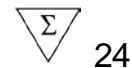


# *therascreen*<sup>®</sup> KRAS Pyro<sup>®</sup> Kit kézikönyv



1. verzió



In vitro diagnosztikai használatra



971460



1061825HU



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

NÉMETORSZÁG

R3

MAT

1061825HU



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN vezető gyártó az innovatív mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák terén, melyek révén bármely biológiai minta tartalmának izolálása és detektálása lehetővé válik. Korszerű, kiváló minőségű termékeink és szolgáltatásaink biztosítják a vizsgálatok sikerét a mintavételtől az eredmények értelmezéséig.

A QIAGEN meghatározó az alábbi területeken:

- DNS, RNS és fehérjék tisztítása
- Nukleinsav- és fehérjevizsgálatok
- Mikro-RNS-kutatás és RNSi
- Mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák automatizálása

Küldetésünk, hogy hozzásegítsük Önöket a szakmai sikerek és áttörések eléréséhez. További információkért látogasson el honlapunkra: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Tartalomjegyzék

<b>Alkalmazási terület</b>	<b>5</b>
<b>Összefoglalás és magyarázat</b>	<b>5</b>
<b>Az eljárás elve</b>	<b>6</b>
<b>Szállított anyagok</b>	<b>8</b>
A kit tartalma	8
<b>Szükséges, de nem biztosított anyagok</b>	<b>10</b>
<b>Figyelmeztetések és óvintézkedések</b>	<b>11</b>
Biztonsági információk	11
Általános óvintézkedések	12
<b>A reagensek tárolása és kezelése</b>	<b>13</b>
<b>A minták kezelése és tárolása</b>	<b>13</b>
<b>Eljárás</b>	<b>14</b>
DNS-izolálás	14
1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját	15
2. protokoll: PCR a <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kittel szállított PCR reagensek használatával	18
3. protokoll: A PCR termékek rögzítése Streptavidin Sepharose High Performance gélyöngyökre	21
4. protokoll: A minták előkészítése a Pyrosequencing analízis előtt a PyroMark Q24 készüléken	23
5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása	27
6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése	29
<b>Az eredmények értelmezése</b>	<b>33</b>
Az analízis eredményeinek értelmezése, és az alacsony értéket adó mutációk kimutatása	33
Hibaelhárítási útmutató	37
<b>Minőség-ellenőrzés</b>	<b>40</b>
<b>Korlátozások</b>	<b>40</b>
<b>Teljesítményjellemzők</b>	<b>41</b>
A vak minta határértéke (LOB) és kimutatási határérték (LOD)	41
Linearitás	43
Közepes pontosság	43
Diagnosztikai kiértékelés	44

<b>Irodalomjegyzék</b>	<b>45</b>
<b>Szimbólumok</b>	<b>46</b>
<b>Kapcsolatfelvételi adatok</b>	<b>47</b>
<b>„A” Függelék: A <i>therascreen</i> KRAS Pyro assay-k beállítása</b>	<b>47</b>
<b>„B” függelék: A hulladéktartályok és teknők kiürítése</b>	<b>50</b>
<b>Rendelési információk</b>	<b>52</b>

## Alkalmazási terület

A *therascreen* KRAS Pyro Kit egy *in vitro* nukleinsav-szekvencia alapú, a Pyrosequencing® technológián alapuló detektáló teszt az emberi szövetmintákból kinyert genomi DNS emberi KRAS génje 12-es, 13-as és 61-es kodonjaiban fellépő mutációk mennyiségi kimutatására.

A *therascreen* KRAS Pyro Kit azzal a céllal lett kialakítva, hogy segítsen azon végbéldaganatos betegek azonosításában, akiknél valószínűsíthetőbb, hogy sikeres lesz az anti-EGFR terápia, például a panitumumabbal és cetuximabbal végzett kezelés. *In vitro* diagnosztikai használatra.

Csak a PyroMark® Q24 rendszerrel használandó. A PyroMark Q24 rendszerbe az alábbiak tartoznak:

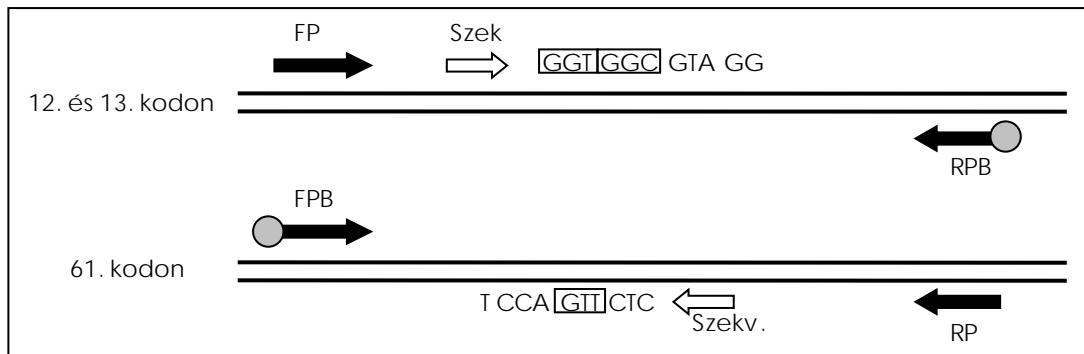
- A PyroMark Q24 készülék és a PyroMark Q24 MDx készülék.
- A PyroMark Q24 Vacuum Workstation és a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- A PyroMark Q24 Software (2.0-s verzió) és a PyroMark Q24 MDx Software (2.0-s verzió).

A terméket csak képzett szakemberek – úgymint *in vitro* diagnosztikai eljárásokban, molekuláris biológiai technikákban, és a PyroMark Q24 rendszer használatában jártas technikusok és orvosok – általi használatra szánták.

## Összefoglalás és magyarázat

Európában komoly figyelem összpontosul a KRAS mutációk analízisére; ez annak tulajdonítható, hogy az Európai Bizottság feltételes piaci értékesítési felhatalmazást adott az áttétes vastagbélrák panitumumab és cetuximab szerekkel való kezelésére nem mutálódott (vad típusú) KRAS génnel rendelkező betegeknél. Ez gyakorlatilag azt jelenti, hogy a panitumumab és cetuximab csak olyan betegeknél adható, akik átestek KRAS mutációs állapot szűrésén.

A CE-IVD-vel jelölt *therascreen* KRAS Pyro Kit a humán KRAS gén 12., 13. és 61. kodonjaiban létrejött mutációk mennyiségi mérésére szolgál. A termék két assay-ből áll: az egyik a 12. és 13. kodonok mutációit, a másik 61. kodonban létrejött mutációkat detektálja (lásd 1. ábra). A két szakaszt külön-külön amplifikálják PCR-rel, és szekvenálják a meghatározott régióban. A meghatározott pozíciókat körülvevő szekvenciák normalizálási és referencia csúcsokként szolgálnak az analízis során a mennyiségi meghatározáshoz és minőségi értékeléshez.



**1. ábra: A KRAS assay képi illusztrációja.** Az itt jelzett szekvencia egy vad típusú minta kielmezett szekvenciája. **FP** és **FPB**: Forward PCR primerek (a B jelzi a biotinilációt); **RP** és **RPB**: Reverz PCR primerek (a B jelzi a biotinilációt); **szekv.**: szekvenáló primerek.

**Megjegyzés:** A 12. és 13. kodonokat a forward irányban, a 61. kodont a reverz irányban szekvenálják.

A termék egy PCR primer elegyből, és mindkét assay számára egy-egy szekvenáló primerből áll. A primerek oldat formájában érkeznek. Minden egyes fiola 24 µl primert vagy primer elegyet tartalmaz.

## Az eljárás elve

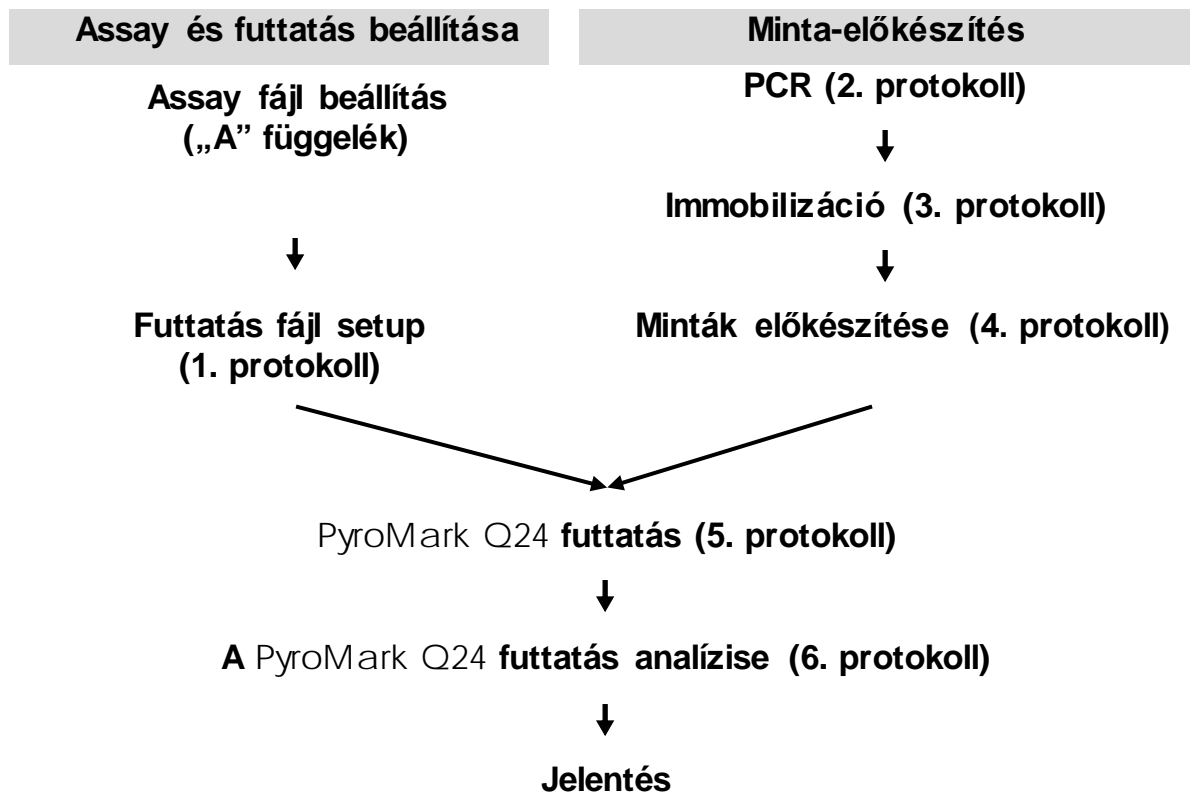
A munkafolyamat illusztrálja az assay eljárásának lépéseit. Miután a PCR felhasználja a 12/13. és a 61. kodont célzó primereket, immobilizálják az amplikonokat Streptavidin Sepharose® High Performance gyöngyökre. Előkészítik az egyszálú DNS-t, és a megfelelő szekvenáló primerek hozzákapcsolódnak a DNS-hez. A mintákat ezután analizálják a PyroMark Q24 rendszeren egy futtatási beállításfájl és egy futtatási fájl segítségével.

A futtatás kielmezéséhez ajánlott a KRAS Plug-in Report beépülő modul használata. A KRAS Plug-in Report beépülő modul e-mail útján szerezhető be a [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com) címről.

A futtatás azonban a PyroMark Q24 rendszerbe szervesen beépített analízis eszköz használatával is kielmezhető. A „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) akkor beállítható a ritka mutációk detektálására a futtatás után (lásd „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése”, 29. o.).

**Megjegyzés:** A munkafolyamat némiképp módosult a *PyroMark KRAS Kit kézikönyvben* és a *therascreen KRAS Pyro Kit kézikönyv R1 átdolgozásában* találhatóhoz képest (lásd „2. protokoll: PCR a *therascreen KRAS Pyro Kittel* szállított PCR reagensek használatával”, 18. o., és „4. protokoll: A minták előkészítése a Pyrosequencing analízis előtt a PyroMark Q24 készüléken”, 23. o.).

## A *therascreen* KRAS Pyro eljárás munkafolyamata



### Kontrollok

A kit része a metilátlan kontroll DNS is, mint a PCR és szekvenálási reakciók pozitív kontrollja. Ez a kontroll minta vad típusú genotípust tartalmaz az ezen kit használatával szekvenált régiókban, és szükséges a használata az eredmények megfelelő értelmezéséhez, és az alacsony szintű mutációk azonosításához (lásd „Interpretation of Results”, 33. o.). Minden Pyrosequencing futtatásnál használjon egy metilátlan kontroll DNS-t tartalmazó mintát minden assay-hez.

