

# *therascreen*<sup>®</sup> BRAF Pyro<sup>®</sup> rinkinio vadovas



2 versija

**IVD**

In vitro diagnostiniam naudojimui



**REF**

971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

VOKIETIJA

**R2**

**MAT**

1074213LT



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN yra inovacinių mėginių ir tyrimų technologijų, leidžiančių išskirti ir nustatyti bet kokio biologinio mėginio turinį, lyderis. Mūsų pažangūs, aukštos kokybės produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio paėmimo iki rezultato gavimo.

### **QIAGEN nustato standartus šiose srityse:**

- DNR, RNR ir baltymų išgryninimas
- Nukleino rūgščių ir baltymų tyrimai
- mikroRNR ir RNRi tyrimai
- Mėginių ir tyrimų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas yra padėti jums pasiekti išskirtinę sėkmę ir laimėjimus. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, apsilankykite adresu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

<b>Turinys</b>	
<b>Numatytas naudojimas</b>	<b>5</b>
<b>Santrauka ir paaiškinimas</b>	<b>5</b>
<b>Procedūros principas</b>	<b>6</b>
<b>Tiekiamos medžiagos</b>	<b>8</b>
Rinkinio turinys	8
<b>Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos</b>	<b>10</b>
<b>Perspėjimai ir atsargumo priemonės</b>	<b>12</b>
Saugumo informacija	12
Bendrosios atsargumo priemonės	13
<b>Reagentų laikymas ir apdorojimas</b>	<b>15</b>
<b>Mėginių apdorojimas ir laikymas</b>	<b>15</b>
<b>Procedūra</b>	<b>16</b>
DNR išskyrimas	16
1 protokolai: PyroMark Q24 sistemos procedūros nustatymas	17
2 protokolai: PGR, atliekama naudojant su <i>therascreen</i> BRAF Pyro rinkiniu tiekiamus reagentus	20
3 protokolai: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance rutuliukų	23
4 protokolai: Mėginių paruošimas prieš Pyrosequencing analizę su PyroMark Q24	25
5 protokolai: Procedūra su PyroMark Q24	29
6 protokolai: PyroMark Q24 procedūros analizė	31
<b>Rezultatų interpretavimas</b>	<b>34</b>
Analizės rezultatų interpretavimas ir žemo lygio mutacijų aptikimas	34
Trikčių šalinimo vadovas	37
<b>Kokybės kontrolė</b>	<b>40</b>
<b>Apribojimai</b>	<b>40</b>
<b>Veikimo charakteristikos</b>	<b>41</b>
<b>Nuorodos</b>	<b>46</b>
<b>Simboliai</b>	<b>46</b>
<b>Kontaktinė informacija</b>	<b>47</b>
<b>A priedas: <i>therascreen</i> BRAF Pyro tyrimų nustatymas</b>	<b>48</b>
<b>B priedas: Atliekų indo ir lovelių ištuštinimas</b>	<b>50</b>



## Numatytas naudojimas

*therascreen* BRAF Pyro rinkinys yra in vitro nukleino rūgščių sekos nustatymo tyrimas, kurio pagrindas yra Pyrosequencing® technologija, skirta kiekybiniam mutacijų aptikimui žmogaus BRAF geno 600 ir 464-469 kodonuose iš genominės DNR, išskirtos iš žmogaus audinio mėginių.

*therascreen* BRAF Pyro rinkinys turi suteikti gydytojams informaciją, kuri padėtų atrinkti vėžiu sergančius pacientus, kuriems daugiau naudos duotų gydymas anti-EGFR terapija. Jis skirtas in vitro diagnostiniam naudojimui.

Rinkinį galima naudoti tik su PyroMark® Q24 sistema. Į PyroMark Q24 sistemas įeina šie komponentai:

- PyroMark Q24 instrumentas ir PyroMark Q24 MDx instrumentas.
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation ir PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- PyroMark Q24 programinė įranga (2.0 versija) ir PyroMark Q24 MDx – programinė įranga (2.0 versija).

Produktą turi naudoti profesionalūs vartotojai, pvz., technikai ir gydytojai, apmokyti atlikti in vitro diagnostikos procedūras, žino kaip naudotis molekulinės biologijos technika ir PyroMark Q24 sistema.

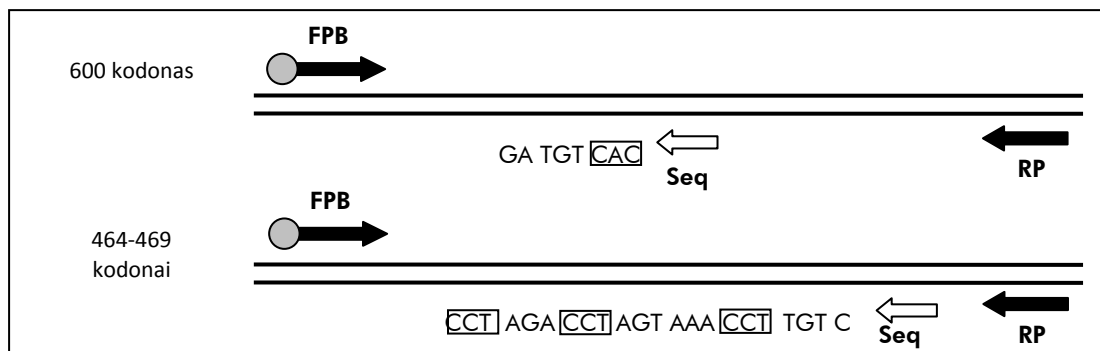
## Santrauka ir paaiškinimas

*therascreen* BRAF Pyro rinkinys yra naudojamas kiekybiniam mutacijų nustatymams žmogaus BRAF geno 600 kodono 15 egzone ir 464-469 kodonų 11 egzone (Figure 1).

15 egzons	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAATAGGTGATTTT GGTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG TTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
11 egzons	AAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATT CCTGATGGGCAGATTACAGTGGACAAAGAATTGGATCTGGA TCATTTGGAACAGTCTACAAGGAAAGTGGCATG

**1 pav. Žmogaus BRAF geno sekvenuojamų sričių genominis kontekstas (Ensembl ID ENSG00000157764).** 600, 464, 466 ir 469 kodonus rodo kvadratėliai.

Rinkinį sudaro du mišiniai: vienas yra skirtas mutacijų aptikimui 600 kodone, o kitas – mutacijų aptikimui 464-469 kodonuose (2 pav.). Dvi sritys atskirai amplifikuojamos atliekant PGR ir -nustatytos vietos sekoskaitą. Aplink ieškomas vietas esančios sekos veikia kaip normalizacijos ir atskaitinės viršūnės, rodančios analizės kiekio nustatymą ir kokybės vertinimą.



**2 pav. BRAF tyrimo pavaizdavimas.** Parodyta seka yra analizuojama laukinio tipo mėginio seka. **FPB**: Priekiniai PGR pradmenys (B reiškia biotinilaciją); **RP**: Atvirkštiniai PGR pradmenys; **Seq**: Sekvenavimo pradmenys.

Abu tyrimai sekvenuojami atvirkštine kryptimi.

Produktą sudaro PGR pradmenų mišinys ir sekvenavimo pradmuo, skirti kiekvienam tyrimui. Pradmenys tiekiami tirpale. Kiekviename mėgintuvėlyje yra 24  $\mu$ l kiekvieno pradmens arba pradmenų mišinio.

## Procedūros principas

7 psl. parodyta darbo eiga iliustruoja visą tyrimo procedūrą. Atliekant PGR su pradmenis, kurie amplifikuoja - 600 kodoną ir 464-469 kodonus, ampikonai imobilizuojami ant Streptavidin Sepharose<sup>®</sup> High Performance dalelių. Paruošiama viengrandė DNR ir atitinkami sekvenavimo pradmenys sujungiami su DNR. Tada mėginiai analizuojami su PyroMark Q24 naudojant tyrimo nustatymo failą ir procedūros failą.

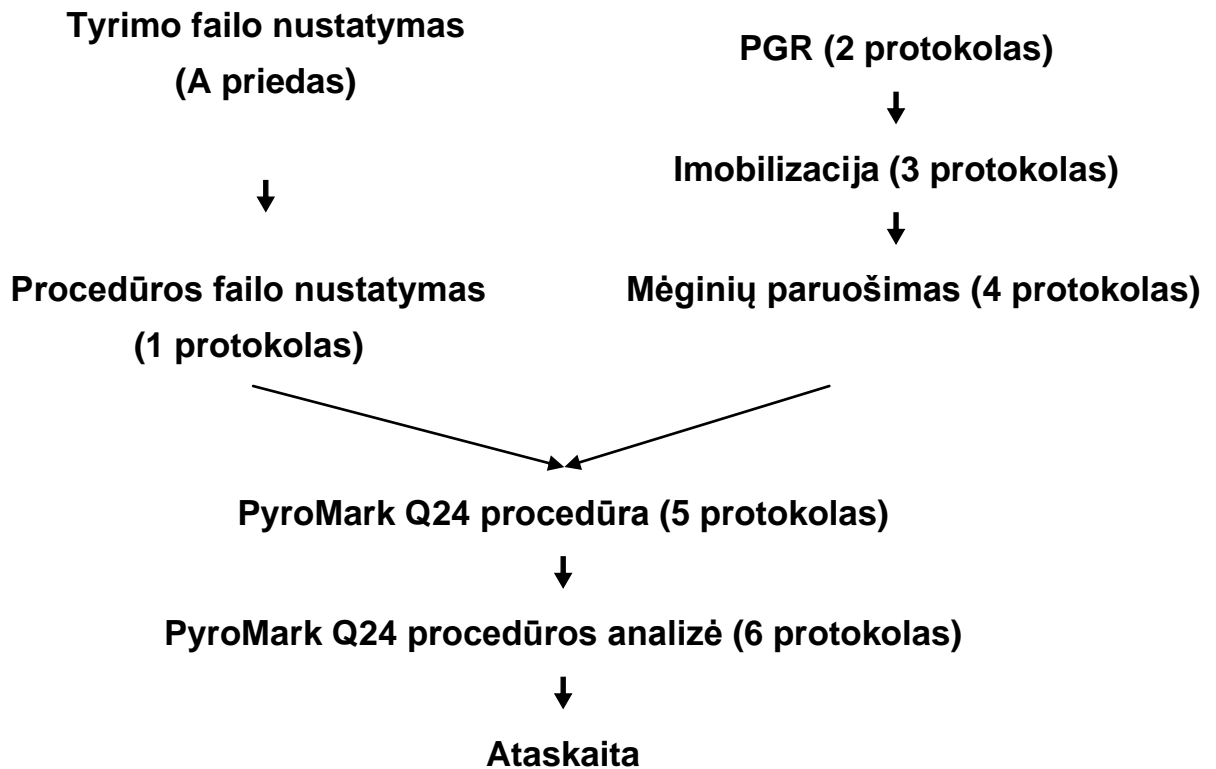
Rekomenduojama tyrimo analizavimui naudoti BRAF įjungiamą ataskaitą. BRAF įjungiamą ataskaitą galima gauti el. paštu [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Tačiau procedūros analizę taip pat galima atlikti su analizės įrankiu, įeinančiu į PyroMark Q24 sistemą. „Sequence to Analyze“ galima pritaikyti retų mutacijų aptikimui po procedūros (žr. „6 protokolas: PyroMark Q24“, 31 psl.).

**Pastaba:** Palyginti su ankstesne thescreen *BRAF Pyro Kit Handbook* versija (2011 metų liepos mėnesio 1 versija), darbo eiga buvo truputį modifikuota. Žr. „3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance“, 23 psl., ir „4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24“, 25 psl., ir „6 protokolas: PyroMark Q24“, 31 psl.

## **therascreen BRAF Pyro procedūros darbo eiga**

### **Tyrimo ir procedūros nustatymas**

### **Mėginio paruošimas**



### **Kontrolės**

Nedenatūruota kontrolinė DNR įeina į rinkinį kaip PGR ir sekvenavimo reakcijų teigiama kontrolė. Ši kontrolinė DNR turi laukinio tipo genotipą sekvenuojamose srityse ir yra reikalinga norint tinkamai interpretuoti rezultatą bei identifikuoti žemo lygio mutacijas (žr. „Rezultatų interpretavimas“, 34 psl.). Kiekvienam tyrimui atliekant kiekvieną pirosekvenavimo reakciją naudokite mėginį su nendenatūruota kontroline DNR.

