

Mayis 2016

# therascreen<sup>®</sup> RAS Extension Pyro<sup>®</sup> Kit El Kitabı



Sürüm 1

**IVD**

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

İnsan KRAS onkojeninin 3 ve 4. eksonlarında ve insan NRAS onkojeninin 2, 3 ve 4. eksonlarında bulunan mutasyonların tespiti için

**CE**

**REF**

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
ALMANYA

**R2**

**MAT**

1085873TR



# İçindekiler

Intended Use.....	5
Özet ve Açıklama .....	5
Prosedür Prensipleri.....	7
Kontroller .....	8
Sağlanan Malzemeler .....	9
Kit içeriği .....	9
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler .....	11
Uyarılar ve Önlemler .....	14
Genel önlemler .....	14
Reaktifli Saklama ve Kullanma .....	15
Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama .....	16
Prosedür.....	18
DNA izolasyonu .....	18
Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için kurulum yapın .....	18
Protokol 2: <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit ile birlikte sağlanan PCR reaktiflerini kullanan PCR .....	21
Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose High Performance boncuklarla immobilizasyonu .....	24
Protokol 4: PyroMark Q24'te Pyrosequencing analizinden önce örneklerin hazırlanması .....	26
Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması.....	31
Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi .....	34
Sonuçların Yorumlanması.....	39

---

Temsili Sonuçlar .....	44
Sorun Giderme Kılavuzu.....	47
Kalite Kontrol .....	49
Sınırlamalar .....	49
Performans Özellikleri .....	50
Boş örnek sınırı ve tespit sınırı .....	50
NRAS kodon 13 içinde GGT > TGT ve GGT > GTT mutasyonları.....	52
Doğrusallık.....	53
Hassasiyet .....	54
Diyagnostik değerlendirme.....	57
Referanslar .....	61
Semboller .....	62
İletişim Bilgileri .....	63
Ek A: <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu .....	64
Ek B: Atık Konteynerinin ve Olukların Boşaltılması .....	70
Sipariş Bilgileri .....	72

## Intended Use

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, insan KRAS onkojeninin 59, 61, 117 ve 146 kodonlarında ve insan NRAS onkojeninin 12, 13, 59, 61, 117 ve 146 kodonlarında bulunan mutasyonların kantitatif olarak saptanmasında kullanılan Pyrosequencing® teknolojisine dayanan, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) metastatik kolorektal kanser (mCRC) tümör dokusu örneklerinden alınmış DNA kullanan bir in vitro tanılama testidir.

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, setuksimab ve panitumumab gibi EGFR karşıtı tedavilerden fayda sağlama olasılığı yüksek olan mCRC hastalarının tespitine yardımcı olmak üzere geliştirilmiştir (1).

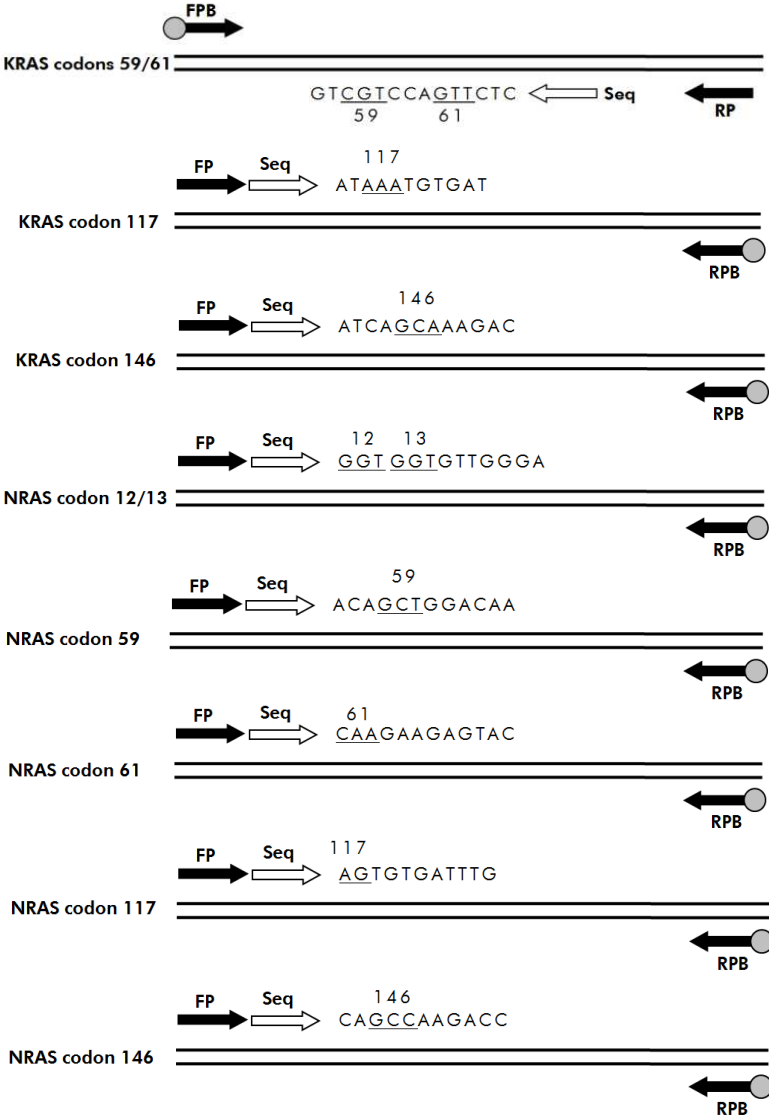
*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, yalnızca PyroMark® Q24 sistemi üzerinde kullanılabilir. PyroMark Q24 sistemleri aşağıdakileri içerir:

- PyroMark Q24 cihazı veya PyroMark Q24 MDx cihazı.
- PyroMark Q24 Vakum İstasyonu veya PyroMark Q24 MDx Vakum İstasyonu.
- PyroMark Q24 yazılımı (sürüm 2.0) veya PyroMark Q24 MDx Yazılımı (sürüm 2.0).

