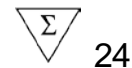


Εγχειρίδιο *therascreen*[®] KRAS Pyro[®] Kit



Έκδοση 1



Για in vitro διαγνωστική χρήση



971460



1061825EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R3

MAT

1061825EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιοδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	5
Αρχή της διαδικασίας	6
Υλικά που παρέχονται	8
Περιεχόμενα του kit	8
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	11
Πληροφορίες για την ασφάλεια	11
Γενικές προφυλάξεις	12
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	13
Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων	14
Διαδικασία	15
Απομόνωση DNA	15
Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24	16
Πρωτόκολλο 2: PCR με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	19
Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance	22
Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24	24
Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24	29
Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24	31
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	35
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου	35
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	39
Έλεγχος ποιότητας	42
Περιορισμοί	42
Χαρακτηριστικά επιδόσεων	43
Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης	43
Γραμμικότητα	45
Ενδιάμεση ακρίβεια	45
Διαγνωστική αξιολόγηση	46

Βιβλιογραφία	47
Σύμβολα	48
Στοιχεία επικοινωνίας	48
Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων <i>therascreen KRAS Pyro</i>	49
Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων	52
Πληροφορίες παραγγελιών	54

Προβλεπόμενη χρήση

Το *therascreen* KRAS Pyro Kit είναι μια *in vitro* εξέταση ανίχνευσης βασισμένη στην αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων, η οποία βασίζεται στην τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού (Pyrosequencing®), για την ποσοτική ανίχνευση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS σε γενωμικό DNA προερχόμενο από δείγματα ανθρώπινου ιστού.

Το *therascreen* KRAS Pyro Kit προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στον εντοπισμό ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο με μεγαλύτερη πιθανότητα να επωφεληθούν από αντι-EGFR αγωγές, όπως με πανιτουμουμάμπη ή κετουξιμάμπη. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Για χρήση μόνο σε συνδυασμό με το σύστημα PyroMark® Q24. Τα συστήματα PyroMark Q24 περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

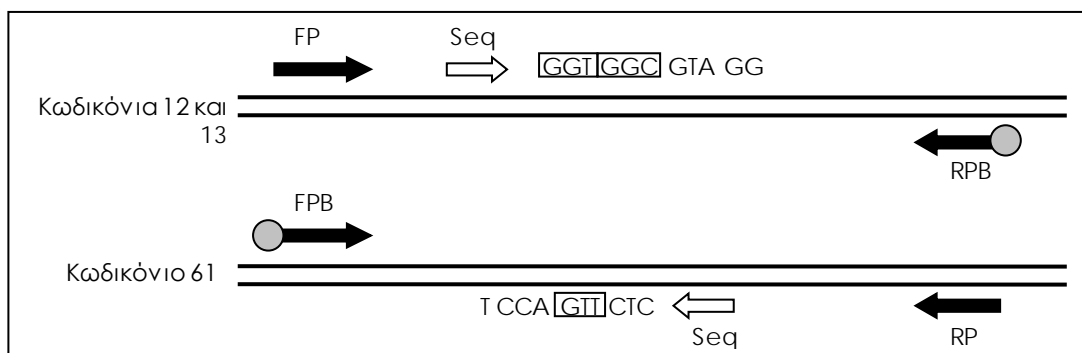
- Το όργανο PyroMark Q24 και το όργανο PyroMark Q24 MDx.
- Τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 και τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 MDx.
- Το λογισμικό PyroMark Q24 (έκδοση 2.0) και το λογισμικό PyroMark Q24 MDx (έκδοση 2.0).

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες χρήστες, όπως τεχνικούς και ιατρούς που έχουν εκπαιδευτεί σε *in vitro* διαγνωστικές διαδικασίες, σε τεχνικές μοριακής βιολογίας και στη χρήση του συστήματος PyroMark Q24.

Σύνοψη και επεξήγηση

Η ανάλυση της μετάλλαξης στο γονίδιο KRAS βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος σε ευρωπαϊκό επίπεδο, λόγω της χορήγησης της υπό αίρεση άδειας κυκλοφορίας από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη πανιτουμουμάμπη και τη κετουξιμάμπη για τη θεραπευτική αντιμετώπιση μεταστατικού καρκίνου του κόλου σε ασθενείς με μη μεταλλαγμένο γονίδιο KRAS άγριου τύπου (wild-type). Αυτό σημαίνει ότι η πανιτουμουμάμπη και η κετουξιμάμπη μπορούν να χορηγούνται μόνο σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε εξέταση ως προς την κατάσταση της μετάλλαξης KRAS.

Το *therascreen* KRAS Pyro Kit που φέρει τη σήμανση CE-IVD προορίζεται για ποσοτικές μετρήσεις των μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS. Το kit περιλαμβάνει δύο αναλύσεις: μία για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 και μια δεύτερη για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 61 (Εικόνα 1). Οι δύο περιοχές ενισχύονται ξεχωριστά με αντίδραση PCR και υποβάλλονται σε αλληλούχιση κατά μήκος ολόκληρης της καθορισμένης περιοχής. Οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις καθορισμένες θέσεις χρησιμοποιούνται ως κορυφές κανονικοποίησης και αναφοράς για την ποσοτικοποίηση και την ποιοτική αξιολόγηση της ανάλυσης.



Εικόνα 1. Απεικόνιση της ανάλυσης του KRAS. Η αλληλουχία που υποδεικνύεται είναι η αναλυθείσα αλληλουχία για ένα δείγμα άγριου τύπου (wild-type). FP και FPB: Πρόσθιοι (Forward) εκκινητές PCR (το B συμβολίζει τη βιοπυλίσωση), RP και RPB: Αντίστροφοι εκκινητές PCR (το B συμβολίζει τη βιοπυλίσωση), Seq: Εκκινητές αλληλούχισης.

Σημείωση: Η αλληλουχία των κωδικονίων 12 και 13 προσδιορίζεται σε πρόσθια κατεύθυνση και του κωδικονίου 61 σε αντίστροφη.

Το προϊόν αποτελείται από μείγμα εκκινητή PCR και εκκινητή αλληλούχισης για κάθε ανάλυση. Οι εκκινητές παρέχονται υπό μορφή διαλύματος. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 24 μl από κάθε εκκινητή ή μείγμα εκκινητών.

Αρχή της διαδικασίας

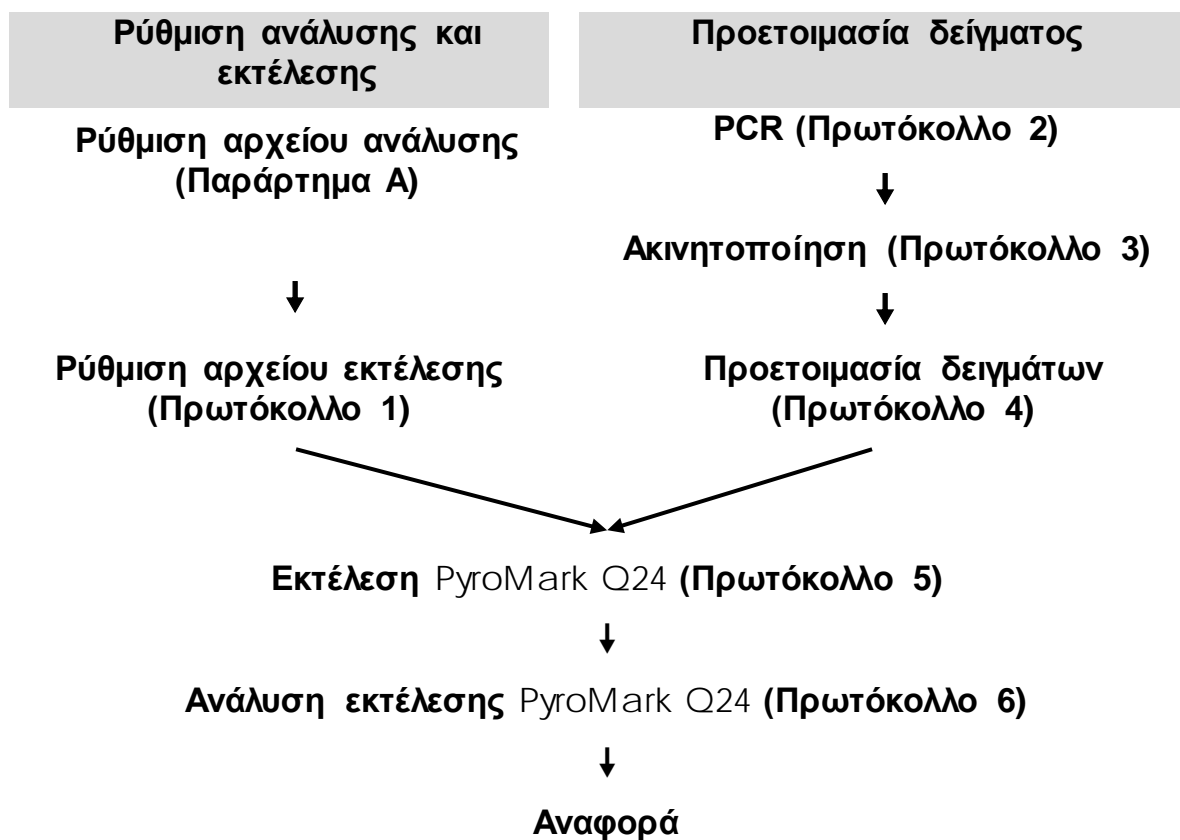
Στη ροή εργασιών απεικονίζεται η διαδικασία της ανάλυσης. Μετά την PCR με τη χρήση εκκινητών για τη στόχευση των κωδικονίων 12/13 και του κωδικονίου 61, τα αμπλικόνα ακινητοποιούνται σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose® High Performance. Παρασκευάζεται μονόκλωνο DNA και οι αντίστοιχοι εκκινητές αλληλούχισης υβριδοποιούνται στο DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα PyroMark Q24 με τη βοήθεια ενός αρχείου ρύθμισης κύκλου και ενός αρχείου κύκλου.

Συνιστάται η χρήση του KRAS Plug-in Report για την ανάλυση της εκτέλεσης. Μπορείτε να προμηθευτείτε το KRAS Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου pyro.plugin@qiagen.com.

Ωστόσο, η ανάλυση της εκτέλεσης είναι εφικτή και με τη χρήση του εργαλείου ανάλυσης που περιλαμβάνεται στο σύστημα PyroMark Q24. Μπορείτε, στη συνέχεια, να ρυθμίσετε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) για την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων μετά την εκτέλεση (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 31).

Σημείωση: Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με το εγχειρίδιο *PyroMark KRAS Kit* και την αναθεώρηση R1 του εγχειριδίου kit *therascreen KRAS Pyro Kit* (βλ. «Πρωτόκολλο 2: PCR με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το *therascreen KRAS Pyro Kit*», σελίδα 19, και «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24», σελίδα 24).

Ροή εργασιών της διαδικασίας theراسcreen KRAS Pyro



Μάρτυρες

Μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου περιλαμβάνεται στο κιτ ως θετικός μάρτυρας για τις αντιδράσεις PCR και αλληλούχισης. Αυτό το δείγμα ελέγχου έχει γονότυπο άγριου τύπου (wild-type) στις θέσεις που αλληλουχούνται με τη χρήση του κιτ αυτού και είναι απαραίτητο για την ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την αναγνώριση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου (βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων», σελίδα 35). Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού.

Πρέπει επίσης να συμπεριλαμβάνεται ένας αρνητικός μάρτυρας (χωρίς μήτρα DNA) για μία τουλάχιστον ανάλυση σε κάθε προετοιμασία PCR.


Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του κιτ

therascreen KRAS Pyro Kit (κουτί 1/2)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
Αρ. καταλόγου	971460
Αριθμός αντιδράσεων	24
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 ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/μl (Μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου)	100 μl

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια *therascreen* (κουτί 2/2)

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια <i>therascreen</i>		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 φιαλίδιο
Substrate Mixture		1 φιαλίδιο
dATP α S		1.180 μ l
dCTP		1.180 μ l
dGTP		1.180 μ l
dTTP		1.180 μ l
Εγχειρίδιο		1

* Περιέχει υδροξείδιο του νατρίου.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (safety data sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε «DNA isolation», σελίδα 15)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα για προετοιμασία PCR)
- Επιπραπέζια μικροφυγόκεντρος*
- Θερμοκυκλοποιητής* και κατάλληλα σωληνάρια PCR
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, αρ. κατ. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001513 ή 9001514)*†
- PyroMark Q24 Software (αρ. κατ. 9019063 ή 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (αρ. κατ. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (αρ. κατ. 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (αρ. κατ. 9001515 ή 9001517)*†
- Αναδευτήρας πλάκας* για ακινητοποίηση σε σφαιρίδια
- Θερμαντικό μπλοκ* με δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασίας 80°C
- Πλάκα PCR 24 βυθισμάτων ή ταινίες PCR
- Πώματα ταινίας
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ή ισοδύναμο)

Σημείωση: Στο κιτ παρέχεται επαρκής ποσότητα νερού για την PCR, την ακινητοποίηση του DNA και τη διάλυση του μείγματος ενζύμων και του μείγματος υποστρώματος. Απαιτείται πρόσθετη ποσότητα νερού υψηλής καθαρότητας για την αραίωση του PyroMark Wash Buffer, 10x.

- Αιθανόλη (70%)‡

* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

† Με σήμανση CE-IMD σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK της ΕΕ. Κανένα από τα υπόλοιπα προϊόντα που παρατίθενται δεν φέρει σήμανση CE-IMD βάσει της οδηγίας 98/79/EK της ΕΕ.

‡ Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη που περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη.

Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας

Οι αναδευτήρες πλάκας που αναφέρονται στον Πίνακα 1 συνιστώνται για χρήση με το *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Πίνακας 1. Αναδευτήρες πλάκας που συνιστώνται για χρήση με το *therascreen* KRAS Pyro Kit

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αριθμός καταλόγου
Eppendorf	Thermomixer comfort (βασική συσκευή)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Πλάκα προσαρμογής για 96 x 0,2 ml σωληνάρια PCR για τοποθέτηση σε μπλοκ για πλάκες μικροπιλοδότησης	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

Πληροφορίες για την ασφάλεια

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS). Διατίθενται στο Διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα SDS για κάθε κιτ της QIAGEN καθώς και για τα περιεχόμενά του.

Οι παρακάτω δηλώσεις επικινδυνότητας και προφυλάξεων αφορούν τα συστατικά του *therascreen* KRAS Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution



Προειδοποίηση! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό ερεθισμό των ματιών. Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Σε περίπτωση διαρροής, απομακρύνετε το διάλυμα που έχει διαρρεύσει, για να αποφύγετε υλικές ζημιές. Να φυλάσσεται πάντα στο αρχικό δοχείο. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

PyroMark Enzyme Mixture



Περιέχει: (R*,R*) Διθειοθρεϊτόλη, οξικό οξύ. Κίνδυνος! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρή βλάβη στα μάτια. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο.

PyroMark Substrate Mixture



Περιέχει: οξικό οξύ. Προειδοποίηση! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό ερεθισμό των ματιών. Εάν ο ερεθισμός των ματιών δεν υποχωρεί: Ζητήστε ιατρική συμβουλή / βοήθεια. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο.

Γενικές προφυλάξεις

Σημείωση: Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει πάντα υπόψη τα εξής.

- Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήστη είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων με τρόπο που δεν προβλέπεται από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς ενδέχεται να προκληθεί υποβάθμιση των επιδόσεων.
- Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς (βλ. «Πρωτόκολλο 2: PCR με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το *therascreen* KRAS Pyro Kit», σελίδα 19, και «Πρωτόκολλο 4:

Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24», σελίδα 24) σε σύγκριση με το εγχειρίδιο *PyroMark KRAS Kit* και την αναθεώρηση R1 του εγχειριδίου *therascreenKRAS Pyro Kit*.

- Τα συστατικά του προϊόντος αυτού επαρκούν για τη διεξαγωγή των 24 αντιδράσεων, σε έως 5 ανεξάρτητες εκτελέσεις.
- Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας με φίλτρα (για προετοιμασία PCR).
- Αποθηκεύετε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δοκίμια, θετικούς μάρτυρες και αμπλικόνια) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Αποψύχετε πλήρως όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη μιας ανάλυσης.
- Αφού αποψυχθούν, αναμείξτε τα συστατικά (αναρροφώντας και διοχετεύοντας επανειλημμένα με πιπέτα ή στροβιλίζοντας παλμικά) και φυγοκεντρήστε για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Τα αποτελέσματα των αποτυχημένων αντιδράσεων δεν αποτελούν σωστή βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το *therascreen KRAS Pyro Kit* παρέχεται σε δύο κουτιά. Το *therascreen KRAS Pyro Kit* (κουτί 1/2) μεταφέρεται σε ξηρό πάγο. Το *PyroMark PCR Master Mix*, το *CoralLoad Concentrate*, το *Unmethylated Control DNA* και όλοι οι εκκινητές πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες από –30 έως –15°C μετά την παραλαβή.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα και τα αντιδραστήρια *therascreen* (κουτί 2/2) που περιέχουν τα ρυθμιστικά διαλύματα *therascreen*, το μείγμα ενζύμων, το μείγμα υποστρώματος και τα αντιδραστήρια dATP α S, dCTP, dGTP και dTTP (δηλ. τα αντιδραστήρια για ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού) αποστέλλονται μαζί με παγοκύστες. Τα συστατικά αυτά πρέπει να αποθηκεύονται στους 2–8°C μετά την παραλαβή. Για να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια δραστηριότητας, συνιστάται η φύλαξη τόσο του μείγματος ενζύμων όσο και του μείγματος υποστρώματος στα παρεχόμενα φιαλίδια.

Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 10 ημέρες στους 2–8°C. Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν στα φιαλίδιά τους στους –30 έως –15°C. Τα κατεψυγμένα αντιδραστήρια δεν πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερους από 3 κύκλους κατάψυξης–απόψυξης.

Σημείωση: Τα νουκλεοτίδια δεν πρέπει να καταψύχονται.

Το *therascreen* KRAS Pyro Kit παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit, όταν αποθηκεύεται υπό αυτές τις συνθήκες.

Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων

Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικά υλικά.

Το υλικό δείγματος είναι ανθρώπινο DNA που εξάγεται από αίμα ή δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (δείγματα FFPE).

Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα από άτομα που υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή με ηπαρίνη. Τα δείγματα αίματος που έχουν συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιέχουν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. Η ηπαρίνη επηρεάζει την PCR.

Διαδικασία

Απομόνωση DNA

Η απόδοση του συστήματος καθορίστηκε με τη βοήθεια του EZ1[®] DNA Tissue Kit και του QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit για την εξαγωγή ανθρώπινου DNA από δείγματα όγκου μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Για το σύστημα του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, η απόδοση καθορίστηκε με τη βοήθεια δειγμάτων αίματος από υγιείς δότες, στα οποία έχουν προστεθεί εν μέρει εξωγενώς κύτταρα όγκου.

Τα κιτ QIAGEN[®] που αναφέρονται στον Πίνακα 2 συστήνονται για τον καθαρισμό DNA από τους υποδεικνυόμενους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων, για χρήση σε συνδυασμό με το *therascreen* KRAS Pyro Kit. Εκτελέστε τον καθαρισμό DNA ακολουθώντας τις οδηγίες που παρατίθενται στα εγχειρίδια των κιτ.

Πίνακας 2. Προτεινόμενα κιτ καθαρισμού DNA για χρήση σε συνδυασμό με το *therascreen* KRAS Pyro Kit

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος	Αριθμός καταλόγου (QIAGEN)
Ιστός εγκλεισμένος σε παραφίνη	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Αίμα	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για χρήση με ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη. Το EZ1 DNA Tissue Kit πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το EZ1 Advanced (αρ. κατ. 9001410 ή 9001411) και την κάρτα EZ1 Advanced Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018298), με το EZ1 Advanced XL (αρ. κατ. 9001492) και την κάρτα EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018700), ή με το BioRobot[®] EZ1 (αρ. κατ. 9000705, δεν κυκλοφορεί πλέον) και την κάρτα EZ1 DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9015862).

† Με σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την οδηγία 98/79/EK της ΕΕ.

Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24


Σημαντική πληροφορία πριν από την έναρξη

- Αν κριθεί απαραίτητο, το όριο τυφλού (LOB) μπορεί να επιβεβαιωθεί με τη χρήση ενός δείγματος φυσικού τύπου για τη δημιουργία μιας πλήρους πλάκας αποτελεσμάτων. Για λεπτομέρειες, ανατρέξτε στην Οδηγία EP17-A του CLSI «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» (Πρωτόκολλο για τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού, εγκεκριμένη οδηγία).

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Εάν δεν έχει εγκατασταθεί το KRAS Plug-in Report, δημιουργήστε μια Assay Setup (Ρύθμιση ανάλυσης) (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 49). Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει μία και μοναδική φορά, πριν από την πρώτη εκτέλεση τη ανάλυσης *therascreen KRAS Pyro*. Εάν έχει εγκατασταθεί το KRAS Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες Assay Setups (Ρυθμίσεις ανάλυσης) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του λογισμικού PyroMark Q24, στη διαδρομή Example Files/PyroMark Setups/KRAS (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/KRAS). Μπορείτε να προμηθευτείτε το KRAS Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου pyro.plugin@qiagen.com.


Διαδικασία

1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων. Δημιουργείται ένα νέο αρχείο εκτέλεσης.
2. Εισαγάγετε τις παραμέτρους της εκτέλεσης (βλ. «Παράμετροι εκτέλεσης», σελίδα 17).
3. Προετοιμάστε την πλάκα προσθέτοντας αναλύσεις για τα κωδικόνια 12/13 και το κωδικόνιο 61 σε βυθίσματα που αντιστοιχούν στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν.

Σημείωση: Πρέπει να περιλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού μάρτυρα (χωρίς μήτρα DNA) για μία τουλάχιστον ανάλυση σε κάθε προετοιμασία PCR.

Σημείωση: Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Μάρτυρες», σελίδα 7).

4. Όταν η ανάλυση έχει ρυθμιστεί και είναι έτοιμη για εκτέλεση στο σύστημα PyroMark Q24, εκτυπώστε μια λίστα με τους απαιτούμενους όγκους μείγματος ενζύμων, μείγματος υποστρώματος και νουκλεοτιδίων, καθώς

και τη διάταξη της πλάκας. Επιλέξτε «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) στο μενού «Tools» (Εργαλεία) και, όταν εμφανιστεί η αναφορά, κάντε κλικ στο .

5. Κλείστε το αρχείο εκτέλεσης και αντιγράψτε το σε ένα USB stick (παρέχεται μαζί με το σύστημα) με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows® Explorer.

Σημείωση: Οι εκτυπωμένες Pre Run Information (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο για την προετοιμασία του δείγματος (βλ. «Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance», σελίδα 22).

Για την ανάλυση της πλάκας στο σύστημα PyroMark Q24, βλ. «Protocol 5: Running the PyroMark Q24», σελίδα 29.

Παράμετροι εκτέλεσης

Run name (Όνομα εκτέλεσης):	Το όνομα της εκτέλεσης παρέχεται κατά την αποθήκευση του αρχείου. Εάν αλλάξετε το όνομα του αρχείου, θα αλλάξει και το όνομα της εκτέλεσης.
Instrument method (Μέθοδος οργάνου):	Επιλέξτε τη μέθοδο οργάνου ανάλογα με το φυσίγγιο που θα χρησιμοποιηθεί στην εκτέλεση. Ανατρέξτε στις οδηγίες που παρέχονται μαζί με τα προϊόντα.
Plate ID (Αναγνωριστικό πλάκας):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε το αναγνωριστικό της πλάκας PyroMark Q24.
Bar code (Γραμμωτός κώδικας):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε τον γραμμωτό κώδικα για την πλάκα ή, αν υπάρχει συνδεδεμένη συσκευή ανάγνωσης γραμμωτού κώδικα στον υπολογιστή σας, τοποθετήστε τον δρομέα του ποντικιού στο πλαίσιο κειμένου «Barcode» (Γραμμωτός κώδικας) (κάνοντας κλικ στο πλαίσιο) και σαρώστε τον γραμμωτό κώδικα.
Kit ID (Αναγνωριστικό kit):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε τον αριθμό παρτίδας για το <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός παρτίδας αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος. Σημείωση: Συνιστάται η εισαγωγή των αναγνωριστικών τόσο του αντιδραστηρίου όσο και του kit, ώστε να είναι δυνατή η ιχνηλάτηση τυχόν μη αναμενόμενων προβλημάτων με τα αντιδραστήρια.