Be to, atliekant PGR - mažiausiai su vienu tyrimu reikia įtraukti neigiamą kontrolę (be šabloninės DNR).

## Tiekiamos medžiagos

### Rinkinio turinys

#### *therascreen* BRAF Pyro rinkinys (1/2 dėžių)

<b><i>therascreen</i> BRAF Pyro rinkinys (24)</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalogo Nr.</b>	<b>971470</b>
<b>Reakcijų skaičius</b>	<b>24</b>
Seq Primer BRAF 600	24 $\mu$ l
Seq Primer BRAF 464–469	24 $\mu$ l
PCR Primer BRAF 600	24 $\mu$ l
PCR Primer BRAF 464–469	24 $\mu$ l
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 $\mu$ l
CoralLoad <sup>®</sup> Concentrate, 10x	1.2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l



**therascreen buferiai ir reagentai (2/2 dėžių)**

<b>Buferiai ir reagentai</b>	
PyroMark Binding Buffer	10 ml
PyroMark Annealing Buffer	10 ml
PyroMark Denaturation Solution*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x	25 ml
Enzyme Mixture	1 buteliukas
Substrate Mixture	1 buteliukas
dATP $\alpha$ S	1180 $\mu$ l
dCTP	1180 $\mu$ l
dGTP	1180 $\mu$ l
dTTP	1180 $\mu$ l
therascreen <i>BRAF</i> Pyro rinkinio vadovas (anglų kalba)	1

\* Sudėtyje yra natrio hidroksido.

## Reikalingos, bet netiekiamos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, prašom perskaityti atitinkamus saugos duomenų lapus.

- DNR išskyrimo rinkinys (žr. „**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**“, psl. 16)
- Pipetės (reguliuojamos)\*
- Sterilūs pipečių antgaliai (su PGR tinkamais filtrais)
- Darbastalio mikrocentrifuga\*
- Termomaišytuvas\* ir atitinkami PGR mėgintuvėliai
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalogo Nr. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (katalogo Nr. 9001513 ar 9001514)\*<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Software (katalogo Nr. 9019063 ar 9019062)<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Plate (katalogo Nr. 979301)<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Cartridge (katalogo Nr. 979302)<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (katalogo Nr. 9001515 ar 9001517)\*<sup>†</sup>
- Dalelių imobilizavimui skirtas plokštelių maišytuvas\*
- Kaitinimo blokas\*, galintis pasiekti 80°C
- 24 šulinėlių PGR plokštelė ar juostelės
- Juostelių kamšteliai
- Labai švarus vanduo (Milli-Q<sup>®</sup> 18.2 MΩ x cm ar jo atitikmuo).  
**Pastaba:** Rinkinyje tiekiama pakankamai vandens PGR, DNR imobilizavimui bei fermento mišinio ir substrato mišinio ištirpinimui; papildomas labai švarus vanduo yra reikalingas norint 10x atskiesti PyroMark Wash Buffer, 10x.
- Etanolis (70%)<sup>‡</sup>

\* Įsitinkite, kad instrumentai buvo patikrinti ir kalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

<sup>†</sup> Pažymėtas CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EB. Visi kiti į sąrašą įtraukti produktai nėra pažymėti CE-IVD pagal ES direktyvą 98/79/EB.

<sup>‡</sup> Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų substancijų, pvz., metanolio ar metiletiketono.

## Rekomenduojami plokštelių maišytuvai

Su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu rekomenduojama naudoti 1 lentelėje išvardintus plokštelių maišytuvus.

### 1 lentelė. Plokštelių maišytuvai, rekomenduojami naudoti su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu

Gamintojas	Produktas	Katalogo Nr.
Eppendorf	Termomaišytuvas comfort (bazinis produktas)	5355 000.011
	MTP termoblokas	5363 000.012
	Adapterio plokštelė, skirta 96 x 0.2 ml PGR mėgintuvėliams, įdedamiems į mikrotitrinių plokštelių blokus	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag <sup>®</sup> Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Rekomenduojamos 24 šulinėlių plokštelės

Su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu rekomenduojama naudoti 2 lentelėje išvardintas 24 šulinėlių plokšteles.

**2 lentelė. 24 šulinėlių plokštelės, rekomenduojamos naudoti su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu**

<b>Gamintojas</b>	<b>Produktas</b>	<b>Katalogo Nr.</b>
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PGR plokštelė	AB-0624
Axygen	24 šulinėlių PGR mikroplokštelė	PCR-24-C
4titude	FrameStar nulaužiami 96 šulinėliai, skaidrūs mėgintuvėliai	4ti-1000
Kisker	Quali – PGR plokštelės be rėmo	G030

## **Perspėjimai ir atsargumo priemonės**

### **Saugumo informacija**

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, prašom perskaityti atitinkamus saugos duomenų lapus. Juos rasite internete patogiu ir kompaktišku PDF formatu adresu [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kur jūs galėsite susirasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir rinkinio komponento saugos duomenų lapus.

therascreen BRAF Pyro rinkinio komponentams taikomos šios pavojingumo ir atsargumo frazės.

### PyroMark Denaturation Solution



Pavojinga! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Gali ėsdinti metalus. Absorbuoti išsiliejusią medžiagą, siekiant išvengti materialinės žalos. Laikyti tik originalioje talpykloje. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

### PyroMark Enzyme Mixture



Sudėtyje yra: (R\*,R\*)-1,4-Dimerkaptobutano-2,3-diolis; acto rūgštis. Pavojinga! Dirgina odą. Smarkiai pažeidžia akis. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: Skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

### PyroMark Substrate Mixture



Sudėtyje yra: acto rūgštis. Pavojinga! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

## Bendrosios atsargumo priemonės

**Pastaba:** Vartotojas visada privalo atkreipti dėmesį į šiuos dalykus.

- Norėdami gauti optimalius rezultatus, visada griežtai laikykitės vartotojo vadove pateiktų nuorodų. Nerekomenduojama skiesti reagentų kitaip negu aprašyta šiame vadove, nes pablogės jų veikimas.
- Palyginti su ankstesne therascreen *BRAF Pyro Kit rinkinio* R1 peržiūra, darbo eiga buvo truputį modifikuota (žr. „3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance“, 23 psl., ir „4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24“, 25 psl., ir „6 protokolas: PyroMark Q24“, 31 psl.).
- Šio produkto komponentų pakanka 24 reakcijoms atliekant 5 atskiras reakcijas.

- Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais (PGR nustatymui).
- Laikykite ir ištraukite teigiamas medžiagas (mėginius, teigiamas kontroles ir amplikonus) atskirai nuo visų kitų reagentų ir sulašinkite jas į reakcijos mišinį naudodami erdvės atžvilgiu atskirtą įrangą.
- Prieš pradėdami tyrimą, gerai atitirpinkite visus komponentus kambario temperatūroje (18-25°C).
- Atitirpinę išmaišykite komponentus (pakartotinai lašindami aukštyn ir žemyn arba atlikdami impulsų sukuriavimą) ir trumpai centrifuguokite.
- Nepavykę rezultatai nėra priežastis spręsti apie mutacinę būklę.

## Reagentų laikymas ir apdorojimas

*therascreen* BRAF Pyro rinkinys yra tiekiamas dviejose dėžėse. *therascreen* BRAF Pyro rinkinys (1/2 dėžių) yra gabenamas ant sauso ledo. Atvežtus PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, Unmethylated Control DNA ir visus pradmenis reikia laikyti  $-30 - -15^{\circ}\text{C}$ .

*therascreen* buferiai ir reagentai (2/2 dėžių) su buferiais, fermento mišiniu, substrato mišiniu, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP ir dTTP (reagentais pirosekvenavimo analizei) yra gabenami ant vėsių paketų. Atvežtus šiuos komponentus reikia laikyti  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Norint iki minimumo sumažinti aktyvumo praradimą, patartina laikyti fermento mišinį ir substrato mišinį tiekiamuose buteliukuose.

Atstatyti fermento ir substrato mišiniai yra stabilūs mažiausiai 10 dienų  $2-8^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Atstatytus fermento ir substrato mišinius galima užšaldyti ir laikyti buteliukuose  $-30 - -15^{\circ}\text{C}$ . Su šaldytais reagentais negalima atlikti daugiau kaip 3 užšaldymo-atitirpinimo ciklų.

**Pastaba:** Nukleotidų negalima šaldyti.

Laikant tokiomis sąlygomis, *therascreen* BRAF Pyro rinkinys išlieka stabilus iki rinkinio galiojimo datos pabaigos.

## Mėginių apdorojimas ir laikymas

Visus mėginius reikia apdoroti kaip potencialiai užkrečiamą medžiagą.

Mėginių medžiaga yra žmogaus DNR, išskirta iš formaline fiksuotų, į parafiną įterptų (FFPI) mėginių.

## Procedūra

### DNR išskyrimas

Sistemos veikimas buvo nustatytas naudojant EZ1<sup>®</sup> DNA audinio rinkinį ir QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue rinkinį, skirtą žmogaus DNR išskyrimui iš formaline fiksuotų, į parafiną įterptų naviko mėginių.

3 lentelėje parodyti QIAGEN<sup>®</sup> rinkiniai yra rekomenduojami DNR išgryninimui iš nurodyto tipo žmogaus mėginių ir yra skirti naudojimui su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu. Išgryninkite DNR pagal instrukcijas rinkinių vadovuose

#### 3 lentelė. DNR išgryninimo rinkiniai, rekomenduojami naudoti su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu

Mėginio medžiaga	Nukleino rūgščių išskyrimo rinkinys	Katalogo Nr. (QIAGEN)
Parafine įterptas audinys	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

\* Laikykitės į parafiną įterpto audinio naudojimo protokolo. EZ1 DNA Tissue rinkinys turi būti naudojamas kartu su EZ1 Advanced (katalogo Nr. 9001410 arba 9001411) ir EZ1 Advanced DNA parafino dalies kortele (katalogo Nr. 9018298), su EZ1 Advanced XL (katalogo Nr. 9001492) ir EZ1 Advanced XL DNR parafino dalies kortele (katalogo Nr. 9018700) arba BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (katalogo Nr. 9000705; jo daugiau nebėra) ir EZ1 DNA parafino dalies kortele (katalogo Nr. 9015862)



# 1 protokolas: PyroMark Q24 sistemos procedūros nustatymas



## Svarbus patarimas prieš pradėdant

- Prireikus galima patvirtinti LOB su laukinio tipo mėginiu, kad būtų generuota pilna rezultatų plokštelė. Smulkesnį aprašymą rasite CLSI potvarkyje EP17-A „Aptikimo ribų ir kiekio apskaičiavimo ribų nustatymo protokolas; patvirtintas potvarkis“.

## Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Jeigu neinstaliuota BRAF įjungiamą ataskaita, sukurkite tyrimo nustatymą (žr. „A priedas: *therascreen* BRAF Pyro tyrimų nustatymas“, 48 psl.). Tai turi būti padaryta prieš pirmą kartą atliekant *therascreen* BRAF Pyro tyrimą. Jeigu instaliuota BRAF įjungiamą ataskaita, iš anksto nustatytus tyrimo nustatymus rasite PyroMark Q24 software trumpųjų šaukinių naršyklėje, takelyje „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“. BRAF įjungiamą ataskaitą gausite, jeigu kreipsitės elektroniniu paštu [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Procedūra

1. Įrankių juostoje spustelkite .  
Bus sukurtas naujas procedūros failas.
2. Įveskite procedūros parametrus (žr. „Tyrimo parametrai“, psl. 19).
3. Nustatykite plokštelę, priskirdami 600 kodono ir 464-469 kodonų tyrimus šulinėliams, atitinkantiems analizuojamus mėginius.  
**Pastaba:** Bent į vieną tyrimą reikia įtraukti neigiamos kontrolės mėginį (be šabloninės DNR) į kiekvieną PGR reakciją.  
**Pastaba:** Į kiekvieną tyrimą kiekvienoje pirosekvenavimo reakcijoje įtraukite mėginį su nedematūruota kontroline DNR (žr. „Kontrolės“, 7 psl.).
4. Kai procedūra jau nustatyta ir galima ją atlikti su PyroMark Q24 system, atsispausdinkite reikiamų fermento mišinio, substrato mišinio ir nukleotidų kiekių sąrašą ir plokštelės nustatymą. Meniu „Tools“ pasirinkite „Pre Run Information“, o kai pasirodys ataskaita, spustelkite .
5. Uždarykite procedūros failą ir nukopijuokite jį į USB atmintinę (tiekiamą su sistema), naudodami Windows® Explorer.  
**Pastaba:** Išspausdintą Pre Run Information galima naudoti kaip mėginio nustatymo šabloną (žr. „3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance“, 23 psl.).