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, in vitro tanılama prosedürleri, moleküler biyoloji teknikleri ve PyroMark Q24 sistemi konusunda eğitimli teknisyenler ve doktorlar gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

## Özet ve Açıklama

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, insan KRAS geninin 3 ve 4. eksonlarında ve insan NRAS geninin 2, 3 ve 4. eksonlarında bulunan mutasyonların kantitatif ölçümü için kullanılır. Kitin içinde 8 adet test yer alır (bkz. Şekil 1).



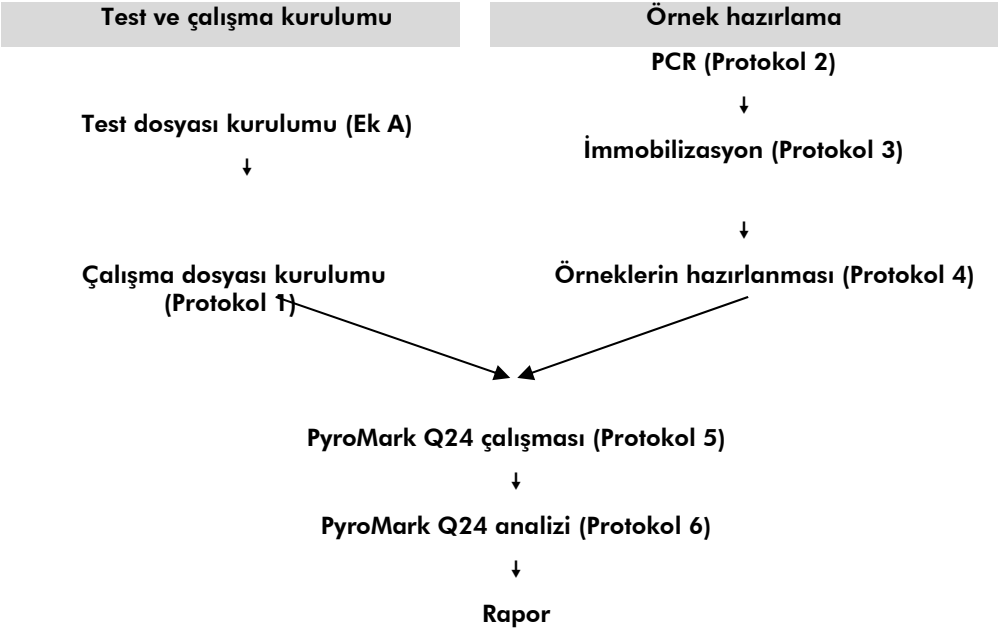
Şekil 1. *therascreen* RAS Extension Pyro Kit içindeki testler.

8 adet bölge PCR tarafından ayrı ayrı çoğaltılır ve tanımlanan bölge içinde sıralanır. Kapsanan bölge içindeki mutasyonlar, Pyrogram® içinde, yabancı tip örneklerden alınan izlerden farklı ve kendine özgü desenler oluşturur. PyroMark Q24 yazılımı kullanılarak analiz edilebilen mutasyonlar Tablo 15'te listelenmiştir (Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu). KRAS içindeki 117 ve 146 kodonları ve NRAS içindeki 12/13, 59, 61, 117 ve 146 kodonları ileri yönlü olarak sıralanırken, KRAS içindeki 59/61 kodonu ters yönlü olarak sıralanır. Ürün içinde her bir test için bir PCR primeri karışımı ve bir sıralama primeri yer almaktadır. Primerler solüsyon içinde bulunur ve her bir şişe içinde 24 µl primer veya primer karışımı yer alır.

## Prosedür Prensibi

Aşağıdaki Şekil 2, test prosedürünün iş akışını göstermektedir. PCR yapıldıktan sonra, ilgili bölgeyi hedef almak için primerler kullanılır ve ampliconlar, Streptavidin Sepharose® High Performance (Yüksek Performanslı) boncuklarla immobilize edilir. Tek iplikli DNA hazırlanır ve ilgili sıralama primerleri DNA'ya bağlanır. Daha sonra örnekler, test kurulum dosyaları ve bir çalışma dosyası kullanılarak PyroMark Q24'te analiz edilir.

“Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) seçeneği, çalışma sonrasında farklı mutasyonları tespit etmek üzere ayarlanabilir (bkz. “Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi”, sayfa 34 ve “Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu”, sayfa 64).



Şekil 2. theascreen RAS Extension Pyro Kit prosedürü iş akışı.

## Kontroller

Kitin içinde, PCR ve sıralama reaksiyonları için pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere demetile edilmiş kontrol DNA'sı bulunur. Bu kontrol DNA'sı, bu kitin kullanıldığı sıralanmış bölgelerde yabancı tip genotipe sahiptir. Tüm Pyrosequencing çalışmalarında her bir test için kontrol DNA'sından örnek kullanın. Bu, sonuçların doğru yorumlanması ve düşük düzeyli mutasyonların da tespit edilebilmesi için gereklidir (bkz. "Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi", sayfa 34).

Ek olarak, en az bir test için her PCR kurulumuna bir negatif kontrol (şablon DNA'sız) eklenmelidir.