Ezen felül, egy negatív (templát DNS nélküli) kontrollnak is szerepelnie kell minden PCR beállításban, legalább egy assay esetében.

# Szállított anyagok


## A kit tartalma

### *therascreen* KRAS Pyro Kit (2/1. doboz)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
<b>Katalógusszám</b>	<b>971460</b>
<b>Reakciók száma</b>	<b>24</b>
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Metilálatlan kontroll DNS)	100 µl



## therascreen pufferek és reagensek (2/2. doboz)

<i>therascreen</i> pufferek és reagensek		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 fiola
Substrate Mixture		1 fiola
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Kézikönyv		1

\* Nátrium-hidroxidot tartalmaz.

## Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (safety data sheets, SDS-ek) tartalmazzák, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

- DNS-izoláló készlet (lásd „DNS-izolálás”, 14. oldal)
- Pipetták (állítható)\*
- Steril pipettahegyek (szűrőkkel a PCR setuphoz)
- Asztali mikrocentrifuga\*
- PCR készülék\* és megfelelő PCR csövek
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalógusszám: 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (katalógusszám: 9001513 vagy 9001514)\*†
- PyroMark Q24 Software (katalógusszám: 9019063 vagy 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (katalógusszám: 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (katalógusszám: 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (katalógusszám: 9001515 vagy 9001517)\*†
- Tálcsás rázó gép\* a gyöngyök rögzítéséhez
- Fűtőblokk\*, amely képes 80 °C-ra felfűteni
- 24 tesztlyukas PCR lemez vagy csőfűzér
- Csőfűzér kupakok
- Nagy tisztaságú víz (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm, vagy azzal egyenértékű).  
**Megjegyzés:** A kitben elegendő víz található a PCR-hez, DNS rögzítéshez és az enzimkeverék és szubsztrátelegy feloldásához; további nagy tisztaságú vízre van szükség a 10x-es PyroMark Wash Buffer mosópuffer felhígításához.
- Etanol (70%-os)‡

\* Ellenőrizze, hogy a műszerek a gyártó ajánlásai szerint rendszeresen lettek-e ellenőrizve és kalibrálva.

† CE-IVD-jelölésű, a 98/79/EK számú EU irányelvnek megfelelően. A többi felsorolt termék nem CE-IVD-jelölésű a 98/79/EK számú EU irányelv alapján.

‡ Ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol más anyagokat, például metanolt vagy metil-etil-ketont is tartalmaz.

## Ajánlott tálcás rázógépek

Az 1. táblázatban bemutatott tálcás rázógépek használata javasolt a *therascreen* KRAS Pyro Kittel.

### 1. táblázat: A *therascreen* KRAS Pyro Kithez javasolt tálcás rázógépek

Gyártó	Termék	Katalógusszám
Eppendorf	Thermomixer comfort (alap készülék)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapterlemez 96 x 0,2 ml PCR tesztcsövekhez, a mikrotiter lemezekhez megfelelő blokkok beillesztéséhez	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51 410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51 110 U)

## Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra

### Biztonsági információk

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmazzák. Ezek elérhetők online, a [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN kitek és kitben található komponensek biztonsági adatlapja.

A következő veszélyességi és biztonsági jelzések vonatkoznak a *therascreen* KRAS Pyro Kit elemeire.

### PyroMark Denaturation Solution



Vigyázat! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Fémekre korrozív hatású lehet. A kiömlött anyagot fel kell itatni a körülvevő anyagok károsodásának megelőzése érdekében. Az eredeti edényben tartandó.

Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

### PyroMark Enzyme Mixture



Tartalmazott anyag: (R\*,R\*)-1,4-dimerkaptobután-2,3-diol; ecetsav. Veszély! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni.

Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

### PyroMark Substrate Mixture



Ecetsavat tartalmaz. Vigyázat! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Ha a szemirritáció nem múlik el: Orvosi ellátást kell kérni. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

## Általános óvintézkedések

**Megjegyzés:** A felhasználó mindig ügyeljen az alábbiakra.

- Az optimális eredmények eléréséhez a felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges. A reagensek ezen kézikönyvben leírtaktól eltérő hígítása nem javasolt, és teljesítményromlást eredményez.
- A munkafolyamat némiképp módosult (lásd „2. protokoll: PCR a *therascreen* KRAS Pyro Kittel szállított PCR reagensek használatával”, 18. o., és „4. protokoll: A minták előkészítése a Pyrosequencing analízis előtt a PyroMark Q24 készüléken”, 23. o.) a *PyroMark* KRAS Kit kézikönyvben és a *therascreen* KRAS Pyro Kit kézikönyv R1 átdolgozásában leírtakhoz képest.
- Ezen termék összetevői elegendőek a 24 reakció legfeljebb 5 független futtatásban való elvégzéséhez.

- Használjon szűrőbetétes steril pipettahegyeket (a PCR kísérletekhez).
- Minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel a pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok), és térben elkülönített helyen adja hozzá azokat a reakcióelegyhez.
- A vizsgálat megkezdése előtt a mintákat szobahőmérsékleten (15–25 °C) teljesen ki kell olvasztani.
- Felolvasás után keverje meg (pipettázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd centrifugálja le a reagenseket.
- A mutációs állapotok megítélése nem alapulhat hibás eredményeken.

## A reagensek tárolása és kezelése

A *therascreen* KRAS Pyro Kitet két külön dobozban szállítják. A *therascreen* KRAS Pyro Kit (2/1. doboz) szárazjégben érkezik. Megérkezése után a PyroMark PCR Master Mix, a CoralLoad koncentrátum, a metilálatlan kontroll DNS és az összes primer -30 °C és -15 °C között tárolandó.

A *therascreen* pufferek és reagensek (2/2. doboz), vagyis a *therascreen* pufferek, az enzimkeverék, a szubsztrátelegy, a dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP és dTTP (a Pyrosequencing analitika reagensei) hűtve érkeznek. Érkezésük után 2–8 °C-on tárolja ezeket az összetevőket. Az aktivitásvesztés minimalizálása érdekében ajánlott az enzimkeveréket és a szubsztrátelegyet is az eredeti fiolájában tartani.

A rekonstituált enzim- és szubsztrátelegyek legalább 10 napon át stabilak maradnak 2–8 °C-on. A rekonstituált enzim- és szubsztrátelegyek lefagyaszthatók és saját fiolájukban tárolhatók -30 °C és -15 °C között. A fagyasztott reagenseket nem szabad háromnál többször lefagyasztani és újra felolvasztani.

**Megjegyzés:** A nukleotidokat nem szabad lefagyasztani.

A *therascreen* KRAS Pyro Kit a fenti körülmények között tárolva minőségét stabilan megőrzi a feltüntetett lejárati dátumig.

## A minták kezelése és tárolása

Minden mintát potenciálisan fertőző anyagnak kell tekinteni.

A vizsgálati mintaanyag vérből, vagy formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) szövetmintákból kivont humán DNS.

Heparin-kezelés alatt álló személyekből származó minták használata tilos. Ne használjon olyan vérmintát, melyet heparinnal alvadásgátló tesztcsővekben vettek le. A heparin ugyanis befolyásolja a PCR-reakciót.

# Eljárás

## DNS-izolálás

A rendszer teljesítményét az EZ1® DNA Tissue Kit és a QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit használatával határozták meg, humán DNS formalinnal fixált, paraffinba ágyazott tumorszövet mintákból való kivonására. A QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit rendszer hatékonyságát egészséges donorok – részlegesen tumor sejtekkel preparált – vérmintáit felhasználva határozták meg.

Az 2. táblázatban feltüntetett QIAGEN® kitek ajánlottak a megadott humán mintatípusokból kinyert DNS tisztítására a *therascreen* KRAS Pyro Kittel való alkalmazáshoz. A DNS tisztítását a kitek kézikönyveiben leírtaknak megfelelően végezze el.

### 2. táblázat: A *therascreen* KRAS Pyro Kittel való használatához ajánlott DNS tisztító kitek

Mintaanyag	Nukleinsav izolációs készlet	Katalógusszám (QIAGEN)
Paraffinba ágyazott szövet	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Vér	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

\* Kövesse a paraffinba ágyazott szövettel való használat protokollját. Az EZ1 DNA Tissue Kitet az alábbiakkal kombinálva használja: EZ1 Advanced (katalógusszám: 9001410 vagy 9001411) és EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (katalógusszám: 9018298); EZ1 Advanced XL (katalógusszám: 9001492) és EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (katalógusszám: 9018700), vagy BioRobot® EZ1 (katalógusszám: 9000705; már nem kapható) és EZ1 DNA Paraffin Section Card (katalógusszám: 9015862).

† CE-IVD-jelölésű, a 98/79/EK számú EU irányelvnek megfelelően.

# 1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját



## A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempont

- Szükség esetén az LOB megerősíthető egy vad típusú minta használatával, hogy létrehozzon egy teljes lemeznyi eredményt. A részletekért lásd a CLSI EP17-A jelű irányelvét: „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (A kimutatási és a kvantifikációs határértékek meghatározásának protokollja; jóváhagyott irányelv).

## Kezdés előtti teendők

- Ha a KRAS Plug-in Report nincs installálva, hozzon létre egy Assay Setup-ot (lásd „A” függelék, 47. o.). Ezt csak egyszer kell elvégezni, a *therascreen* KRAS Pyro assay-k első futtatása előtt. Amennyiben a KRAS Plug-in Report beépülő modul installálva van, az előre beállított setup paraméterek elérhetők a PyroMark Q24 szoftver hivatkozásokat tartalmazó böngészőjében, az „Example Files/PyroMark Setups/KRAS” (Mintafájlok/PyroMark beállítások/KRAS) elérési útvonalon. A KRAS Plug-in Report beépülő modul e-mail útján szerezhető be a [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com) címről.

## Eljárás

1. **Kattintson a  ikonra az eszköztárban.**  
Ezzel létrehoz egy új futtatás fájlt.
2. **Adja meg a futtatási paramétereket (lásd „Futtatási paraméterek”, 16. o.).**
3. **Állítsa be a lemezt: adjon assay-eket mind a 12/13. kodonokra, mind a 61. kodonra, a megfelelő minták analitikai vizsgálatához.**  
**Megjegyzés:** Minden PCR setup-nál szerepelnie kell egy negatív kontroll (templát DNS nélküli) mintának, legalább egy assay-ben.  
**Megjegyzés:** Minden Pyrosequencing futtatás minden egyes assay-ében legyen egy metilálatlan kontroll DNS minta (lásd „Kontrollok”, 7. o.).
4. **Amikor beállította a futtatást, és készen áll elindítani azt a PyroMark Q24 rendszeren, nyomtassa ki az enzimkeverékek, szubsztrátelegyek és nukleotidok szükséges térfogatait, valamint a mintalemez setupot. Válassza a „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) opciót a „Tools” (Eszközök) menüből, és amikor megjelenik a jelentés, kattintson a  ikonra.**
5. **Zárja be a futtatás fájlt, és másolja fel azt egy USB-meghajtóra (a rendszerhez mellékelve) a Windows® Fájlkészlet segítségével.**  
**Megjegyzés:** A kinyomtatott „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) sablonként használható a minta setuphoz (lásd „3. protokoll:

A PCR termékek rögzítése Streptavidin Sepharose High Performance gélgyöngyökre”, 21. o.).

A lemez futtatásához a PyroMark Q24 rendszeren lásd „5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 27. o.

### Futtatási paraméterek

Run name: (A futtatás neve)	A futtatás nevét a fájl mentésekor kell megadni. A fájl átnevezése a futtatás nevét is megváltoztatja.
Instrument method: (Készülék mód)	Válassza ki a készülék üzemmódját a futtatáshoz használt patronnak megfelelően. Lásd a termékekhez mellékelt használati utasításokat.
Plate ID: (Lemez azonosítószáma)	<b>Opcionális:</b> Adja meg a PyroMark Q24 lemez azonosítószámát.
Bar code: (Vonalkód)	<b>Opcionális:</b> Írja be a mintalemez vonalkódja számsorát, vagy ha rendelkezik vonalkód-leolvasóval, és az csatlakoztatva van a számítógépéhez, vigye az egérmutatót a „Barcode” (Vonalkód) jelölőnégyzethez (kattintson a négyzetre), és szkennelje be a vonalkódot.
Kit ID: (Kit azonosítószáma)	<b>Opcionális:</b> Írja be a használt therascreen KRAS Pyro Kit tételszámát. A tételszám a termékcímkén található. <b>Megjegyzés:</b> Azt javasoljuk, írja be a reagens azonosítószámát és a kit azonosítószámát is, hogy a reagensekkel adódó bármilyen váratlan probléma nyomon követhető legyen.
Run note: (Futtatással kapcsolatos megjegyzés)	<b>Opcionális:</b> Írjon be egy megjegyzést, emlékeztetőt a futtatás tartalmára vagy céljára vonatkozóan.

