. pokojowej (15–25°C) do użytku w kroku 18.
- Bufor płuczący (PyroMark Wash Buffer) jest dostarczany jako koncentrat (10x). Przed pierwszym użyciem rozcieńcz go do stężenia roboczego (1x) poprzez dodanie 225 ml wody o wysokiej czystości do 25 ml koncentratu (10x PyroMark Wash Buffer) – do uzyskania końcowej objętości 250 ml.

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

Procedura

- 1. Rozcieńcz wystarczającą ilość każdego ze starterów sekwencyjnych (Seq Primers) - KRAS 12/13 oraz KRAS 61 w buforze hybrydyzacyjnym (PyroMark Annealing Buffer) jak przedstawiono w Tabeli 7.**

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

Tabela 7. Przykładowe rozcieńczanie starterów sekwencyjnych

Składowa	Objętość/próbkę (μl)	Objętość dla 9 + 1 reakcji (μl)
Seq Primer KRAS 12/13 lub Seq Primer KRAS 61	0,8	8,0
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydacyjny)	24,2	242,0
Objętość całkowita	25,0	250,0

- 2. Dodaj 25 μ l rozcieńczonego startera sekwencyjnego do każdego dołka na płytce (PyroMark Q24 Plate) zgodnie ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy 'run setup' (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 15).**

Uwaga: Miej przygotowany jeden ze statywów do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) dostarczony wraz ze stacją próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) w temp. pokojowej (15–25°C) i używaj podczas przygotowywania i przenoszenia płytki.

- 3. Umieść płytkę/paski PCR przygotowane w Protokole 3 oraz płytkę PyroMark Q24 Plate na stole roboczym stacji próżniowej (Rysunek 2).**

Uwaga: Upewnij się, że płytka jest w tej samej orientacji, jak podczas dodawania próbek.



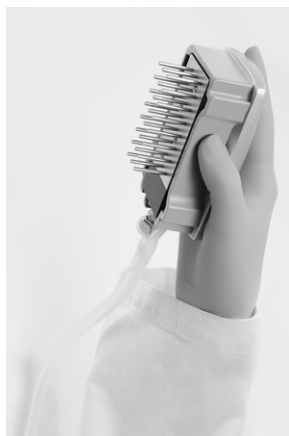
Rysunek 2. Umieszczanie płytki PCR (lub pasków) oraz płytki PyroMark Q24 na stacji próżniowej

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

Uwaga: Cząsteczki sefarozy szybko opadają (sedymentują) i ich pobranie musi nastąpić natychmiast po ich wcześniejszym wymieszaniu.

Jeśli od wytrząsania płytki (pasków) minęła więcej niż 1 minuta – wytrząsaj dodatkowo przez 1 minutę i natychmiast przejdź do pobrania cząsteczek sefarozy.

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



Rysunek 3. Narzędzie próżniowe uniesione celem odessania całego płynu z filtrów.

10. **Ostrożnie przenieś narzędzie próżniowe nad płytkę PyroMark Q24 Plate, a następnie zamknij ssanie przełącznikiem na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off').**
11. **Obniż narzędzie próżniowe tak, aby końcówki filtrujące znalazły się w dołkach płytki PyroMark Q24 Plate zawierających rozcieńczony starter sekwencyjny, a następnie delikatnie poruszaj narzędziem próżniowym na boki celem uwolnienia cząsteczek sefarozy do roztworu.**

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

12. **Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki z wodą o wysokiej czystości (Rysunek 2) i wytrząśnij delikatnie przez 10 sekund.**
13. **Przepłucz końcówki filtrujące poprzez ich zanurzenie w wodzie o wysokiej czystości (Rysunek 2) i włączenie ssania (próżni). Przepłucz końcówki ok. 70 ml wody o wysokiej czystości.**
14. **Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunku 3, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**
15. **Wyłącz ssanie na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off') i umieść je w miejscu spoczynkowym (Parking (P) position).**
16. **Wyłącz pompę próżniową.**

Uwaga: Na koniec dnia roboczego, wszystkie wykorzystane płyny powinny zostać usunięte, a stacja próżniowa (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) sprawdzona pod kątem zanieczyszczeń (patrz 'Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory', strona 49).
17. **Inkubuj płytkę (PyroMark Q24 Plate) z próbkami w 80°C przez 2 minuty na nagrzanym statywie do płytek PyroMark Q24 Plate Holder.**
18. **Usuń płytkę PyroMark Q24 Plate z podgrzanego statywu i umieść na drugim statywie znajdującym się w temp. pokojowej (15–25°C) i pozostaw w takich warunkach przez 10–15 minut celem ostudzenia.**
19. **Przejdź do 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 27.**

Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24

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

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Raport przed-reakcyjny (pre run information report) znajdujący się w menu narzędzi (Tools) dla ustawień reakcji (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 15), dostarcza informacji dotyczących objętości nukleotydów, mieszanin enzymów, substratów oraz buforów wymaganych dla danej reakcji.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Włącz urządzenie PyroMark Q24 - włącznik znajduje się w jego tylnej części.

Procedura

- 1. Rozpuść zliofilizowane mieszaniny enzymów i substratów w 620 µl (każdy) wody (H₂O; zawarta w zestawie).**
- 2. Wymieszaj delikatnie. Nie mieszaj przez worteksovanie!**
Uwaga: Celem pełnego rozpuszczenia mieszanin, pozostaw je w temp. pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut. Przed użyciem upewnij się, że roztwory nie są mętne przed ich dodaniem do kartridża PyroMark Q24. Jeśli odczynniki nie mają zostać użyte natychmiast, umieść je na lodzie* lub w lodówce.
- 3. Przed użyciem, zarówno odczynniki, jak i kartridż PyroMark Q24 powinny osiągnąć temp. pokojową (20–25°C).**
- 4. Postaw kartridż PyroMark Q24 etykietą w swoją stronę.**
- 5. Załaduj kartridż PyroMark Q24 odpowiednimi objętościami nukleotydów oraz mieszanin enzymów i substratów, zgodnie z Rysunkiem 4.**

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

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




Rysunek 4. Widok kartridża PyroMark Q24 z góry. Widoczne oznaczenia korespondują z oznaczeniami na etykietach odczynników. Dodaj mieszaniny enzymów (E), mieszaniny substratów (S) oraz nukleotydów (A, T, C, G) zgodnie z informacjami zawartymi w raporcie przed-reakcyjnym ('pre run information report' w menu 'Tools' ustawień reakcji).