# Sağlanan Malzemeler

## Kit içeriği

### Kutu 1/2

<b>therascreen RAS Extension Pyro Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalog no.</b>	<b>971590</b>
<b>Prep sayısı</b>	<b>24</b>
Seq Primer KRAS 59/61	24 µl
Seq Primer KRAS 117	24 µl
Seq Primer KRAS 146	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13	24 µl
Seq Primer NRAS 59	24 µl
Seq Primer NRAS 61	24 µl
Seq Primer NRAS 117	24 µl
Seq Primer NRAS 146	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61	24 µl
PCR Primer KRAS 117	24 µl
PCR Primer KRAS 146	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13	24 µl
PCR Primer NRAS 59	24 µl
PCR Primer NRAS 61	24 µl
PCR Primer NRAS 117	24 µl
PCR Primer NRAS 146	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1.2 ml
H <sub>2</sub> O	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl	3 x 100 µl

## Kutu 2/2

<b>Tamponlar ve reaktifler</b>	<b>Hacim</b>
PyroMark Binding Buffer (Bağlayıcı Tampon)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Isıtıcı Tampon)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Denatürasyon Solüsyonu)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (Yıkama Tamponu), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Enzim Karışımı)	2 şişe
Substrate Mixture (Substrat Karışımı)	2 şişe
dATP $\alpha$ S	2 x 1180 $\mu$ l
dCTP	2 x 1180 $\mu$ l
dGTP	2 x 1180 $\mu$ l
dTTP	2 x 1180 $\mu$ l
therascreen RAS Extension Pyro Kit El Kitabı (İngilizce)	1

\* Sodyum hidroksit içerir

# Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

## Reaktifler

- DNA isolation kit (DNA izolasyon kiti) (bkz. "DNA izolasyonu", sayfa 18)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat. no. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- High-purity water (Yüksek saflıkta su) (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm veya muadili)  
**Not:** Kit içinde PCR, DNA immobilizasyonu ve Enzim Karışımı ile Substrat Karışımını çözme işlemleri için yeterli miktarda su sağlanmaktadır; PyroMark Yıkama Tamponu, 10x seyreltme işlemi için ayrıca yüksek saflıkta su gereklidir.
- Ethanol (Etanol) (%70)\*

## Ekipman

- Steril pipet uçları (PCR kurulumu için filtrelili)
- 24 kuyulu PCR plakası (bkz. "Önerilen 24 kuyulu plakalar", sayfa 13)
- Yapışkan folyo
- PyroMark Q24 Plate (PyroMark Q24 Plakası) (kat. no. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (PyroMark Q24 Kartuşu) (kat. no. 979302)†

\* Metanol veya metiletilketon gibi diğer kimyasal maddeleri içeren denatüre alkol kullanmayın.

† AB Direktifi 98/79/EC uyarınca CE-IVD işaretlidir. Listelenen diğer ürünlerin hiçbiri AB Direktifi 98/79/EC uyarınca CE-IVD işaretli değildir.

## Ekipman

- Pipetler (ayarlanabilir)\*
- Masaüstü mikro santrifüj\*
- Isıl döngüleyici\* ve uygun PCR tüpleri
- PyroMark Q24 MDx veya PyroMark Q24 (kat. no. 9001513 veya 9001514)\*
- PyroMark Q24 MDx veya PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Vakum İstasyonu) (kat. no. 9001515 veya 9001516 veya 9001518 veya 9001519)\*
- Boncuklarla immobilizasyon için plaka karıştırıcı\* (bkz. “Önerilen plaka karıştırıcılar”, sayfa 13)
- 80°C sıcaklığa ulaşma kapasiteli ısıtma bloğu\*

\* Cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

## Önerilen plaka karıştırıcılar

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte, Tablo 1'de gösterilen orbital plaka karıştırıcıların kullanılması önerilir.

**Tablo 1. *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte kullanılması önerilen plaka karıştırıcılar**

Üretici	Ürün	Katalog no.
Eppendorf	<b>ThermoMixer® C</b> (temel cihaz)	5382000031
Eppendorf	<b>SmartBlock™ PCR 96, 96 PCR</b> plakası için termoblok	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

## Önerilen 24 kuyulu plakalar

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte, Tablo 2'de gösterilen 24 kuyulu plakaların kullanılması önerilir.

**Tablo 2. *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte 24 kuyulu plakaların kullanılması önerilir**

Üretici	Ürün	Katalog no.
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate (Thermo-Fast PCR Plakası), 24 kuyucuklu	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate (24 Kuyucuklu Polipropilen PCR Mikrolaka)	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 kuyucuklu, şeffaf tüpler	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame (Çerçevesiz Quali – PCR Plakaları)	G030

# Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım için.

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDSs) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

## Genel önlemler

Her zaman aşağıdakilere dikkat edin:

- Bu ürünün bileşenleri, her bir test için 24 reaksiyon gerçekleştirmeye yeterlidir.
- Steril pipet uçları (PCR kurulumu için filtrelili) kullanın.
- Pozitif materyalleri (numuneler, pozitif kontroller ve amplikonlar) diğer reaktiflerden ayrı olarak saklayın ve çıkartın, bunları reaksiyon karışımına mekansal olarak ayrı bir yerde ekleyin.
- Teste başlamadan önce tüm bileşenleri oda sıcaklığında (15–25°C) çözündürün.
- Çözdürüldüğünde bileşenleri karıştırın (aşağı ve yukarı pipetleyerek veya titreşimli vorteks yaparak) ve kısaca santrifüj yaptırın.
- Başarısız sonuçlar, mutasyon durumunun değerlendirilmesinde kullanılamaz.

# Reaktifli Saklama ve Kullanma

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, 2 kutu halinde teslim edilir. *therascreen* RAS Extension Pyro Kit (kutu 1/2) kuru buz üzerinde gelir. PyroMark PCR ana Karışımı, CoralLoad Konsantresi, demetile edilmiş kontrol DNA'sı ve tüm primerler, teslim alındıktan itibaren -15 ila -25°C'de saklanmalıdır.

Tamponları, Enzim Karışımını, Substrat Karışımını, dATPaS, dCTP, dGTP ve dTTP'yi içeren Pyro Tamponlar ve Reaktifler (kutu 2/2) kutusu, soğuk paketler halinde teslim edilir. Bu bileşenler, teslim alındıktan itibaren 2–8°C arasında saklanmalıdır. Aktivite kaybını en aza indirmek adına, hem enzim karışımının hem substrat karışımının verilen şişelerde saklanması önerilir.