### Assay fájlok hozzáadása

Egy assay és egy adott tesztlyuk társításához tegye az alábbiak valamelyikét:

- Kattintson jobb egérgombbal a tesztlyukra, és válassza ki a „Load Assay” (Assay betöltése) opciót a megjelenő környezeti menüből.
- Válassza ki a kívánt assay-t a parancsikon-böngészőből, majd kattintson rá, és húzza át a tesztlyukhoz.

Az adott tesztlyuk színkódot kap, az oda betöltött assay szerint.



## **Minta-azonosítószámok és megjegyzések bevitele**

Egy minta-azonosítószám vagy megjegyzés beviteléhez válassza ki az adott cellát, és gépelje be a kívánt szöveget.

Egy minta-azonosítószám vagy megjegyzés szerkesztéséhez vagy válassza ki a cellát (az aktuális cellatartalom ki lesz jelölve) vagy kattintson duplán a cellára.

## 2. protokoll: PCR a *therascreen* KRAS Pyro Kittel szállított PCR reagensek használatával

Ez a protokoll egy a 12. és 13. kodonokat tartalmazó régió PCR amplifikálására, és a 61. kodont tartalmazó régió egy külön PCR amplifikálására szolgál, a *therascreen* KRAS Pyro Kit használatával.

### A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- A munkafolyamat némiképp módosult a *PyroMark KRAS Kit kézikönyvben* találhatóhoz képest (5. lépés).
- A *PyroMark Master Mix*-ben lévő *HotStarTaq*<sup>®</sup> DNS polimeráz igényel egy **15 perces aktiválási lépést 95 °C-on**.
- Készítsen elő minden reakcióelegyet egy a DNS tisztításra használt munkaterülettől különálló helyen, hozzáadva a templát DNS-t a PCR-hez, PCR termék analízishez, vagy minta-előkészítéshez a *Pyrosequencing* analízis előtt.
- Használjon hidrofób szűrőt tartalmazó eldobható pipettahegyeket a kereszt-fertőzés minimalizálása érdekében.

### Kezdés előtti teendők

- Mielőtt kinyitja a PCR primereket tartalmazó csöveket, röviden centrifugálja le azokat, hogy összegyűjtse a tartalmukat a csövek alján.
- Szükség esetén állítsa be a kontroll és minta DNS koncentrációkat 0,4–2 ng/μl közé.

### Eljárás

#### 1. Olvasszon fel minden szükséges reagenst (lásd 3. táblázat).

Használat előtt alaposan keverje össze.

#### 2. Készítsen reakcióelegyet minden egyes PCR primer szettnek, a 3. táblázatban foglaltak szerint.

A reakciókeverék – a mintát kivéve – a PCR-reakcióhoz szükséges összes összetevőt tartalmazza.

Nagyobb mennyiségű reakcióelegyet készítsen, mint ami az elvégezni kívánt összes PCR assay-hez együttesen szükséges.

**3. táblázat: A reakcióelegy elkészítése minden egyes PCR primer keverékhez**

<b>Komponens</b>	<b>Térfogat/reakció (µl)</b>
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 12/13 <b>vagy</b> PCR Primer KRAS 61	1,0
Víz (H <sub>2</sub> O, a kit része)	4,0
<b>Teljes térfogat</b>	<b>20,0</b>

**3. Alaposan keverje össze a reakcióelegyet, és pipetázzon 20 µl-t minden egyes PCR tesztcsőbe.**

Nem szükséges jégen tartani a PCR tesztcsőveket, mivel a HotStarTaq DNS polimeráz szobahőmérsékleten inaktív.

**4. Adjon 5 µl templát DNS-t (2–10 ng genomi DNS) az egyes PCR tesztcsővekhez (lásd 4. táblázat), és keverje össze alaposan.**

**Megjegyzés:** Minden PCR setup-nál szerepelnie kell egy negatív kontroll (templát DNS nélküli) mintának, legalább egy assay-ben.

**Megjegyzés:** Minden Pyrosequencing futtatás minden egyes assay-ében legyen egy metilálatlan kontroll DNS minta (lásd „Kontrollok”, 7. o.).

**4. táblázat: A PCR-vizsgálat előkészítése**

<b>Komponens</b>	<b>Térfogat/reakció (µl)</b>
Reakcióelegy	20
DNS minta	5
<b>Teljes térfogat</b>	<b>25</b>

- Programozza be a PCR készüléket a gyártó használati útmutatója szerint, az 5. táblázatban feltüntetett feltételek használatával.

5. táblázat: Optimalizált ciklus protokoll

			Megjegyzések
<b>Kezdeti aktiválási lépés:</b>	15 perc	95 °C	A HotStarTaq DNS polimerázt ez a felfűtési lépés aktiválja.
<b>3 lépéses ciklus:</b>			
Denaturálás	20 másodperc	95 °C	
Kapcsolódás	30 másodperc	53 °C	
Lánchosszabbítás	20 másodperc	72 °C	
Ciklusok száma	42		
<b>Végső lánchosszabbítási lépés:</b>	5 perc	72 °C	

- Helyezze be a PCR tesztcsöveket a PCR készülékbe, és indítsa el a ciklus programot.
- Az amplifikálás után folytassa a „3. protokoll: A PCR termékek rögzítése Streptavidin Sepharose High Performance **gélgyöngyökre**” protokollal, lásd 21. o.

### 3. protokoll: A PCR termékek rögzítése Streptavidin Sepharose High Performance gélgyöngyökre

Ez a protokoll a templát DNS Streptavidin Sepharose High Performance (nagyteljesítményű sztreptavidines szefaróz) (GE Healthcare) gyöngyökre való rögzítésére szolgál, a PyroMark Q24 rendszeren végzett analízis előtt.

#### Kezdés előtti teendők

- A kezdés előtt hagyja, hogy minden szükséges reagens és oldat szobahőmérsékletűre (15–25 °C) melegedjen.

#### Eljárás

1. **Finoman rázza fel a Streptavidin Sepharose High Performance gélgyöngyöket tartalmazó üveget, amíg homogén oldatot nem kap.**
2. **A 6. táblázatban foglaltak szerint készítsen egy DNS immobilizáló mesterkeveréket. Készítsen az összes elvégzendő reakcióhoz együttesen szükségesnél 10%-kal nagyobb térfogatú reakcióelegyet.**

#### 6. táblázat: Mesterkeverék DNS immobilizáláshoz

Komponens	Térfogat/minta (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance (nagyteljesítményű sztreptavidines szefaróz gélgyöngy)	2
PyroMark Binding Buffer	40
Víz (H <sub>2</sub> O, a kit része)	28
<b>Teljes térfogat</b>	<b>70</b>

3. **Adjon 70 µl mesterkeveréket egy 24 tesztlyukas PCR lemez vagy csőfűzér tesztlyukaiba, a futtatási setupban előre meghatározottak szerint (lásd „1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját”, 15. o.).**
4. **Adjon 10 µl biotinilált PCR terméket a 2. protokollból minden egyes mesterkeveréket tartalmazó tesztlyukhoz a futtatási setupban előre meghatározottak szerint (lásd „1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját”, 15. oldal).**

**Megjegyzés:** A teljes reakció-térfogat tesztlyukanként 80 µl legyen a mesterkeverék és a PCR termék hozzáadása után.

5. **Zárja le a PCR lemezt (vagy csőfűzéseket) a csikkupakok segítségével.**

**Megjegyzés:** Győződjön meg róla, hogy nem lehetséges szivárgás az egyes tesztlyukak között.

- 6. Rázassa a PCR lemezt szobahőmérsékleten (15–25 °C) 5–10 percig, 1400 rpm-en.**

**Megjegyzés:** Ezalatt az idő alatt készítse elő a PyroMark Q24 Vacuum Workstation készüléket a minta-előkészítéshez, a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvben* leírtak szerint.

- 7. Folytassa azonnal a „4. protokoll: A minták előkészítése a Pyrosequencing analízis előtt a PyroMark Q24 készüléken ” protokollal, lásd 23. o.**

**Megjegyzés:** A szefaróz gélgyöngyök gyorsan leülepsznek. A gélgyöngyök befogását közvetlenül az összerázás után el kell végezni.

Ha több mint 1 perc telt el a mintalemez (vagy csőfüzerek) rázatása óta, rázassa azokat újra 1 percig a gélgyöngyök befogása előtt.

## 4. protokoll: A minták előkészítése a Pyrosequencing analízis előtt a PyroMark Q24 készüléken

Ez a protokoll az egyszálú DNS előkészítésére, és a szekvenáló primer a templáthoz való kapcsolódására szolgál a PyroMark Q24 készüléken végzett Pyrosequencing analízis előtt.

### A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Mielőtt kinyitja a szekvenáló primereket tartalmazó csöveket, röviden centrifugálja le azokat, hogy összegyűjtse a tartalmukat a csövek alján.
- Adja hozzá a tesztlyukakhoz a 2 különböző szekvenáló primert a futtatási setupban előre meghatározottak szerinti azonos mintázatban (lásd „1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját” protokoll, 15. o.), az analízisben vizsgált régiótól (12. és 13. kodonok, vagy 61. kodon) függően.
- A munkafolyamat némiképp módosult a *therascreen KRAS Pyro Kit kézikönyv* 1. átdolgozásában találhatóhoz képest (18. lépés). Ne rövidítse le a minták lehűtési idejét, miután felfűtötte azokat 80 °C-ra.
- Rendszeres időközönként végezze el a funkciótesztet a szűrő szondákra, a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* szerint, és a jelzett időpontokban cserélje ki a szűrő szondákat.

### Kezdés előtti teendők

- Helyezzen egy PyroMark Q24 lemeztartót egy előmelegített, 80 °C-os fűtőblokkra, a 17. lépésben való használatra. Hagyjon egy második PyroMark Q24 lemeztartót szobahőmérsékleten (15–25 °C), a 18. lépésben való használatra.
- A PyroMark Wash Buffer 10x-es koncentrátumként található a kitben. Az első használat előtt hígítsa 1x-es koncentrációjú munkaoldatra: adjon 225 ml nagy tisztaságú vizet 25 ml 10x PyroMark Wash Buffer (a végső térfogat 250 ml).

**Megjegyzés:** Az 1x PyroMark Wash Buffer munkaoldat 2–8 °C-on minőségét stabilan megőrzi a jelzett lejárat dátumig.

### Eljárás

1. **Hígítson elegendő mennyiséget minden egyes szekvenáló primerből – KRAS 12/13 szekvenáló primer és KRAS 61 szekvenáló primer – a PyroMark Annealing Bufferben, a 7. táblázatban foglaltak szerint.**

Készítsen nagyobb térfogatú hígított szekvenáló primer oldatot annál, ami az összes szekvenálandó mintához együttesen szükséges (a minták számának + egy extrának megfelelő mennyiséget).

## 7. táblázat: A szekvenáló primerek példahígítása

Komponens	Térfogat/minta ( $\mu$ l)	9 + 1 reakciónak megfelelő térfogat ( $\mu$ l)
Seq Primer KRAS 12/13 <b>vagy</b> Seq Primer KRAS 61	0,8	8
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
<b>Teljes térfogat</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

2. Pipetázzon 25  $\mu$ l hígított szekvenáló primert a PyroMark Q24 lemez minden egyes tesztlyukába, a futtatási setup szerint (lásd „1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját” protokoll, 15. o.).

**Megjegyzés:** Tartson egy PyroMark Q24 lemeztartót (a PyroMark Q24 Vacuum Workstation készülék tartozéka) szobahőmérsékleten (15–25 °C), és használja támasztékként a lemez előkészítésekor és mozgásakor.

3. Helyezze a 3. protokollból kapott PCR lemezt (vagy csőfüzérek) és a PyroMark Q24 lemezt a munkaasztalra (2. ábra).

**Megjegyzés:** Ügyeljen rá, hogy a lemez ugyanolyan irányban álljon, mint amikor a mintákat beletöltötte.



2. ábra: A PCR lemez (vagy csőfüzérek) és a PyroMark Q24 lemez ráhelyezése a vákuumos munkaállomásra ..