Run note Προαιρετικά: Εισαγάγετε μία σημείωση σχετικά με τα (Σημείωση εκτέλεσης): συστατικά ή τον σκοπό της εκτέλεσης.

Προσθήκη αρχείων ανάλυσης

Για να προσθέσετε μια ανάλυση σε ένα βύθισμα, έχετε δύο δυνατότητες.

- Κάντε δεξί κλικ στο βύθισμα και επιλέξτε «Load Assay» (Φόρτωση ανάλυσης) από το θεματικό μενού.
- Επιλέξτε την ανάλυση στο πρόγραμμα περιήγησης συντομεύσεων και, στη συνέχεια, κάντε κλικ και σύρετε την ανάλυση στο βύθισμα.

Τα βυθίσματα διαθέτουν χρωματική κωδικοποίηση σύμφωνα με την ανάλυση που φορτώνεται σε αυτά.

Εισαγωγή αναγνωριστικών δειγμάτων και σημειώσεων

Για να εισαγάγετε το αναγνωριστικό ενός δείγματος ή μια σημείωση, επιλέξτε το κελί και εισαγάγετε το κείμενο.

Για να επεξεργαστείτε ένα αναγνωριστικό δείγματος ή μια σημείωση, επιλέξτε το κελί (θα επιλεγούν τα τρέχοντα περιεχόμενα) ή κάντε διπλό κλικ στο κελί.

Πρωτόκολλο 2: PCR με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το *therascreen* KRAS Pyro Kit

Το πρωτόκολλο αυτό αφορά τις ενισχύσεις PCR μίας περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12 και το κωδικόνιο 13, και μία ξεχωριστή ενίσχυση PCR μίας περιοχής που περιλαμβάνει το κωδικόνιο 61 με τη βοήθεια του *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σχέση με το εγχειρίδιο kit *PyroMark KRAS* (βήμα 5).
- Η HotStarTaq® DNA πολυμεράση στο *PyroMark* Master Mix χρειάζεται ένα βήμα ενεργοποίησης διάρκειας 15 λεπτών στους 95°C.
- Προετοιμάστε όλα τα μείγματα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο από αυτόν που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό DNA, την προσθήκη μήτρας DNA στην PCR, την ανάλυση προϊόντων PCR ή την προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση της αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού.
- Χρησιμοποιήστε ρύγχη μίας χρήσης που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα για να ελαχιστοποιήσετε την πιθανότητα διασταυρούμενης-επιμόλυνσης.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάρια με τους εκκινητές PCR, φυγοκεντρήστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Ρυθμίστε τη συγκέντρωση του μάρτυρα και του δείγματος DNA στα 0,4–2 ng/μl, εάν χρειάζεται.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια (βλ. Πίνακα 3). Αναμείξτε τα καλά πριν από τη χρήση.
2. Προετοιμάστε ένα μείγμα αντίδρασης για κάθε σετ εκκινητή PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 3.

Το μείγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR, εκτός από το δείγμα.

Προετοιμάστε μεγαλύτερη ποσότητα μείγματος αντίδρασης από αυτήν που απαιτείται για τον συνολικό αριθμό αναλύσεων PCR που πρόκειται να εκτελεστούν.

Πίνακας 3. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης για κάθε μείγμα εκκινητή PCR

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 12/13 ή PCR Primer KRAS 61	1,0
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	4,0
Συνολικός όγκος	20,0

3. Αναμείξτε σχολαστικά το μείγμα αντίδρασης και προσθέστε 20 μl σε κάθε σωληνάριο PCR.

Δεν είναι απαραίτητο να διατηρείτε τα σωληνάρια PCR στον πάγο, καθώς η HotStarTaq DNA πολυμεράση είναι ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προσθέστε 5 μl μήτρας DNA (2–10 ng γενωμικού DNA) στα επιμέρους σωληνάρια PCR (βλ. Πίνακα 4) και αναμείξτε σχολαστικά.

Σημείωση: Πρέπει να περιλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού μάρτυρα (χωρίς μήτρα DNA) για μία τουλάχιστον ανάλυση σε κάθε προετοιμασία PCR.

Σημείωση: Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Μάρτυρες», σελίδα 7).

Πίνακας 4. Προετοιμασία της PCR

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
Μείγμα αντίδρασης	20
Δείγμα DNA	5
Συνολικός όγκος	25

5. Προγραμματίστε τον θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο κυκλοποίησης

			Σχόλια
Αρχικό βήμα ενεργοποίησης:	15 λεπτά	95°C	Η HotStarTaq DNA πολυμεράση ενεργοποιείται σε αυτό το βήμα θέρμανσης.
Κυκλοποίηση 3 βημάτων:			
Αποδιάταξη	20 δευτερόλεπτα	95°C	
Υβριδισμός	30 δευτερόλεπτα	53°C	
Επιμήκυνση	20 δευτερόλεπτα	72°C	
Αριθμός κύκλων	42		
Τελική επιμήκυνση:	5 λεπτά	72°C	

6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια PCR στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης.
7. Μετά την ενίσχυση, προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 3: Ακινητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance», σελίδα 22.

Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορά την ακίνητοποίηση μήτρας DNA σε Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) πριν από την ανάλυση στο σύστημα PyroMark Q24.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Αφήστε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και διαλύματα να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία.

Διαδικασία

1. Ανακινήστε ελαφρώς τη φιάλη που περιέχει Streptavidin Sepharose High Performance μέχρι να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.
2. Παρασκευάστε το κύριο μείγμα για την ακίνητοποίηση του DNA σύμφωνα με τον Πίνακα 6. Παρασκευάστε 10% μεγαλύτερο όγκο μείγματος από αυτόν που απαιτείται για τον συνολικό αριθμό των αντιδράσεων που πρόκειται να εκτελεστούν.

Πίνακας 6. Κύριο μείγμα για ακίνητοποίηση του DNA

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	28
Συνολικός όγκος	70

3. Προσθέστε 70 μl του κύριου μείγματος στα βυθίσματα μιας πλάκας PCR 24 βυθισμάτων ή των ταινιών PCR, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16).
4. Προσθέστε 10 μl βιοτινυλιωμένου προϊόντος PCR από το Πρωτόκολλο 2 σε κάθε βύθισμα που περιέχει κύριο μείγμα, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση κύκλου (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16).

Σημείωση: Ο συνολικός όγκος ανά βύθισμα πρέπει να ανέρχεται σε 80 μl μετά την προσθήκη του κύριου μείγματος και του προϊόντος PCR.

5. Σφραγίστε την πλάκα PCR (ή τις ταινίες) με τα ειδικά πώματα.

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει κίνδυνος διαρροής μεταξύ των βυθισμάτων.

6. Αναδεύστε την πλάκα PCR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για 5–10 λεπτά στις 1.400 σ.α.λ.

Σημείωση: Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, προετοιμάστε τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 για την προετοιμασία δειγμάτων, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24*.

7. Προχωρήστε αμέσως στο «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24 », σελίδα 24.

Σημείωση: Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Η σύλληψη των σφαιριδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την ανάδευση.

Εάν έχει περάσει περισσότερο από 1 λεπτό από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταιμιών), αναδεύστε ξανά για 1 λεπτό πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων.

Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορά στην προετοιμασία μονόκλωνου DNA και στον υβριδισμό του εκκινητή αλληλούχισης με τη μήτρα πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάρια με τους εκκινητές αλληλούχισης, φυγοκεντρήστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσθέστε τους 2 διαφορετικούς εκκινητές αλληλούχισης στο ίδιο μοτίβο που προκαθορίστηκε για την πλάκα κατά τη ρύθμιση κύκλου (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16), ανάλογα με την περιοχή της ανάλυσης (κωδικόνια 12 και 13 ή κωδικόνιο 61)
- Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με την αναθεώρηση R1 του εγχειριδίου του therascreen KRAS Pyro Kit (βήμα 18). Μην ελαττώνετε τον χρόνο ψύξης των δειγμάτων μετά τη θέρμανση στους 80°C.
- Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδειχθεί.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Τοποθετήστε έναν συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμομαντικό μπλοκ που έχει προθερμανθεί στους 80°C, για να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 17. Αφήστε έναν δεύτερο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 18.
- Το PyroMark Wash Buffer παρέχεται υπό μορφή συμπυκνώματος 10x. Πριν από την πρώτη χρήση, αραιώστε το σε διάλυμα εργασίας 1x προσθέτοντας 225 ml νερού υψηλής καθαρότητας σε 25 ml PyroMark Wash Buffer 10x (τελικός όγκος 250 ml).

Σημείωση: Το ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας PyroMark 1x παραμένει σταθερό μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης εφόσον φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2–8°C.

Διαδικασία

1. Αραιώστε επαρκή ποσότητα από κάθε εκκινητή αλληλούχισης, Seq Primer KRAS 12/13 και Seq Primer KRAS 61, στο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού PyroMark, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 7.

Προετοιμάστε μεγαλύτερη ποσότητα αραιωμένου εκκινητή αλληλούχισης από αυτήν που απαιτείται για τον συνολικό αριθμό δειγμάτων που πρόκειται να υποβληθούν σε αλληλούχιση (επαρκή για τον αριθμό των δειγμάτων συν ένα επιπλέον).

Πίνακας 7. Παράδειγμα αραιώσης των εκκινητών αλληλούχισης

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)	Όγκος για 9 + 1 αντιδράσεις (μl)
Seq Primer KRAS 12/13 ή Seq Primer KRAS 61	0,8	8
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Συνολικός όγκος	25	250

2. Προσθέστε 25 μl από τον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχισης σε κάθε βύθισμα της πλάκας PyroMark Q24, σύμφωνα με τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Protocol 1: Run setup for the PyroMark Q24 system», σελίδα 16).

Σημείωση: Διατηρήστε έναν από τους συγκρατητήρες πλάκας PyroMark Q24 (παρέχεται μαζί με τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) και χρησιμοποιήστε τον ως στήριγμα κατά την προετοιμασία και τη μετακίνηση της πλάκας.

3. Τοποθετήστε την πλάκα (ή τις ταινίες) PCR από το Πρωτόκολλο 3 και την πλάκα PyroMark Q24 στον πάγκο εργασίας (Εικόνα 2).

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα έχει τον ίδιο προσανατολισμό όπως και κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.



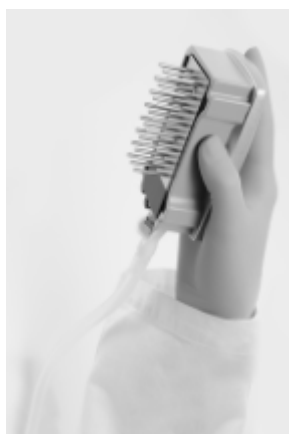
Εικόνα 2. Τοποθέτηση της πλάκας (ή των ταινιών) PCR και της πλάκας PyroMark Q24 στον σταθμό εργασίας υπό κενό.

4. Εφαρμόστε κενό στο εργαλείο ανοίγοντας τον διακόπτη κενού.
5. Βυθίστε προσεκτικά τους δειγματολήπτες με φίλτρο του εργαλείου κενού στην πλάκα (ή τις ταινίες) PCR, για τη συλλογή των σφαιριδίων που περιέχουν την ακινητοποιημένη μήτρα. Κρατήστε τους δειγματολήπτες στη θέση αυτή επί 15 δευτερόλεπτα. Προσέξτε πολύ όταν ανασηκώνετε το εργαλείο κενού.