Yeniden hazırlanan enzim ve substrat karışımları 2–8°C arasında en az 10 gün boyunca stabil kalır. Yeniden hazırlanan enzim ve substrat karışımları dondurularak -15 ila -25°C sıcaklıkta kendi şişelerinde saklanabilir. Dondurulan reaktifler en fazla 6 kere çözülüp dondurulabilir.

**Not:** Nükleotidler dondurulmamalıdır.

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, bu koşullarda saklandığı zaman kitin son kullanma tarihine kadar stabil kalır.

# Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama

**Not:** Tüm örneklere potansiyel enfeksiyöz madde olarak bakılmalıdır.

Örnek materyali, FFPE dokusundan alınmış insan genomik DNA'sı olmalıdır. Numuneler, numune kalitesini sağlamak için standart patoloji metodolojisine göre nakledilmelidir.

Tümör örnekleri heterojendir ve tümör örneğinden elde edilen veri aynı tümörden alınan diğer kısımlarla uyumlu olmayabilir. Ayrıca, tümör örnekleri tümör olmayan doku da içerebilir. Tümör olmayan dokudan elde edilen DNA'nın *therascreen* RAS Extension Pyro Kiti aracılığıyla tespit edilen mutasyonlarını içermesi beklenmez.

## Doku örneklerinin hazırlanması

**Not:** Kuru bir neşter kullanın. Bu adımı laminar hava akımı veya davlumbaz altında gerçekleştirmeyin.

- Tümör dokusunu, her bir örnek için yeni bir neşterle kazıyarak kesitlerden etiketli mikrosantrifüj tüplerine aktarın.

## Doku örneklerinin DNA alımına hazırlanması

- Standart malzemeler ve yöntemler kullanarak, doku numunesini %10 renksiz tamponlu formalin (NBF) içine yerleştirin ve parafine gömün. Mikrotom kullanarak parafin blokundan 5  $\mu$ m'lik seri kesitler kesin ve bunları cam slaytlar üzerine yerleştirin.
- Eğitimli bir görevli (örn. bir patolog), Hematoksilin ve Eozin (H&E) ile boyanmış kesiti tümör içeriği ve alan tespiti açısından değerlendirmelidir. Tümörün normal dokudan ayırt edilebilmesi için, boyanmış slaytı işaretleyin. DNA alımı için seri kesitler kullanın.
- Makrodiseksiyon olmaksızın işlem için alana göre > %20 tümör içerikli kesitleri kullanın (bkz. sonraki madde).



- Alana göre < %20 tümör içeriğine sahip olan kesitlere makrodiseksiyon yapın ve bunları bir veya daha fazla kesite ayırın. Tümörsüz dokuyu atın.
- Alanı < 4 mm<sup>2</sup> olan kesitler için, toplam tümör alanını en az 4 mm<sup>2</sup> olarak artırmak için iki veya daha fazla kesit daha işleyin (makrodiseksiyon yapılmış ve yapılmamış örnekler için geçerlidir). Tümörsüz dokuyu atın.
- Yeni, steril bir neşter kullanarak doku etrafındaki fazla parafini kazıyarak ortadan kaldırın.

## Saklama

FFPE bloklarını ve slaytlarını oda sıcaklığında saklayın. Slaytlar, DNA alımı öncesinde oda sıcaklığında 4 haftaya kadar saklanabilir.

Genomik DNA, alındıktan sonra 1 hafta boyunca 2–8°C sıcaklıkta, ardından kullanım öncesinde 8 haftaya kadar -15 ila -25°C sıcaklıkta saklanabilir.

# Prosedür

## DNA izolasyonu

Aşağıdaki Tablo 3'te gösterilen QIAGEN kiti, belirtilen insan örneği tipi için DNA temizleme işlemi yapmak amacıyla *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte kullanılır. Bu kiti kullanmak için, ilgili kit el kitabında verilen DNA temizleme talimatlarına göre hareket edin.

**Tablo 3. *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte kullanılması önerilen DNA temizleme kiti**


Örnek materyal	Nükleik asit izolasyon kiti	Katalog no.
Parafine gömülmüş doku	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

## Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için kurulum yapın

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Sayfa 64'de içinde yer alan Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu uyarınca Test Kurulumu oluşturun. Bu kurulum, RAS Extension Pyro Kit testini ilk defa çalıştırmadan önce yalnızca bir kez yapılmalıdır.
- Yüksek sinyal yoğunluğuna sahip örnekleri “şablonsuz kontrol” kuyularının ve düşük sinyal beklenen kuyuların yanına yerleştirmeyin. Bir kuyudaki sinyalin bitişikteki kuyudan alınması ihtimali olduğu için bunun yapılması, kuyular arasında sinyallerin karışmasına neden olabilir.


### Prosedür

1. Araç çubuğundaki  simgesine tıklayın.  
Yeni bir çalışma dosyası oluşturulur.
2. Çalışma parametrelerini girin (bkz. “Çalışma parametreleri”, sayfa 19).

3. theascreen RAS Extension Pyro Kit'in 8 testinin tamamı için, incelenecek örneklere karşılık gelen testleri kuyulara ekleyerek plakayı hazırlayın.

**Not:** En az bir test için her PCR kurulumuna bir negatif kontrol örneği (şablon DNA'sız) eklenmelidir.

**Not:** Tüm Pyrosequencing çalışmalarındaki her bir test için yabani tip kontrol olarak demetile edilmiş kontrol DNA'sı ekleyin (bkz. "Şekil 2. theascreen RAS Extension Pyro Kit prosedürü iş akışı.", sayfa 8).