4. A vákuum-kapcsoló megnyitásával hozzon létre vákuumot a készülékben.

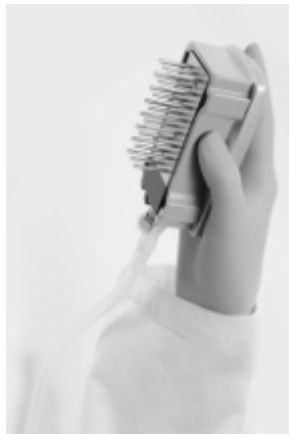


5. **Óvatosan engedje bele a vákuumos eszköz szűrő szondáit a PCR lemezbe (vagy csőfüzerekbe), hogy befogja az immobilizált templát DNS-t tartalmazó gélyöngyöket. Tartsa a helyükön a szondákat 15 másodpercig. Óvatosan emelje ki a vákuumos eszközt.**

**Megjegyzés:** A szefaróz gélyöngyök gyorsan leülepsznek. A gélyöngyök befogását közvetlenül az összerázás után el kell végezni.

Ha több mint 1 perc telt el a mintalemez (vagy csőfüzerek) rázatása óta, rázassa azokat újra 1 percig a gélyöngyök befogása előtt.

6. **Helyezze át a vákuumos eszközt a 40 ml 70%-os etanolt tartalmazó teknőbe (2. ábra). Öblögesse a szűrő szondákat 5 másodpercig.**
7. **Helyezze át a vákuumos eszközt a 40 ml denaturáló oldatot tartalmazó teknőbe (2. ábra). Öblögesse a szűrő szondákat 5 másodpercig.**
8. **Helyezze át a vákuumos eszközt a 50 ml mosópuffert tartalmazó teknőbe (2. ábra). Öblögesse a szűrő szondákat 10 másodpercig.**
9. **Emelje fel és vissza a vákuumos eszközt vertikális 90° derékszögön túl 5 másodpercig, hogy lecsorgasson minden folyadékot a szűrő szondákról (3. ábra).**



3. ábra: Illusztráció a vákuumos eszköz vertikális 90° derékszögön túli kiemeléséről.

10. **A PyroMark Q24 lemez fölött tartva a vákuumos eszközt, zárja az eszköz vákuum-kapcsolóját (Off (Ki) pozíció).**
11. **Engedje bele a gélyöngyöket a PyroMark Q24 lemezbe: eressze bele a szűrő szondákat a meghígított szekvenáló primerbe, és finoman mozgassa oldalirányban ide-oda az eszközt.**

**Megjegyzés:** Ügyeljen rá, ne hogy megsértse a PyroMark Q24 lemezt; ha nem óvatos, a szűrő szondák megkarcolhatják a felületét.
12. **Helyezze át a vákuumos eszközt a nagy tisztaságú vizet tartalmazó teknőbe (2. ábra), és rázassa az eszközt 10 másodpercig.**
13. **Mossa ki a szűrő szondákat: engedje bele azokat a nagy tisztaságú vízbe (2. ábra), és kapcsolja be a vákuumot. Öblítse ki a szondákat 70 ml nagy tisztaságú vízbe.**

14. **Emelje fel és vissza a vákuumos eszközt vertikális 90° derékszögön túl 5 másodpercig, hogy lecsorgasson minden folyadékot a szűrő szondákról (3. ábra).**
15. **Zárja az eszköz vákuum-kapcsolóját (Off (Ki) pozíció), és állítsa a vákuumos eszközt parkoló (P) pozícióba.**
16. **Kapcsolja ki a vákuum-szivattyút.**  
**Megjegyzés:** A munkanap végén öntse ki a használt folyadékokat és maradék oldatokat, és ellenőrizze a PyroMark Q24 Vacuum Workstation készüléket, nincs-e rajta por vagy csorgás (lásd „B” függelék, 50. o.).
17. **Tartsa a mintákat tartalmazó PyroMark Q24 lemezt 80 °C-on 2 percig az előre felfűtött PyroMark Q24 lemeztartó segítségével.**
18. **Vegye le a PyroMark Q24 lemezt a lemeztartóról, és helyezze át egy második, szobahőmérsékleten (15–25 °C) tartott PyroMark Q24 lemeztartóra 10–15 percig, hogy a minták szoba-hőmérsékletűre hűlhessenek.**
19. **Folytassa a „5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása” protokollal, 27. o.**

## 5. protokoll: A PyroMark Q24 futtatása

Ez a protokoll leírja, hogyan készítse elő és töltsse be a PyroMark Gold Q24 reagenseket a PyroMark Q24 patronba, és hogyan kezdjen el és fejezzen be egy futtatást a PyroMark Q24 készüléken. Arról, hogyan állítson be egy futtatást, részletes leírást talál a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvben*.

### A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempont

- A „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) jelentés – amely megtalálható a „Tools” (Eszközök) menüben a futtatási setupban (lásd „1. protokoll: Futtassa a PyroMark Q24 rendszer setup fájlját”, 15. o.) – információkat nyújt egy adott specifikus futtatáshoz szükséges nukleotidok, polimeráz enzim és szubsztrát puffer térfogatáról.

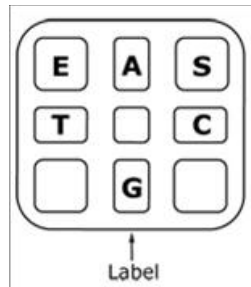
### Kezdés előtti teendők

- Kapcsolja be a PyroMark Q24 készüléket. A főkapcsoló a készülék hátulján található.

### Eljárás

1. **Oldja fel a fagyasztva szárított enzimet és szubsztrátelegyeket külön-külön 620 µl vízben (H<sub>2</sub>O, a kit tartalmazza).**
2. **Finom rázogatóással keverje össze a fiola tartalmát.**  
**Megjegyzés:** Ne használjon vortexet a keveréshez!  
**Megjegyzés:** Annak biztosítása érdekében, hogy a keverék teljesen feloldódott, hagyja szobahőmérsékleten (15–25 °C) pihenni 5–10 percig. Győződjön meg róla, hogy az oldat nem zavaros, mielőtt beletölti a PyroMark Q24 patronba. Ha a reagenseket nem használja fel azonnal, helyezze a reagenscsöveket jégre\* vagy hűtőszekrénybe.
3. **Várja meg, amíg a reagensek és a PyroMark Q24 patron eléri a környezeti hőmérsékletet (20–25 °C).**
4. **Úgy helyezze el a PyroMark Q24 patron, hogy a címkéje ön felé nézzen.**
5. **Töltsse meg a PyroMark Q24 patron a megfelelő térfogatú nukleotidokkal, enzimmel és szubsztrátelegyekkel, a 4. ábra szerint.**  
Ügyeljen rá, hogy ne kerüljenek légbuborékok a pipettahegyből a patronba.

\* Vegyszerekkel való munka során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmazznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.



**4. ábra: Illusztráció a PyroMark Q24 patronról, felülnézetből.** A magyarázó megjegyzések megfelelnek a reagenscsöveken található címkékkel. Adja hozzá az enzimkeveréket (**E**), a szubsztrátelegyet (**S**) és a nukleotidokat (**A, T, C, G**), a futtatási beállítások „Tools” (Eszközök) menüjében található „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) jelentésben megadott térfogatok szerint.

6. Nyissa ki a patron tartó nyílását, és helyezze be a reagensekkel megtöltött patron t, címkéjével kifelé. Tolja be a patron t ütközésig, majd nyomja lefelé.
7. Ügyeljen rá, hogy a vonal látható legyen a patron előtt, majd zárja be a nyílást.
8. Nyissa ki a lemeztartó keretet, és helyezze rá a lemezt a fűtőblokkra.
9. Zárja vissza a lemeztartó keretet, és csukja le a készülék fedelét.
10. Csatlakoztassa az (a futtatás fájl t tartalmazó) USB adathordozót a készülék elején található USB portba.  
Megjegyzés: Ne távolítsa el az USB-meghajtót a futtatás befejezése előtt.
11. A főmenüből válassza ki a „Run” (Futtatás) parancsot (a ▲ és ▼ képernyő-gombok segítségével), majd nyomja meg az „OK” (Rendben) lehetőséget.
12. A ▲ és ▼ képernyő-gombok segítségével válassza ki a futtatás fájl t.  
Megjegyzés: Egy mappa tartalmának megtekintéséhez jelölje ki az adott mappát, és nyomja meg a „Select” (Kiválaszt) gombot. Az előző nézethez való visszatéréshez nyomja meg a „Back” (Vissza) gombot.
13. Amikor kiválasztotta a futtatási fájl t, nyomja meg a „Select” (Kiválaszt) gombot a futtatás elindításához.
14. Amikor a futtatás befejeződött, és a készülék megerősítette, hogy a futtatás fájl t lementette az USB adathordozóra, nyomja meg a „Close” (Bezár) gombot.
15. Távolítsa el az USB adathordozót.
16. Nyissa fel a készülék fedelét.
17. Nyissa ki a patron tartó nyílását, és távolítsa el a reagenspatron t: emelje fel, majd húzza ki azt.
18. Csukja vissza a patron tartó nyílást.
19. Nyissa ki a lemeztartó keretet, és távolítsa el a lemezt a fűtőblokkról.
20. Zárja vissza a lemeztartó keretet, és csukja le a készülék fedelét.

21. Dobja ki a lemezt, és tisztítsa meg a patron, a patronhoz mellékelt terméktájékoztató instrukciói szerint.
22. Elemezze ki a futtatást, a „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése” protokoll szerint, 29. o.

## 6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése

Ez a protokoll leírja egy befejezett KRAS futtatás mutációs analízisének menetét a PyroMark Q24 szoftver használatával.

### Eljárás

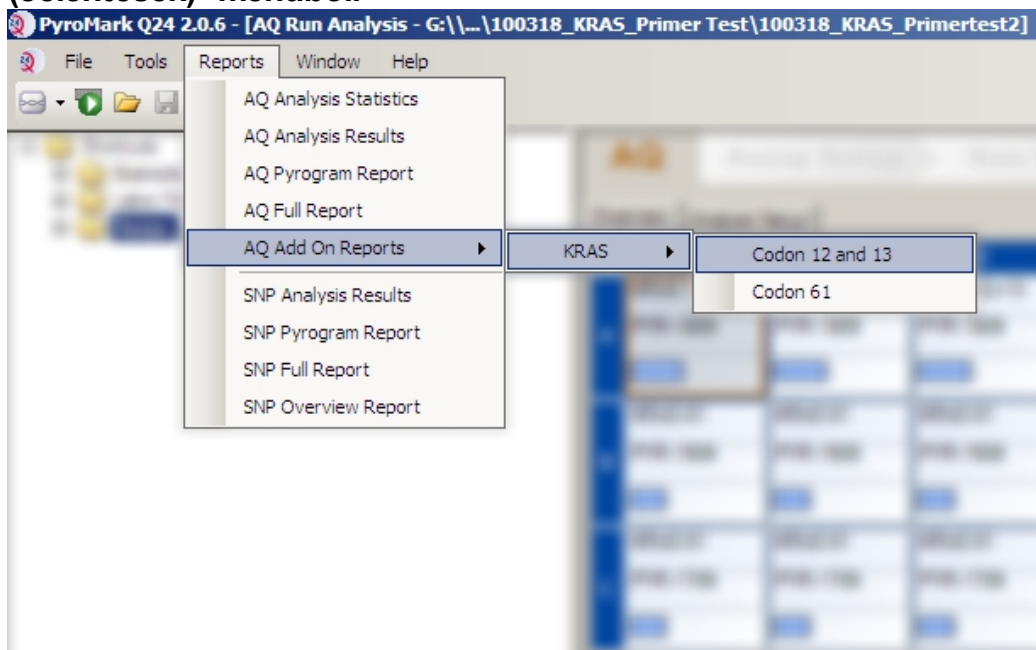
1. Csatlakoztassa a feldolgozott futtatás fájlját tartalmazó USB-adathordozót a számítógép USB-csatlakozójához.
2. Másolja át a futtatási fájlt az USB-adathordozóról a számítógép kívánt célmappájába a Windows Explorer használatával.
3. A PyroMark Q24 szoftverben AQ módban nyissa meg a futtatási fájlt úgy, hogy a „File” (Fájl) menüben az „Open” (Megnyitás) lehetőséget választja, vagy duplán kattint a fájlra (☑) a hivatkozásokat tartalmazó böngészőfelületen.
4. A futtatás kielemezéséhez 2 módszer közül választhat. Ha a KRAS Plug-in Report beépülő modult használja, ugorjon az 5. lépéshez. Ha a PyroMark Q24-ba integrált AQ analízist használja, ugorjon a 6. lépéshez.