Σημείωση: Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Η συλλογή των σφαιριδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την ανάδευση.

Εάν έχει περάσει περισσότερο από 1 λεπτό από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταινιών), αναδεύστε ξανά για 1 λεπτό πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων.

6. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 40 ml αιθανόλης 70% (Εικόνα 2). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
7. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 40 ml διαλύματος αποδιάταξης (Εικόνα 2). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Εικόνα 2). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 10 δευτερόλεπτα.
9. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Απεικόνιση του εργαλείου κενού, ανασηκωμένου πέρα από την κατακόρυφο (90°).

10. Για όσο διάστημα το εργαλείο κενού βρίσκεται πάνω από την πλάκα PyroMark Q24, απενεργοποιήστε τον διακόπτη κενού του εργαλείου (Off).
11. Ελευθερώστε τα σφαιρίδια μέσα στην πλάκα PyroMark Q24, χαμηλώνοντας τους δειγματολήπτες με φίλτρο μέσα στον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχισης και μετακινώντας το εργαλείο με απαλές πλευρικές κινήσεις.

Σημείωση: Φροντίστε να μη χαράξετε την επιφάνεια της πλάκας PyroMark Q24 με τους δειγματολήπτες με φίλτρο.

12. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει νερό υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 2) και ανακινήστε το εργαλείο για 10 δευτερόλεπτα.
13. Καθαρίστε τους δειγματολήπτες με φίλτρο βυθίζοντάς τους σε νερό υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 2) και εφαρμόζοντας κενό. Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με 70 ml νερού υψηλής καθαρότητας.
14. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 3).
15. Απενεργοποιήστε τον διακόπτη κενού του εργαλείου (Off) και τοποθετήστε το εργαλείο κενού στη μόνιμη θέση (P).
16. Απενεργοποιήστε την αντλία κενού.

Σημείωση: Στο τέλος της εργάσιμης ημέρας, τα υγρά απόβλητα και τα υπολείμματα διαλυμάτων θα πρέπει να απορριφθούν και ο σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 να ελεγχθεί για τυχόν σκόνη και διαρροές (βλ. Παράρτημα Β, σελίδα 52).

17. Θερμάνετε την πλάκα PyroMark Q24 με τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας τον προθερμασμένο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24.
18. Αφαιρέστε την πλάκα PyroMark Q24 από τον θερμό συγκρατητήρα και τοποθετήστε τη σε έναν δεύτερο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 ο οποίος είχε παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), όπου θα

αφήσετε τα δείγματα να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου επί 10–15 λεπτά.

19. Προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 29.

Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την προετοιμασία και τη φόρτωση των αντιδραστηρίων PyroMark Gold Q24 στο φυσίγγιο PyroMark Q24 και την έναρξη και ολοκλήρωση μιας εκτέλεσης ανάλυσης στο PyroMark Q24. Για λεπτομερή περιγραφή των ενεργειών που απαιτούνται για τη ρύθμιση μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

Σημαντική πληροφορία πριν από την έναρξη

- Η αναφορά Πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, που βρίσκεται στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16), παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους όγκους των νουκλεοτιδίων, των ενζύμων και του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος που απαιτούνται για μια συγκεκριμένη εκτέλεση ανάλυσης.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Ενεργοποιήστε το σύστημα PyroMark Q24. Ο κεντρικός διακόπτης βρίσκεται στην πίσω πλευρά του οργάνου.

Διαδικασία

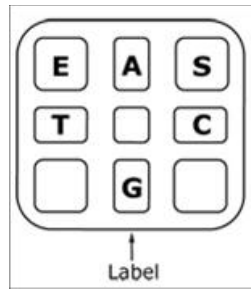
1. **Διαλύστε το καθένα από τα μείγματα λυοφιλιωμένων ενζύμων και υποστρώματος σε 620 μl νερού (H₂O, παρέχεται).**
2. **Αναμείξτε περιστρέφοντας το φιαλίδιο με ήπιες κινήσεις.**
Σημείωση: Μη στροβιλίζετε!

Σημείωση: Για να εξασφαλίσετε ότι το μείγμα θα διαλυθεί πλήρως, αφήστε το σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) επί 5–10 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι το διάλυμα δεν είναι θολό προτού γεμίσετε το φυσίγγιο PyroMark Q24. Αν τα αντιδραστήρια δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αμέσως, τοποθετήστε τα φιαλίδια αντιδραστηρίων σε πάγο* ή σε ψυγείο.

3. **Αφήστε τα αντιδραστήρια και το φυσίγγιο PyroMark Q24 να περιέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20–25°C).**
4. **Τοποθετήστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με την ετικέτα στραμμένη προς το μέρος σας.**
5. **Γεμίστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με τον απαιτούμενο όγκο μειγμάτων νουκλεοτιδίων, ενζύμων και υποστρώματος σύμφωνα με την Εικόνα 4.**

Βεβαιωθείτε ότι δεν μεταφέρονται φουσαλίδες αέρα από την πιπέτα στο φυσίγγιο.

* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (safety data sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.



Εικόνα 4. Απεικόνιση του φυσιγγίου PyroMark Q24 από την επάνω πλευρά. Οι ενδείξεις αντιστοιχούν στην επκέτα στα φιαλίδια των αντιδραστηρίων. Προσθέστε το μείγμα ενζύμων (**E**), το μείγμα υποστρώματος (**S**) και τα νουκλεοτίδια (**A**, **T**, **C**, **G**) σύμφωνα με τις πληροφορίες όγκων που παρέχονται στην αναφορά Πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση ανάλυσης.

6. **Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και εισαγάγετε το γεμάτο φυσίγγιο αντιδραστηρίου με την ετικέτα προς τα έξω. Πιέστε το φυσίγγιο εντελώς προς τα μέσα και, στη συνέχεια, πιέστε το προς τα κάτω.**
7. **Βεβαιωθείτε ότι η γραμμή είναι ορατή μπροστά από το φυσίγγιο και κλείστε το διάφραγμα.**
8. **Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και τοποθετήστε την πλάκα στο θερμαντικό μπλοκ.**
9. **Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.**
10. **Εισαγάγετε το USB stick (που περιέχει το αρχείο εκτέλεσης) στη θύρα USB στο μπροστινό μέρος του οργάνου.**
Σημείωση: Μην αφαιρέσετε το USB stick πριν ολοκληρωθεί η εκτέλεση.
11. **Επιλέξτε «Run» (Εκτέλεση) στο κύριο μενού (χρησιμοποιώντας τα κουμπιά ▲ και ▼ στην οθόνη) και πατήστε «OK».**
12. **Επιλέξτε το αρχείο εκτέλεσης χρησιμοποιώντας τα κουμπιά ▲ και ▼ στην οθόνη.**
Σημείωση: Για να προβάλετε τα περιεχόμενα ενός φακέλου, επιλέξτε τον φάκελο και πατήστε «Select» (Επιλογή). Για να επιστρέψετε στην προηγούμενη προβολή, πατήστε «Back» (Πίσω).
13. **Όταν έχει επιλεγεί το αρχείο κύκλου, πατήστε «Select» (Επιλογή), για να ξεκινήσει η εκτέλεση.**
14. **Όταν ολοκληρωθεί η εκτέλεση και το όργανο επιβεβαιώσει ότι το αρχείο εκτέλεσης έχει αποθηκευτεί στο USB stick, πατήστε «Close» (Κλείσιμο).**
15. **Αφαιρέστε τη μονάδα μνήμης USB.**
16. **Ανοίξτε το κάλυμμα του οργάνου.**
17. **Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και αφαιρέστε το φυσίγγιο αντιδραστηρίων ανασηκώνοντάς το και τραβώντας το προς τα έξω.**
18. **Κλείστε το διάφραγμα.**

19. Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και αφαιρέστε την πλάκα από το θερμαντικό μπλοκ.
20. Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.
21. Απορρίψτε την πλάκα και καθαρίστε το φυσίγγιο σύμφωνα με τις οδηγίες στο δελτίο προϊόντος που συνοδεύει το φυσίγγιο.
22. Αναλύστε την εκτέλεση σύμφωνα με το «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 31.

Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την ανάλυση της μετάλλαξης ενός ολοκληρωμένου κύκλου KRAS με τη βοήθεια του λογισμικού PyroMark Q24.

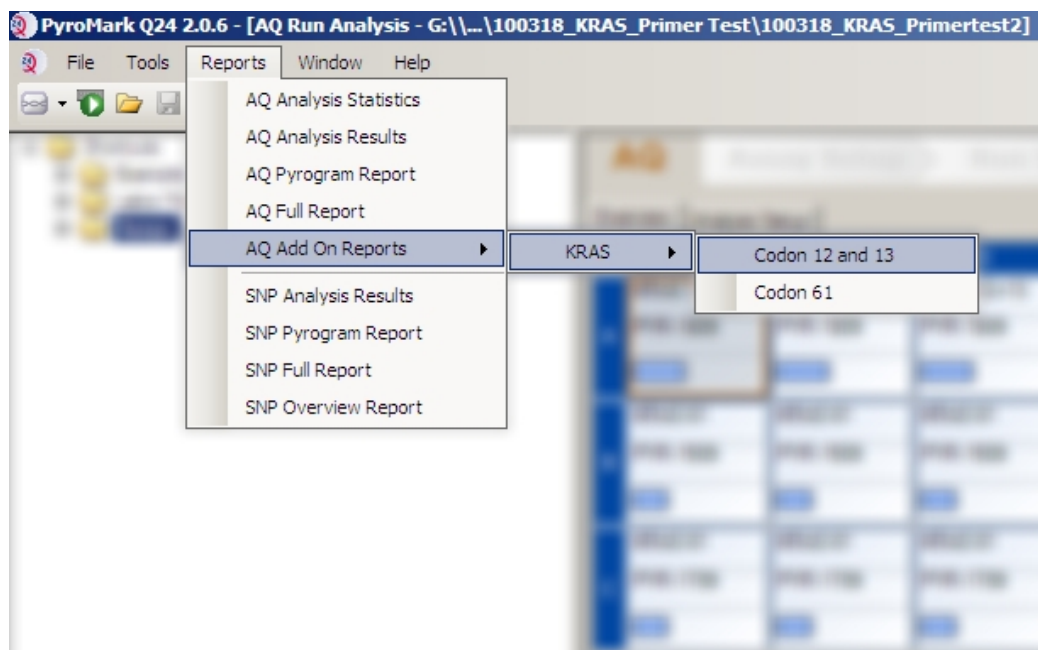
Διαδικασία

1. Εισαγάγετε στη θύρα USB του υπολογιστή το USB stick που περιέχει το αρχείο του διεξαχθέντος κύκλου.
2. Μεταφέρετε το αρχείο εκτέλεσης από το USB stick στην επιθυμητή θέση στον υπολογιστή με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows Explorer.
3. Ανοίξτε το αρχείο εκτέλεσης στον τρόπο λειτουργίας AQ του λογισμικού PyroMark Q24 είτε επιλέγοντας «Open» (Άνοιγμα) στο μενού «File» (Αρχείο) είτε με διπλό κλικ στο αρχείο (📁) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων.
4. Υπάρχουν 2 μέθοδοι ανάλυσης της εκτέλεσης. Εάν χρησιμοποιείτε το KRAS Plug-in Report, προχωρήστε στο βήμα 5. Εάν χρησιμοποιείτε την ανάλυση AQ που περιλαμβάνεται στο σύστημα PyroMark Q24, προχωρήστε στο βήμα 6.

Σημείωση: Συνιστάται έντονα η χρήση του KRAS Plug-in Report για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μπορείτε να προμηθευτείτε το KRAS Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου pyro.plugin@qiagen.com. Η αναφορά αυτή διασφαλίζει ότι έχουν χρησιμοποιηθεί οι αντίστοιχες τιμές LOD (Πίνακας 8) και διαφορετική «Sequences to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση) για την αυτόματη ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων.