4. Çalışma kurulduğunda ve PyroMark Q24 sisteminde çalışmaya hazır olduğunda, gerekli enzim karışımı, substrat karışımı ve nükleotid hacimlerinin bir listesini ve plaka kurulumunu yazdırın. "Tools" (Araçlar) menüsünden "Pre Run Information" (Çalışma Öncesi Bilgiler) seçeneğini seçin. Rapor görüntülendiğinde  simgesini tıklayın.
5. Çalışma dosyasını kapatın ve Windows® Explorer kullanarak bir USB belleğe (sistemle birlikte verilir) kopyalayın.

**Not:** Yazdırılan çalışma öncesi bilgiler, örnek kurulumu için şablon olarak kullanılabilir (bkz. "Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose High Performance boncuklarla immobilizasyonu", sayfa 24).

**Not:** Plakayı PyroMark Q24 sisteminde çalıştırmak için, bkz. "Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması", sayfa 31.

## Çalışma parametreleri

- **Run name (Çalışma adı):** Çalışmanın adı, dosya kaydedilirken verilir. Dosyanın adını değiştirmek, çalışmanın da adının değiştirilmesi anlamına gelir.
- **Instrument method (Cihaz yöntemi):** Çalışma için kullanılacak kartuşa göre cihaz yöntemi seçin; ürünle birlikte verilen talimatlara bakın.
- **Plate ID (Plaka Kimliği, isteğe Bağlı):** PyroMark Q24 Plaka Kimliğini girin.
- **Bar code (Barkod, isteğe Bağlı):** Plaka için bir barkod numarası girin veya bilgisayarınıza bağlı bir barkod okuyucunuz varsa, farenin imlecini "Barcode" (Barkod) metin kutusuna getirin (kutuya tıklayarak) ve barkodu taratın.

- **Kit and reagent ID (Kit ve reaktif kimliği, isteğe Bağlı):** *therascreen* RAS Extension Pyro Kit'in kullanılacağı lot numarasını girin. Lot numarası ürün etiketinde bulunur.  
Not: *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile ilgili oluşabilecek beklenmedik sorunların takip edilebilmesi için her iki lot numarasını da girmenizi öneririz.
- **Run note (Çalışma notu, isteğe Bağlı):** Çalışmanın içeriği veya amacı ile ilgili bir not girin.

### Test dosyalarının eklenmesi

Bir kuyuya test eklemek için aşağıdakilerden birini yapabilirsiniz:

- Kuyuya sağ tıklayın ve içerik menüsünden "Load Assay" (Test Yükle) seçeneğini seçin.
- Kısayol tarayıcıdan testi seçin ve sağ tıklayarak testi kuyuya sürükleyin.

Kuyu, içine yüklenen teste göre renk koduyla gösterilir.

### Örnek kimliği ve not girme

Örnek kimliği veya not girmek için, hücreyi seçin ve metni girin.

Örnek kimliğini veya notu düzenlemek için, hücreyi seçin (içerik seçili hale gelecektir) veya hücreye çift tıklayın.

## Protokol 2: *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ile birlikte sağlanan PCR reaktiflerini kullanan PCR

Bu protokol, insan KRAS geninin 3 ve 4. eksonlarında ve insan NRAS geninin 2, 3 ve 4. eksonlarındaki 8 ayrı bölgenin *therascreen* RAS Extension Pyro Kit kullanılarak PCR büyütülmesi için tasarlanmıştır.

### Başlamadan önce önemli noktalar

- PyroMark PCR Ana Karışımındaki HotStarTaq® DNA polimerazı, 95°C'de 15 dakikalık bir aktivasyon adımı gerçekleştirilmesini gerektirir.
- Pyrosequencing analizi öncesinde şablonu PCR'ye ekleyerek tüm reaksiyon karışımlarını DNA temizleme, PCR ürün analizi veya örnek hazırlama için kullanılan alandan ayrı bir alanda kurun.
- Çapraz kontaminasyonu en aza indirmek için hidrofobik filtrelere sahip tek kullanımlık uçlar kullanın.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- PCR primerlerini içeren tüpleri açmadan önce, tüplerin dibindekileri toplamak için kısaca santrifüj yaptırın.
- Kontrol ve örnek DNA yoğunluğunu gerekirse 0,4 ila 2 ng/μl olarak ayarlayın.

### Prosedür

1. Gerekli tüm bileşenleri çözdüren (bkz. Tablo 4, sayfa 22).  
Kullanım öncesinde iyice karıştırın.
2. Tablo 4 uyarınca, her bir PCR primer seti için bir reaksiyon karışımı hazırlayın.  
Reaksiyon karışımı normalde, örnek hariç PCR için gerekli bileşenlerin tümünü içerir.  
Yapılacak toplam PCR testi sayısı için gerekenden daha yüksek hacimde bir reaksiyon karışımı hazırlayın.

**Tablo 4. Her bir PCR primer karışımı için reaksiyon karışımı hazırlama**

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 veya PCR Primer KRAS 117 veya PCR Primer KRAS 146 veya PCR Primer NRAS 12/13 veya PCR Primer NRAS 59 veya PCR Primer NRAS 61 veya PCR Primer NRAS 117 veya PCR Primer NRAS 146	1
Su (H <sub>2</sub> O, verilir)	4
<b>Toplam hacim</b>	<b>20</b>

3. Reaksiyonu iyice karıştırın ve her PCR tüpüne 20 µl koyun.

PCR tüplerini buz üzerinde tutmak gerekmez, çünkü HotStarTaq DNA polimerazı oda sıcaklığında aktif durumda değildir.

4. Her bir PCR tüpüne 5 µl şablon DNA (2–10 ng genomik DNA) ekleyin (bkz. Tablo 5) ve iyice karıştırın.

**Not:** En az bir test için her PCR kurulumuna bir negatif kontrol örneği (şablon DNA'sız) eklenmelidir.

**Not:** Tüm Pyrosequencing çalışmalarındaki her bir test için yabancı tip kontrol olarak demetile edilmiş kontrol DNA'sı ekleyin (bkz. "Kontroller", sayfa 8).