6. **Otwórz bramkę kartridża w aparacie PyroMark Q24 i wstaw kartridż napełniony odczynnikami z etykietą zwróconą w kierunku operatora. Wsuń kartridż do końca, a następnie dociśnij w dół.**
7. **Upewnij się, że z przodu kartridża jest widoczna linia, po czym zamknij bramkę.**
8. **Otwórz ramkę do blokowania płytki i umieść płytkę PyroMark Q24 Plate na bloku grzejmym aparatu.**
9. **Zamknij ramkę do blokowania płytki oraz pokrywę aparatu.**
10. **Do znajdującego się w przedniej części urządzenia portu USB podłącz nośnik pamięci USB zawierający plik reakcyjny 'run file'.**
Uwaga: Nie usuwaj nośnika pamięci USB przed zakończeniem reakcji.
11. **W menu głównym wybierz 'Run' (używając przycisków ▲ oraz ▼) i wciśnij 'OK'.**
12. **Wybierz plik reakcyjny 'run file' (używając przycisków ▲ oraz ▼).**
Uwaga: Celem podglądu zawartości folderu, zaznacz go i wybierz 'Select'. Aby wrócić do poprzedniego widoku wybierz 'Back'.
13. **Aby rozpocząć reakcję zaznacz plik 'run file', a następnie wybierz 'Select'.**
14. **Po skończonej reakcji, gdy aparat wyświetli informację o zapisaniu całej analizy na nośniku pamięci USB, wybierz 'Close'.**
15. **Usuń nośnik pamięci USB z aparatu.**
16. **Otwórz pokrywę aparatu.**
17. **Otwórz bramkę zabezpieczającą kartridża i wyjmij kartridż - należy go pociągnąć lekko w górę, a następnie na zewnątrz (do siebie).**
18. **Zamknij bramkę kartridża.**
19. **Otwórz ramkę zabezpieczającą płytkę i usuń płytkę z bloku grzejmego.**
20. **Zamknij ramkę zabezpieczającą płytkę oraz pokrywę aparatu.**
21. **Usuń płytkę i umyj kartridż zgodnie z zaleceniami zawartymi w instrukcji załączonej do kartridża.**
22. **Dokonaj analizy reakcji zgodnie z opisem w 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 29.**

Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24

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

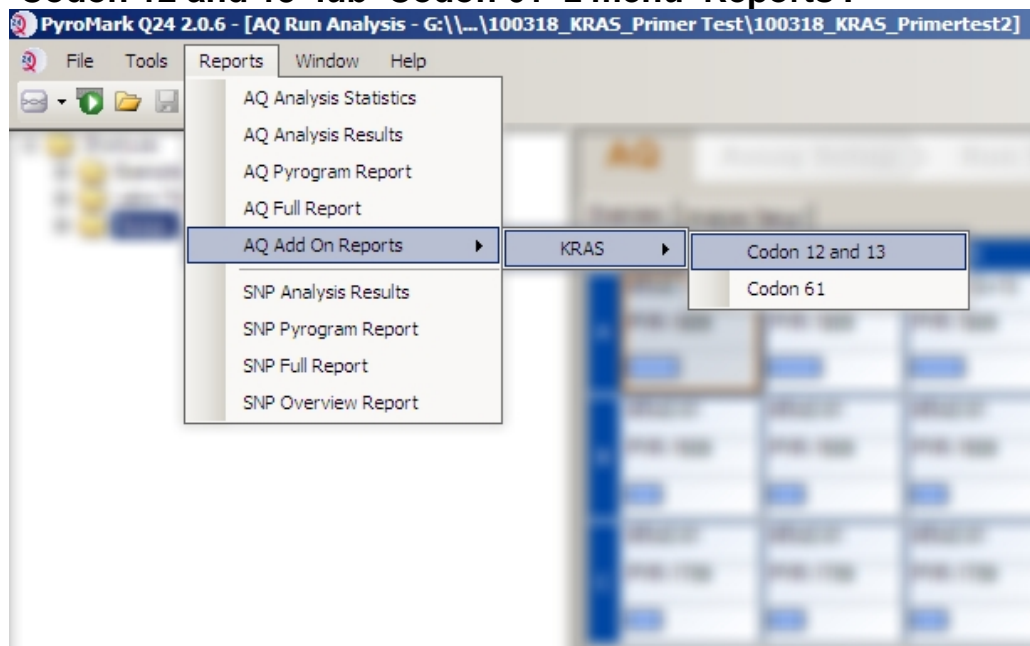
Procedura

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

Uwaga: Rekomendowaną metodą analizy i interpretacji wyniku jest użycie wtyczki 'KRAS Plug-in Report'. Wtyczkę 'KRAS Plug-in Report' można otrzymać pisząc na adres pyro.plugin@qiagen.com. Raport automatycznie wygenerowany przy użyciu tej wtyczki zawiera wyniki określające status wszystkich mutacji z uwzględnieniem odpowiednich wartości LOD (Tabela 8) oraz różnych sekwencji do analizy.

5. Używanie wtyczki 'KRAS Plug-in Report':

Aby wygenerować raport, wybierz 'AQ Add On Reports/KRAS' oraz 'Codon 12 and 13' lub 'Codon 61' z menu 'Reports'.





Rysunek 5. Widok 'AQ Run Analysis'.

Wyniki dla poszczególnych próbek (dołków) zostaną automatycznie przeanalizowane dla wszystkich mutacji z LOD jak podano w Tabeli 8. Wyniki zostaną przedstawione w tabeli, tak jak pokazano na Rysunku 6, a następnie również pozostałe wyniki wraz z pyrogramami i analizą jakości.

Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				

 See detailed results for further explanation.

Rysunek 6. Tabela z podsumowaniem wyników.

6. Użycie trybu analizy AQ:

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



Analiza wszystkich próbek (dołków).



Analiza wybranych próbek (dołków).

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

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

Uwaga: Najczęstsze mutacje w KRAS występują w nukleotydzie 35 (druga zasada kodonu 12). W związku z tym standardowa sekwencja 'Sequence to Analyze' dla analizy kodonów 12 i 13 KRAS jak to zostało zdefiniowane w przygotowaniu analizy (Analysis Setup) uwzględnia mutacje w tej pozycji (patrz Dodatek A, strona 46). Jeśli próbka zawiera mutację w nukleotydzie 34 (pierwsza zasada kodonu 12), sekwencja w 'Sequence to Analyze' może zostać zmieniona celem uwzględnienia analizy statusu mutacji w tej pozycji, jak opisano w Dodatku A. Podobnie, sekwencja 'Sequence to Analyze' może zostać zmieniona dla analizy kodonu 61 KRAS jak opisano w Dodatku A.