Norédami išnagrinėti plokšteę su PyroMark Q24 sistema, žr. „5 protokolas: Procedūra su PyroMark Q24“, 2929 psl.

## Tyrimo parametrai

Run name:	Tyrimo pavadinimas duodamas išsaugojus failą. Pervardinus failą, pasikeičia ir tyrimo pavadinimas.
Instrument method:	Pasirinkite instrumento metodą pagal kasetę, kurią naudosite tyrimo metu. Žr. su produktais tiekiamas instrukcijas.
Plate ID:	<b>Pasirinktis:</b> Įveskite PyroMark Q24 plokštelės ID.
Bar code:	<b>Pasirinktis:</b> Įveskite plokštelės brūkšninį kodą, o jeigu turite brūkšninių kodų skaitytuvą, prijungtą prie kompiuterio, patalpinkite pelės žymeklį tekstiniame laukelyje „Barcode“ (spusteldami laukelį) ir nuskenaukite brūkšninį kodą.
Kit and Reagent ID:	<b>Pasirinktis:</b> Įveskite naudojamo <i>therascreen</i> BRAF Pyro rinkinio partijos numerį. Partijos numerį rasite ant produkto etiketės. <b>Pastaba:</b> Mes rekomenduojame įvesti ir reagento ID, ir rinkinio ID, kad būtų galima atsekti netikėtas su reagentais iškilusias problemas.
Run Pastaba:	<b>Pasirinktis:</b> Įveskite pastabą apie procedūros turinį ar tikslą.

## Tyrimo failų pridėjimas

Norėdami priskirti tyrimą prie šulinėlio, jūs galite:

- Spustelti ant šulinėlio dešinį pelės klavišą ir kontekstiniame meniu pasirinkti „Load Assay“.
- Pasirinkti tyrimą trumpųjų šaukinių naršyklėje, spustelti ir tempti tyrimą į šulinėlį.

Šulinėlis yra užkoduotas pagal spalvą priklausomai nuo jam priskirto tyrimo.

## Mėginio ID ir pastabų įvedimas

Norėdami įvesti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite elementą ir įveskite tekstą. Norėdami redaguoti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite elementą (bus pasirinktas tuometinis turinys) arba du kartus spustelkite elementą.

## 2 protokolas: PGR, atliekama naudojant *therascreen* BRAF Pyro rinkinyje esančius reagentus

Šis protokolas yra skirtas 600 kodono PGR amplifikacijai ir 464-469 kodonų PGR amplifikacijai naudojant *therascreen* BRAF Pyro rinkinį

### Svarbūs patarimai prieš pradėdant

- HotStarTaq<sup>®</sup> polimerazei su PyroMark Master Mix reikalingas **15 minučių 95°C** aktyvavimo veiksmas.
- Išdėstykite visus reakcijos mišinius tokiam plote, kuris būtų atskirtas nuo naudojamo DNR išgryninimui, įtraukdami šabloninę DNR į PGR, PGR produktų analizę ar mėginių paruošimą prieš pirosekvenavimo analizę
- Naudokite vienkartinius antgalius su hidrofobiniais filtrais, kad iki minimumo sumažintumėte kryžminį užteršimą.

### Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su PGR pradmenimis, trumpai juos centrifuguokite, kad surinktumėte turinį mėgintuvėlių dugne.
- Pritaikykite kontrolės ir mėginio DNR koncentraciją iki 0.4-2 ng/ $\mu$ l, jeigu to reikia.

### Procedūra

#### 1. Atitirpinkite visus reikiamus komponentus (žr. 4 lentelę).

Prieš naudojimą gerai išmaišykite.

#### 2. Pagal 3 lentelę paruoškite reakcijos mišinį kiekvienam PGR pradmenų rinkiniui.

Į reakcijos mišinį paprastai įeina visi komponentai, kurių reikia PGR, išskyrus mėginį.

Paruoškite didesnę negu reikia visam atliekamų PGR tyrimų skaičiui reakcijos mišinio kiekį.

#### 4 lentelė. Reakcijos mišinio paruošimas kiekvienam PGR pradmens mišiniui

Komponentas	Kiekis/reakcija $\mu$ l)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer BRAF 600 kodonas ar PCR Primer BRAF 464-469 kodonai	1.0
Vanduo (H <sub>2</sub> O, tiekiamas)	4.0
<b>Visas kiekis</b>	<b>20.0</b>

#### 3. Kruopščiai išmaišykite reakcijos mišinį ir įlašinkite 20 $\mu$ l į kiekvieną PGR mėgintuvėlį.

PGR mėgintuvėlių nereikia laikyti ant ledo, nes HotStarTaq DNR polimerazė kambario temperatūroje nėra aktyvi.

#### 4. Įlašinkite į atskirus PGR mėgintuvėlius (žr. 5 lentelę) 5 $\mu$ l šabloninės DNR (2-10 ng genomines DNR) ir gerai išmaišykite.

**Pastaba:** Bent į vieną tyrimą reikia įtraukti neigiamos kontrolės mėginį (be šabloninės DNR) į kiekvieną PGR reakciją.

**Pastaba:** Į kiekvieną tyrimą kiekvienoje pirosekvenavimo reakcijoje įtraukite mėginį su nedenaatūruota kontroline DNR (žr. „Kontrolės“ 7 psl.).

#### 5 lentelė. PGR paruošimas

Komponentas	Kiekis/reakcija $\mu$ l)
Reakcijos mišinys	20
Mėginio DNR	5
<b>Visas kiekis</b>	<b>25</b>

5. Užprogramuokite termomaišytuvą pagal gamintojo instrukcijas, laikydamiesi 6 lentelėje aprašytų sąlygų.

6 lentelė. Optimizuotas ciklo atlikimo protokolas

			Komentariai
<b>Pradinis aktyvavimo veiksmas:</b>	15 minučių	95°C	HotStarTaq DNR polimerazė aktyvuojama per šį kaitinimo veiksmą.
<b>3 veiksmy ciklo atlikimas:</b>			
Denatūravimas	20 sekundžių	95°C	
Prijungimas	30 sekundžių	53°C	
Pratęsimas	20 sekundžių	72°C	
Ciklų skaičius	42		
<b>Galutinis pratęsimas:</b>	5 minutes	72°C	

6. Sudėkite PGR mėgintuvėlius į termomaišytuvą ir paleiskite ciklo atlikimo programą.
7. Po amplifikacijos pereikite prie „3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance“, 23 psl.

### 3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas prie Streptavidin Sepharose High Performance dalelių

Šis protokolas skirtas šabloninės DNR imobilizavimui prie Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) prieš analizę su PyroMark Q24 sistema.

#### Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Prieš pradėdami, leiskite visiems reikiamiems reagentams ir tirpalams pasiekti kambario temperatūrą (18-25°C).

#### Svarbūs patarimai prieš pradėdant

- Palyginti su ankstesne theascreen *BRAF Pyro rinkinio vadovo* versija (2011 metų liepos mėnesio 1 versija, 2 veiksmas), darbo eiga buvo truputį modifikuota.

#### Procedūra

1. Švelniai suplakite buteliuką su Streptavidin Sepharose High Performance rutuliukais, kol gausite homogeninį tirpalą.
2. Paruoškite Pagrindinį Mišinį DNR imobilizavimui, kaip aprašyta 6 lentelėje. Paruoškite 10% didesnį kiekį negu reikia visų reakcijų atlikimui.

#### 7 lentelė. Pagrindinis Mišinys DNR imobilizavimui

Komponentas	Kiekis/mėginys (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	1
PyroMark Binding Buffer	40
Vanduo (H <sub>2</sub> O, tiekiamas)	29
<b>Visas kiekis</b>	<b>70</b>

**Pastaba:** Šis protokolas taikomas Streptavidin Sepharose High Performance, kurio partijos numeris 10057037 ar didesnis. Naudojant Streptavidin Sepharose High Performance rutuliukus, kurių partijos numeris mažesnis negu 10057037, vienam mėginiui naudojamų rutuliukų kiekį reikia padidinti iki 2 µl, kaip nurodyta procedūros nustatyme.

3. Įlašinkite 70 µl Pagrindinio Mišinio į 24 šulinėlių PGR plokštelės ar juostelių šulinėlius, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „1 protokolas: PyroMark Q24“, 17 psl.).

4. Įlašinkite 10 µl biotininto PGR produkto iš 2 protokolo į kiekvieną šulinėlį, kuriame yra Pagrindinis Mišinys, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „1 protokolas: PyroMark Q24“, 17 psl.).

**Pastaba:** Visas kiekis šulinėlyje turi būti 80 µl po Master Mix ir PGR produkto įlašinimo.

5. Uždarykite PGR plokštelę (arba juosteles) su juostelių kamšteliais.

**Pastaba:** Įsitikinkite, kad skystis neištekės iš vieno šulinėlio į kitą.

6. 5-10 minučių kratykite PGR plokštelę kambario temperatūroje (15–25°C) 1400 apsukų/min. greičiu.

**Pastaba:** Per šį veiksmą paruoškite PyroMark Q24 Vacuum Workstation mėginių paruošimui, kaip aprašyta *PyroMark Q24 vadove*.

7. Nedelsdami pereikite prie „4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24“, 25 psl.

**Pastaba:** Sefarozės dalelės greitai nusėda. Dalelės turi surinktos iš karto po kratymo.

Jeigu nuo plokštelės (juostelių) kratymo praėjo daugiau kaip 1 minutė, prieš surinkdami daleles, dar 1 minutę juos pakratykite.



## 4 protokolas: Mėginių paruošimas prieš pirosekvenavimo analizę su PyroMark Q24

Šis protokolas yra skirtas viengrandės DNR paruošimui ir sekvenavimo pradmenų prijungimui prie mėginio prieš atliekant pirosekvenavimo reakciją su PyroMark Q24.

### Svarbūs patarimai prieš pradėdant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su sekvenavimo pradmenimis, trumpai juos centrifuguokite, kad surinktumėte turinį mėgintuvėlių dugne.
- Sulašinkite 2 skirtingus sekvenavimo pradmenis pagal tą patį pavyzdį, kaip nurodyta plokštelės procedūros nustatyme (žr. „1 protokolas: PyroMark Q24“, 17 psl.), priklausomai nuo analizės srities (600 kodonas arba 464–469 kodonai).
- Palyginti su ankstesne theascreen *BRAF Pyro rinkinio vadovo* versija (2011 metų liepos mėnesio 1 versija, 18 veiksmas), darbo eiga buvo truputį modifikuota. Netrumpinkite mėginių aušinimo laiko, kai įkaitinsite iki 80°C.
- Reguliariai atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta PyroMark Q24 vadove ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta.

### Ką reikia padaryti prieš pradėdant

- Patalpinkite vieną PyroMark Q24 plokštelių laikiklį ant iš anksto įkaitinto 80°C kaitinimo bloko, kad panaudotumėte per 17 veiksmą. Palikite antrą PyroMark Q24 plokštelių laikiklį kambario temperatūroje (18-25°C), kad panaudotumėte per 18 punktą.
- PyroMark Wash Buffer yra tiekiamas kaip 10x koncentratas. Prieš panaudodami jį pirmą kartą, atskieskite iki 1x darbinio tirpalo, įlašindami 225 ml labai švaraus vandens į 25 ml 10x PyroMark Wash Buffer (galutinis kiekis 250 ml).

**Pastaba:** 1x PyroMark Wash Buffer darbinis tirpalas yra stabilus 2-8°C iki pažymėtos galiojimo datos pabaigos.

### Procedūra

1. **Atskieskite pakankamą kiekį kiekvieno sekvenavimo pradmenų, Seq Primer BRAF 600 ar Seq Primer BRAF 464–469, PyroMark Annealing Buffer, kaip parodyta 8 lentelėje.**

Paruoškite didesnę skiesto sekvenavimo pradmenų kiekį negu reikia visam mėginių skaičiui, su kuriais bus atliekamas sekvenavimas (mėginių skaičiui + vieną papildomą).