5. Χρήση του KRAS Plug-in Report:

Για να δημιουργήσετε μία αναφορά, επιλέξτε «AQ Add On Reports/KRAS» (Πρόσθετες αναφορές AQ/KRAS) και «Codon 12 and 13» (Κωδικόνιο 12 και 13) ή «Codon 61» (Κωδικόνιο 61) από το «Reports» (Αναφορές) στο μενού.



Εικόνα 5. Η οθόνη AQ Run Analysis (Ανάλυση εκτελέσεων AQ).

Τα βυθίσματα θα αναλυθούν αυτόματα για όλες τις μεταλλάξεις για τις οποίες το όριο LOD παρέχεται στον Πίνακα 8. Τα αποτελέσματα θα προβληθούν σε συνοπτικό πίνακα (Εικόνα 6), ακολουθούμενα από τα λεπτομερή αποτελέσματα, στα οποία περιλαμβάνονται τα διαγράμματα αλληλούχισης με πυροφωσφορικό (Pyrogram) και η ποιότητα ανάλυσης.

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.

Εικόνα 6. Θα εμφανιστεί η οθόνη Results Summary (Σύνοψη αποτελεσμάτων).

6. Χρήση της ανάλυσης AQ:

Για να κάνετε ανάλυση της εκτέλεσης και να λάβετε μια επισκόπηση των αποτελεσμάτων, κάντε κλικ σε ένα από τα κουμπιά Analyze (Ανάλυση).



Ανάλυση όλων των βυθισμάτων.



Ανάλυση του επιλεγμένου βυθίσματος.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (συχνότητες αλληλόμορφων) και η ποιοτική αξιολόγηση εμφανίζονται πάνω από τη μεταβλητή θέση στο ίχνος του Pyrogram®. Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24*.

Για να δημιουργήσετε μια αναφορά, επιλέξτε «AQ Full Report» (Πλήρης αναφορά AQ) ή «AQ Analysis Results» (Αποτελέσματα ανάλυσης AQ) στο μενού «Reports» (Αναφορές).

Σημείωση: Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο KRAS εντοπίζονται στο νουκλεοτίδιο 35 (δεύτερη βάση του κωδικόνιου 12). Για τον λόγο αυτό, το τυπικό «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) για την ανάλυση των κωδικόνιων 12 και 13 του KRAS, όπως καθορίζεται στη Analysis Setup (Ρύθμιση ανάλυσης), αφορά μεταλλάξεις στη θέση αυτή (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 49). Αν ένα δείγμα περιέχει μία μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 34 (πρώτη βάση του κωδικόνιου 12) το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να τροποποιηθεί προκειμένου να αναλυθεί και η κατάσταση μετάλλαξης στη θέση αυτή, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα A. Παρομοίως, το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να τροποποιηθεί για την ανάλυση του κωδικόνιου 61 του KRAS, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα A.

Ενημερωμένες αλληλουχίες μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονίδιο KRAS στα κωδικόνια 12/13 και το κωδικόνιο 61 παρέχονται στο διαδίκτυο από το Ινστιτούτο Sanger, στη διεύθυνση www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Σημείωση: Για αξιόπιστα αποτελέσματα, συνιστώνται ύψη μονής κορυφής άνω των 30 RLU. Ρυθμίστε την τιμή 30 RLU ως «required peak height for passed quality» (απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα) στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. Παράρτημα A και *Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24*).

Σημείωση: Η αναφορά αποτελεσμάτων ανάλυσης AQ (AQ Analysis Results) πρέπει να χρησιμοποιείται για την τεκμηρίωση και την ερμηνεία της ποσοτικοποίησης αλληλόμορφων. Οι αριθμοί που φαίνονται στο Pyrogram είναι στρογγυλοποιημένοι και δεν αντιπροσωπεύουν με ακρίβεια την ποσοτικοποίηση.

Σημείωση: Το Pyrogram θα πρέπει να αντιπαραβάλλεται πάντοτε με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Οι μετρηθείσες κορυφές πρέπει να συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος.

Επαναληπτική ανάλυση δειγμάτων χωρίς ανίχνευση μετάλλαξης στο νουκλεοτίδιο 35 (κωδικόνιο 12) ή 183 (κωδικόνιο 61) ή με ποιοτική αξιολόγηση «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Απέτυχε).

Συνιστάται έντονα η επαναληπτική ανάλυση όλων των δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη με το τυπικό «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) καθώς και των δειγμάτων που κατά την ποιοτική αξιολόγηση έλαβαν το αποτέλεσμα «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Απέτυχε). Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Απέτυχε) είναι πιθανό να υποδεικνύουν την παρουσία μετάλλαξης σε διαφορετική θέση από το νουκλεοτίδιο 35 ή 183, με αποτέλεσμα την απόκλιση του ύψους κορυφής σε προσθήκες νουκλεοτιδίων αναφοράς. Για παράδειγμα, μία κορυφή σε οποιαδήποτε από τις πρώτες 3 προσθήκες νουκλεοτιδίων υποδεικνύει την παρουσία μετάλλαξης στο νουκλεοτίδιο 34.

Για την επαναληπτική ανάλυση και τη στόχευση μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 34, μεταβείτε στο «Analysis Setup» (Ρύθμιση ανάλυσης) και αλλάξτε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) από *GNTGRCGTAGGC* σε *NGTGRCGTAGGC*. Κάντε κλικ στο «Apply» (Εφαρμογή) και, στη συνέχεια, στο «To All» (Σε όλα) όταν εμφανιστεί το παράθυρο «Apply Analysis Setup» (Εφαρμογή ρύθμισης ανάλυσης).

Για την επαναληπτική ανάλυση και τη στόχευση μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 182 (δεύτερη θέση του κωδικόνιου 61), αλλάξτε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) της ανάλυσης του κωδικόνιου 61 με αυτήν που αναφέρεται ακολούθως.

CTCTHGACCTG

Για την επαναληπτική ανάλυση και τη στόχευση μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 181 (πρώτη θέση του κωδικόνιου 61), αλλάξτε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) της ανάλυσης του κωδικόνιου 61 με αυτήν που αναφέρεται ακολούθως.

CTCTTSACCTG

Σημείωση: Αφού αλλάξετε την παράμετρο «Sequence to Analyze», βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU.

Σημείωση: Εάν οι μετρηθείσες κορυφές δεν αντιστοιχούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν μπορούν να εξηγηθούν από σπάνιες ή μη αναμενόμενες μεταλλάξεις, τότε το αποτέλεσμα της ανάλυσης δεν αποτελεί βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης. Συνιστάται η επαναληπτική ανάλυση του δείγματος.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου

Συνιστάται ιδιαίτερα να συμπεριλαμβάνεται μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου σε κάθε εκτέλεση αλληλούχισης, για σκοπούς σύγκρισης και ως μάρτυρας των επιπέδων υποβάθρου. Η μετρούμενη συχνότητα του δείγματος ελέγχου θα πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από το όριο τυφλού (LOB).

Όλα τα δείγματα πρέπει να εξετάζονται σε σχέση με το όριο ανίχνευσης (LOD, βλ. Πίνακα 8) και να ερμηνεύονται ως εξής.

- Συχνότητα μετάλλαξης < LOD: Άγριος τύπος
- Συχνότητα μετάλλαξης \geq LOD και \leq LOD + 3 ποσοστιαίες μονάδες: Πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου
Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείτε το Plug-in Report (βλ. βήμα 5 στο «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 31) και προκύψει αυτό, θα εμφανιστεί μια προειδοποίηση.

Τα δείγματα με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου θα πρέπει να θεωρούνται θετικά για τη μετάλλαξη αυτή μόνον εάν αυτό επιβεβαιωθεί με επανάληψη της αλληλούχισης εις διπλούν, μαζί με δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου. Το αποτέλεσμα και των δύο επαναλήψεων θα πρέπει να είναι \geq LOD και να διαφέρει από το αποτέλεσμα του δείγματος ελέγχου. Διαφορετικά, το δείγμα θα πρέπει να θεωρηθεί ως άγριου τύπου.

- Συχνότητα μετάλλαξης > LOD + 3 ποσοστιαίες μονάδες: Μετάλλαξη

Αν χρησιμοποιείτε το KRAS Plug-in Report, η σύγκριση αυτή πραγματοποιείται αυτόματα.

Σημείωση: Συνιστάται η χρήση του KRAS Plug-in Report για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τη λεπτομερέστερη εξέταση των δειγμάτων με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου, καλό είναι να αναλύεται το δείγμα και μη αυτόματα, μέσω του λογισμικού της εφαρμογής (π.χ. για σύγκριση με τη συχνότητα μετάλλαξης του δείγματος ελέγχου).

Σημείωση: Εάν μετρηθεί συχνότητα μεγαλύτερη από το LOB στο δείγμα ελέγχου, τότε το επίπεδο του υποβάθρου στην αντίστοιχη εκτέλεση αλληλούχισης είναι υψηλότερο από το συνηθισμένο και άρα ενδέχεται να επηρεαστεί η ποσοτική εκτίμηση των αλληλόμορφων, ιδίως για μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου. Σε αυτή την περίπτωση, οι μετρηθείσες συχνότητες μεταξύ του LOD (Πίνακας 8) και του LOD + 3 ποσοστιαίες μονάδες δεν αποτελούν βάση για την αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης. Καλό είναι να επαναλαμβάνεται η αλληλούχιση των δειγμάτων με πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου.

Σημείωση: Ο αλγόριθμος του KRAS Plug-in Report χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των δεδομένων LOB και LOD. Η μη αυτόματη ανάλυση με χρήση του λογισμικού της εφαρμογής PyroMark, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο 6 (σελίδα 31) μπορεί να δώσει ελαφρώς διαφορετικές τιμές.

Σημείωση: Η απόφαση θεραπευτικής αγωγής για καρκινοπαθείς ασθενείς δεν πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στην κατάσταση μετάλλαξης του KRAS.

Πίνακας 8. Όρια LOB και LOD που καθορίστηκαν για συγκεκριμένες μεταλλάξεις

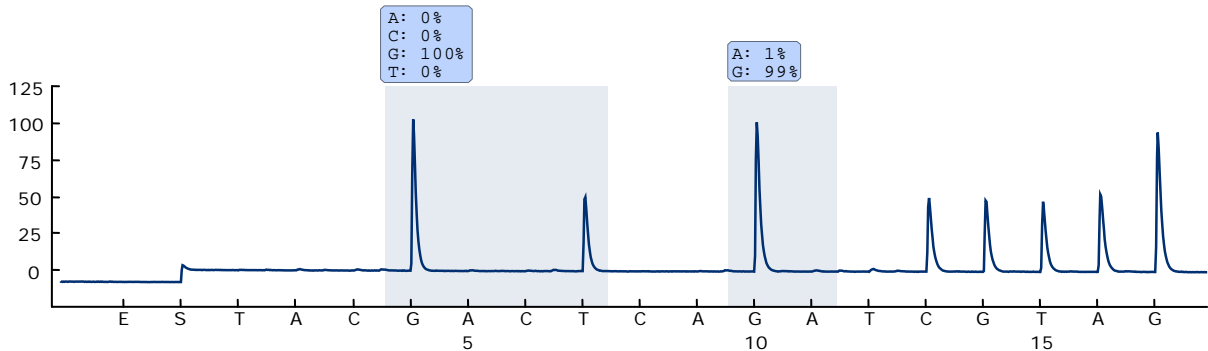
Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V42)
Κωδικόνιο 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Κωδικόνιο 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Κωδικόνιο 61 (CAA), όπως αναλύθηκε με αντίστροφο προσανατολισμό (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* Από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) που είναι διαθέσιμος στο διαδίκτυο, στην ιστοσελίδα του Ινστιτούτου Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

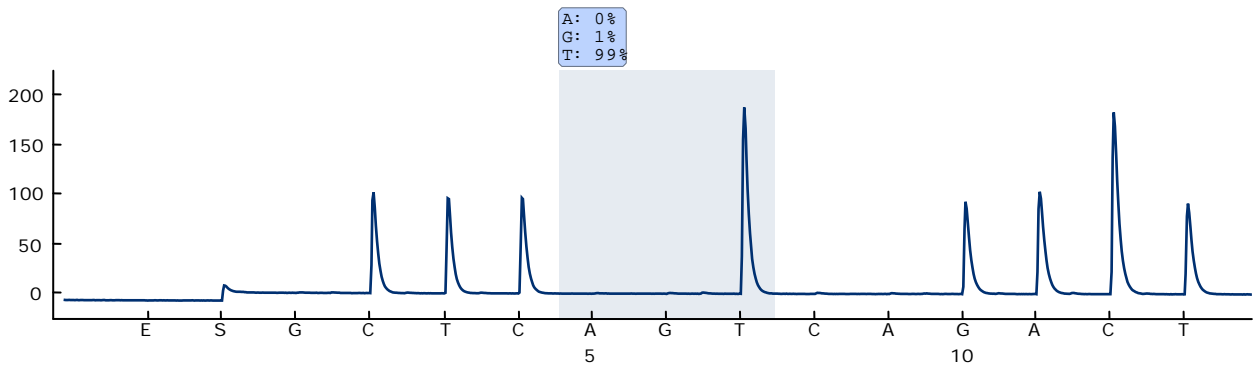
[†] Το χαμηλότερο επίπεδο μετάλλαξης σε ένα δείγμα που οδηγεί σε μέτρηση συχνότητας \geq LOD.