Zaktualizowane częstotliwości mutacji dla kodonów 12/13 oraz kodonu 61 ludzkiego genu KRAS są dostępne online w Sanger Institute pod adresem www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

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

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

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

Reanaliza próbek, w których nie wykryto mutacji w nukleotydzie 35 (kodon 12) lub 183 (kodon 61) lub z notą jakościową 'Check' (sprawdź) albo 'Failed' (niepowodzenie).

Zdecydowanie zaleca się ponowną analizę wszystkich próbek bez wykrytej mutacji z użyciem standardowej sekwencji 'Sequence to Analyze', ale także próbek z notą jakościową 'Check' lub 'Failed'. Noty jakościowe 'Check' lub 'Failed' mogą wskazywać na mutację w pozycji innej niż nukleotydy 35 lub 183, skutkującą odchyleniami wysokości pików w dozowaniach referencyjnych. Przykładowo, pik dla któregośkolwiek z 3 pierwszych dozowań wskazuje na mutację w nukleotydzie 34.

Celem reanalizy i wykrycia mutacji dla nukleotydu 34, przejdź do 'Analysis Setup' i zmień 'Sequence to Analyze' z *GNTGRCGTAGGC* na *NGTGRCGTAGGC*. Kliknij 'Apply', a następnie gdy pojawi się okno 'Apply Analysis Setup' kliknij 'To All'.

Celem reanalizy i wykrycia mutacji dla nukleotydu 182 (druga pozycja kodonu 61), zmień 'Sequence to Analyze' analizy kodonu 61 na następującą sekwencję.

CTCTHGACCTG

Celem reanalizy i wykrycia mutacji dla nukleotydu 181 (pierwsza pozycja kodonu 61), zmień 'Sequence to Analyze' analizy kodonu 61 na następującą sekwencję.

CTCTTSACCTG

Uwaga: Po zmianie sekwencji 'Sequence to Analyze', upewnij się, że minimalna wysokość pojedynczego pików jest ustawiona na 30 RLU.

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

Interpretacja Wyników

Interpretacja wyników detekcji i analizy mutacji występujących na niskim poziomie

Zdecydowanie zaleca się uwzględnienie kontroli z niemetylowanym DNA w każdym eksperymencie dla celów porównawczych oraz jako kontrola poziomu tła. Zmierzona częstotliwość dla próbki kontrolnej powinna być mniejsza lub równa wartości LOB.

Wszystkie próbki powinny zostać przetestowane pod kątem limitu detekcji (LOD) – Tabela 8 i interpretowane jak poniżej.

- Częstotliwość mutacji < LOD: Typ dziki
- Częstotliwość mutacji \geq LOD oraz \leq LOD + 3 %: Potencjalna mutacja na niskim poziomie

Uwaga: W przypadku używania wtyczki (krok 5 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 29) i otrzymania takiego wyniku wyświetlone zostanie ostrzeżenie.

Próbki z raportowaną potencjalną mutacją na niskim poziomie mogą być uznane za pozytywne dla danej mutacji tylko w przypadku przeprowadzenia ponownej reakcji w duplikacie i z użyciem kontroli niemetylowanego DNA. Wynik dla obu duplikatów powinien być \geq LOD i różnić się od próbki kontrolnej. W przeciwnym wypadku próbka powinna być zakwalifikowana jako typ dziki.

- Częstotliwość mutacji $>$ LOD + 3 %: Mutacja

W przypadku używania wtyczki 'KRAS Plug-in Report', analiza ta przebiega automatycznie.

Uwaga: Do interpretacji wyników zaleca się używania wtyczki 'KRAS Plug-in Report'. Celem bardziej dogłębnej analizy wyników raportujących obecność mutacji na niskim poziomie, zaleca się dodatkową analizę ręczną przy pomocy programu PytoMark Q24 (np. dla porównania z częstotliwością mutacji próbki kontrolnej).

Uwaga: Zmierzona częstotliwość o wartości powyżej LOB dla próbki kontrolnej wskazuje na ponadprzeciętny poziom tła dla danej analizy, co może wpływać na ocenę ilościową alleli, szczególnie w przypadku mutacji występujących na niskim poziomie. W takim przypadku, zmierzone częstotliwości w zakresie od LOD (Tabela 8) do LOD + 3 % nie mogą stanowić

podstawy do oceny statusu mutacji. Zaleca się ponowne przeprowadzenie analizy dla wątpliwych próbek.

Uwaga: Do wygenerowania danych LOB i LOD został użyty algorytm ‘KRAS Plug-in Report’. Analiza ręczna przy pomocy oprogramowania PyroMark Q24 może skutkować uzyskaniem nieznacznie innych wartości, patrz Protokół 6 (strona 29).

Uwaga: Decyzje dotyczące leczenia pacjentów nowotworowych nie powinny być podejmowane wyłącznie na podstawie statusu mutacji dla genu KRAS.

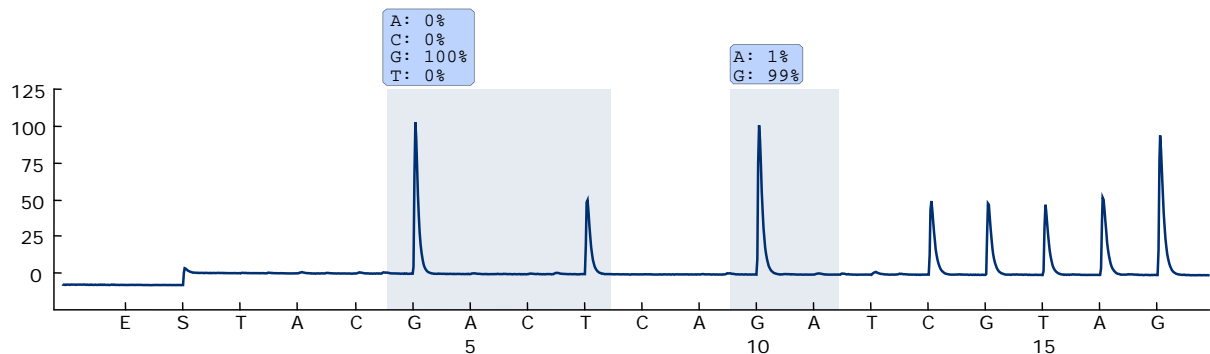
Tabela 8. Wartości LOB oraz LOD ustalone dla konkretnych mutacji

Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), analizowany w orientacji wstecznej (reverse) (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

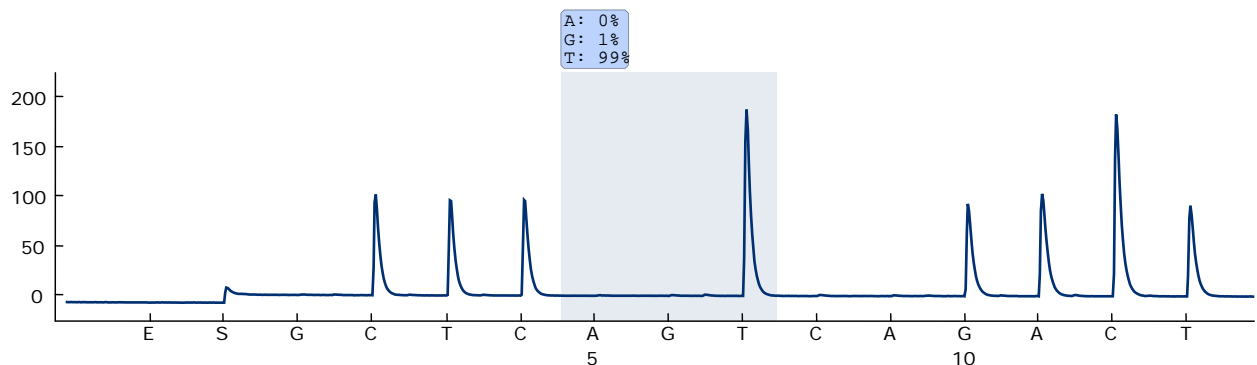
* Źródło: ‘Catalogue of Somatic Mutations in Cancer’, dostępne online na stronie Sanger Institute pod adresem www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Najniższy poziom mutacji w próbce dający wynik mierzonej częstotliwości \geq LOD.

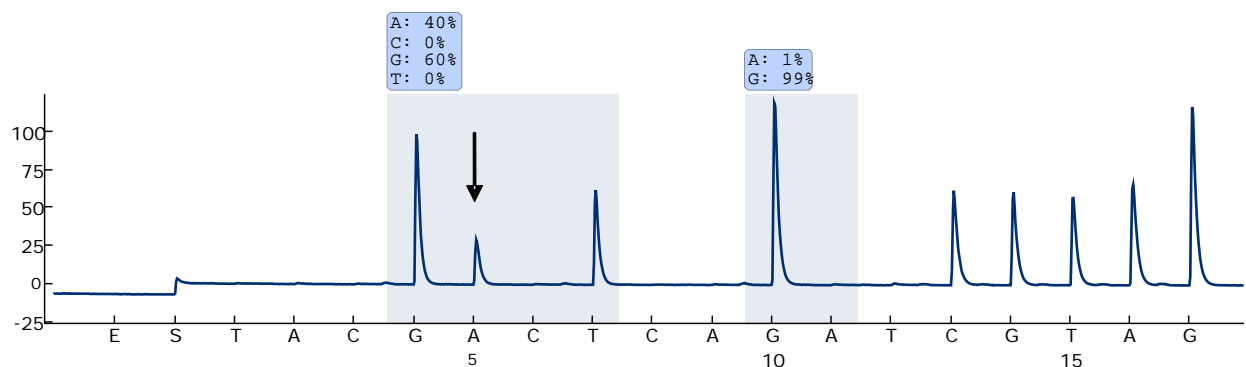
Reprezentatywne wyniki przy użyciu analizy 'AQ' integralnej z PyroMark Q24
 Reprezentatywne wyniki w postaci pyrogramów – Rusunki 7–11.



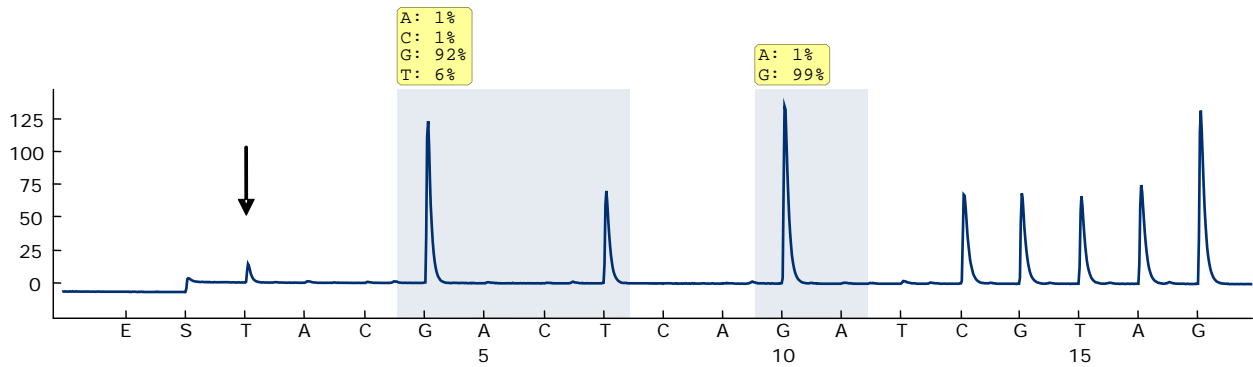
Rysunek 7. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie typu dzikiego dla kodonów 12 i 13.