Neatskieskite ir nelaikykite daugiau sekvenavimo pradmenų.

## 8 lentelė. Sekvenavimo pradmenų pavyzdinis skiedimas

Komponentas	Kiekis/mėginys (μl)	Kiekis 9 + 1 reakcijoms (μl)
Seq Primer BRAF 600 ar Seq Primer BRAF 464–469	0.8	8
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
<b>Visas kiekis</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

- Įlašinkite 25 μl skiesto sekvenavimo pradmens į kiekvieną PyroMark Q24 Plate šulinėlį, kaip nurodyta procedūros nustatyme (žr. „1 protokolas: PyroMark Q24“, 17 psl.).

**Pastaba:** Laikykite vieną iš PyroMark Q24 Plate Holders (tiekiamų su PyroMark Q24 Vacuum Workstation) kambario temperatūroje (15–25°C) ir naudokite kaip atramą, ruošdami ir perkeldami plokšteles.

- Uždėkite PGR plokštelę (ar juosteles) iš 3 protokolo ir PyroMark Q24 Plate ant darbastalio (3 pav.).

Patikrinkite PGR plokštelę ir įsitikinkite, kad tirpale yra Sepharose dalelių.

**Pastaba:** Įsitikinkite, kad plokštelė pakreipta ta pačia kryptimi, kaip ir sudedant mėginius.



3 pav. PGR plokštelės (ar juostelių) ir PyroMark Q24 plokštelės padėjimas ant vakuumo darbo vietos.

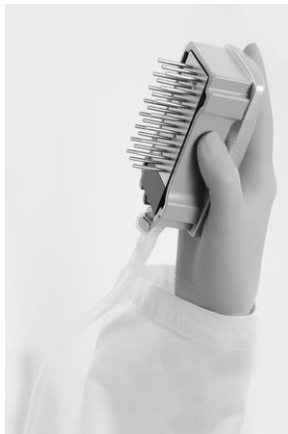
- Sudarykite vakuumą įrankyje, įjungdami vakuumą.

5. **Atsargiai nuleiskite vakuuminio įrankio filtravimo zondus į PGR plokštelę (arba juosteles), kad surinktumėte daleles su imobilizuota matrica. Laikykite zondus vietoje 15 sekundžių. Keldami vakuuminį įrankį, būkite labai atsargūs.**

**Pastaba:** Sefarozės dalelės greitai nusėda. Jeigu nuo plokštelės (juostelių) kratymo praėjo daugiau kaip 1 minutė, prieš surinkdami rutuliukus, dar 1 minutę juos pakratykite.

Patikrinkite, ar vakuuminis įrankis pilnai paėmė visus mėginius PGR plokštelėje.

6. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su 40 ml 70% etanolio (3 pav.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.**
7. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su 40 ml Denaturation Solution (3 pav.). 5 sekundes plaukite filtravimo zondus.**
8. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su 50 ml Wash Buffer (3 pav.). 10 sekundžių plaukite filtravimo zondus.**
9. **5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyn ir atgal, daugiau kaip 90° vertikaliai, kad ištuštintumėte skystį iš filtravimo zondų (4 pav.).**



4 pav. Daugiau kaip 90° vertikaliai pakelto vakuuminio įrankio pavaizdavimas.

10. **Kol vakuuminis įrankis laikomas virš PyroMark Q24 Plate, uždarykite vakuuminį jungtuką virš įrankio (į padėtį Off).**
11. **Išleiskite daleles į PyroMark Q24 Plate, nuleisdami filtravimo zondus į skiestą sekvenavimo pradmenį ir švelniai kilnodami įrankį iš vienos pusės į kitą.**  
**Pastaba:** Elkitės atsargiai, kad nepažeistumėte PyroMark Q24 Plate paviršiaus, subraižydami su filtravimo zondais.
12. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su labai švariu vandeniu (3 pav.) ir sukite 10 sekundžių.**
13. **Išplaukite filtravimo zondus, nuleisdami juos į labai švarų vandenį (2 pav.) ir naudodami vakuumą. Praplaukite zondus su 70 ml labai švaraus vandens.**

- 14. 5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštin ir atgal, daugiau kaip 90° vertikaliai, kad ištuštintumėte skystį iš filtravimo zondų (4 pav.).**
- 15. Uždarykite vakuuminį jungtuką ant įrankio (į padėtį Off) ir patalpinkite vakuuminį įrankį stovėjimo padėtyje (P).**
- 16. Išjunkite vakuuminę pompą.**  
**Pastaba:** Darbo dienos pabaigoje reikia išpilti skysčio atliekas ir likusius tirpalus bei patikrinti PyroMark Q24 Vacuum Workstation, ar joje nėra dulkių ir skysčio likučių (žr. B priedą, 51 psl.).
- 17. 2 minutes kaitinkite PyroMark Q24 Plate su mėginiais 80°C, naudodami iš anksto įšildytą PyroMark Q24 plokštelių laikiklį.**
- 18. Nuimkite PyroMark Q24 plokštelę nuo karšto plokštelės laikiklio ir patalpinkite ant antro PyroMark Q24 plokštelės laikiklio, kuris buvo laikomas kambario temperatūroje (15-25°C), kad mėginiai 10-15 minučių būtų aušinami kambario temperatūroje.**
- 19. Pereikite prie „5 protokolą: Procedūra su PyroMark Q24“, 29 psl.**

## 5 protokolas: Procedūra su PyroMark Q24

Šiame protokole aprašytas PyroMark Gold Q24 reagentų paruošimas ir sudėjimas į PyroMark Q24 Cartridge bei procedūros su PyroMark Q24 pradžia ir pabaiga. Detalesnį aprašymą, kaip nustatyti procedūrą, rasite *PyroMark Q24 vadove*.

### Svarbus patarimas prieš pradedant

- Iki procedūrinės informacijos ataskaitoje, kurią rasite meniu „Tools“ per procedūros nustatymą (žr. „1 protokolas: PyroMark Q24“, 17 psl.), pateikta informacija apie tam tikrai procedūrai reikalingų nukleotidų, fermento ir substrato buferio kieki.

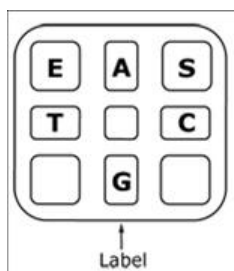
### Ką reikia padaryti prieš pradedant

- Įjunkite PyroMark Q24. Elektros jungtukas yra instrumento gale.

### Procedūra

1. Ištirpinkite šaldyto-liofilizuoto fermento ir substrato mišinius, kiekvienam naudodami po 620 µl vandens (teikiama H<sub>2</sub>O).
2. Išmaišykite, švelniai siūbuodami buteliuką.  
**Pastaba:** Nesūkuriuokite!  
**Pastaba:** Norėdami įsitikinti, kad mišinys pilnai ištirpo, 5-10 minučių palaikykite jį kambario temperatūroje (15-25°C). Prieš pripildydami PyroMark Q24 Cartridge, įsitikinkite, kad tirpalas nėra drumstas. Jeigu reagentų tuoj pat nepanaudosite, patalpinkite reagentų buteliukus ant ledo<sup>š</sup> arba šaldytuve.
3. Leiskite reagentams ir PyroMark Q24 Cartridge pasiekti aplinkos temperatūrą (20–25°C).
4. Patalpinkite PyroMark Q24 kasetę, atsukę etiketę į save.
5. Sudėkite į PyroMark Q24 Cartridge atitinkamus nukleotidų, fermento ir substrato mišinius, kaip parodyta 5 pav.  
Įsitikinkite, kad iš pipetės neperkelsite į kasetę oro burbuliukų.

§ Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir nešiokite apsauginius akinius. Jeigu jums reikia daugiau informacijos, prašom perskaityti atitinkamus medžiagų saugos duomenų lapus (SDL), kuriuos gausite iš produkto gamintojo.



**5 pav. PyroMark Q24 Cartridge pavaizdavimas iš viršaus.** Anotacijos atitinka etiketę ant reagentų buteliukų. Įlašinkite fermento mišinį (E), substrato mišinį (S) ir nukleotidus (A, T, C, G) pagal kiekio informaciją, pateiktą Pre Run informacijos ataskaitoje, kurią rasite meniu „Tools“ per procedūros nustatymą.

6. **Atidarykite kasetės vožtuvą ir įdėkite pripildytą reagento kasetę, atsukę etiketę į išorę. Pilnai įstumkite kasetę ir stumkite žemyn.**
7. **Įsitikinkite, kad matosi linija kasetės priekyje, ir uždarykite vožtuvą**
8. **Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir patalpinkite plokštelę ant kaitinimo bloko.**
9. **Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.**
10. **Įdėkite USB atmintinę (su procedūros failu) į USB jungtį instrumento priekyje.**  
**Pastaba:** Neišimkite USB atmintinės, kol nesibaigs procedūra.
11. **Pagrindiniame meniu pasirinkite „Run“ (naudodami ekrano mygtukus ▲ ir ▼) ir spauskite „OK“.**
12. **Pasirinkite procedūros failą, naudodami ekrano mygtukus ▲ ir ▼.**  
**Pastaba:** Norėdami pamatyti aplanko turinį, pasirinkite aplanką ir spauskite „Select“. Norėdami grįžti į ankstesnį vaizdą, spauskite „Back“.
13. **Pasirinkę procedūros failą, spauskite „Select“ ir pradėkite procedūrą.**
14. **Kai baigsite procedūrą ir instrumentas patvirtins, kad procedūros failas išsaugotas USB atmintinėje, spauskite „Close“.**
15. **Išimkite USB atmintinę.**
16. **Atidarykite instrumento dangtį.**
17. **Atidarykite kasetės vožtuvą ir išimkite reagento kasetę, keldami ją aukštyn ir traukdami lauk.**
18. **Uždarykite vožtuvą.**
19. **Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir nuimkite plokštelę nuo kaitinimo bloko.**
20. **Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.**
21. **Išmeskite plokštelę ir išvalykite kasetę, kaip aprašyta su kasete tiekiamo produkto lapo instrukcijose.**
22. **Išanalizuokite procedūrą pagal „6 protokolas: PyroMark Q24 , 31 psl.**

## 6 protokolas: PyroMark Q24 procedūros analizė

Šiame protokole aprašyta baigtinės BRAF procedūros mutacijos analizė naudojant PyroMark Q24 Software.

### Procedūra

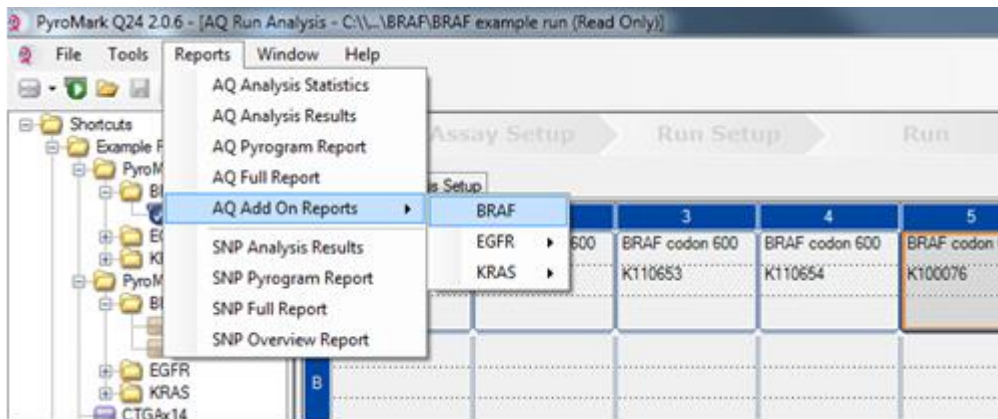
1. Įdėkite USB atmintinę (su apdorotu procedūros failu) į kompiuterio USB jungtį.
2. Perkelkite procedūros failą iš USB atmintinės į norimą kompiuterio vietą, naudodami Windows Explorer.
3. Atidarykite procedūros failą PyroMark Q24 Software AQ režimu, meniu „File“ pasirinkdami „Open“ arba trumpųjų šaukinių naršyklėje du kartus spusteldami failą (🔍).
4. Yra 2 procedūros analizavimo būdai. Jeigu naudojate BRAF įjungiamą ataskaitą, eikite į 5 veiksmą. Jeigu naudojate AQ analizės integralą į PyroMark Q24, eikite į 6 veiksmą.