**Tablo 5. PCR hazırlanması**

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
Reaksiyon Karışımı	20
Örnek DNA	5
<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

5. Isıl döngüleyiciyi Tablo 6'da verilen koşulları kullanarak, üreticinin talimatlarına göre programlayın.

**Tablo 6. Optimize edilmiş döngüleme protokolü**

	Süre	Sıcaklık	Açıklamalar
<b>İlk aktivasyon adımı:</b>	15 min	95°C	HotStarTaq DNA polymerase is activated by this heating step
<b>3 adımlı döngüleme:</b>			
Denatürasyon	20 s	95°C	
Isıtma	30 s	53°C	
Uzatma	20 s	72°C	
Döngü sayısı	42	–	
<b>Son uzatma:</b>	5 min	72°C	

6. PCR tüplerini ısıl döngüleyiciye yerleştirin ve döngüleme programını başlatın.

7. Çoğaltma sonrasında, sayfa 24'de içinde yer alan "Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose High Performance boncuklarla immobilizasyonu" adımı ile devam edin.

PCR örnekleri 2 ila 8°C'de 3 güne kadar saklanabilir.

## Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose High Performance boncuklarla immobilizasyonu

Bu protokol, PyroMark Q24 sistemiyle analiz edilmeden önce şablon DNA'nın Streptavidin Sepharose High Performance ile immobilize edilmesi için kullanılır.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Başlamadan önce, kullanılacak tüm reaktiflerin ve solüsyonların oda sıcaklığında ulaşmasını sağlayın (15–25°C).
- PyroMark Q24'ü çalışma başlangıcından en az 30 dakika önce açın. Güç anahtarı cihazın arka kısmında bulunur.
- Bir PyroMark Q24 plaka tutucuyu 80°C'deki önceden ısıtılmış ısıtma bloğu üzerine yerleştirin. İkinci bir PyroMark Q24 plaka tutucuyu oda sıcaklığında (15–25°C) bırakın.
- PyroMark Yıkama Tamponu 10x konsantre olarak gelir. İlk kullanımdan önce, 225 ml yüksek saflıkta suyu 25 ml 10x PyroMark Yıkama Tamponuna ekleyerek seyreltin ve 1x çalışma solüsyonu elde edin (son hacim 250 ml).  
**Not:** 1x PyroMark Yıkama Tamponu çalışma solüsyonu, belirtilen son kullanma tarihine kadar 2 ila 8°C'de stabildir.
- PyroMark Q24 Vakum İstasyonunu, *PyroMark Q24 User Manual*'da (PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu) belirtildiği üzere örnek hazırlama için hazırlayın.

### Prosedür

1. Streptavidin Sepharose High Performance içeren şişeyi, homojen bir solüsyon elde edinceye kadar hafifçe sallayın.
2. Tablo 7 uyarınca, DNA immobilizasyonu için bir ana karışım hazırlayın.  
Toplam reaksiyon sayısı için gerekenden daha yüksek hacimde bir reaksiyon karışımı hazırlayın (reaksiyon sayısı + fazladan bir karışım).



**Tablo 7. DNA immobilizasyonu için kullanılacak ana karışım**

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
PyroMark Binding Buffer (Bağlayıcı Tampon)	40
Su (H <sub>2</sub> O, verilir)	29
Streptavidin Sepharose High Performance (Yüksek Performans)	1
<b>Toplam hacim</b>	<b>70</b>

- 24 kuyulu PCR plakasının kuyularına, çalışma kurulumunda belirtildiği şekilde 70 µl ana karışım ekleyin (bkz. "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için kurulum yapın", sayfa 18).  
Sepharose boncukları hemen dibe çöker. Ana karışımı bir pipetle veya titreşimli vorteks yaparak homojen hale getirin. Ana karışıma santrifüj yaptırmayın.
- Ana karışım içeren her bir kuyuya, çalışma kurulumunda belirtildiği şekilde Protokol 2'den 10 µl biyotinlenmiş PCR ürünü ekleyin (bkz. "Protokol 2: theascreen RAS Extension Pyro Kit ile birlikte sağlanan PCR reaktiflerini kullanan PCR", sayfa 21).  
Ana karışımın ve PCR ürününün eklenmesinden sonra her kuyudaki toplam hacim 80 µl olmalıdır.
- Yapışkan folyo kullanarak PCR plakasını kapatın.  
Kuyular arasında sızıntı olmayacağından emin olun.
- PCR plakasını 5–10 dakika boyunca oda sıcaklığında (15–25°C'de) 1400 dev/dk hızda sallayın.  
Bu adım esnasında hemen "Protokol 4: PyroMark Q24'te Pyrosequencing analizinden önce örneklerin hazırlanması", sayfa 26 işlemini gerçekleştirin.

---

## Protokol 4: PyroMark Q24'te Pyrosequencing analizinden önce örneklerin hazırlanması

Bu protokol, PyroMark Q24'te Pyrosequencing analizinden önce tek iplikli DNA'nın hazırlanması ve sıralama primerinin şablona bağlanması için hazırlanmıştır.

### Başlamadan önce önemli noktalar

- Sıralama primerlerini içeren tüpleri açmadan önce, tüplerin dibindekileri toplamak için kısaca santrifüj yaptırın.
- Analiz edilecek bölgeye bağlı olarak, farklı sıralama primerlerini aynı düzende çalışma kurulumunda tanımlandığı şekilde ekleyin (bkz. "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için kurulum yapın", sayfa 18).
- PyroMark Q24 User Manual'da (PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu) belirtildiği şekilde, düzenli aralıklarla filtre problemleri için fonksiyon testi yapın ve filtre problemlerini değiştirin.

### Prosedür

1. Tablo 8'de gösterildiği üzere, her bir sıralama primerinden yeterli miktarda alıp PyroMark Isıtıcı Tamponla seyreltin.