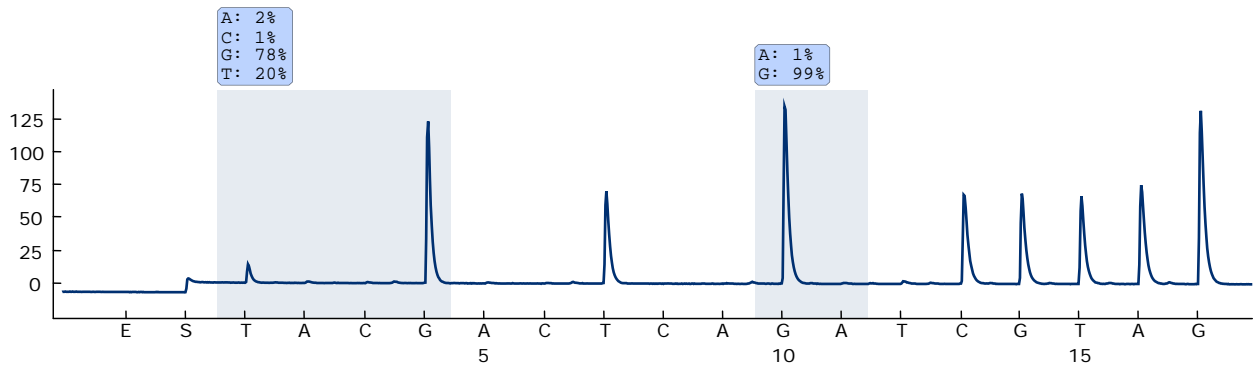
Rysunek 8. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie typu dzikiego dla kodonu 61.



Rysunek 9. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki z mutacją GGT → GAT w zasadzie 2 kodonu 12 (nukleotyd 35, wskazany strzałką).



Rysunek 10. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki z mutacją GGT → TGT w nukleotydzie 1 kodonu 12 (nukleotyd 34, wskazany strzałką) z ‘Sequence to Analyze’ GNTGRCGTAGGC wykrywającą zasadę 2 w kodonie 12 (nukleotyd 35). Kolor żółty oznacza, że sekwencja ta nie jest spodziewana i wymaga sprawdzenia.



Rysunek 11. Pyrogram będący wynikiem reanalizy próbki z Rysunku 10. Mutacja GGT → TGT została reanalizowana przy użyciu ‘Sequence to Analyze’ NGTGRCGTAGGC wykrywającej zasadę 1 w kodonie 12 (nukleotyd 34).

Rozwiązywanie problemów

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

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

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

Komentarze i sugestie

Obecność sygnału dla kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

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

Sekwencja niespodziewana lub o niskiej jakości

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

Komentarze i sugestie

Wynik z komunikatem 'Check' (sprawdź) lub 'Failed' (niepowodzenie)

- a) Niskie piki
- Błędy w przygotowaniu PCR lub przygotowaniu próbek do pirosekwencjonowania mogą prowadzić do powstawania zbyt małych pików. Przeprowadź test funkcjonowania końcówek filtrujących oraz wymieniaj je na nowe zgodnie z zaleceniami opisanymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.
- W przypadku pojawienia się komunikatu 'Check', uważnie porównaj pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecana jest powtórna analiza próbki.
- b) Mutacja nie zdefiniowana w 'Sequence to Analyze'
- Dopasuj analizowaną sekwencję 'Sequence to Analyze' w ustawieniach reakcji (patrz 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* KRAS Pyro str. 46) i ponownie przeprowadź reakcję.
- c) Niespodziewana rzadka mutacja
- Komunikat oceny jakości wyniku 'Check' lub 'Failed' może być spowodowany niespodziewanym wzorem wykresu. Może to wskazywać na obecność niespodziewanej mutacji, która nie jest analizowana w ramach raportu wtyczki (plug-in report). Takie próbki powinny być analizowane ręcznie z użyciem oprogramowania PyroMark Q24 i z uwzględnieniem nieoczekiwanych mutacji.
- d) Komunikat sygnalizujący duże odchylenie wysokości piku 'High peak height deviation' dla danego dozowania (dispensation).
- Pyrogram powinien zostać uważnie porównany z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokości pików odpowiadają wysokości słupków i nie mogą być przypisane rzadkim mutacjom, to zalecana jest powtórna analiza próbki.

Wysoki poziom tła

- a) Niewłaściwe przechowywanie nukleotydów
- Nukleotydy przechowuj w 2–8°C. Przechowywanie w –15 do –25°C może powodować wzrost poziomu tła.

Komentarze i sugestie

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b) Krótki czas schładzania próbek przed rozpoczęciem analizy pirosekwencjonowaniem | Trzymaj próbki na statywie 'PyroMark Q24 Plate Holder' w temp. pokojowej przez 10–15 minut. Nie skracaj czasu schładzania. |
| c) Zanieczyszczenie kartridża | Ostrożnie oczyść kartridż zgodnie z wytycznymi w instrukcji kartridży. Przechowuj kartridż zabezpieczony przed światłem i kurzem. |

Brak sygnałów dla kontroli pozytywnych (niemetylowane DNA kontrolne)

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Niewystarczająca dla wszystkich próbek ilość mieszaniny enzymów lub substratów | Upewnij się, że kartridż aparatu PyroMark Q24 jest napełniony odczynnikami zgodnie z protokołem pre-reakcyjnym (Pre Run Information) z menu 'Tools'. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie lub rozcieńczanie odczynników | Przygotuj odczynniki PyroMark Q24 Gold zgodnie z załączonymi instrukcjami. |
| c) Niewystarczająca aktywacja polimerazy DNA HotStarTaq | Polimeraza HotStarTaq DNA w PyroMark PCR Master Mix wymaga etapu aktywacji 15 minut w 95°C. |
| d) Niepowodzenie w przygotowaniu PCR lub próbki | Błędy w przygotowaniu reakcji PCR, programowaniu termocyklera lub przygotowaniu próbki do analizy pirosekwencjonowaniem mogą skutkować brakiem sygnału. Przeprowadź test funkcyjny końcówek filtrujących zgodnie z wytycznymi zawartymi w <i>Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24</i> i wymień je na nowe jeśli zajdzie taka potrzeba. Powtórz PCR oraz analizę pirosekwencjonowaniem. |

Kontrola Jakości

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

Ograniczenia

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

Sprawdzenie wydajności systemu jest odpowiedzialnością użytkownika w kontekście procedur stosowanych w jego laboratorium, a które nie są objęte testami wykonywanymi przez QIAGEN.

Charakterystyka Wydajności

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

Wartości LOB oraz LOD zostały ustalone dla szeregu mutacji przy pomocy mieszanin plazmidów (Tabela 9). LOB oraz LOD zostały ustalone zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protokół ustalania limitów detekcji oraz pomiarów ilościowych; zaaprobowany poradnik). Błędy α oraz β (odpowiednio, fałszywie pozytywne i fałszywie negatywne) zostały ustalone na 5%.