Ενδεικτικά αποτελέσματα με τη χρήση της ενσωματωμένης στο σύστημα PyroMark Q24 ανάλυσης AQ

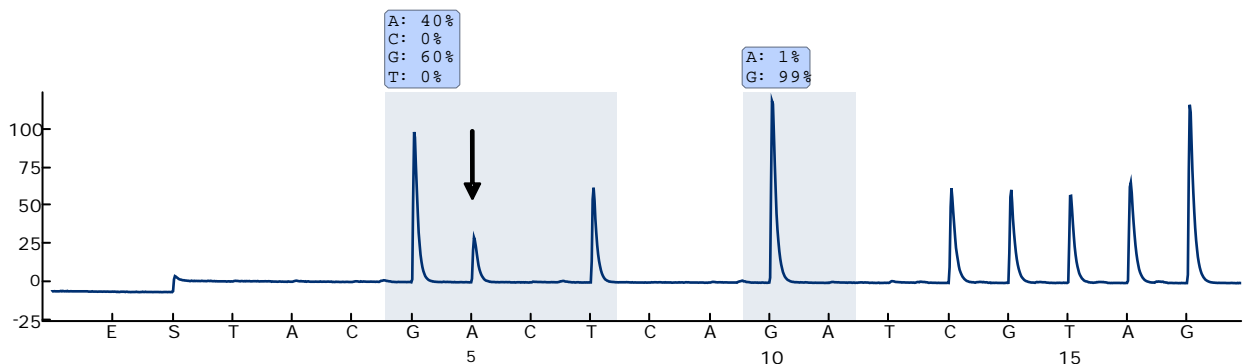
Ενδεικτικά αποτελέσματα Pyrogram παρουσιάζονται στις Εικόνες 7–11.



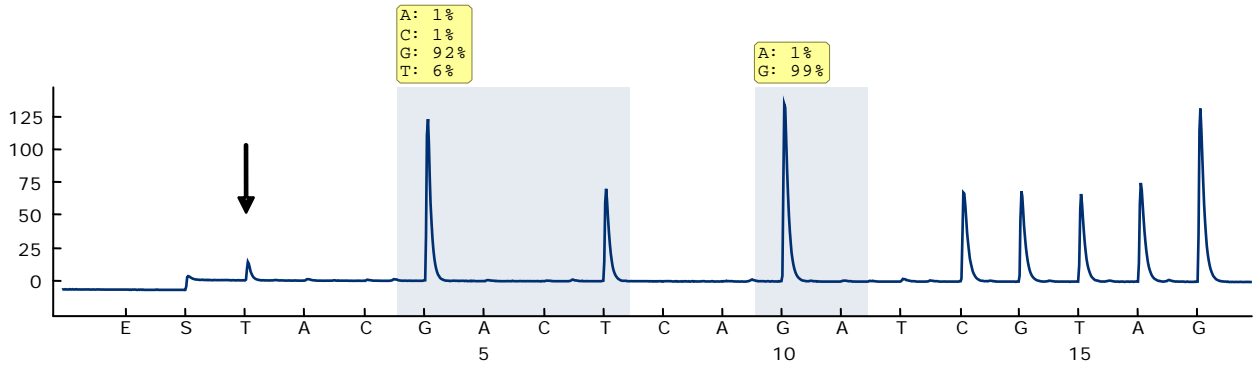
Εικόνα 7. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου στα κωδικόνια 12 και 13.



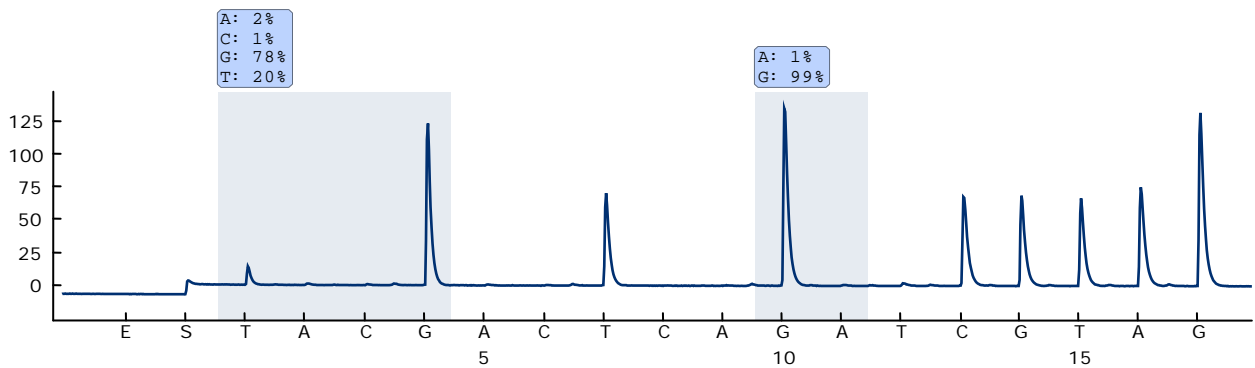
Εικόνα 8. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου στο κωδικόνιο 61.



Εικόνα 9. Ήχος Pyrogram που προέκυψε από την ανάλυση δειγμάτων με μετάλλαξη GGT → GAT στη βάση 2 του κωδικόνιου 12 (νουκλεοτίδιο 35, επισημαίνεται με βέλος).



Εικόνα 10. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει μετά την ανάλυση δειγμάτων με μετάλλαξη **GGT → TGT** στη βάση 1 του κωδικόνιου 12 (νουκλεοτίδιο 34, επισημαίνεται με βέλος) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **GNTGRCGTAGGC** με στόχευση της βάσης 2 στο κωδικόνιο 12 (νουκλεοτίδιο 35). Το κίτρινο χρώμα υποδεικνύει ότι η αλληλουχία αυτή είναι μη αναμενόμενη και πρέπει να ελεγχθεί.



Εικόνα 11. Ίχνος Pyrogram και αποτέλεσμα που προκύπτει μετά από επαναληπτική ανάλυση του δείγματος στην Εικόνα 10. Η μετάλλαξη **GGT → TGT** υποβλήθηκε σε επαναληπτική ανάλυση με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **NGTGRCGTAGGC** με στόχευση της βάσης 1 στο κωδικόνιο 12 (νουκλεοτίδιο 34).

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com).

Σημείωση: Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* για γενικές οδηγίες αντιμετώπισης προβλημάτων του οργάνου.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Σήματα στο δείγμα ελέγχου χωρίς μήτρα (αρνητικός μάρτυρας)

- | | |
|-------------------------------------|--|
| α) Παρεμβολές μεταξύ των βυθισμάτων | Το σήμα ενός βυθίσματος ανιχνεύεται σε παρακείμενο βύθισμα. Αποφύγετε την τοποθέτηση δειγμάτων με σήμα υψηλής έντασης δίπλα στα βυθίσματα δειγμάτων ελέγχου χωρίς μήτρα. |
| β) Μόλυνση της αντίδρασης PCR | Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο. Αποθηκεύετε και εξάγετε τα υλικά, όπως δοκίμια, μάρτυρες και αμπλικόνια, ξεχωριστά από τα αντιδραστήρια PCR. |

Αλληλουχία χαμηλής ποιότητας ή μη αναμενόμενη αλληλουχία

- | | |
|-----------------------------------|---|
| α) χαμηλής ποιότητας γενωμικό DNA | Η χαμηλή ποιότητα του γενωμικού DNA μπορεί να προκαλέσει αποτυχία της PCR. Αναλύστε τα δείγματα PCR με μια ηλεκτροφορητική τεχνική (π.χ. το QIAxcel [®] System ή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης). |
|-----------------------------------|---|

Αποτέλεσμα «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία)

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- α) Χαμηλό ύψος κορυφής Τυχόν σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την αλληλούχιση μέσω πυροφωσφορικού είναι πιθανό να οδηγήσουν σε χαμηλές τιμές κορυφής. Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδειχθεί.
- Εάν εμφανιστεί προειδοποίηση «Check» (Έλεγχος), συγκρίνετε προσεκτικά το Pyrogram με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να εμφανίσετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος, το αποτέλεσμα είναι έγκυρο. Διαφορετικά, συνιστάται η επαναληπτική αλληλούχιση του δείγματος.
- β) Η μετάλλαξη δεν ορίζεται στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) Προσαρμόστε την αλληλουχία προς ανάλυση στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 49) και επαναλάβετε την ανάλυση της εκτέλεσης.
- γ) Μη αναμενόμενη σπάνια μετάλλαξη Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία) μπορεί να οφείλονται σε μη αναμενόμενο μοτίβο κορυφών. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία μίας μη αναμενόμενης μετάλλαξης, η οποία δεν αναλύεται από την αναφορά plug-in. Τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αναλυθούν μη αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού PyroMark Q24 και λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία μη αναμενόμενων μεταλλάξεων.
- δ) Προειδοποίηση μεγάλης απόκλισης ύψους κορυφής για κάποια προσθήκη αντιδραστηρίων Το Pyrogram θα πρέπει να ανιπαραβάλλεται προσεκτικά με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές δεν συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν εξηγούνται από σπάνιες μεταλλάξεις, συνιστάται η επαναληπτική αλληλούχιση του δείγματος.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Υψηλό υπόβαθρο

- α) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης των νουκλεοτιδίων
Φυλάσσετε τα νουκλεοτίδια σε θερμοκρασία 2–8°C. Η αποθήκευση σε θερμοκρασία –15 έως –30°C μπορεί να προκαλέσει αύξηση του υποβάθρου.
- β) Σύντομος χρόνος ψύξης των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού
Αφήστε τα δείγματα σε έναν συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου επί 10–15 λεπτά. Μη συντομεύετε τον χρόνο ψύξης.
- γ) Μόλυνση του φυσιγγίου
Καθαρίστε προσεκτικά το φυσίγγιο όπως περιγράφεται στο δελτίο του προϊόντος. Φυλάξτε το φυσίγγιο σε θέση προστατευμένη από το φως και τη σκόνη.

Απουσία σημάτων στον θετικό μάρτυρα (μη μεθυλωμένο DNA ελέγχου)

- α) Ανεπαρκής ποσότητα μείγματος ενζύμων ή υποστρώματος για όλα τα βυθίσματα
Βεβαιωθείτε ότι η πλήρωση του φυσιγγίου PyroMark Q24 εκτελείται σύμφωνα με το «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν την εκτέλεση) στο μενού «Tools» (Εργαλεία).
- β) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης ή αραίωσης των αντιδραστηρίων
Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια PyroMark Q24 Gold σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται μαζί με τα αντιδραστήρια.
- γ) Ανεπαρκής ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης
Η HotStarTaq DNA πολυμεράση στο PyroMark PCR Master Mix χρειάζεται ένα βήμα ενεργοποίησης διάρκειας 15 λεπτών στους 95°C.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- δ) Αποτυχία προετοιμασίας της PCR ή των δειγμάτων
- Τα σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR, τον προγραμματισμό του θερμοκυκλοποιητή ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού ενδέχεται να οδηγήσουν σε απουσία σήματος. Να εκτελείτε τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο όπως περιγράφεται στο *εγχειρίδιο χρήσης PyroMark Q24* και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται. Επαναλάβετε την PCR και την ανάλυση αλληλούχισης μέσω πυροφωσφορικού.

Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *therascreen KRAS Pyro Kit* ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση της σταθερής ποιότητας των προϊόντων.

Περιορισμοί

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επικυρώνει την απόδοση του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες απόδοσης της QIAGEN.

Χαρακτηριστικά επιδόσεων

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το όριο τυφλού (LOB) και το όριο ανίχνευσης (LOD) έχουν καθοριστεί για διάφορες μεταλλάξεις με τη χρήση μειγμάτων πλασμιδίων (Πίνακας 9). Ο καθορισμός των ορίων LOB και LOD πραγματοποιήθηκε βάσει των συστάσεων της Οδηγίας EP17-A «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation, approved guideline» (Πρωτόκολλο για τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού, εγκεκριμένη οδηγία) του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI). Τα σφάλματα α και β (ψευδώς θετικό και ψευδώς αρνητικό αντίστοιχα) καθορίστηκαν στο 5%.

Οι τιμές LOB αντιπροσωπεύουν τη μετρηθείσα συχνότητα που προέκυψε από ένα δείγμα άγριου τύπου. Οι τιμές LOD αντιπροσωπεύουν το ελάχιστο σήμα (μετρηθείσα συχνότητα) που μπορεί να θεωρηθεί θετικό για την αντίστοιχη μετάλλαξη.

Η μετάλλαξη GGT → GTT στο κωδικόνιο 12

Για τη μετάλλαξη αυτή, οι μετρήσεις τυφλού ήταν διαρκώς κοντά στις 0 ποσοστιαίες μονάδες ($n=72$), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη κανονικής (κατά Gauss) κατανομής. Κατά συνέπεια, η τιμή LOD προσδιορίστηκε με διαφορετική μέθοδο, σύμφωνα με τις συστάσεις της κατευθυντήριας οδηγίας EP17-A του CLSI. Το χαμηλότερο σήμα που υποδεικνύει την παρουσία μετάλλαξης (LOD) στη θέση αυτή καθορίστηκε σε 1 ποσοστιαία μονάδα, τιμή που βρίσκεται σαφώς πιο πάνω από το σταθερό επίπεδο γραμμής αναφοράς (LOB) των 0 ποσοστιαίων μονάδων. Κατά την ανάλυση ενός δείγματος με επίπεδο μετάλλαξης 7%, από το 95% των αποτελεσμάτων ($n = 89$) ελήφθη ένα σήμα που μπορεί να εκληφθεί ως θετικό ($\geq LOD$, δηλ. ≥ 1 ποσοστιαία μονάδα).

Πίνακας 9. Όρια LOB και LOD που καθορίστηκαν για συγκεκριμένες μεταλλάξεις

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V42)
Κωδικόνιο 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Κωδικόνιο 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Κωδικόνιο 61 (CAA), όπως αναλύθηκε με αντίστροφο προσανατολισμό (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* Από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) που είναι διαθέσιμος στο διαδίκτυο, στην ιστοσελίδα του Ινστιτούτου Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Το χαμηλότερο επίπεδο μετάλλαξης σε ένα δείγμα που οδηγεί σε μέτρηση συχνότητας \geq LOD.

Σημείωση: Αυτές οι τιμές βασίζονται σε κύκλους ανάλυσης στους οποίους μείγματα πλασμιδίων, που έφεραν αλληλουχία άγριου τύπου ή μεταλλαγμένη αλληλουχία, χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την ενίσχυση με PCR.

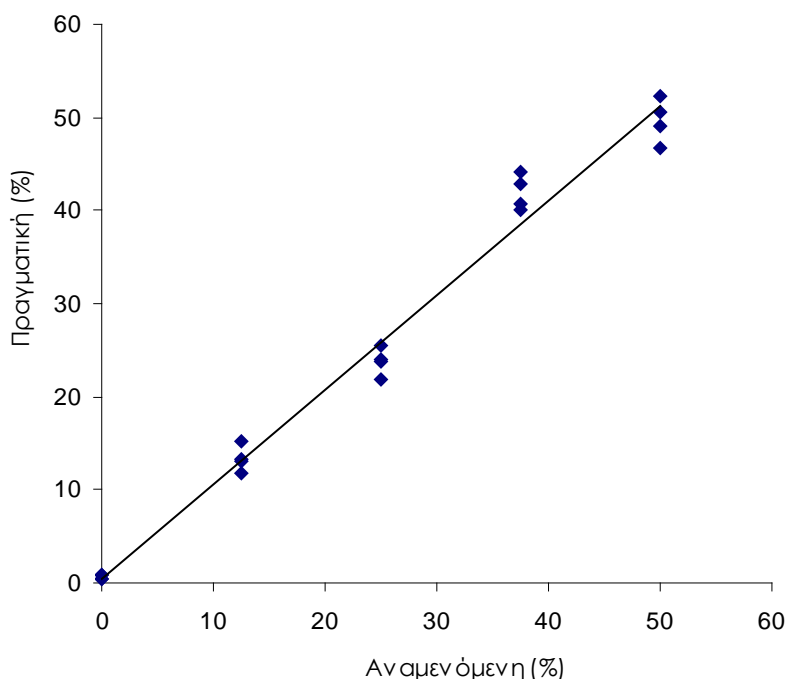
Σημείωση: Ο αλγόριθμος του KRAS Plug-in Report χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των δεδομένων LOB και LOD. Η μη αυτόματη ανάλυση με χρήση του λογισμικού εφαρμογής PyroMark Q24, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο 6 (σελίδα 31) μπορεί να δώσει ελαφρώς διαφορετικές τιμές.

Σημείωση: Συνιστάται η εργαστηριακή επαλήθευση της απόδοσης της μεθόδου.

Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα μετρήθηκε σύμφωνα με την οδηγία EP6-A του CLSI «Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline» (Αξιολόγηση της γραμμικότητας των διαδικασιών ποσοτικής μέτρησης: μια στατιστική προσέγγιση – εγκεκριμένη οδηγία).

Πλασμίδια με αλληλουχίες άγριου τύπου και μεταλλαγμένες αλληλουχίες αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δώσουν τα παρακάτω επίπεδα μετάλλαξης: 0, 12,5, 25, 37,5 και 50%. Τέσσερα αντίγραφα των μειγμάτων τοποθετήθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε μία πλάκα και αναλύθηκαν. Τα αποτελέσματα για τη μετάλλαξη GGT → TGT στο κωδικόνιο 12 αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Analyse-it® v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) και παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12. Γραμμικότητα της μετάλλαξης GGT → TGT στο κωδικόνιο 12.

Η συνολική επαναληψιμότητα ανήλθε σε 1,64 ποσοστιαίες μονάδες και τα αποτελέσματα ήταν γραμμικά εντός ενός επιτρεπόμενου εύρους μη γραμμικότητας της τάξης των 3 ποσοστιαίων μονάδων. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν για τη μετάλλαξη GGC → GAC στο κωδικόνιο 13.

Ενδιάμεση ακρίβεια

Ο προσδιορισμός της γραμμικότητας της μετάλλαξης GGT → TGT στο κωδικόνιο 12 επαναλήφθηκε από 3 χειριστές σε 3 διαφορετικές ημέρες με τη χρήση διαφορετικών συνδυασμών οργάνων PyroMark Q24 και ανιδραστηρίων. Τα αποτελέσματα των 3 αναλύσεων παρατίθενται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Ενδιάμεση ακρίβεια*

% μεταλλαγμένου πλασμιδίου†	Ανάλυση 1		Ανάλυση 2		Ανάλυση 3		Σύνοψη	
	Μέσος όρος	SD	Μέσος όρος	SD	Μέσος όρος	SD	Μέσος όρος	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

Όλες οι τιμές παρέχονται σε ποσοστιαίες μονάδες. SD: standard deviation (τυπική απόκλιση).

† Με βάση τη μέτρηση OD₂₆₀.

Οι τιμές ενδιάμεσης ακρίβειας (SD) κυμάνθηκαν ως εκ τούτου μεταξύ 0,6–2,0 ποσοστιαίων μονάδων στο ελεγχόμενο εύρος του επιπέδου μετάλλαξης 0–50%.

Διαγνωστική αξιολόγηση

Το *therascreen* KRAS Pyro Kit αξιολογήθηκε σε σύγκριση με το kit DxS KRAS Mutation. DNA εξάχθηκε από 100 μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) δείγματα όγκου με πιθανή εξέλιξη σε ορθοκολικό καρκίνο και αναλύθηκε για την παρουσία μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13.

DNA για εξέταση απομονώθηκε με τη βοήθεια του kit EZ1® DNA Tissue και η ανάλυση εκτελέστηκε με το *therascreen* KRAS Pyro Kit στο PyroMark Q24 και με το DxS KRAS Mutation Kit στο ABI PRISM® 7900HT SDS.

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν, η κατάσταση μετάλλαξης στάθηκε δυνατόν να προσδιοριστεί σε 91 δείγματα με το kit DxS KRAS Mutation. Με το *therascreen* KRAS Pyro Kit ήταν δυνατό να καθοριστεί η κατάσταση μετάλλαξης για 94 δείγματα.

Με εξαίρεση τα δείγματα που απέτυχαν με ένα ή και με τα δύο kit, παρατηρήθηκε συμφωνία 100% στα αποτελέσματα μεταξύ του *therascreen* KRAS Pyro Kit και του DxS KRAS Mutation Kit.

Η διαγνωστική ευαισθησία του *therascreen* KRAS Pyro Kit ανήλθε σε 100% και η διαγνωστική ειδικότητα σε 100% (, Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Αποτελέσματα αναλυθέντων δειγμάτων όγκων με πιθανή εξέλιξη σε ορθοκολικό καρκίνο για τα κωδικόνια 12 και 13

		DxS KRAS Mutation Kit			Σύνολο
		Μεταλλαγμένο	Άγριος τύπος	Άγνωστο	
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	33	0	1	34
	Άγριος τύπος	0	57	3	60
	Άγνωστο	0	1	5	6
	Σύνολο	33	58	9	100

Ανάλυση κωδικόνιου 61

Τα ίδια 100 δείγματα αναλύθηκαν για μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 με τη βοήθεια του *therascreen* KRAS Pyro Kit. Μόνο σε ένα δείγμα η ποιοτική αξιολόγηση για την ανάλυση του κωδικόνιου 61 ήταν ανεπιτυχής. Το συγκεκριμένο δείγμα απέτυχε επίσης στην ανάλυση του *therascreen* KRAS Pyro Kit και του DxS για τα κωδικόνια 12 και 13, γεγονός που υποδηλώνει ότι το DNA ήταν υπερβολικά χαμηλής ποιότητας. Το υψηλότερο ποσοστό επιτυχίας για την ανάλυση του κωδικόνιου 61 υποδηλώνει ότι εξαρτάται λιγότερο από την ποιότητα του DNA από ό,τι και οι αναλύσεις *therascreen* KRAS Pyro Kit και DxS για τα κωδικόνια 12 και 13. Δεδομένου ότι η ανάλυση DxS δεν εξετάζει την παρουσία μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 61, δεν είναι εφικτή η άμεση σύγκριση των αναλύσεων.

Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 ανιχνεύθηκαν σε 4 από τα 99 δείγματα. Τρία από αυτά περιείχαν συχνές μεταλλάξεις (CAC, CAT, CTA) στο κωδικόνιο 61, ενώ το τέταρτο δείγμα περιείχε μεταλλάξεις τόσο στο κωδικόνιο 60 (GGT→GGA) όσο και στο κωδικόνιο 61 (CAA→AAA).

Σημείωση: Σε όλες τις εκτελέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης, το σήμα ήταν πάνω από 60 RLU, όπως κατά κανόνα προκύπτει από 10 ng DNA που απομονώθηκε από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE).