Toplam örnek sayısının sıralanması için gerekenden daha yüksek hacimde bir seyreltilmiş sıralama primeri hazırlayın (reaksiyon sayısı + fazladan bir primer).

İhtiyacınız olandan fazla sıralama primeri seyreltip saklamayın.

**Tablo 8. Sıralama primerlerinin seyreltilmesine örnek**

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim/örnek (µl)</b>	<b>9+1 reaksiyonun hacmi (µl)</b>
PyroMark Annealing Buffer (Isıtıcı Tampon)	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 veya Seq Primer KRAS 117 veya Seq Primer KRAS 146 veya Seq Primer NRAS 12/13 veya Seq Primer NRAS 59 veya Seq Primer NRAS 61 veya Seq Primer NRAS 117 veya Seq Primer NRAS 146	0.8	8
<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

2. Çalışma kurulumuna göre, PyroMark Q24 Plakasının her bir kuyusuna 25 µl seyreltilmiş sıralama primeri ekleyin (bkz. "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için kurulum yapın", sayfa 18).

PyroMark Q24 plaka tutuculardan birini (PyroMark Q24 Vakum İstasyonu ile birlikte verilir) oda sıcaklığında (15–25°C) tutun ve plakayı hazırlama ve taşıma esnasında destek olarak kullanın.

3. PyroMark Q24 Vakum İstasyonunun vakum pompasını açın.
4. Protokol 3'teki PCR plakasını ve PyroMark Q24 Plakasını vakum istasyonuna yerleştirin (Şekil 3).

PCR plakasını inceleyin ve Sepharose boncuklarının çözelti içinde olduğundan emin olun. PCR plakasının, örneklerin yüklendiği andaki yönde baktığından emin olun.



**Şekil 3.** PCR plakasının ve PyroMark Q24 plakasının vakum istasyonundaki konumu.

5. Vakumu açarak cihaza vakum uygulayın.
6. Vakum cihazının filtre problemlerini PCR plakasına doğru yavaşça indirerek immobilize edilmiş şablonu içeren boncukları tutun. Probu burada 15 saniye tutun. Vakum cihazını kaldırdırken dikkatli olun.

**Not:** Sepharose boncukları hemen dibe çöker. Boncuklar, sallama işleminden hemen sonra tutulmalıdır. Plakanın sallanmasından sonra 1 dakikadan fazla süre geçerse, boncukları tutmak için plakayı tekrar 1 dakika boyunca sallayın.

PCR plakasını, vakum cihazının tüm örnekleri aldığını görmek üzere inceleyin.

7. Vakum cihazını, 40 ml %70'lik etanol içeren oluğa alın (**oluk 1; Şekil 3**). Filtre problemlerini 5 saniye boyunca su fışkırtarak temizleyin.
8. Vakum cihazını, 40 ml Denatürasyon Çözeltisi içeren oluğa alın (**oluk 2; Şekil 3**). Filtre problemlerini 5 saniye boyunca su fışkırtarak temizleyin.

9. Vakum cihazını, 50 ml Yıkama Tamponu içeren oluğa alın (**oluk 3; Şekil 3**). Filtre problemlerini 10 saniye boyunca su fişkırtarak temizleyin.
10. Vakum cihazını 5 saniye boyunca kaldırılmış ve 90° açıdan daha geriye yatırılmış halde tutarak filtre problemlerindeki sıvıyı boşaltın (Şekil 4).



**Şekil 4.** Vakum cihazının kaldırılmış ve 90° açıdan daha geriye yatırılmış hali.

11. Vakum cihazını PyroMark Q24 Plakasının üzerinde tutarken vakumu kapatın.
12. Filtre problemlerini seyreltilmiş sıralama primerine doğru alçaltarak ve vakum cihazını hafifçe iki yana hareket ettirerek boncukları PyroMark Q24 Plakasının içine bırakın.  
**Not:** PyroMark Q24 Plakasının yüzeyinin filtre problemleri ile çizilmemesine dikkat edin.
13. Vakum cihazını, yüksek saflıkta su içeren oluğun (**oluk 4; Şekil 3**) içine alın ve cihazı 10 saniye boyunca sallayın.
14. Filtre problemlerini yüksek saflıkta suyun bulunduğu oluğun (**oluk 5; Şekil 3**) içine doğru indirerek yıkayın ve vakum uygulayın. Problemleri 70 ml yüksek saflıkta su fişkırtarak yıkayın.
15. Vakum cihazını 5 saniye boyunca kaldırılmış ve 90° açıdan daha geriye yatırılmış halde tutarak filtre problemlerindeki sıvıyı boşaltın (Şekil 4).
16. Vakum cihazını kapatın ve Park (P) konumuna alın.

---

17. Vakum pompasını kapatın.

**Not:** İş gününün sonunda, sıvı atıklar ve kalan solüsyonlar imha edilmeli ve PyroMark Q24 Vakum İstasyonunda toz ve artıklar kalmadığı kontrol edilmelidir. Bkz. "Ek B: Atık Konteynerinin ve Olukların Boşaltılması", sayfa 70.

18. Önceden ısıtılmış PyroMark Q24 plaka tutucu kullanarak, PyroMark Q24 Plakasını 80°C'deki örneklerle 2 dakika boyunca ısıtın.

19. Örneklerin oda sıcaklığına düşmesi için, PyroMark Q24 Plakasını sıcak plaka tutucudan çıkarın ve oda sıcaklığında (15–25°C) tutulan diğer bir PyroMark Q24 plaka tutucuya yerleştirerek 10–15 dakika bekletin.

Doğrudan "Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması", sayfa 31 işlemiyle devam edin.

## Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması

Bu protokol, PyroMark Gold Q24 Reaktiflerinin hazırlanmasını ve PyroMark Q24 Kartuşuna yüklenmesini ve PyroMark Q24'ün bir çalışmasını başlatılmasını ve bitirilmesini açıklamaktadır. Çalışma kurulumu hakkında ayrıntılı bilgi için bkz. *PyroMark Q24 User Manual* (PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu).