**Megjegyzés:** Az eredmények kiértékeléséhez erősen ajánlott a KRAS Plug-in Report használata. A KRAS Plug-in Report beépülő modul e-mail útján szerezhető be a [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com) címről. Ez a jelentés biztosítja, hogy a megfelelő LOD értékek (lásd 8. táblázat) és a különböző „Sequences to Analyze” (Analizálandó szekvenciák) fel lesznek használva az összes mutáció automatikus detektálására.

5. A KRAS Plug-in Report használata:

Jelentés létrehozásához válassza ki az „AQ Add On Reports/KRAS” (AQ bővítmény jelentései / KRAS) és a „Codon 12 and 13” (12. és 13. kodon) vagy „Codon 61” (61. kodon) opciókat a „Reports”

## (Jelentések) menüből.



5. ábra: Az AQ futtatáselemzés képernyő.

A szoftver automatikusan elvégzi az összes mintahely esetében az összes olyan mutáció elemzését, amelynek szerepel az LOD-értéke a 8. táblázatban. A rendszer összefoglaló táblázatban jeleníti meg az eredményeket (6. ábra), és ez alatt található a Pyrogram lenyomatokat és az elemzések minőségére vonatkozó adatokat tartalmazó részletes eredmények.

## Summary

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

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

⚠ See detailed results for further explanation.

6. ábra: Az eredmények összefoglaló táblázata.

## 6. AQ analízis használatával:

A futtatás kielemezéséhez és az eredmények áttekintéséhez kattintson az Elemzés gombok egyikére.



Minden tesztlyuk elemzése.



A kijelölt tesztlyukak elemzése.

Az elemzés eredményei (az allélfrekvenciák) és a minőségi értékelések megjelennek a változó pozíció fölött a Pyrogram® lenyomaton. Arról, hogyan elemezzon ki egy futtatást, részletes leírást talál a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvben*.

**Jelentés létrehozásához válassza ki az „AQ Full Report” (AQ teljes jelentés) vagy „AQ Analysis Results” (AQ analízis eredmények) opciókat a „Reports” (Jelentések) menüből.**

**Megjegyzés:** A KRAS génben a leggyakoribb mutációk a 35. nukleotidnál (a 12. kodon második bázisánál) találhatóak. Ezért a szabvány „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) a KRAS 12. és 13. kodon assay-ban – amint azt az analízis setup meghatározza – az ebben a pozícióban megjelenő mutációkat vizsgálja (lásd „A” függelék, 47. o.). Ha egy minta mutációt tartalmaz a 34. nukleotidnál (a 12. kodon első bázisánál), a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) megváltoztatható, hogy az ebben a pozícióban lévő mutációk helyzetét is elemezze ki, az „A” függelékben leírtak szerint. Hasonlóképpen, a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) ugyanígy megváltoztatható a KRAS 61. kodon assay esetében is, az „A” függelékben leírtak szerint.

A humán KRAS gén 12/13. kodonjaiban és 61. kodonjában előforduló mutációk frekvenciáiról frissített információkat talál online, a Sanger Institute honlapján, az alábbi címen:

[www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Megjegyzés:** Ha megbízható eredményekre törekszik, javasoljuk, hogy a 30 RLU-nál magasabb, egyhegyű csúcsokat vizsgálja. Az assay setupban a „required peak height for passed quality” (A pozitívnak minősülő csúcs minimális magassága) értéket állítsa 30 RLU-ra (lásd az „A” függelék, és a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvét*).

**Megjegyzés:** Az „AQ Analysis Results” (AQ analízis eredmények) jelentést használja az allélok mennyiségi meghatározásának dokumentálására és értelmezésére. A Pyrogram lenyomatban látott számok kerekítve vannak, és nem a mennyiségi meghatározás pontos értékeit mutatják.

**Megjegyzés:** A Pyrogram lenyomatot mindig össze kell vetni a hisztogrammal, amely jobb egérgombbal a Pyrogram ablakba kattintva jeleníthető meg. A mért csúcsoknak egyezniük kell a hisztogramoszlopok magasságával.

**Elemesse újra azokat a mintákat, ahol nem detektált mutációt a 35. nukleotidnál (12. kodon) vagy 183. nukleotidnál (61. kodon), vagy amelyek „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségi értékelést kaptak.**

Erősen ajánlott az összes olyan minta újraelemzése, amelyeknél nem detektált mutációt a szabvány „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) program, valamint amelyek „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségi értékelést kaptak. A „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségi értékelés a 35. vagy 183. nukleotidtól eltérő pozíciójú mutációt is jelezhet, ami a referencia diszpenzációknál csúcsmagasságbeli eltéréseket eredményezhet. Például, az első 3 diszpenzáció bármelyikénél található csúcs azt mutatja, hogy mutáció van jelen a 34. nukleotidnál.

A 34. nukleotid pozíciójában megjelenő mutációk újraelemzéséhez és megcélzásához az „Analysis Setup” (Analízis beállítások) menüpontban a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) tartalmát írja át *GNTGRCGTAGGC*-ről *NGTGRCGTAGGC*-re. Kattintson az „Apply” (Alkalmaz) gombra, majd kattintson a „To All” (Minden mintára) gombra, amikor megjelenik az „Apply Analysis Setup” (Az analízis beállítások alkalmazása) ablak.

A 182. nukleotidnál (a 61. kodon második pozíciójában) fellépő mutációk újraelemzéséhez és megcélzásához a 61. kodon assay „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) tartalmát cserélje az alábbi szekvenciára.

*CTCTHGACCTG*

A 181. nukleotidnál (a 61. kodon első pozíciójában) fellépő mutációk újraelemzéséhez és megcélzásához a 61. kodon assay „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) tartalmát cserélje az alábbi szekvenciára.

*CTCTTSACCTG*

**Megjegyzés:** A „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) megváltoztatása után ügyeljen rá, hogy az önálló csúcsok magassági küszöbértéke 30 RLU-ra legyen állítva.

**Megjegyzés:** Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogramoszlopok magasságával, és ez nem magyarázható ritka vagy váratlan mutációval, akkor az eredmény nem használható a mutációs státusz megítélésére. Javasolt a minta újrafuttatása.



## Az eredmények értelmezése

### Az analízis eredményeinek értelmezése, és az alacsony értéket adó mutációk kimutatása

Erősen ajánljuk, hogy összehasonlítás, illetve a háttérértékek ellenőrzése céljából minden futtatásban szerepeljen a metilálatlan kontroll DNS minta is. A kontroll minta mért gyakoriságának kisebbnek vagy akkorának kell lennie, mint a vak minta határértéke (limit of blank; LOB).

Az összes mintát a kimutatási határérték (limit of detection; LOD, lásd 8. táblázat) vonatkozásában kell megvizsgálni, és az alábbiak szerint értelmezni.

- Mutációk gyakorisága  $< \text{LOD}$ : Vad típusú DNS
- Mutációk gyakorisága  $\geq \text{LOD}$  és  $\leq \text{LOD} + 3\%$  egység: Potenciális alacsony szintű mutációk

**Megjegyzés:** Ha a Plug-In Report beépülő modult használja (a „6. protokoll: A PyroMark Q24 futtatás elemzése” protokoll 5. lépése, 29. o.), és ez előfordul, a rendszer figyelmeztetést küld.

Azok a minták, amelyekben a jelentés alapján alacsony értéket adó mutáció lehet jelen, csak akkor tekintendők pozitívnak az adott mutációra nézve, ha két párhuzamossal és egy metilálatlan kontroll DNS mintával megismételt futtatással megerősíti az eredeti elemzésnél kapott eredményt. Mindkét párhuzamos minta eredménye a kimutatási határnál nagyobb ( $\geq \text{LOD}$ ), és a kontroll mintától különböző kell, hogy legyen. Ellenkező esetben a mintát vad típusúnak kell tekinteni.

- Mutációk gyakorisága  $> \text{LOD} + 3\%$  egység: Mutáció

Ha a KRAS Plug-in Report beépülő modult használja, a rendszer automatikusan elvégzi ezt.

**Megjegyzés:** Az eredmények értelmezéséhez ajánlott a KRAS Plug-in Report beépülő modul használata. Javasoljuk, hogy azon minták esetében, amelyeknél a jelentés alapján fennáll az alacsony szintű mutáció lehetősége, az alaposabb vizsgálatért végezzen el egy további manuális elemzést a szoftverrel (pl. a kontrollminta mutációs gyakoriságával való összehasonlítás céljából).

**Megjegyzés:** Ha a kontrollmintánál az LOB feletti gyakoriság tapasztalható, az a szokásosnál magasabb háttérértéket jelez az adott futtatás esetében, amely hatással lehet az allélkvantifikálásra, különösen alacsony értéket adó mutációknál. Ebben az esetben a LOD (lásd 8. táblázat) és a  $\text{LOD} + 3\%$  egység közötti tartományban mért gyakoriságok nem használhatók a mutációs státusz megítélésére. Ajánlott a potenciálisan alacsony mutációs szintű minták újrafuttatása.

**Megjegyzés:** A KRAS Plug-in Report beépülő modul algoritmusai segítségével generálták a LOB és LOD adatokat. A PyroMark alkalmazás szoftver

segítségével végzett manuális analízis – a 6. protokollban leírva (lásd 29. o.) – kissé eltérő értékeket eredményezhet.

**Megjegyzés:** A rákos beteg terápiájáról nem szabad kizárólag a KRAS mutációs státusza alapján dönteni.

**8. táblázat: A specifikus mutációk számára meghatározott LOB és LOD**

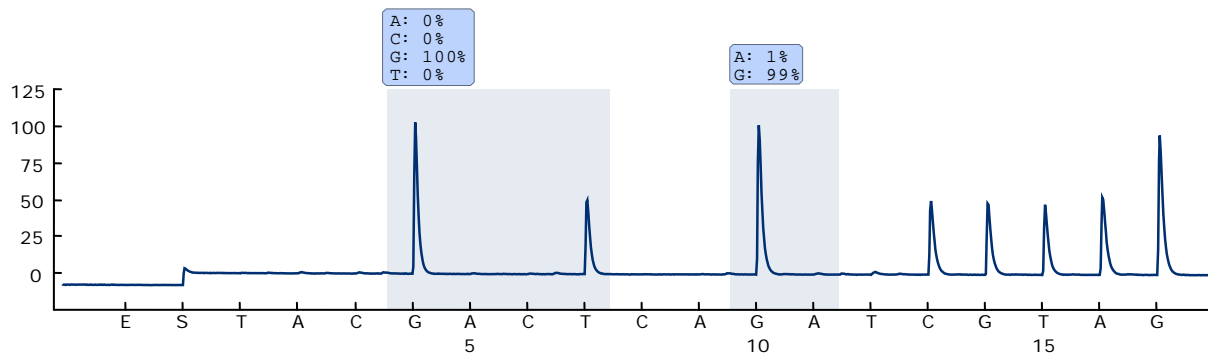
Nukleinsavcsere	Aminosavcsere	LOB (% egységek)	LOD (% egységek)	COSMIC ID* (V42)
<b>12. kodon (GGT)</b>				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) <sup>†</sup>	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
<b>13. kodon (GGC)</b>				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
<b>61. kodon (CAA), az assay-ben reverz irányban (TTG)</b>				
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

\* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Szomatikus rákmutációk katalógusa) értékei, amely elérhető a Sanger Institute honlapján: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

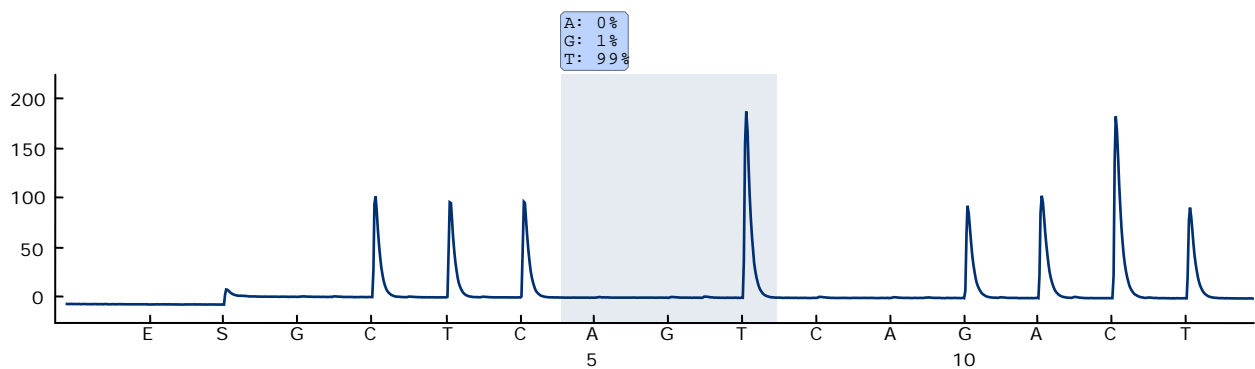
<sup>†</sup> Az a legalacsonyabb mutációs szint egy mintában, amely kimutatási határ feletti ( $\geq$ LOD) mért gyakoriságot eredményez.