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

Mutacje GGT → GTT w kodonie 12

Dla tych mutacji pomiary próby ślepej były zgodnie bliskie 0 % (n=72), co skutkowało dystrybucją nie gaussowską. W związku z tym LOD było ustalane przy użyciu innej metody, zgodnie z wytycznymi 'CLSI Guideline EP17-A'. Niski sygnał wskazujący na obecność mutacji (LOD) w tych pozycjach był ustawiony na 1 %, czyli wyraźnie powyżej stałego poziomu linii bazowej (LOB) wynoszącego 0 %. Podczas analizy próbki o poziomie mutacji 7%, 95% wyników (n=89) dała sygnał, który można uznać za pozytywny (\geq LOD, i.e., \geq 1 %).

Tabela 9. LOB oraz LOD ustalone dla specyficznych mutacji

Substytucja w kw. nukleinowym	Substytucja aminokwasów	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), analizowany w orientacji wstecznej (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

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

[†] Najniższy poziom mutacji w próbce dający wynik mierzonej częstotliwości \geq LOD.

Uwaga: Powyższe wartości oparte są na reakcjach, gdzie mieszaniny plazmidów zawierających dziką lub odpowiednią zmutowaną sekwencję zostały użyte jako matryce do amplifikacji PCR.

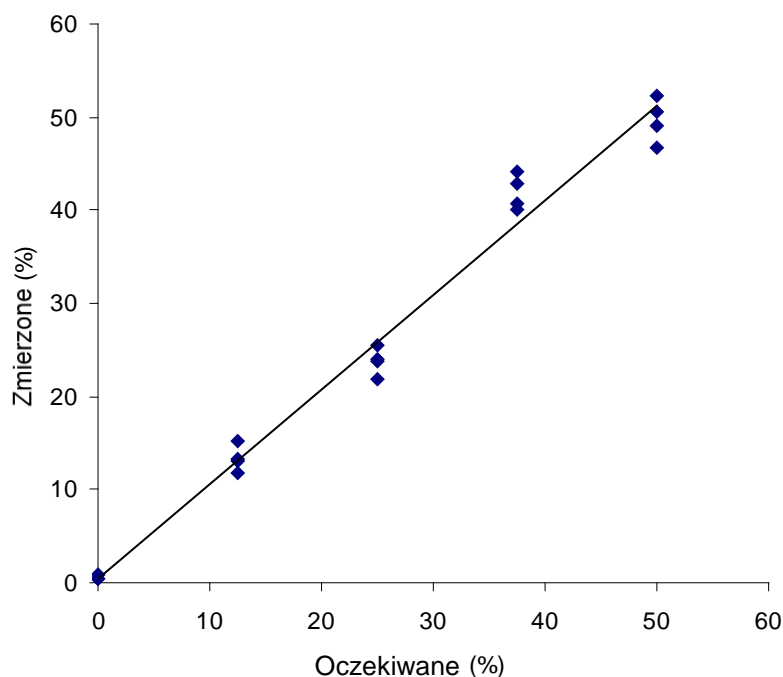
Uwaga: Do wygenerowania danych LOB i LOD został użyty algorytm 'KRAS Plug-in Report'. Analiza ręczna przy pomocy oprogramowania PyroMark Q24 może skutkować uzyskaniem nieznacznie innych wartości, patrz Protokół 6 (strona 29).

Uwaga: Zaleca się potwierdzenie wydajności metody w laboratorium.

Liniowość

Liniowość została zmierzona zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP6-A 'Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline' (Ocena liniowości dla procedur pomiarów ilościowych: analiza statystyczna; zaaprobowany przewodnik).

Plazmidy zawierające sekwencje typu dzikiego oraz zmutowane były mieszane w proporcjach dających następujące poziomy mutacji: 0, 12,5, 25, 37,5 oraz 50%. Mieszanki, każda w czterech powtórzeniach, zostały losowo dodane do dołków płytki i przeanalizowane. Wyniki dla mutacji GGT → TGT w kodonie 12 zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania Analyse-it® v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) i są przedstawione na Rysunku 12.



Rys. 11. Liniowość dla mutacji GGT → TGT w kodonie 12.

Sumaryczna powtarzalność wyniosła 1,64 % i wyniki były liniowe w zakresie dopuszczalnej nieliniowości 3 %. Podobne wyniki zostały uzyskane dla mutacji GGC → GAC w kodonie 13.

Precyzja uśredniona

Ustalanie liniowości dla mutacji GGT → TGT w kodonie 12 zostało wykonane przez powtórzenie pomiarów przez 3 operatorów w ciągu 3 osobnych dni i z użyciem różnych kombinacji aparatów i odczynników PyroMark Q24. Wyniki trzech reakcji przedstawione są w Tabeli 12.

Tabela 10. Precyzja uśredniona*

% plazmidów zmutowanych [†]	Reakcja 1		Reakcja 2		Reakcja 3		Sumarycznie	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

* Wszystkie wartości podane są w jednostkach procentowych [%]. SD: odchylenie standardowe.

† Na podstawie pomiarów OD₂₆₀.

Wartości dla uśrednionej precyzji (SD) wyniosły 0,6–2,0 % w mierzonym zakresie poziomu mutacji 0–50 %.

Ocena diagnostyczna

Zestaw *therascreen* KRAS Pyro został przetestowany w porównaniu do Zestawu DxS KRAS Mutation. DNA zostało wyizolowane ze 100 próbek nowotworowych skóry zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE), a następnie przetestowane pod kątem mutacji w kodonach 12 i 13.

DNA zostało wyizolowane przy użyciu Zestawu EZ1 DNA Tissue i analiza została przeprowadzona przy pomocy Zestawu *therascreen* KRAS Pyro na aparacie PyroMark Q24 przy pomocy Zestawu DxS KRAS Mutation na aparacie ABI PRISM® 7900HT SDS.

Na 100 przeanalizowanych próbek, status mutacji został określony w 91 próbkach przy użyciu Zestawu DxS KRAS Mutation. Użycie Zestawu *therascreen* KRAS Pyro umożliwiło ocenę statusu mutacji 94 próbek.

Poza próbkami, których analiza skończyła się niepowodzeniem dla jednego lub obu zestawów, Zestaw *therascreen* KRAS Pyro oraz Zestaw DxS KRAS wykazały 100% zgodność wyników.

Zarówno czułość diagnostyczna, jak i specyficzność diagnostyczna Zestawu *therascreen* KRAS Pyro zostały określone na 100% (Tabela 11).