**Pastaba:** Mes primygtinai rekomenduojame rezultatų interpretavimui naudoti BRAF įjungiamą ataskaitą. BRAF įjungiamą ataskaitą galite gauti el. paštu [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Ši ataskaita užtikrins, kad automatiniam visų mutacijų aptikimui bus naudojamos atitinkamos AR vertės (9 lentelė) ir įvairios „Sequences to Analyze“.

**Pastaba:** BRAF 600 ir 469 kodonų kompleksinių mutacijų negalima analizuoti naudojant su PyroMark Q24 Software AQ analizę. Mes rekomenduojame 600 ir 469 kodonų kompleksinių mutacijų analizei naudoti BRAF įjungiamą ataskaitą.

**Pastaba:** Kai kurių 600 kodone analizuojamų mutacijų bei mutacijų G469A ir G469S gali nepavykti tiksliai atskirti, kai mutacijų lygiai nesiekia 10%.

5. **BRAF įjungiamos ataskaitos naudojimas:**  
Norėdami generuoti ataskaitą, meniu iš „Reports“ pasirinkite „AQ Add On Reports/BRAF“ (žr. 6 pav.).



6 pav. Meniu BRAF Plug-in Report.

Šulinėliai bus automatiškai išanalizuoti ryšium su visomis mutacijomis, kurių AR nurodytos 9 lentelėje. Rezultatai bus pateikti apžvalginėje lentelėje (7 pav.), o po jų seks detalūs rezultatai, į kuriuos įeina pirogramos ir analizės kokybė.

### Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

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

7 pav. BRAF įjungiamo ataskaita.

6. **AQ analizės naudojimas:**  
Norėdami analizuoti procedūrą ir gauti rezultatų apžvalgą, spustelkite vieną iš mygtukų **Analyze**.



Analizuoti visus šulinėlius.



Analizuoti pasirinktą šulinėlį.

Analizės rezultatai (alelių dažniai) ir kokybės vertinimas parodomi virš kintamojo padėties Pyrogram<sup>®</sup> įrašė. Daugiau detalių, kaip analizuoti procedūrą, rasite *PyroMark Q24 vadove*.

7. **Norėdami generuoti ataskaitą, menu iš „Reports“ pasirinkite „AQ Full Report“ ar „AQ Analysis Results“.**



**Pastaba:** Jeigu norite gauti patikimus rezultatus, mes rekomenduojame, kad vienos viršūnės aukštis viršytų 30 RLU. Nustatykite 30 RLU tyrimo nustatyme kaip „reikiamą tinkamos kokybės viršūnės aukštį“ (žr. A priedą ir *PyroMark Q24 vadovą*).

**Pastaba:** AQ Analysis rezultatų ataskaita turi būti naudojama alelių kiekio nustatymo dokumentavimui ir interpretavimui. Pirogramoje pateikiami skaičiai suapvalinami ir nerodo tikslaus kiekio nustatymo.

**Pastaba:** Pirogramą visada reikia palyginti su histograma, ir jūs galite ją pamatyti spustelėję dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Išmatuotos viršūnės turi derėti prie histogramos juostų aukščio.

### **Mėginių be aptiktos GTG → GAG mutacijos arba su kokybės vertinimu „Check“ ar „Failed“ peranalizavimas**

Dažniausia BRAF mutacija yra GTG → GAG prie 1799 nukleotido (antra 600 kodono bazė). Todėl šiai mutacijai taikomas tyrimo nustatyme apibūdintas standartas „Sequence to Analyze“ (žr. „A priedas: theascreen BRAF Pyro“ 48 psl.).

Mes primygtinai rekomenduojame peranalizuoti visus mėginius, kuriuose neaptikote mutacijos su standartine „Sequence to Analyze“, bei tokius mėginius, kuriems pateiktas kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ arba kurių viršūnės neatitinka histogramos juostų aukščio. Kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ gali rodyti mutaciją, kuriai netinka standartinė „Sequence to Analyze“, todėl atsiranda viršūnių aukščio nukrypimų.

Norėdami peranalizuoti ir nusitaikyti į mutacijas prie 600 kodono 1798 ar 1798 nukleotido, eikite į „Analysis Setup“ ir pakeiskite „Sequence to Analyze“ į vieną iš papildomų „Sequence to Analyze“, išvardintų „A priedas: theascreen BRAF Pyro“, 48 psl. Spustelkite „Apply“ ir po to „To All“, kai atsiras langas „Apply Analysis Setup“.

Atnaujintus mutacijų dažnius žmogaus BRAF gene, 600 kodone ir 464-469 kodonuose, rasite Sanger Instituto internetiniame puslapyje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Pastaba:** Pakeitę „Sequence to Analyze“, įsitinkinkite, kad vienos viršūnės aukščio riba nustatyta 30 RLU.

**Pastaba:** Sekvenuojamoje srityje gali būti papildomų retų ar netikėtų mutacijų ir jas galima išanalizuoti naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“ atsižvelgiant į netikėtas mutacijas.

**Pastaba:** Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir to negalima paaiškinti retomis ar netikėtomis mutacijomis, rekomenduojama iš naujo išanalizuoti mėginį.

## Rezultatų interpretavimas

### Analizės rezultatų interpretavimas ir žemo lygio mutacijų aptikimas

Primygtinai rekomenduojama palyginimui ir kaip foninių lygių kontrolę įtraukti į kiekvieną procedūrą nedematūruotą kontrolinę DNR. Išmatuotas kontrolinio mėginio dažnis turi būti žemesnis ar lygus tuščios vietos ribai (TVR).

Visus mėginius reikia iširti ryšium su aptikimo riba (AR, 9 lentelė) ir interpretuoti taip.

- Mutacijos dažnis  $<AR$ : Mutacijos nėra arba mutacija neaptikta.
- Mutacijos dažnis  $\geq AR$  ir  $\leq AR + 3\%$  vnt.: Potenciali žemo lygio mutacija.

**Pastaba:** Jeigu naudojate BRAF įjungiamą ataskaitą (žr. „5 protokolai: Procedūra su PyroMark Q24“ 5 veiksma, 29 psl.) ir taip nutiktų, bus pateiktas perspėjimas.

Mėginiai, kuriuose pranešama potenciali žemo lygio mutacija, turi būti laikomi teigiamais mutacijos atžvilgiu tik tokiu atveju, jeigu ji patvirtinama peranalizuojant juos dviem egzemplioriais kartu su mėginiu su nedematūruota kontroline DNR. Abiejų dublikatų rezultatas turi būti  $\geq AR$  ir skirtis nuo kontrolinio mėginio. Priešingu atveju mėginys bus laikomas tokiu, kuriame „mutacija neaptikta“.

- Mutacijos dažnis  $>AR + 3\%$  vnt.: Mutacija

Jeigu naudojate BRAF įjungiamą ataskaitą, tai atliekama automatiškai.

**Pastaba:** Rezultatų interpretavimui rekomenduojama naudoti BRAF įjungiamą ataskaitą. Tam, kad išsamiau iširtumėte mėginius su pranešama potencialia žemo lygio mutacija, mes rekomenduojama papildomai išanalizuoti mėginį rankiniu būdu su taikomąja programine įranga (pvz., kontrolinio mėginio mutacijos dažnio palyginimui).

**Pastaba:** Kai kurių 600 kodone analizuojamų mutacijų bei mutacijų G469A ir G469S gali nepavykti tiksliai atskirti, kai mutacijų lygiai nesiekia 10%.

**Pastaba:** Išmatuotas didesnis nei TVR kontrolinio mėginio dažnis rodo, kad tos procedūros fono lygis yra aukštesnis nei įprastinis, kas gali paveikti alelių kiekio nustatymą, ypač žemos mutacijos lygiams. Tokiu atveju intervale nuo TVR (9 lentelė) iki  $AR + 3\%$  vnt. išmatuoti dažniai negali būti naudojami mutacijos būsenos apsprendimui. Rekomenduojama peranalizuoti mėginius su potencialia žemo lygio mutacija

**Pastaba:** Priimant sprendimą dėl vėžiu sergančių pacientų gydymo, negalima remtis vien BRAF mutacijos būseną.

**9 lentelė. Tam tikroms mutacijoms nustatytos AR ir TVR**

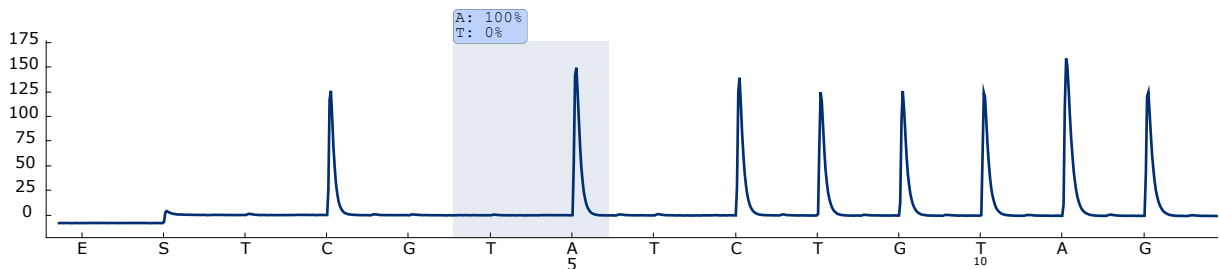
<b>Nukleino rūgštis pakaitalas</b>	<b>Aminorūgštis pakaitalas</b>	<b>TVR (% vnt.)</b>	<b>AR (% vnt.)</b>	<b>COSMIC ID* (V46)</b>
<b>600 kodonas (GTG), iširtas atvirkštine kryptimi (CAC)</b>				
1799T>A	V600E	0.4	2.4	476
1799T>G	V600G	0.1	2.1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0.2	2.2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0.4	2.4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0.4	2.4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2.3	4.3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0.1	2.1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0.2	2.2	474
<b>469 kodonas (GGA), iširtas atvirkštine kryptimi (TCC)</b>				
1406G>A	G469E	1.1	3.1	461
1406G>C	G469A	1.2	3.8	460
1406G>T	G469V	1.1	3.1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1.5	3.5	458
<b>466 kodonas (GGA), iširtas atvirkštine kryptimi (TCC)</b>				
1397G>A	G466E	4.1	8.6	453
1397G>T	G466V	1.3	3.3	451
<b>464 kodonas (GGA), iširtas atvirkštine kryptimi (TCC)</b>				
1391G>A	G464E	1.3	3.4	449
1391G>T	G464V	0.3	2.3	450

\* Somatinių vėžio mutacijų katalogas, kurį rasite Sanger instituto tinklalapyje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

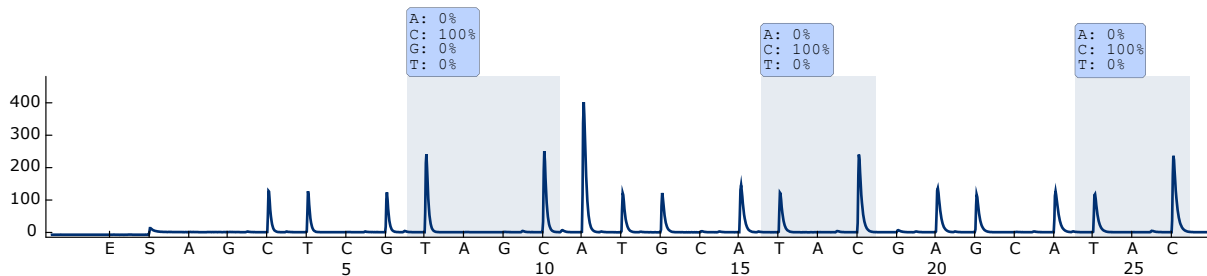
<sup>†</sup> Žemiausias mėginio mutacijos lygis, kurio rezultatas yra išmatuotas dažnis  $\geq$ AR.