## A PyroMark Q24 szoftverbe integrált AQ analízis használatával kapott reprezentatív eredmények

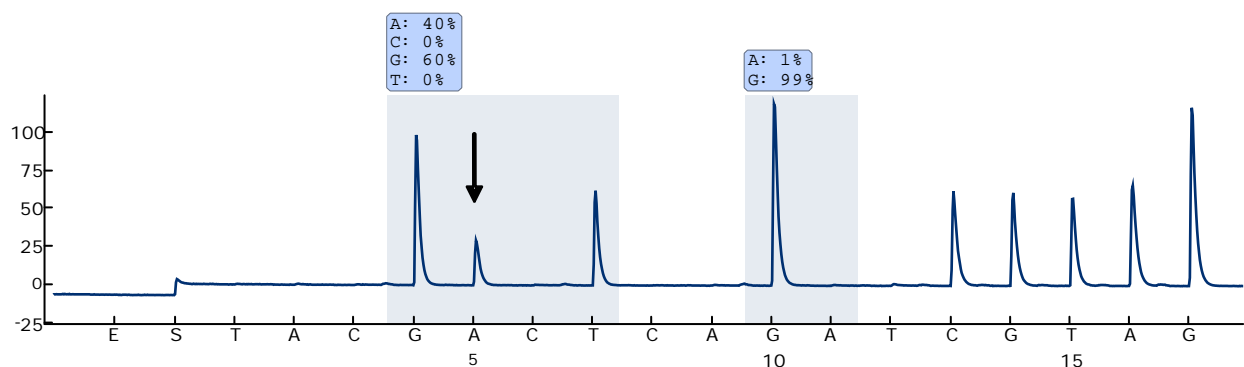
A reprezentatív Pyrogram eredmények a 7–11. ábrákon láthatók.



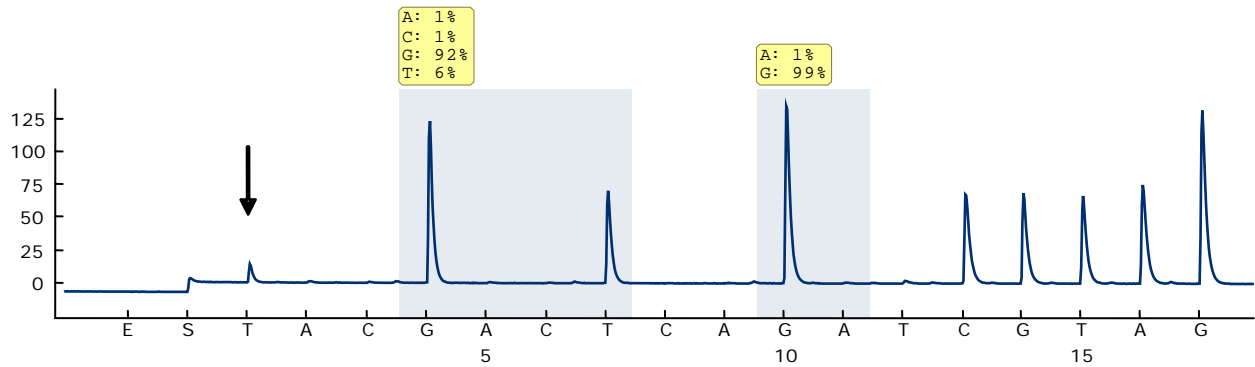
7. ábra: A 12. és 13. kodonban vad genotípusú minta elemzése után kapott Pyrogram lenyomat.



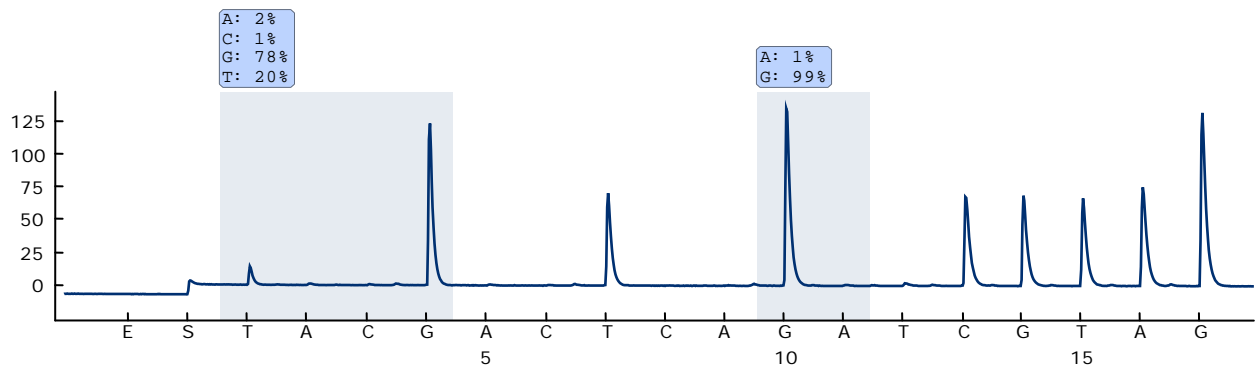
8. ábra: A 61. kodonban vad genotípusú minta elemzése után kapott Pyrogram lenyomat.



9. ábra: A 12. kodon második bázisában (35. nukleotid, nyíllal jelölve) GGT → GAT mutációval rendelkező minták elemzése után kapott Pyrogram lenyomat.



**10. ábra: A 12. kodon első bázisában (34. nukleotid, nyíllal jelölve) GGT → TGT mutációval rendelkező minták elemzése után kapott Pyrogram lenyomat, ahol a GNTGRCGTAGGC „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) a 12. kodon 2. bázisát (a 35. nukleotidot) célozza. A sárga szín azt jelzi, hogy ez a szekvencia nem várt, így le kell ellenőrizni.**



**11. ábra: A 10. ábrán bemutatott minta újraelmzése után kapott Pyrogram lenyomat és eredmények. A GGT → TGT mutáció újraelmzése, ahol a NGTGRCGTAGGC „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) a 12. kodon 1. bázisát (a 34. nukleotidot) célozza.**

## Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). A QIAGEN kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és a benne szereplő protokollokkal, akár a minta- és vizsgálati technológiákkal kapcsolatban (az elérhetőségeket lásd a kézikönyv hátlapján, vagy a következő címen: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Megjegyzés:** A készülék általános hibaelhárításával kapcsolatban lásd a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyvét*.

### Megjegyzések és javaslatok

---

Jelek a templát nélküli kontrollban (negatív kontroll)

- |   |   |
|---|---|
| a) Keresztszennyeződés a tesztlyukak között | Az egyik tesztlyuk jele egy szomszédos tesztlyukban is detektálható. Lehetőleg ne helyezzen magas jelintenzitású mintákat templát nélküli kontroll tesztlyukak mellé.           |
| b) PCR szennyeződés                         | Használjon szűrős steril pipettákat. A PCR reagensektől elkülönítve tárolja és készítse elő a kísérleti anyagokat, úgymint a vizsgálati mintákat, kontrollokat és amplikonokat. |

### Gyenge vagy váratlan szekvencia

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| a) Silány minőségű genomi DNS | A silány minőségű genomi DNS okozhatja a PCR reakció sikertelenségét. Analizálja a PCR mintákat valamilyen elektroforetikus technika (például a QIAxcel® System, vagy agarózos gél-elektroforézis) segítségével. |
|-------------------------------|--|

## „Check” (Ellenőrizendő) vagy „failed” (Sikertelen) eredmény

- a) Alacsony csúcsmagasság
- A kezelési hibák a PCR setupban vagy a minta-előkészítésben a Pyrosequencing előtt alacsony jelcsúcsokat eredményezhetnek. Rendszeres időközönként végezze el a funkciótesztet a szűrő szondákra, a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* szerint, és a jelzett időpontokban cserélje ki a szűrő szondákat.
- „Check” (Ellenőrizendő) figyelmeztetés esetén gondosan vesse össze a Pyrogramot és a hisztogramot, amely a Pyrogram programablakban a jobb egérgomb kattintásával megjeleníthető. Ha a mért csúcsok egyeznek a hisztogramoszlopok magasságával, az eredmény érvényes. Máskülönben javasolt a minta újrafuttatása.
- b) A „Sequence to Analyse” (Analizálandó szekvencia) által nem meghatározott mutáció
- Módosítsa az analizálandó szekvenciát az assay setupban (lásd „A” függelék, 47. o.), majd elemezze újra a futtatás eredményét.
- c) Váratlan, ritka mutáció
- A „Check” (Ellenőrizendő) vagy „Failed” (Sikertelen) minőségi értékelést a nem várt csúcsmintázat okozhatja. Ez jelezhet egy olyan váratlan mutációt, amelyet nem elemzett a plugin report beépülő modul. Ezen minták elemzését manuálisan, a PyroMark Q24 szoftver használatával kell elvégezni, figyelembe véve azt, hogy nem várt mutációkat tartalmazhatnak.
- d) Nagy csúcsmagasságbeli eltérések figyelmeztetés diszpenzációra
- A Pyrogram lenyomatot gondosan össze kell vetni a hisztogrammal, amely jobb egérgombbal a Pyrogram ablakba kattintva jeleníthető meg. Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogramoszlopok magasságával, és ez nem magyarázható ritka mutációkkal, akkor ajánlott a minta újrafuttatása.

## Magas háttérérték

- a) A nukleotidok helytelen tárolása Tárolja a nukleotidokat 2–8 °C közötti hőmérsékleten. A -15 és -30 °C közötti tárolás növelheti a háttérjelet.
- b) A minták túl rövid ideig tartó hűtése a Pyrosequencing analízis előtt Tartsa a mintákat egy PyroMark Q24 lemeztartón, szobahőmérsékleten, 10–15 percig. Ne rövidítse le a hűlési időt.
- c) A patron beszennyeződése Gondosan tisztítsa meg a patron, a terméktájékoztatón található leírásnak megfelelően. Tárolja a patron fénytől és portól védett helyen.

## Nincs értékelhető jel a pozitív kontrollban (metilátlan kontroll DNS-ben)

- a) Nem elegendő enzim- vagy szubsztrátelegy minden tesztlyukhoz Győződjön meg róla, hogy a „Tools” (Eszközök) menü „Pre Run Information” (Futtatás előtti információk) pontjának megfelelően töltötte-e meg a PyroMark Q24 Cartridge patron.
- b) Helytelenül tárolt vagy hígított reagensek Az adott reagensekhez mellékelt instrukciónak megfelelően készítse elő a PyroMark Q24 Gold reagenseket.
- c) A HotStarTaq DNS polimeráz elégtelen aktiválása A HotStarTaq DNS polimeráz a PyroMark PCR Master Mixben 15 perces aktiválási lépést igényel 95 °C-on.
- d) Hibás PCR- vagy minta-előkészítés A kezelési hibák a PCR setupban, a PCR készülék programozásában, vagy a minta-előkészítésben a Pyrosequencing előtt az értékelhető jel hiányát eredményezheti. Végezze el a funkciótesztet a szűrő szondákra, a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* szerint, és a jelzett időpontokban cserélje ki a szűrő szondákat. Ismétlje meg a PCR és Pyrosequencing analízist.

## **Minőség-ellenőrzés**

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően a *therascreen* KRAS Pyro Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítva a kit egyetlen és kifogástalan minőségét.

## **Korlátozások**

Bármilyen kapott diagnosztikai eredményt mindig az egyéb klinikai vagy laboratóriumi leletekkel való összefüggésben kell értelmezni.

A felhasználó felelőssége, hogy validálja a rendszer teljesítményét a laboratóriumában alkalmazott bármely olyan eljárásra, amely nem része a QIAGEN teljesítmény-értékelő vizsgálatoknak.



# Teljesítményjellemzők

## A vak minta határértéke (LOB) és kimutatási határérték (LOD)

A vak minta határértékét (LOB) és a kimutatási határértéket (LOD) számos mutáció esetében meghatározták plazmidelegyek segítségével (9. táblázat). Az LOB és LOD értékeket a Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinikai és Laboratóriumi Szabványok Intézete, CLSI) EP17-A jelű, „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (A kimutatási és a kvantifikációs határértékek meghatározásának protokollja; jóváhagyott irányelv) című irányelvnek ajánlásai szerint határozták meg. A  $\alpha$  és  $\beta$  (fals pozitív és fals negatív) hibákat 5% értékre állították.