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί στο Διαδίκτυο μια μεγάλη, ενημερωμένη βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε, είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού είτε ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κ.λπ.

Για έναν πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στη

διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Σύμβολα



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις

<N>



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



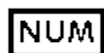
Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιεχόμενα



Αριθμός



Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Στοιχεία επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support ή επικοινωνήστε τηλεφωνικά με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* KRAS Pyro


Εάν έχει εγκατασταθεί το KRAS Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες Assay Setups (Ρυθμίσεις ανάλυσης) για τα κωδικόνια 12 και 13 και για το κωδικόνιο 61 στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του λογισμικού PyroMark Q24, στη διαδρομή «Example Files/PyroMark Setups/KRAS» (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/KRAS). Τα παρακάτω βήματα δεν χρειάζεται να εκτελεστούν. Μπορείτε να προμηθευτείτε το KRAS Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου pyro.plugin@qiagen.com.

Συνιστάται έντονα η προτίμηση του KRAS Plug-in Report έναντι της μη αυτόματης ανάλυσης. Μετά την εγκατάσταση του Plug-in ή κάθε φορά που γίνεται αναβάθμιση ή εγκατάσταση νέου λογισμικού στον υπολογιστή, η σωστή λειτουργία του Plug-in πρέπει να επαληθεύεται, όπως περιγράφεται στον γρήγορο οδηγό Plug-In Quick Guide.

Εάν δεν έχει εγκατασταθεί το KRAS Plug-in Report, το αρχείο ανάλυσης πρέπει να ρυθμιστεί μη αυτόματα πριν από την πρώτη εκτέλεση της ανάλυσης *therascreen* KRAS Pyro. Ρυθμίστε την ανάλυση για τα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS και το κωδικόνιο 61 του KRAS χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία

Κωδικόνια 12 και 13 του KRAS

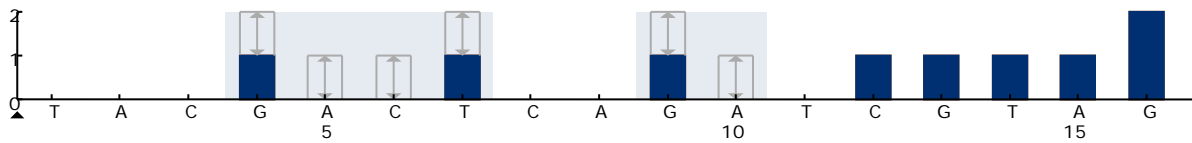
1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέα ανάλυση AQ).
2. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
GNTGRCGTAGGC

Σημείωση: Οι συχνότερες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 θα ανιχνευθούν στο νουκλεοτίδιο 35 (δεύτερη θέση) με τη βοήθεια του συγκεκριμένου «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση). Για την ανάλυση της παρουσίας μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 34 (πρώτη θέση), αντικαταστήστε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) με το παρακάτω.

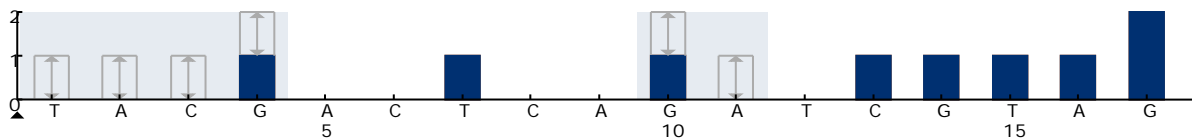
NGTGRCGTAGGC

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU.


3. Εισαγάγετε μη αυτόματα το παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων).
TACGACTCAGATCGTAG




Εικόνα 13. Ιστόγραμμα για τα κωδικόνια 12 (νουκλεοτίδιο 35) και 13 (νουκλεοτίδιο 38) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) GNTGRCGTAGGC.



Εικόνα 14. Ιστόγραμμα για τα κωδικόνια 12 (νουκλεοτίδιο 34) και 13 (νουκλεοτίδιο 38) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) NGTGRCGTAGGC.

4. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.
5. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «KRAScodon 12+13».

Κωδικόνιο 61 του KRAS

6. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέα ανάλυση AQ).
7. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
CTCDTGACCTG

Σημείωση: Οι συχνότερες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 θα ανιχνευθούν στο νουκλεοτίδιο 183 (τρίτη θέση) με τη βοήθεια της συγκεκριμένης αλληλουχίας προς ανάλυση. Για την ανάλυση της παρουσίας μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 182 (δεύτερη θέση), αντικαταστήστε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) με το παρακάτω.

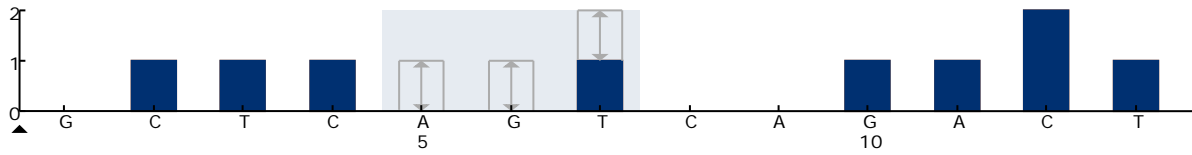
CTCTHGACCTG

Για την ανάλυση της παρουσίας μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 181 (πρώτη θέση), αντικαταστήστε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) με το παρακάτω.

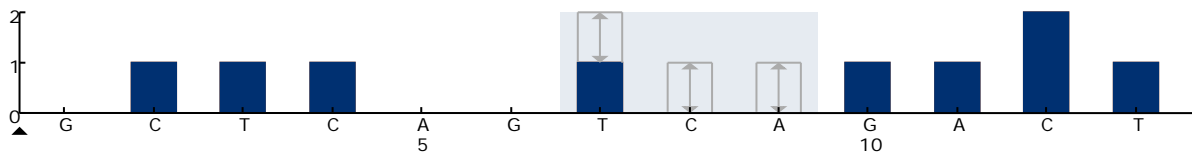
CTCTTSACCTG

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU.

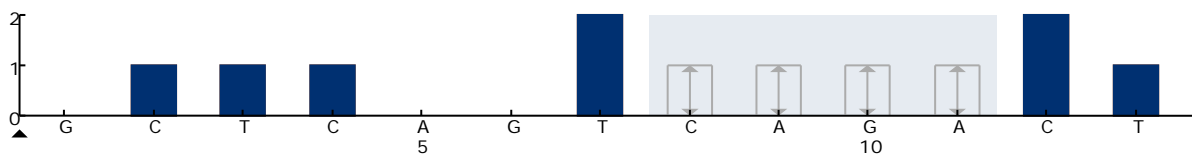
8. Εισαγάγετε μη αυτόματα το παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων).
GCTCAGTCAGACT




Εικόνα 15. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 61 (νουκλεοτίδιο 183) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **CTCDTGACCTG**.




Εικόνα 16. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 61 (νουκλεοτίδιο 182) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **CTCTHGACCTG**.



Εικόνα 17. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 61 (νουκλεοτίδιο 182) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **CTCTTSACCTG**.

9. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.
10. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «KRAScodon 61».

Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων

<p>ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ</p> 	<p>Επικίνδυνες χημικές ουσίες</p> <p>Το διάλυμα αποδιάταξης που χρησιμοποιείται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, το οποίο προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια και το δέρμα.</p> <p>Να φοράτε πάντοτε γυαλιά ασφαλείας, γάντια και ποδιά εργαστηρίου.</p> <p>Η αρμόδια αρχή (π.χ. ο υπεύθυνος του εργαστηρίου) πρέπει να λαμβάνει τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χώρος εργασίας είναι ασφαλής και ότι οι χειριστές των οργάνων δεν εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα τοξικών ουσιών (χημικών ή βιολογικών), όπως καθορίζεται στα ισχύοντα δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS) ή τα έγγραφα των OSHA*, ACGIH† και COSHH‡.</p> <p>Ο αερισμός για αναθυμιάσεις και η απόρριψη των αποβλήτων πρέπει να γίνονται σύμφωνα με όλους τους εθνικούς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς και νόμους υγείας και ασφάλειας.</p>
---	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Ηνωμένο Βασίλειο)

Βεβαιωθείτε ότι τηρούνται οι ομοσπονδιακοί, κρατικοί και τοπικοί περιβαλλοντικοί κανονισμοί σχετικά με την απόρριψη των εργαστηριακών αποβλήτων.

Σημαντική πληροφορία πριν από την έναρξη

- Το πρωτόκολλο αυτό απαιτεί νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, ή ισοδύναμο).

Διαδικασία

1. Βεβαιωθείτε ότι στο εργαλείο κενού δεν εφαρμόζεται κενό. Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία κενού και η αντλία κενού είναι απενεργοποιημένες (Off).
2. Απορρίψτε διαλύματα που τυχόν απομένουν στα λεκανίδια.
3. Ξεπλύνετε τα λεκανίδια με νερό υψηλής καθαρότητας, ή αντικαταστήστε τους, εάν είναι απαραίτητο.

4. Αδειάστε τον περιέκτη αποβλήτων.

Σημείωση: Το καπάκι μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς αποσύνδεση της σωλήνωσης.

5. Αν απαιτείται καθαρισμός του σταθμού εργασίας υπό κενό (για παράδειγμα λόγω σκόνης ή διαρροών), ακολουθήστε τις οδηγίες που παρατίθενται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις σε συστήματα PyroMark Q24: 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 α S, dCTP, dGTP, dTTP και H ₂ O	971460
PyroMark Q24 MDx	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχιση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001513
PyroMark Q24	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχιση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Λογισμικό εφαρμογής	9019063
PyroMark Q24 Software	Λογισμικό ανάλυσης	9019062
Βοηθητικός εξοπλισμός		
PyroMark Q24 Plate (100)	Πλάκα αντίδρασης αλληλούχισης 24 βυθισμάτων	979301

* Αποκλειστικά για το Ηνωμένο Βασίλειο.

† Υπόλοιπες χώρες.

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
PyroMark Q24 Cartridge(3)	Φυσίγγια για την προσθήκη νουκλεοτιδίων και αντιδραστηρίων	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Επαναχρησιμοποιούμενοι δειγματολήπτες με φίλτρο για τους σταθμούς εργασίας υπό κενό PyroMark Q96 και Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Για έλεγχο εγκατάστασης του συστήματος	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Για επιβεβαίωση απόδοσης του συστήματος	979304
Σχετικά προϊόντα		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Για 50 παρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp MinElute®, πρωτεϊνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Για 48 παρασκευές: Φυσίγγια με αντιδραστήρια (ιστού), ρύγχη με φίλτρο μίας χρήσης, συγκρατητήρες για ρύγχη μίας χρήσης, σωληνάρια δειγμάτων (2 ml), σωληνάρια έκλουσης (1,5 ml), ρυθμιστικό διάλυμα G2, πρωτεϊνάση K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Για 50 παρασκευές: Στήλες φυγοκέντρησης QIAamp Mini, ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, VacConnectors	61104

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας και δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο kit QIAGEN ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

Για χώρες όπου ισχύει:

Η ΑΓΟΡΑ ΑΥΤΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΕΠΙΤΡΕΠΕΙ ΣΤΟΝ ΑΓΟΡΑΣΤΗ ΝΑ ΤΟ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ *IN VITRO* ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ. ΚΑΝΕΝΑ ΓΕΝΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ Ή ΑΛΛΗ ΑΔΕΙΑ ΟΠΟΙΟΥΔΗΠΟΤΕ ΕΙΔΟΥΣ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΑΥΤΟ ΤΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΔΙΚΑΙΩΜΑ ΧΡΗΣΗΣ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ ΔΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΟΝΤΟΣ.

Εμπορικά σήματα: 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).

Συμφωνία περιορισμένης αδειας

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του *therascreen KRAS Pyro Kit* των εξής όρων:

1. Το *therascreen KRAS Pyro Kit* μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο theascreen KRAS Pyro Kit* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχονται στο κιτ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του κιτ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο theascreen KRAS Pyro Kit* και στα πρόσθετα πρωτόκολλα που είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το κιτ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του κιτ συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιαδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιαδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιασδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

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)