Tabela 11. Wyniki analizy próbek raka jelita grubego dla kodonów 12 i 13

		Zestaw DxS KRAS Mutation			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Razem
Zestaw <i>therascreen</i> KRAS Pyro	Mutant	33	0	1	34
	Typ dziki	0	57	3	60
	Nieznany	0	1	5	6
	Razem	33	58	9	100

Analiza kodonu 61

Te same 100 próbek zostało przeanalizowanych pod kątem mutacji w kodonie 61 przy użyciu Zestawu *therascreen* KRAS Pyro. Tylko w przypadku jednej próbki nie zostały spełnione kryteria jakościowe dla analizy kodonu 61. Ta sama próbka również nie spełniła wymogów jakościowych analizy z użyciem Zestawów *therascreen* KRAS Pyro oraz DxS dla kodonów 12 i 13, co wskazuje na zbyt niską jakość użytego DNA. Odsetek pozytywnych wyników przy użyciu metody Sangera dla kodonu 61 wskazuje, że metoda ta jest mniej zależna od jakości DNA niż zestawy *therascreen* KRAS Pyro oraz DxS dla analiz kodonów 12 i 13. Z uwagi na brak testu dla mutacji kodonu 61 w Zestawie DxS, nie może zostać wykonane bezpośrednie porównanie pomiędzy odpowiednimi analizami.

Mutacje w kodonie 61 zostały wykryte w 4 na 99 próbek. Trzy zawierały częste mutacje (CAC, CAT, CTA) w kodonie 61, podczas gdy czwarta próbka zawierała mutacje zarówno w kodonie 60 (GGT→GGA) jak i w kodonie 61 (CAA→AAA).

Uwaga: We wszystkich analizach oceniających charakterystykę wydajności, sygnał wynosił ponad 60 RLU, co odpowiada rutynowym wynikom przy 10 ng DNA wyizolowanego z tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE).

Literatura

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

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

Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające na <N> ilość testów

<N>



Użyj do (określonej daty)



Do medycznego użytku diagnostycznego in vitro



Numer katalogowy



Numer partii (lot)



Numer materiału



Komponenty (składowe)



Zawiera



Numer



Globalny Numer Handlowy Produktu (Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe



Producent



Zapoznaj się z instrukcją użytkownika

Informacje Kontaktowe

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

Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* KRAS Pyro

Gdy wtyczka KRAS Plug-in Report została zainstalowana, predefiniowane ustawienia analiz (Assay Setups) dla kodonów 12 i 13 oraz kodonu 61 są dostępne w menu oprogramowania PyroMark Q24 (ścieżka dostępu: Example Files/PyroMark Setups/KRAS). Następujące kroki nie muszą zostać wykonane. Wtyczkę KRAS Plug-in Report można otrzymać pisząc na adres pyro.plugin@qiagen.com.

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

Gdy wtyczka KRAS Plug-in Report nie została zainstalowana, przed przystąpieniem do analizy przy użyciu Zestawu *therascreen* KRAS Pyro po raz pierwszy, analiza musi zostać zaprogramowana ręcznie. Zaprogramuj analizę dla kodonów KRAS 12 i 13 oraz kodonu KRAS 61 przy pomocy oprogramowania PyroMark Q24, jak to opisano poniżej.

Procedura

Kodony 12 i 13 KRAS

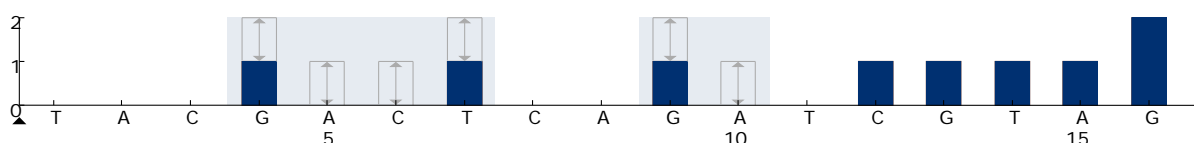
1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New AQ Assay'.
2. W oknie 'Sequence to Analyze' wpisz poniższą sekwencję.
GNTGRCGTAGGC

Uwaga: Najczęstsze mutacje w kodonie 12 zostaną wykryte dla nukleotydu 35 (druga pozycja) przy użyciu tej sekwencji do analizy. Aby sprawdzić obecność mutacji dla nukleotydu 34 (pierwsza pozycja), zmień sekwencję 'Sequence to Analyze' na poniższą.

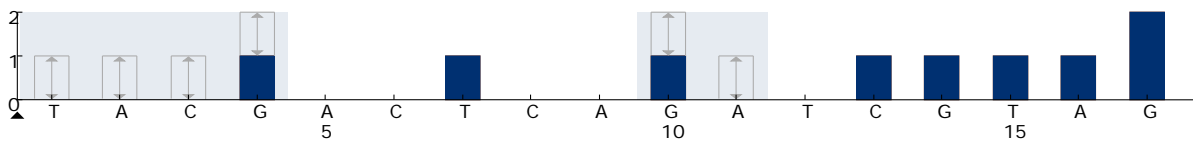
NGTGRCGTAGGC

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


3. Ręcznie wprowadź następującą kolejność dozowania (Dispensation Order).
TACGACTCAGATCGTAG



Rysunek 13. Histogram dla kodonów 12 (nukleotyd 35) oraz 13 (nukleotyd 38) z sekwencją 'Sequence to Analyze' **GNTGRCGTAGGC**.



Rysunek 14. Histogram dla kodonów 12 (nukleotydy 34) oraz 13 (nukleotydy 38) z sekwencją ‘Sequence to Analyze’ *NGTGRCGTAGGC*.

4. Wybierz zakładkę ‘Analysis Parameters’ (parametry analizy) i zwiększ ‘Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality’ (odcięcie wysokości piku – wymagana wysokość piku spełniająca kryteria jakości) do 30.
5. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę, jako ‘KRAScodon 12+13’.

Kodon 61 KRAS

6. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz ‘New AQ Assay’.
7. W oknie ‘Sequence to Analyze’ wpisz poniższą sekwencję.
CTCDTGACCTG

Uwaga: Najczęstsze mutacje w kodonie 61 zostaną wykryte dla nukleotydu 183 (trzecia pozycja) przy użyciu tej sekwencji do analizy. Aby sprawdzić obecność mutacji dla nukleotydu 182 (druga pozycja), zmień sekwencję ‘Sequence to Analyze’ na poniższą.