A LOB értékek egy vad típusú DNS-t tartalmazó mintából mért gyakoriságot jelentik. A LOD értékek azt a legalacsonyabb jelerősséget (mért gyakoriságot) jelentik, amely már pozitívként értékelhető a kérdéses mutáció vonatkozásában.

A GGT → GTT mutáció a 12. kodonban

Ezen mutáció esetében a vak mérések következetesen a 0 % egységhez közelítettek (n=72), ami nem Gauss-eloszlást eredményezett. Ezért az LOD értéket egy másik módszerrel határozták meg, a CLSI EP17-A jelű irányelvnek ajánlásai szerint. A legalacsonyabb jelet, amely jelzi egy mutáció jelenlétét (LOD) ebben az adott pozícióban, 1 % egységre állították, ami nyilvánvalóan magasabb a 0 % egység következetesen kapott alapvonal szintjénél (LOB). Egy 7% mutációs gyakoriságú minta elemzésekor az eredmények 95%-a (n=89) adott pozitívként értékelhető jelet ( $\geq$ LOD, azaz  $\geq$ 1 % egység).

9. táblázat: A specifikus mutációk számára meghatározott LOB és LOD

Nukleinsavcsere	Aminosavcsere	LOB (% egységek)	LOD (% egységek)	COSMIC ID* (V42)
<b>12. kodon (GGT)</b>				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) <sup>†</sup>	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
<b>13. kodon (GGC)</b>				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
<b>61. kodon (CAA), az assay-ben reverz irányban (TTG)</b>				
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

\* A Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Szomatikus rákmutációk katalógusa) értékei, amely elérhető a Sanger Institute honlapján: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

<sup>†</sup> Az a legalacsonyabb mutációs szint egy mintában, amely kimutatási határ feletti ( $\geq$ LOD) mért gyakoriságot eredményez.

**Megjegyzés:** Ezek az értékek olyan futtatásokon alapultak, ahol a vad típusú vagy mutáns génszekvenciát hordozó plazmidok elegyét használták templátként a PCR amplifikáláshoz.

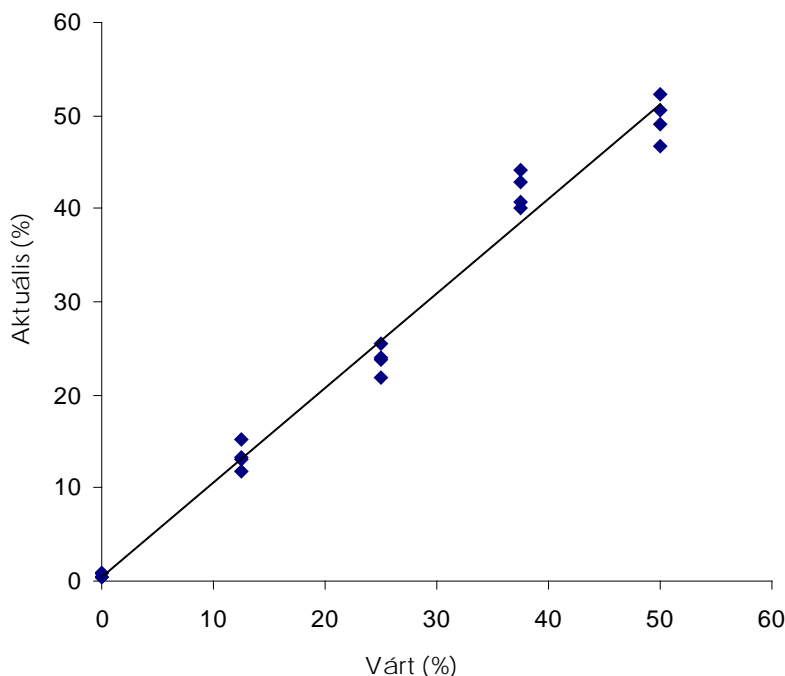
**Megjegyzés:** A KRAS Plug-in Report beépülő modul algoritmusával segítségével generálták a LOB és LOD adatokat. A PyroMark Q24 Application szoftver segítségével végzett manuális analízis – a 6. protokollban leírva (lásd 29. o.) – kissé eltérő értékeket eredményezhet.

**Megjegyzés:** Javasolt a módszer teljesítményének laboratóriumi megerősítése.

## Linearitás

A linearitást a CLSI EP6-A jelű, „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline” (A mennyiségi mérési eljárások linearitásának kiértékelése: statisztikai megközelítés; jóváhagyott irányelv) című irányelvének ajánlásai szerint határozták meg.

Vad típusú és mutáns szekvenciákat hordozó plazmidokat keverték össze olyan arányban, hogy az alábbi mutációs gyakorisági szinteket kapják: 0, 12,5, 25, 37,5 és 50%. Az elegyeket négy párhuzamos mintaként, véletlenszerű mintázatban vitték PCR lemezre, és elemezték. A 12. kodon GGT → TGT mutációját az Analyse-it® szoftver (Analyse-it Software, Ltd., UK) 2.04-es verziójával elemezték ki; az eredmények a 12. ábrán láthatók.



**12. ábra: A GGT → TGT mutáció linearitása a 12. kodonban.**

A teljes ismételhetség 1,64 % egység volt, az eredmények pedig a 3 % egység megengedhető nemlinearitáson belül lineárisak. Hasonló eredményeket kaptak a GGC → GAC mutációkra a 13. kodonban.

## Közepes pontosság

A GGT → TGT mutáció linearitásának meghatározását a 12. kodonban 3 operátor ismételte meg 3 különböző napon, a PyroMark Q24 készülékek és reagensek különböző kombinációit használva. A 3 futtatás eredményeit a 12. táblázat foglalja össze.

## 12. táblázat: Közepes pontosság\*

% mutáció átesett plazmid†	1. futtatás		2. futtatás		3. futtatás		Összegzés	
	Átlag	SD	Átlag	SD	Átlag	SD	Átlag	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

\* Minden érték % egységként van megadva. SD: standard deviation (standard deviáció) (szórás).

† Az OD<sub>260</sub> mérések alapján.

A közepes pontosság, avagy szórás (SD) értékek ezért 0,6–2,0 % egységnek adódtak a 0–50% mutációs gyakorisági szint mért tartományában.

## Diagnosztikai kiértékelés

A *therascreen* KRAS Pyro Kit kiértékelése a DxS KRAS Mutation Kittel összehasonlítva történt. 100 formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) várhatóan végbélrákos tumorszövet-mintából kivonták a DNS-t, és a 12. és 13. kodonokban előforduló mutációk szempontjából analizálták azokat.

A vizsgálathoz kinyert DNS-t az EZ1 DNA Tissue Kit segítségével izolálták, és magát az analízist a *therascreen* KRAS Pyro Kit segítségével kivitelezték a PyroMark Q24 készüléken, valamint a DxS KRAS Mutation Kit segítségével az ABI PRISM® 7900HT SDS készüléken.

A DxS KRAS Mutation Kit segítségével az elemzett 100 mintából 91 minta esetében sikerült meghatározni a mutációs státuszt. A *therascreen* KRAS Pyro Kittel 94 minta mutációs státuszát lehetett meghatározni.

Az egyik vagy mindkét kittel sikertelen minták kizárása után a *therascreen* KRAS Pyro Kit és a DxS KRAS Mutation Kit az eredmények 100%-os egyezését mutatta.

A *therascreen* KRAS Pyro Kit diagnosztikai szenzitivitása és diagnosztikai specificitása egyaránt 100%-os volt (13. táblázat).

**13. táblázat: Az elemzett várhatóan végbélrákos tumorszövet-minták 12. és 13. kodonra vonatkozó vizsgálatának eredményei**

		A DxS KRAS Mutation Kit			
		Mutáns DNS	Vad típusú DNS	Ismeretlen	Összes
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Mutáns DNS	33	0	1	34
	Vad típusú DNS	0	57	3	60
	Ismeretlen	0	1	5	6
	Összes	33	58	9	100

### A 61. kodon elemzése

Ugyanazt a 100 mintát a 61. kodon mutációira vonatkozóan is kielemezték a *therascreen* KRAS Pyro Kit használatával. A 61. kodon assay-re mindössze egy minta esetében volt sikertelen a minőségi értékelés. Ez a minta a 12. és 13. kodonra vonatkozó *therascreen* KRAS Pyro Kit és DxS assay-k esetében sem adott értékelhető eredményt, ami azt jelzi, hogy a DNS-tartalma valószínűleg túl silány minőségű volt. A 61. kodon assay sikeres eredményeinek magasabb aránya azt jelzi, hogy ez a *therascreen* KRAS Pyro Kit és a DxS kit használatával egyaránt kevésbé függött a DNS minőségétől, mint a 12. és 13. kodon assay-k esetében. Mivel a DxS assay nem vizsgálja a 61. kodon mutációit, az assay-k közvetlen összehasonlítása nem lehetséges.

A 61. kodon mutációit a 99 mintából összesen 4-ben sikerült kimutatni. Három közülük a 61. kodonban gyakori mutációkat (CAC, CAT, CTA) tartalmazott, míg a negyedik minta a 60. kodonban (GGT→GGA) és a 61. kodonban (CAA→AAA) is mutatott mutációt.

**Megjegyzés:** A mért jelek a teljesítmény-jellemzők meghatározásához használt minden futtatás esetében 60 RLU fölött voltak, amint az rutinszerűen elérhető formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetekből izolált 10 ng DNS esetében.

### Irodalomjegyzék

A QIAGEN egy nagy és naprakész online adatbázist tart fent olyan publikációkból, amelyek QIAGEN termékek használatán alapulnak. A kívánt cikk megtalálását elősegítik a sokrétű keresési lehetőségek (pl. egyszerű

kulcsszó, vagy az alkalmazásra, a kutatási területre, a címre történő szűrés stb.).

A hivatkozások teljes listáját lásd a QIAGEN online szakirodalmi adatbázisában a [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) cím alatt, vagy vegye fel a kapcsolatot a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatával vagy a helyi forgalmazóval.

## Szimbólumok



<N> teszthez elegendő reagenst tartalmaz

<N>



Lejárat dátum



In vitro diagnosztikai alkalmazásra szolgáló orvosi eszköz



Katalógusszám



Sarzs szám



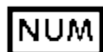
Anyagszám



Összetevők



Tartalom



Szám



Globális kereskedelmi áruazonosító szám



Hőmérséklet-korlátozás



Gyártó



Lásd a használati útmutatót

## Kapcsolatfelvételi adatok

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki támogatásunk weblapját a [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) címen, hívja a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályát, vagy forduljon a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) webhelyen).

## „A” Függelék: A *therascreen* KRAS Pyro assay-k beállítása


Amennyiben a KRAS Plug-in Report beépülő modul installálva van, a 12. és 13., valamint a 61. kodon assay-k előre beállított setup paraméterei elérhetők a PyroMark Q24 szoftver hivatkozásokot tartalmazó böngészőjében, az „Example Files/PyroMark Setups/KRAS” (Mintafájlok/PyroMark beállítások/KRAS) elérési útvonalon. Az alábbi lépéseket nem muszáj elvégezni. A KRAS Plug-in Report beépülő modul e-mail útján szerezhető be a [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com) címről.

Erősen ajánlott a KRAS Plug-in Report beépülő modul használata a kézi analízis helyett. A beépülő modul telepítése után – vagy valahányszor új szoftvert telepít vagy frissít az irodai számítógépen – mindig ellenőrizze a beépülő modul helyes működését, a Plug-In Quick Guide (Beépülő modul gyors útmutatója) instrukciói szerint.

Ha a KRAS Plug-in Report beépülő modul nincs telepítve, az assay fájlt kézi úton kell beállítani a *therascreen* KRAS Pyro assay legelső futtatása előtt. Állítsa be a KRAS 12. és 13. kodon, valamint a KRAS 61. kodon assay-t a PyroMark Q24 szoftver segítségével, az alább leírtak szerint.

### Eljárás

#### KRAS 12. és 13. kodon

1. **Kattintson a  ikonra az eszköztárban, és válassza ki a „New AQ Assay” (Új AQ assay) opciót.**
2. **Gépelje be a következő szekvenciát a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szövegmezőbe.**  
*GNTGRCGTAGGC*

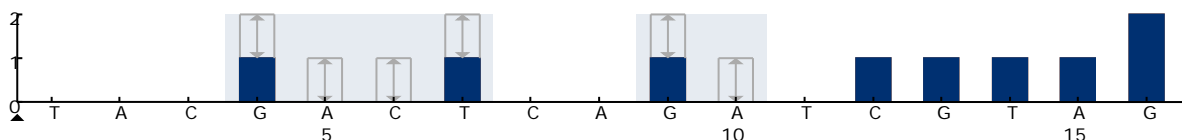
**Megjegyzés:** Ezen „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) használatával a 12. kodonban a 35. nukleotidnál (második pozícióban) előforduló leggyakoribb mutációk lesznek kimutatva. Annak ellenőrzésére, hogy jelen van-e mutáció a 34. nukleotidnál (első pozíció), írja át a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) tartalmát az alábbi szekvenciára.