## Pavyzdiniai rezultatai

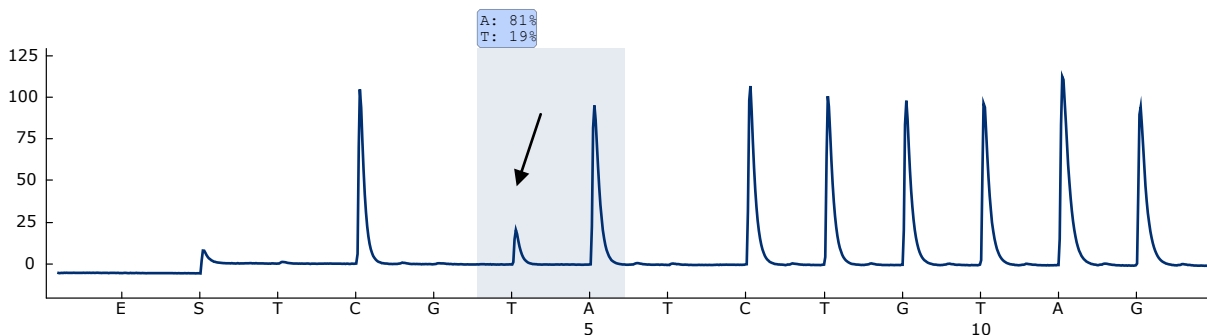
Pavyzdiniai pirogramų rezultatai parodyti 8–10 pav.



8 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu 600 kodone su „Sequence to Analyze“ *CWCTGTAGC*.



9 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginį su laukinio tipo genotipu 464-469 kodonuose su „Sequence to Analyze“ *CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA*.



10 pav. Pirogramos įrašas, gautas išanalizavus mėginius su GTG → GAG (V600E) mutacija 600 kodono 2 bazėje (1799 nukleotidas, kurį rodo rodyklė) su „Sequence to Analyze“ *CWCTGTAGC*.

## **Trikčių šalinimo vadovas**

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas sprendžiant bet kokias išskylančias problemas. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro puslapyje „Dažnai užduodami klausimai“

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN Technical Services mokslininkams visada malonu atsakyti į bet kokius jūsų užduodamus klausimus apie šio vadovo informaciją ir protokolus arba mėginių ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją rasite užpakaliniame viršelyje arba apsilankę [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Pastaba:** Bendrą instrumento trikčių šalinimą rasite *PyroMark Q24 vadove*.

### **Komentari ir pasiūlymai**

---

#### **Signalai nešabloninėje kontrolėje (neigiamoje kontrolėje)**

- |                             |                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Trikdžiai tarp šulinėlių | Signalas iš vieno šulinėlio aptinkamas gretimuose šulinėliuose. Stenkitės nedėti aukšto intensyvumo skleidžiančių mėginių šalia nešabloninės kontrolės šulinėlių. |
| b) PGR užteršimas           | Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais. Laikykite ir ištraukite tokias medžiagas kaip mėginiai, kontrolės ir amplikonai atskirai nuo PGR reagentų.     |

#### **Silpna ar netikėta seka**

- |                                |                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Žemos kokybės genominės DNR | Žemos kokybės genominės DNR gali sugadinti PGR. Analizuokite PGR mėginius, taikydami elektroforezės techniką (pvz., QIAxcel <sup>®</sup> Advanced System arba agarozės gelio elektroforezę) |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## Komentarai ir pasiūlymai

---

### Rezultatas „Check“ ar „failed“

- a) Žemas viršūnės aukštis
- Esant apdorojimo klaidoms per PGR reakciją ar mėginių paruošimą prieš pirosekvenavimą, gali susiformuoti žemos viršūnės.
- Svarbu pilnai paimti mėginius su vakuuminiu įrankiu. Pasistenkite lėtai nuleisti vakuuminį įrankį į mėginius ir sekite, kad imobilizavimui naudojamų PGR plokštelės ar juostelių geometrija leistų pilnai paimti mėginius.
- Reguliariai atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta *PyroMark Q24 vadove*, ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta
- Jeigu atsiranda perspėjimas „Check“, atidžiai palyginkite pirogramą su histograma, kuri pasirodys spustelėjus dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Jeigu išmatuotos viršūnės dera prie histogramos juostų aukščio, rezultatas yra galiojantis. Priešingu atveju rekomenduojama peranalizuoti mėginį.
- b) „Sequence to Analyze“ neaptikta mutacija
- Tyrimo nustatyme pritaikykite „Sequence to Analyze“ (žr. „A priedą: *therascreen* BRAF Pyro tyrimų nustatymas“, 48 psl.) ir peranalizuokite procedūrą.
- c) Netikėta reta mutacija
- Kokybės vertinimas „Check“ arba „Failed“ gali atsirasti dėl netikėto viršūnių pavyzdžio. Tai gali rodyti netikėtą mutaciją, kurios neišanalizuoja esama analizuojama seka. Šiuos mėginius galima analizuoti naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“ ir atsižvelgiant į netikėtas mutacijas.
- d) Aukšto viršūnės aukščio nukrypimo perspėjimas per paskirstymą
- Pirogramą reikia atidžiai palyginti su histograma, kuri atsiras spustelėjus dešinį pelės klavišą lange Pyrogram. Jeigu išmatuotos viršūnės nedera prie histogramos juostų aukščio ir negali būti paaiškinamos retomis mutacijomis, rekomenduojama peranalizuoti mėginį.

## Komentarai ir pasiūlymai

---

- e) Per 600 kodono tyrimo 6 paskirstymą atsiranda perspėjimo pranešimas “High peak height deviation”, kai „Sequence to Analyze“ yra *CAYCTGTAGC* Pirogramą reikia atidžiai palyginti su histograma, kuri pasirodys spustelėjus dešinį pelės klavišą ant lango Pyrogram. Jeigu prie T6 paskirstymo foninis triukšmas nesiekia laukiamo lygio, o likusios išmatuotos viršūnės dera prie histogramos juostų aukščio, perspėjimo ir kokybės vertinimo „Check“ ar „Failed“ galima nepaisyti.
- f) Per 600 kodono tyrimo 3 ar 4 paskirstymą atsiranda perspėjimo pranešimas “High peak height deviation”, kai „Sequence to Analyze“ yra *CVCTGTAGC* Pirogramą reikia atidžiai palyginti su histograma, kuri pasirodys spustelėjus dešinį pelės klavišą ant lango Pyrogram. Jeigu prie G3 ar T4 paskirstymo foninis triukšmas nesiekia laukiamo lygio, o likusios išmatuotos viršūnės dera prie histogramos juostų aukščio, perspėjimo ir kokybės vertinimo „Check“ ar „Failed“ galima nepaisyti.
- g) Per 600 kodono tyrimą atsiranda perspėjimo pranešimas “The sequence contains less reference peaks than required”, kai „Sequence to Analyze“ yra *CVCTGTAGC* Jeigu išmatuotos viršūnės dera prie histogramos juostų aukščio, perspėjimo ir kokybės vertinimo “Check” galima nepaisyti.

### Aukštas fonas

- a) Neteisingas nukleotidų laikymas Laikykite nukleotidus 2-8°C. Jeigu laikysite nuo -15 iki -25°C, gali padidėti fonas.
- b) Trumpas mėginių aušinimo laikas prieš Pyrosequencing analizę 10-15 minučių laikykite mėginius ant PyroMark Q24 Plate Holder kambario temperatūroje. Netrumpinkite aušinimo laiko.
- c) Kasetės užteršimas Kruopščiai išvalykite kasetę, kaip aprašyta produkto lape. Laikykite kasetę saugomą nuo šviesos ir dulkių.

### Nėra signalų teigiamoje kontrolėje (nedenatūruotoje kontrolinėje DNR)

- a) Fermento ar substrato mišinio nepakanka visiems šulinėliams Įsitikinkite, kad pripildėte PyroMark Q24 Cartridge, kaip nurodyta meniu „Tools“ „Pre Run Information“.

## Komentariai ir pasiūlymai

---

- |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b) Reagentai neteisingai laikomi ar skiesti | Paruoškite <i>therascreen</i> pagal instrukcijas, aprašytas „5 protokolas: Procedūra su PyroMark Q24“, 2929 psl.                                                                                                                                                                                                               |
| c) PGR ar mėginio ruošimo klaida            | Apdorojimo klaidos per PGR nustatymą, PGR maišytuvo programavimą ar mėginių paruošimą prieš Pyrosequencing gali nepasireikšti jokiais signalais. Atlikite filtravimo zondų funkcinį testą, kaip aprašyta <i>PyroMark Q24 vadove</i> , ir keiskite filtravimo zondus, kaip nurodyta. Pakartokite PGR ir Pyrosequencing analizę. |

## Kokybės kontrolė

Pagal QIAGEN ISO sertifikuotą kokybės valdymo sistemą kiekviena *therascreen* BRAF Pyro rinkinio partija yra testuojama pagal iš anksto nustatytas specifikacijas, kad būtų užtikrinta pastovi produkto kokybė.

## Apribojimai

Bet kokie generuojami rezultatai turi būti interpretuojami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

Vartotojas atsakingas už tai, kad patvirtintų sistemos veikimą su bet kokiomis laboratorijoje naudojamomis procedūromis, kurios neįeina į QIAGEN veikimo studijas.



## Veikimo charakteristikos

### Tuščios vietos riba ir aptikimo riba

Tuščios vietos riba (TVR) ir aptikimo riba (AR) buvo nustatytos daugeliui mutacijų naudojant plazmidžių mišinius (10 lentelė). TVR ir AR buvo nustatytos pagal Klinikinių ir laboratorinių standartų instituto (CLSI) EP17-A potvarkio „Aptikimo ribų ir kiekio apskaičiavimo ribų nustatymo protokolas; patvirtintas potvarkis“ rekomendacijas.  $\alpha$ - ir  $\beta$  klaidos (atitinkamai klaidingi teigiami ir klaidingi neigiami rezultatai) buvo nustatytos iki 5%. TVR vertės reiškia išmatuotą dažnį, gautą su laukinio tipo mėginiu. AR vertės reiškia žemiausią signalą (išmatuotą dažnį), kurį galima traktuoti kaip teigiamą tam tikros mutacijos atžvilgiu.

### Mutacijos (GTG → GGG) ir (GTG → GCG) 600 kodone ir (GGA → GAA) 464 kodone

Šių mutacijų tuščios vietos matavimai buvo nuosekliai artimi 0 % vnt. (n=72), todėl buvo gautas negausinis pasiskirstymas arba mėginių su žemo lygio mutacijomis matavimai turėjo negausinį pasiskirstymą. Todėl AR buvo nustatyta naudojant kitokį metodą ir remiantis CLSI EP17-A potvarkio rekomendacijomis. Žemiausias signalas, rodantis mutacijos buvimą (AR) šiose padėtyse, buvo nustatytas 2 % vnt. virš atitinkamo išėities taško lygio, kaip nustatoma remiantis 95 proc. tuščių vietų matavimų procentiliu. Analizuojant mėginį, kurio mutacijos lygis, pateiktas 10 lentelėje, skliaustuose, 95 %, 95 proc. rezultatų (n=72) parodė signalą, kurį galima laikyti teigiamu ( $\geq$  AR).

**10 lentelė. Tam tikroms mutacijoms nustatytos TVR ir AR**

<b>Nukleino rūgšties pakaitalas</b>	<b>Aminorūgšties pakaitalas</b>	<b>TVR (% vnt.)</b>	<b>AR (% vnt.)</b>	<b>COSMIC ID* (V46)</b>
<b>600 kodonas (GTG), iširtas atvirkštine kryptimi (CAC)</b>				
1799T>A	V600E	0.4	2.4	476
1799T>G	V600G	0.1	2.1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0.2	2.2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0.4	2.4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0.4	2.4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2.3	4.3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0.1	2.1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0.2	2.2	474
<b>469 kodonas (GGA), iširtas atvirkštine kryptimi (TCC)</b>				
1406G>A	G469E	1.1	3.1	461
1406G>C	G469A	1.2	3.8	460
1406G>T	G469V	1.1	3.1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1.5	3.5	458
<b>466 kodonas (GGA), iširtas atvirkštine kryptimi (TCC)</b>				
1397G>A	G466E	4.1	8.6	453
1397G>T	G466V	1.3	3.3	451
<b>464 kodonas (GGA), iširtas atvirkštine kryptimi (TCC)</b>				
1391G>A	G464E	1.3	3.4	449
1391G>T	G464V	0.3	2.3	450

\* Somatinių vėžio mutacijų katalogas, kurį rasite Sanger instituto tinklalapyje [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

<sup>†</sup> Žemiausias mėginio mutacijos lygis, kurio rezultatas yra išmatuotas dažnis  $\geq$ AR.