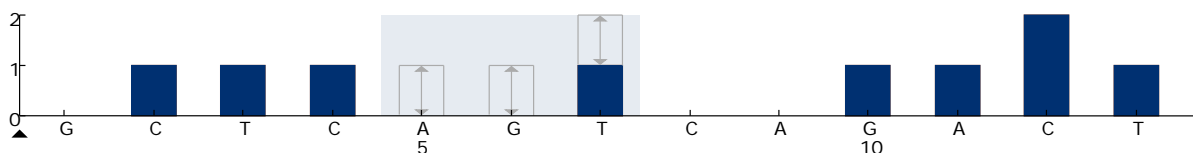
CTCTHGACCTG

Celem oceny obecności mutacji w kodonie 181 (pierwsza pozycja), zamień sekwencję ‘Sequence to Analyze’ na następującą.

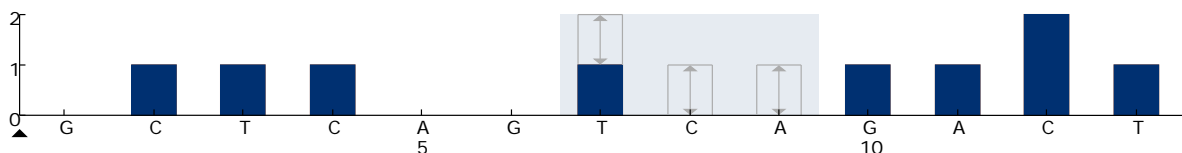
CTCTTSACCTG

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

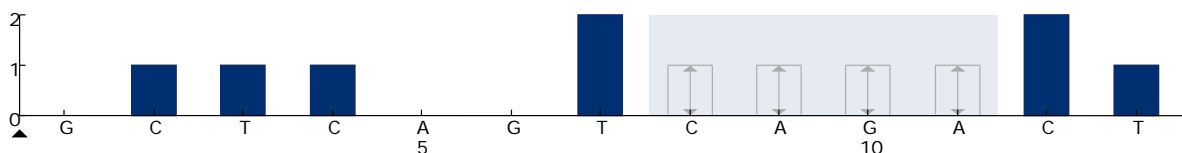
8. Ręcznie wprowadź następującą sekwencję dozowania (Dispensation Order).
GCTCAGTCAGACT



Rysunek 15. Histogram dla kodonu 61 (nukleotydy 183) z sekwencją ‘Sequence to Analyze’ *CTCDTGACCTG*.




Rysunek 16. Histogram dla kodonu 61 (nukleotyd 182) z sekwencją 'Sequence to Analyze' *CTCTHGACCTG*.



Rysunek 15. Histogram dla kodonu 61 (nukleotyd 182) z sekwencją 'Sequence to Analyze' *CTCTTSACCTG*.

9. Wybierz zakładkę 'Analysis Parameters' i zwiększ 'Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality' do 30.
10. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę, jako 'KRAScodon 61'.

Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory

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

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

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

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

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

Ważne informacje przed rozpoczęciem

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

Procedura

1. Upewnij się, że narzędzie próżniowe ma wyłączone ssanie (próżnię; pozycja 'Off') i pompa próżniowa jest wyłączona.
2. Usuń wszystkie roztwory pozostałe w wanienkach.
3. Umyj waniенki wodą o wysokiej czystości lub jeśli konieczne wymień na nowe
4. Opróżnij butlę na odpady płynne.
Uwaga: Pokrywa może zostać odkręcona bez potrzeby odłączania wężyków.

5. Jeśli stacja próżniowa musi zostać umyta (np. z powodu kurzu lub wycieków), postępuj zgodnie z wytycznymi zawartymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	Na 24 reakcje dla systemów PyroMark Q24: Seq Primers (startery sekwencyjne), PCR Primers (startery PCR), Human Control DNA (DNA kontrolne), PyroMark PCR Master Mix (mieszanina do PCR), CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący), PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny), PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący), PyroMark Wash Buffer (bufor płuczący), Enzyme Mixture (mieszanina enzymów), Substrate Mixture (mieszanina substratów), dATPaS, dCTP, dGTP, dTTP i H ₂ O	971460
PyroMark Q24 MDx	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001513
PyroMark Q24	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)*	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Oprogramowanie aplikacyjne	9019063
PyroMark Q24 Software	Oprogramowanie analityczne	9019062
Akcesoria		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-dołkowa płytka reakcyjna	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartridże do dozowania nukleotydów i odczynników	979302

* Tylko UK.

† Reszta świata.

Produkt	Zawartość	Nr kat.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Końcówki filtrujące wielokrotnego użytku do stacji próżniowej PyroMark Vacuum Workstation Q96 oraz Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Odczynnik do sprawdzania działania systemu po instalacji	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Odczynnik do testu wydajności systemu po instalacji	979304
Produkty powiązane		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Zestaw na 50 izolacji DNA: 50 QIAamp MinElute® Columns (kolumny), Proteinase K (proteinaza K), Buffers (bufory), Collection Tubes (2 ml) (próbówki na eluat)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Zestaw na 48 izolacji: Reagent Cartridges (Tissue) (kartridże odczynnikowe), Disposable Filter-Tips (jednorazowe końcówki pipet z filtrami), Disposable Tip-Holders (jednorazowe uchwyty do końcówek pipet), Sample Tubes (2 ml) (próbówki), Elution Tubes (1.5 ml) (próbówki na eluat), Buffer G2 (bufor G2), Proteinase K (proteinaza K)	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Zestaw na 50 izolacji: QIAamp Mini Spin Columns (kolumny), Buffers (bufory), Reagents (odczynniki), Tubes (próbówki), VacConnectors (adaptery)	61104

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

Strona celowo pozostawiona pustą

Dla krajów, których dotyczy:

ZAKUP NINIEJSZEGO PRODUKTU POZWALA KUPUJĄCEMU NA JEGO UŻYWANIE CELEM WYKONYWANIA USŁUG DIAGNOSTYCZNYCH W ODNIESIENIU DO DIAGNOSTYKI MATERIAŁÓW LUDZKICH IN VITRO. NIE UDZIELA SIĘ ŻADNEGO OGÓLNEGO PATENTU ANI INNEJ LICENCJI PONAD NINIEJSZE PRAWO UŻYTKOWANIA WYNIKAJĄCE Z ZAKUPU NINIEJSZEGO PRODUKTU.

Znaki towarowe: 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).

Ograniczona Umowa Licencyjna

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu *therascreen* KRAS Pyro na następujące warunki:

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

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

© 2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