*NGTGRCGTAGGC*

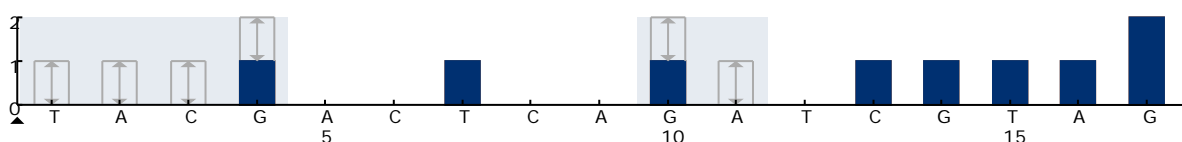
**Megjegyzés:** Ügyeljen rá, hogy az önálló csúcsok magassági küszöbértéke 30 RLU-ra legyen állítva.

**3. Kézi úton gépelje be az alábbi „Dispensation Order” (Diszpenzációs rendet) értéket.**


*TACGACTCAGATCGTAG*




**13. ábra:** A 12. kodon (35. nukleotid) és a 13. kodon (38. nukleotid) hisztogramja az alábbi „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szekvenciával: *GNTGRCGTAGGC*.



**14. ábra:** A 12. kodon (34. nukleotid) és a 13. kodon (38. nukleotid) hisztogramja az alábbi „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szekvenciával: *NGTGRCGTAGGC*.

- 4. Kattintson az „Analysis Parameters” (Az analízis paramétereit) lapfültre, és növelje a „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Csúcsmagasság-küszöbérték – A sikeres minősítéshez szükséges csúcsmagasság) értéket 30-ra.**
- 5. Kattintson a  ikonra az eszköztárban, és mentse el az assay-beállítást „KRAScodon 12+13” néven.**

**KRAS 61. kodon**

- 6. Kattintson a  ikonra az eszköztárban, és válassza ki a „New AQ Assay” (Új AQ assay) opciót.**
- 7. Gépelje be a következő szekvenciát a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szövegmezőbe.**

*CTCDTGACCTG*

**Megjegyzés:** Ezen „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) használatával a 61. kodonban a 183. nukleotidnál (harmadik pozícióban) előforduló leggyakoribb mutációk lesznek kimutatva. Annak ellenőrzésére, hogy jelen van-e mutáció a 182. nukleotidnál (második pozíció), írja át a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) tartalmát az alábbi szekvenciára.

*CTCTHGACCTG*



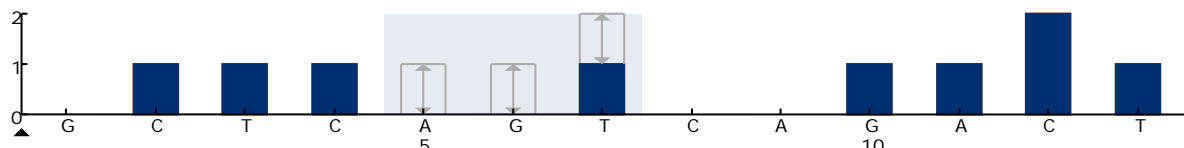
Annak ellenőrzésére, hogy jelen van-e mutáció a 181. nukleotidnál (első pozíció), írja át a „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) tartalmát az alábbi szekvenciára.

*CTCTTSACCTG*

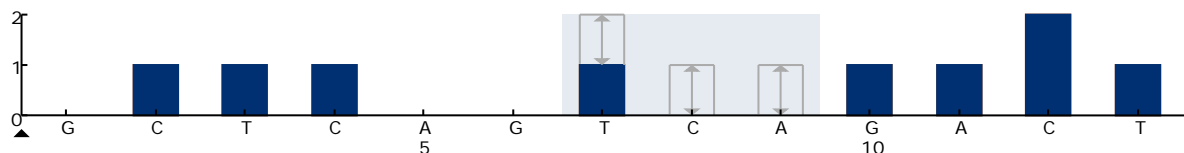
**Megjegyzés:** Ügyeljen rá, hogy az önálló csúcsok magassági küszöbértéke 30 RLU-ra legyen állítva.

**8. Kézi úton adja hozzá az alábbi „Diszpenzációs rendet”.**

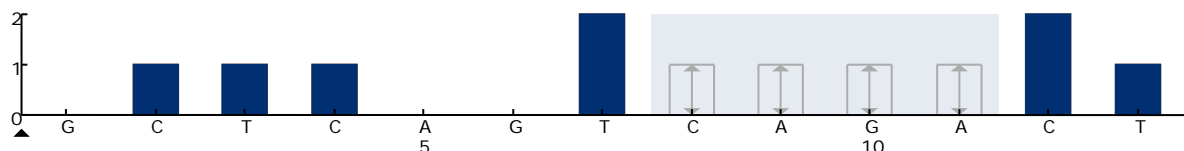
*GCTCAGTCAGACT*




**15. ábra: A 61. kodon (183. nukleotid) hisztogramja az alábbi „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szekvenciával: *CTCDTGACCTG*.**




**16. ábra: A 61. kodon (182. nukleotid) hisztogramja az alábbi „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szekvenciával: *CTCTHGACCTG*.**



**17. ábra: A 61. kodon (182. nukleotid) hisztogramja az alábbi „Sequence to Analyze” (Analizálandó szekvencia) szekvenciával: *CTCTTSACCTG*.**

- Kattintson az „Analysis Parameters” (Az analízis paramétereit) lapfültre, és növelje a „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Csúcsmagasság-küszöbérték – A sikeres minősítéshez szükséges csúcsmagasság) értéket 30-ra.
- Kattintson a  ikonra az eszköztárban, és mentse el az assay-beállítást „KRAScodon 61” néven.

## „B” függelék: A hulladéktartályok és teknők kiürítése

<b>VIGYÁZAT</b> 	<b>Veszélyes vegyi anyagok</b> <p>A vákuumos munkaállomással használt denaturáló oldat nátrium-hidroxidot tartalmaz, amely szem- és bőrirritációt okoz.</p> <p>Mindig viseljen védőszemüveget, kesztyűt és laboratóriumi köpenyt.</p> <p>A felelős személynek (pl. laborvezetőnek) meg kell tennie a szükséges óvintézkedéseket, hogy biztosítsa a munkahelyi környezet biztonságosságát, és azt, hogy a készülékek kezelőszemélyzete nincs kitéve egészségre veszélyes mennyiségű mérgező (vegyi vagy biológiai) vegyületeknek, a vonatkozó Biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets; SDSs) vagy OSHA,* ACGIH,† vagy COSHH‡ dokumentumok előírásainak megfelelően.</p> <p>A vegyi gőzök kiszellőztetése és a hulladékanyagok biztonságos eltávolítása során figyelembe kell venni az összes vonatkozó országos és helyi egészségügyi és biztonsági előírást és jogszabályt.</p>
--	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Munkavédelmi és Munkaegészségügyi Hivatal, Amerikai Egyesült Államok)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Amerikai Kormányzati Iparhigiénikusok Konferenciája, Amerikai Egyesült Államok)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Egészségre ártalmas anyagok ellenőrzése, Egyesült Királyság)

Ügyeljen rá, hogy betartja a laboratóriumi veszélyes hulladékok eltávolítására vonatkozó szövetségi, állami és helyi környezetvédelmi előírásokat.

### A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempont

- Ez a protokoll nagy tisztaságú víz (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com), vagy azzal egyenértékű) használatát igényli.

### Eljárás

1. **Ügyeljen rá, hogy a vákuumos eszközben ne legyen bekapcsolva a vákuumszívás. Győződjön meg róla, hogy a vákuum zárva van (Off (Ki) pozíció), és a vákuumszivattyú ki van kapcsolva.**
2. **Öntsön ki a teknőkben maradt minden használt folyadékot.**
3. **Mossa ki a teknőket nagy tisztaságú vízzel, vagy szükség esetén cserélje ki azokat.**
4. **Ürítse ki a hulladékgyűjtő tartályt.**

**Megjegyzés:** A kupakja eltávolítható a csatlakozó csövek kihúzása nélkül.

5. Ha a vákuumos munkaállomást meg kell tisztítani (például por vagy kiömlött folyadék miatt), kövesse a *PyroMark Q24 felhasználói kézikönyv* instrukcióit.

## Rendelési információk

Termék	Tartalomjegyzék	Katalógusszám
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	24 reakcióra elegendő kit a PyroMark Q24 rendszereken: Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP és H <sub>2</sub> O	971460
PyroMark Q24 MDx	Szekvencia-alapú detektáló platform 24 minta párhuzamos Pyrosequencing vizsgálatára	9001513
PyroMark Q24	Szekvencia-alapú detektáló platform 24 minta párhuzamos Pyrosequencing vizsgálatára	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vákuumos munkaállomás (220 V) 24 minta párhuzamos előkészítésére, PCR termékektől az egyszálú templátokig	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vákuumos munkaállomás (220 V) 24 minta párhuzamos előkészítésére, PCR termékektől az egyszálú templátokig	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Alkalmazás szoftver	9019063
PyroMark Q24 Software	Elemzőszoftver	9019062
<b>Tartozékok</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 tesztlyukas lemez szekvenálási reakcióhoz	979301

\* Csak az Egyesült Királyságban.

† A világ többi részén.

<b>Termék</b>	<b>Tartalomjegyzék</b>	<b>Katalógusszám</b>
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Patronok a nukleotidok és reagensek kiadagolásához	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Többször használható szűrő szondák a PyroMark Vacuum Workstation Q96 és Q24 készülékhez	979010
PyroMark Control Oligo	A rendszer telepítésének ellenőrzésére	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	A rendszer teljesítményének ellenőrzésére	979304
<b>Kapcsolódó termékek</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNS-preparáláshoz: 50 QIAamp MinElute® oszlop, proteináz K, pufferek, gyűjtőcsövek (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 szövetminta preparálásához: reagens patronok (szövet), eldobható szűrős pipettahegyek, eldobható pipettahegy-tartók, mintacsövek (2 ml), leöblítő csövek (1,5 ml), G2 puffer, proteináz K enzim	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 szövetminta preparálásához: QIAamp Mini Spin oszlopok, pufferek, reagensek, tesztcsövek, vákuum-csatlakozók	61104

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói kézikönyvében található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói útmutatói a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) webhelyen érhetők el, vagy a QIAGEN Műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva

Az érintett országokban:

EZEN TERMÉK VÁSÁRLÓJA JOGOSULT A TERMÉK HUMÁN IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLRA TÖRTÉNŐ FELHASZNÁLÁSÁRA. A VÁSÁRLÓT A TERMÉK MEGVÁSÁRLÁSÁVAL MEGSZERZETT HASZNÁLATI JOGON KÍVÜL SEMMILYEN MÁS ÁLTALÁNOS SZABADALOM VAGY LICENC NEM ILLETI MEG.

Védjegyek: 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).

Korlátozott licencmegállapodás

Ennek a terméknek a használatával a *therascreen KRAS Pyro Kit* minden vásárlója és használója elfogadja az alábbi feltételeket:

1. A *therascreen KRAS Pyro Kit* kizárólag a *therascreen KRAS Pyro Kit kézikönyvben* leírtaknak megfelelően, és csak a kitben található komponensekkel használható. A QIAGEN semmilyen szellemi tulajdonjoga alapján nem járul hozzá, hogy felhasználják az ezen kitben lévő komponenseket a kitben nem megtalálható más komponensekkel vagy ilyenekbe beépítsék őket, kivéve abban az esetben, ha és ahogyan az szerepel a *therascreen KRAS Pyro Kit kézikönyvben* vagy a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) honlapon található további protokollok valamelyikében.
2. Az itt leírt licenceken kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a kit és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A kit és komponenseinek licence csak egy szeri használatra jogosít; a komponensek újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A kit vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztül érvényesítésére és az azzal kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség kifizetésére, beleértve a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a kittel és/vagy komponenseivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárás ügyvédi költségeit.

A legújabb licencfeltételekről a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oldalon tájékozódhat.

© 2015 QIAGEN, minden jog fenntartva.

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)