**Pastaba:** Šios vertės buvo nustatytos remiantis procedūromis, kuomet kaip PGR amplifikacijos šablonas buvo naudojami plazmidų mišiniai su laukinio tipo ar atitinkama mutacine seka.

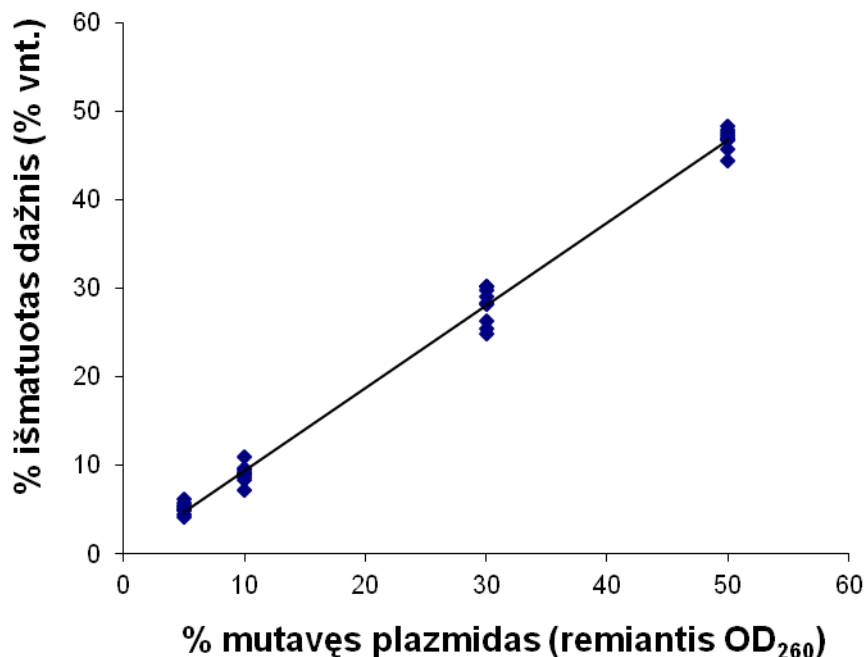
**Pastaba:** Rekomenduojama metodo veikimą patvirtinti laboratorijoje.

## Linijiškumas

Linijiškumas buvo nustatytas naudojant plazmidžių mišinius su laukinio tipo ar mutacine seka su BRAF geno 600 kodono mutacija V600E (GTG → GAG). Plazmidai buvo sumaišyti tokiomis proporcijomis, kad būtų gauti keturi mutacijų lygiai (5, 10, 30 ir 50%). Kiekvienas mišinys buvo analizuojamas su trimis skirtingomis *therascreen* BRAF Pyro rinkinio partijomis, atliekant tris Pyrosequencing procedūras, į kurių kiekvieną įėjo trys kartotiniai.

Rezultatai (kiekvieno mutacijos lygio n=9) buvo analizuojami pagal CLSI potvarkį EP6-A „Kiekybinio matavimo procedūrų linijiškumo įvertinimas: statistinis metodas; patvirtintas potvarkis“ naudojant Analyse-it® Software v2.21 ir yra parodyti 11 pav., kur pavaizduota 600 kodono mutacija V600E (GTG → GAG).

Rezultatai buvo linijiniai ir įėjo į leistiną 5 % vnt. nelinijiškumą testuojamame 5-50 % mutacijos lygio intervale.



11 pav. 600 kodono mutacijos V600E (GTG → GAG) linijiškumas.

## Preciziškumas

Preciziškumo duomenys leidžia nustatyti visą tyrimų kintamumą ir jis buvo gautas trimis skirtingais lygiais, analizuojant aukščiau minėtus plazmidžių mišinius, kiekvieną trimis kartotiniais.

Atkartojimas (tyrimo metu ir naudojant kelias partijas) buvo apskaičiuotas pagal linijiškumo nustatymo duomenis (per tris procedūras tą pačią dieną, naudojant kintamas *therascreen* BRAF Pyro rinkinio partijas). Tarpinis preciziškumas (kintamumas laboratorijoje) buvo nustatytas per tris procedūras

vienoje laboratorijoje, atliekamas trimis skirtingomis dienomis įvairių operatorių, su įvairiais PyroMark Q24 sistemomis bei *therascreen* BRAF Pyro rinkinio partijomis. Atkuriamumas (kintamumas keliose laboratorijose) buvo apskaičiuotas per dvi procedūras, kurių kiekviena buvo atliekama vidinėje ir išorinėje laboratorijoje ir naudojant kintamas *therascreen* BRAF Pyro rinkinio partijas.

Preciziškumo sąmatos išreiškiamos kaip išmatuoto mutacijos dažnio standartinis nukrypimas % vnt. (11 lentelė). 600 kodono mutacijos V600E (GTG → GAG) atkartojimas, tarpinis preciziškumas ir atkuriamumas atitinkamai buvo 0.6–2.1, 0.7–1.8 ir 0.8–2.1 % vnt. testuojamame 5 - 50% mutacijos lygio intervale.

**11 lentelė. 600 kodono mutacijos V600E (GTG → GAG) preciziškumas\***

% mutavusi plazmidė†	Atkartojimas		Tarpinis preciziškumas		Atkuriamumas	
	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN
5	5.2	0.6	4.4	0.7	5.1	0.8
10	9.1	1.0	9.6	1.0	9.6	1.3
30	28.1	2.1	27.9	1.8	28.3	2.1
50	46.9	1.2	46.3	1.5	47.9	1.7

\* Visos vertės pateiktos % vnt. SN: standartinis nukrypimas (n=9).

† Remiantis OD<sub>260</sub> matavimu.

## Diagnostinis vertinimas

*therascreen* BRAF Pyro rinkinys buvo vertinamas lyginant jį su Sanger sekvenavimu. DNR buvo išskirta iš 100 formaline fiksuotų ir į parafiną įterptų (FFPĮ) naviko mėginių, paimtų iš odos, ir išanalizuotos -su 600 kodono bei 464-469 mutacijomis

DNR buvo išskirta naudojant QIAamp DNA FFPĮ Tissue rinkinį.

Pyrosekvenavimog analizė buvo atlikta naudojant *therascreen* BRAF Pyro rinkinį su PyroMark Q24 sistema, o Sanger sekvenavimas buvo atliktas naudojant ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Iš 100 analizuotų mėginių su visais pavyko nustatyti 600 kodono ir 464-469 kodonų mutacinę būseną taikant taikant Sanger sekvenavimą, o naudojant *therascreen* BRAF Pyro rinkinį – su 99 (12 ir 13 lentelė).

Keturiuose iš 100 mėginių taikant Sanger sekvenavimą pavyko aptikti V600E (GTG → GAG) mutaciją. Trys iš šių mėginių parodė identiškus rezultatus su *therascreen* BRAF Pyro rinkiniu, o vienas mėginys neparodė 600 kodono nutacijos pirosekvenavimo metu dėl žemų viršūnių. Per 464–469 tyrimą šis mėginys turėjo pakankamai viršūnių, bet jos buvo daug žemesnės negu kitų

mėginių, kas rodo, kad DNR kokybė buvo žema. Taikant abu metodus, nebuvo aptikta retų mutacijų 464–469 kodonuose.

Neskaitant mėginio, kuris nesuveikė taikant vieną metodą, *therascreen* BRAF Pyro rinkinys ir Sanger sekvenavimas parodė atitinkamai 100% sutapimą su 600 kodono ir 464-469 kodonų rezultatais (12 ir 13 lentelės).

**12 lentelė. 600 kodono atžvilgiu analizuotų odos auglių mėginių rezultatai**

		Sanger sekvenavimas			
		Mutantas	Laukinio tipo	Nežinomas	Viso
<i>therascreen</i> BRAF Pyro rinkinys	Mutantas	3	0	0	3
	Laukinio tipo	0	96	0	96
	Nežinomas	1	0	0	1
	Viso	4	96	0	100

**13 lentelė. 464-469 kodonų atžvilgiu analizuotų odos auglių mėginių rezultatai**

		Sanger sekvenavimas			
		Mutantas	Laukinio tipo	Mutantas	Laukinio tipo
<i>therascreen</i> BRAF Pyro rinkinys	Mutantas	0	0	0	0
	Laukinio tipo	0	99	0	99
	Nežinomas	0	1	0	1
	Viso	0	99	0	100

**Pastaba:** Atliekant visas procedūras, naudojamas veikimo charakteristikų nustatymui, signalas viršijo 30 RLU, įprastai gaunant iš 10 ng DNR, išskirtos iš formaline fiksuoto ir į parafiną įterpto (FFP) audinio. Pirosekvenavimo duomenys buvo analizuojami naudojant BRAF įjungiamą ataskaitą.

## Nuorodos

QIAGEN palaiko didelę, šiuolaikinę internetinę mokslinių publikacijų duomenų bazę apie QIAGEN produktus. Išsamios paieškos galimybės leidžia jums rasti reikiamus straipsnius paprasčiausiai ieškant pagal raktažodžius arba specifikuojant programą, tyrimų sritį, pavadinimą ir t.t.

Jeigu jums reikalingas visas nuorodų sąrašas, apsilankykite QIAGEN internetinėje nuorodinėje bazėje [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) arba susisiekite su QIAGEN technine pagalba ar savo vietiniu platintoju.

## Simboliai

Šie simboliai gali būti nurodyti ant pakuotės ir etikečių:



Reagentų pakanka <N> testams



Galiojimo data



In vitro diagnostinis medicininis produktas



Katalogo numeris



Partijos numeris



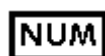
Medžiagos numeris



Komponentai



Turinys



Numeris



Natrio hidroksidas



Pasaulinės prekybos prekės numeris



Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Perskaitykite naudojimo instrukcijas

## Kontaktinė informacija

Jeigu jums reikalinga techninė pagalba ir daugiau informacijos, prašom kreiptis į mūsų techninės pagalbos centrą [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) arba skambinti į vieną iš QIAGEN techninės pagalbos skyrių ar vietiniams platintojams (žr. užpakalinį viršelį arba apsilankykite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## A priedas: *therascreen* BRAF Pyro tyrimų nustatymas

Jeigu instaliuota BRAF įjungiamą ataskaita, PyroMark Q24 programinės įrangos trumpųjų šaukinių naršyklėje, takelyje „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ rasite apibūdintus 600 ir 464-469 kodonų tyrimų nustatymus. Tolesnių veiksmų nereikia atlikti. BRAF įjungiamą ataskaitą galima gauti el. paštu [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Mes primygtinai rekomenduojame per rankinę analizę naudoti BRAF įjungiamą analizę. Kompleksinių mutacijų negalima rankiniu būdu pridėti prie „Sequence to Analyze“ ir jas reikia analizuoti naudojant įjungiamą ataskaitą. Instaliavus įjungiamą ataskaitą arba kiekvieną kartą, kai kompiuteryje instaliuojama ar atnaujinama nauja programinė įranga, reikia patikrinti, ar įjungiamą ataskaita teisingai veikia, kaip aprašyta BRAF įjungiamos ataskaitos greitame vadove.

Jeigu BRAF įjungiamą ataskaita nebuvo instaliuota, prieš pirmą kartą paleidžiant *therascreen* BRAF Pyro tyrimą, reikia nustatyti tyrimo failą. Nustatykite BRAF 600 kodono ir 464-469 kodonų tyrimą, naudodami PyroMark Q24 Software, kaip aprašyta žemiau.

### Procedūra

#### BRAF 600 kodonas

**A1.** Įrankių juostoje spustelkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“.

**A2.** „Sequence to Analyze“ išspausdinkite šią seką. **CWCTGTAGC**

**Pastaba:** Dažniausia 600 kodono mutacija bus GTG → GAG mutacija 1799 nukleotide (antra padėtis).

„Sequence to Analyze“ galima pakeisti po procedūros, kad būtų galima analizuoti skirtingose padėtyse.

Norėdami patikrinti, ar 1798 nukleotide (pirma padėtis) egzistuoja mutacijos, pakeiskite „Sequence to Analyze“ į šią seką. **CAYTGTAGC**

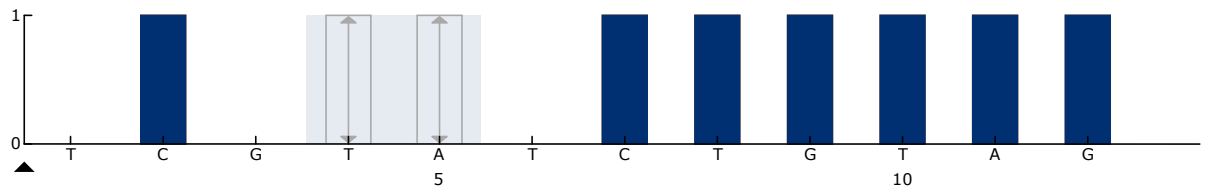
Ryšium su papildomomis retomis 1799 nukleotido mutacijomis reikia išanalizuoti ir „Sequence to Analyze“ **CVCTGTAGC**.

**Pastaba:** Įsitikinkite, kad pavienės viršūnės aukščio riba nustatyta 30 RLU.

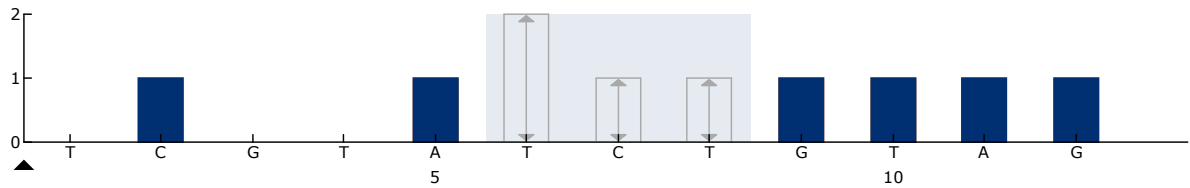
**Pastaba:** Kompleksinių mutacijų BRAF 600 kodone negalima analizuoti naudojant PyroMark Q24 Software AQ analizę su „Sequence to Analyze“. Mes rekomenduojame 600 kodono kompleksinių mutacijų analizei naudoti BRAF įjungiamą ataskaitą.



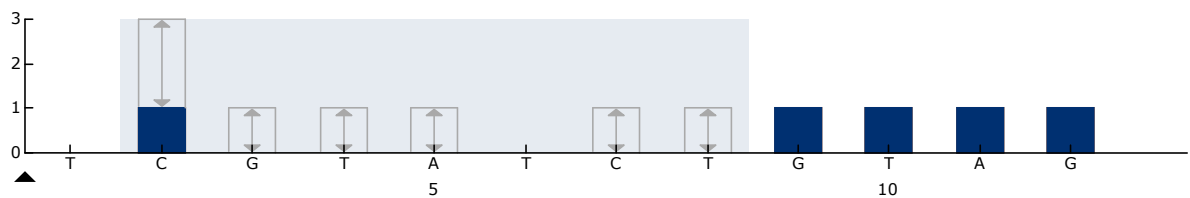
**A3. Rankiniu būdu įveskite šią „Dispensation Order“.**  
**TCGTATCTGTAG**



**12 pav. 600 kodono (1799 nukleotido) histograma su „Sequence to Analyze“**  
**CWCTGTAGC.**



**13 pav. 600 kodono (1798 nukleotido) histograma su „Sequence to Analyze“**  
**CAYTGTAGC.**



**14 600 kodono (1799 nukleotido) histograma su „Sequence to Analyze“**  
**CVCTGTAGC.**

**A4. Spustelkite stulpelį „Analysis Parameters“ ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ iki 30.**

**A5. Įrankių juostoje spustelkite  ir išsaugokite tyrimą kaip „BRAFCodon 600“.**

## BRAF 464-469 kodonai

A1. Įrankių juostoje spustelkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“.

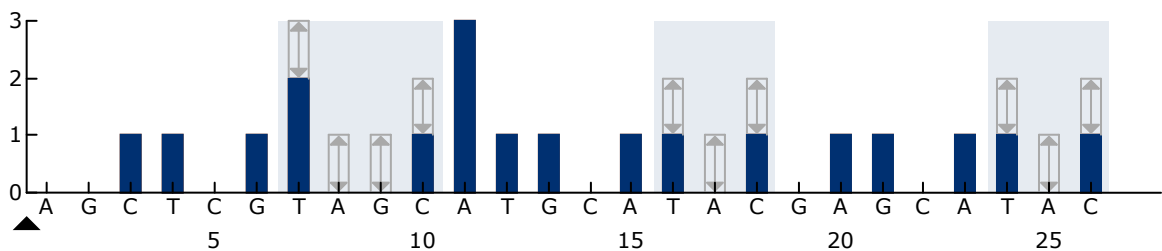
A2. „Sequence to Analyze“ išspausdinkite šią seką.

**CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA**

**Pastaba:** Kompleksinių mutacijų BRAF 469 kodone negalima analizuoti naudojant PyroMark Q24 Software AQ analizę su „Sequence to Analyze“. Mes rekomenduojame 469 kodono kompleksinių mutacijų analizei naudoti BRAF įjungiamą ataskaitą.

A3. Rankiniu būdu įveskite šią „Dispensation Order“.

**AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATA**




15 pav. 464-469 kodonų (1391 [464 kodono], 1397 [466 kodono] ir 1406 [469 kodono]) histograma.

A4. Spustelkite stulpelį „Analysis Parameters“ ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ iki 30.

A5. Įrankių juostoje spustelkite  ir išsaugokite tyrimą kaip „BRAFCodons 464–469“.

## B priedas: Atliekų indo ir lovelių ištuštinimas

<b>DĖMESIO</b> 	<b>Pavojingi chemikalai</b> Su vakuumine darbo vieta naudojamame denatūravimo tirpale yra natrio hidroksido, kuris dirgina akis ir odą. Visada dėvėkite apsauginius akinius, pirštines ir laboratorinį chalata. Atsakingas asmuo (pvz., laboratorijos vadovas) turi imtis reikiamų priemonių ir užtikrinti, kad supanti darbinė aplinka būtų saugi, o instrumento operatoriaus nepakenks pavojingi nuodingų (cheminių ar biologinių) substancijų lygiai, kaip nurodyta atitinkamuose medžiagos saugumo duomenų lapuose (MSDS) arba OSHA*, ACGIH† ar COSHH‡ dokumentuose. Išvėdinti dūmus ir išmesti atliekas reikia laikantis visų nacionalinių, valstybinių ir vietinių sveikatos ir saugumo reikalavimų bei įstatymų.
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

\* OSHA: Profesinio saugumo ir sveikatos administracija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

†ACGIH: Amerikos vyriausybės sveikatos higienistų konferencija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

‡COSHH: Sveikatai pavojingų substancijų kontrolė (Jungtinė Karalystė)

Būtinai laikykitės federalinių, valstybinių ir vietinių aplinkos reikalavimų, nustatytų laboratorinių atliekų išmetimui.

### Svarbus patarimas prieš pradėdant

- Per šį protokolą reikalingas labai švarus vanduo.

### Procedūra

**B1. Įsitikinkite, kad į vakuuminį įrankį netiekiamas vakuumas. Įsitikinkite, kad vakuumas uždarytas (į padėtį Off), o vakuuminė pompa išjungta.**

**B2. Išpilkite loveliuose likusius tirpalus.**

**B3. Išskalaukite lovelius su labai švariu vandeniu arba prireikus pakeiskite juos.**

**B4. Ištuštinkite atliekų indą.**

**Pastaba:** Kamštelį galima nuimti ir neatjungus vamzdelio.

**B5. Jeigu reikia išvalyti vakuuminę darbo vietą (pvz., esant dulkėms ar išsipylusiems likučiams), laikykitės instrukcijų, aprašytų PyroMark Q24 vadove.**

## Užsakymų informacija

Produktas	Turinys	Katalogo Nr.
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	24 reakcijoms su PyroMark Q24 sistemomis: 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, and H <sub>2</sub> O	971470
PyroMark Q24 MDx	Sekos pagrindo aptikimo platforma, skirta Pyrosequencing su 24 lygiagrečiai apdorojamais mėginiais	9001513
PyroMark Q24	Sekos pagrindo aptikimo platforma, skirta Pyrosequencing su 24 lygiagrečiai apdorojamais mėginiais	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumo darbo vieta (220 V), skirta 24 mėginių paruošimui lygiagrečiai iš PGR produkto į vienos vijos šabloną	9001517* 9001515 <sup>†</sup>
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumo darbo vieta (220 V), skirta 24 mėginių paruošimui lygiagrečiai iš PGR produkto į vienos vijos šabloną	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Taikomoji programinė įranga	9019063
PyroMark Q24 Software	Analizės programinė įranga	9019062
<b>Priedai</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 šulinėlių sekvenavimo reakcijos plokštelė	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kasetės nukleotidų ir reagentų paskirstymui	979302

\* Tik Jungtinėje Karalystėje

<sup>†</sup> Kitose šalyse

<b>Produktas</b>	<b>Turinys</b>	<b>Katalogo Nr.</b>
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Daugkartiniai PyroMark Vacuum Workstation Q96 ir Q24 filtravimo produktai	979010
PyroMark Control Oligo	Sistemos instaliavimo patikrai	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Sistemos veikimo patikrai	979304
Related products		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR ruošinių: 50 QIAamp MinElute® Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 ruošiniams: Reagent Cartridges (Tissue), Disposable Filter-Tips, Disposable Tip-Holders, Sample Tubes (2 ml), Elution Tubes (1.5 ml), Buffer G2, Proteinase K	953034

Naujausią licencijavimo informaciją ir su produktais susijusius atsakomybės atsisakymus rasite atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove ar vartotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovus ir vartotojo vadovus rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) arba galite užsisakyti iš QIAGEN techninės pagalbos ar savo vietinio platintojo.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Prekės ženklai: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, theascreen® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag (Florida Scientific Services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation)

#### **Ribotos atsakomybės sutartis**

Šio produkto naudojimas reiškia, kad *therascreen* BRAF Pyro rinkinio pirkėjas ar vartotojas sutinka su šiomis sąlygomis:

1. *therascreen* BRAF Pyro rinkinys gali būti naudojamas tik su *therascreen* BRAF Pyro rinkinio vadovu ir tik su į šį rinkinį įeinančiais komponentais. Turėdami intelektualinę nuosavybę, QIAGEN neleidžia naudoti ar įdiegti į prie šio rinkinio pridedamus komponentus kitų komponentų, kurie neįeina į šį rinkinį, kaip aprašyta *therascreen* BRAF Pyro rinkinio vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. QIAGEN nesuteikia jokios garantijos, kad šis rinkinys ir/ar jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisės, išskyrus aiškiai apibūdintą licenciją.
3. Šis rinkinys ir jo komponentai yra licencijuoti vienkartiniam naudojimui ir jų negalima naudoti pakartotinai, atnaujinti ar perparduoti.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų aiškių ar turimų omenyje licencijų, išskyrus aiškiai apibūdintąsias.
5. Rinkinio pirkėjas ir vartotojas sutinka neatlikti tokių veiksmų, kurie skatintų ar palengvintų aukščiau aprašytus draudžiamus veiksmus, ir neleisti jų atlikti kitiems. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotos atsakomybės sutarties draudimus bet kokiame teisme ir atgauti visas tyrimo bei teismo išlaidas, įskaitant mokesčius teisininkams, priverstinį ribotos atsakomybės sutarties vykdymą ir intelektualinės nuosavybės teises, susijusias su rinkiniu ir/ar jo komponentais.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, visos teisės saugomos.





---

**www.qiagen.com**

**Australija** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austrija** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgija** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazilija** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Kanada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**Kinija** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Danija** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Suomija** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Prancūzija** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Vokietija** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kongas** ■ techservice-hk@qiagen.com

**Indija** ■ techservice-india@qiagen.com

**Airija** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italija** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japonija** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korėja (Pietų)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Liuksemburgas** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Meksika** ■ techservice-mx@qiagen.com

**Nyderlandai** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norvegija** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapūras** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Švedija** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Šveicarija** ■ techservice-ch@qiagen.com

**Jungtinė Karalystė** ■ techservice-uk@qiagen.com

**JAV** ■ techservice-us@qiagen.com