### Başlamadan önce önemli noktalar

- Çalışma kurulumundaki "Tools" (Araçlar) menüsünde bulunan çalışma öncesi bilgi raporu (bkz. "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için kurulum yapın", sayfa 18) nükleotidlerin, enzim ve substrat tamponunun belirli bir çalışma için gereken hacmi konusunda bilgi sağlar.
- Hidrofobik filtreleri olmayan tek kullanımlık uçları kartuşa yükleyin ve kartuşun doğru çalıştığını onaylayın.

### Prosedür

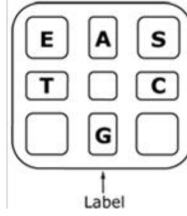
1. Dondurulmuş enzim ve substrat karışımlarını 620 µl suda (H<sub>2</sub>O, verilir) çözün.
2. Şişeyi nazikçe döndürerek karıştırın.

**Not:** Vorteks yapmayın!

Karışımın tamamen çözündüğünden emin olmak için, karışımı 5–10 dakika boyunca oda sıcaklığında (15–25°C) tutun. PyroMark Q24 Kartuşunu doldurmadan önce solüsyonun tortulu kalmadığından emin olun. Reaktifler hemen kullanılmayacaksa, reaktif şişelerini buz üzerine veya buzdolabına koyun.

3. Reaktiflerin ve PyroMark Q24 Kartuşunun oda sıcaklığına (20–25°C) ulaşmasını sağlayın.
4. PyroMark Q24 Kartuşunu etiketi size bakacak şekilde yerleştirin.
5. PyroMark Q24 Kartuşuna uygun hacimlerde nükleotid, enzim ve substrat karışımları yükleyin (bkz. Şekil 5, sayfa 32).

Pipetten kartuşa hiçbir hava baloncuğunun geçmediğinden emin olun.



**Şekil 5. PyroMark Q24 Kartuşunun yukarıdan görünümü.** Notlar, reaktif şişelerindeki etiketlere karşılık gelmektedir. Enzim karışımını (E), substrat karışımını (S) ve nükleotidleri (A, T, C, G), çalışma kurulumundaki "Tools" (Araçlar) menüsünde bulunan Çalışma Öncesi bilgi raporundaki hacim bilgilerine göre ekleyin.

6. Kartuş kapağını açın ve doldurulmuş reaktif kartuşunu etiketi dışarı bakacak şekilde yerleştirin. Kartuşu tamamen içeri itin ve aşağı bastırın.
7. Kartuşun ön kısmındaki çizginin görünür durumda olduğundan emin olun ve kapağı kapatın.
8. Plaka tutma çerçevesini açın ve plakayı ısıtma bloğu üzerine yerleştirin.
9. Plaka tutma çerçevesini ve cihaz kapağını kapatın.
10. Çalışma dosyasını içeren USB belleği, cihazın ön kısmındaki USB portuna yerleştirin. Çalışma bitmeden USB belleği çıkarmayın.
11. Ana menüden "Run" (Çalışma) seçeneğini seçin (▲ ve ▼ ekran düğmelerini kullanarak) ve "OK" (Tamam) seçeneğine tıklayın.
12. ▲ ve ▼ ekran düğmelerini kullanarak çalışma dosyasını seçin.  
Bir klasörün içeriğini görüntülemek için klasörü seçin ve "Select" (Seç) düğmesine basın.  
Bir önceki görünüme dönmek için "Back" (Geri) seçeneğine tıklayın.
13. Çalışma dosyası seçildiğinde, çalışmayı başlatmak için "Select" (Seç) düğmesine tıklayın.
14. Çalışma bittiğinde ve cihaz, çalışma dosyasının USB belleğe kaydedildiğini doğruladığında "Close" (Kapat) seçeneğine tıklayın.




- 
- 15.USB belleği çıkarın.
  - 16.Cihaz kapağını açın.
  - 17.Kartuş kapağını açın ve reaktif kartuşunu kaldırıp çekerek çıkarın.
  - 18.Kapağı kapatın.
  - 19.Plaka tutma çerçevesini açın ve plakayı ısıtma bloğu üzerinden alın.
  - 20.Plaka tutma çerçevesini ve cihaz kapağını kapatın.
  - 21 .Kartuşla birlikte verilen ürün kılavuzundaki talimatlar uyarınca plakayı atın ve kartuşu temizleyin.
  - 22.“Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi”, sayfa 34 uyarınca çalışmayı analiz edin.

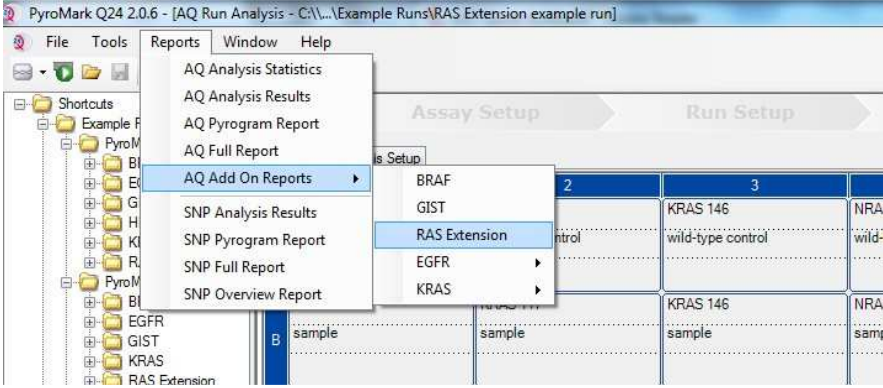
## Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi

Bu protokol, PyroMark Q24 Yazılımı kullanılarak yapılmış ve bitmiş bir *therascreen* RAS Extension Pyro çalışmasının mutasyon analizini açıklamaktadır.

### Prosedür

1. İşlem yapılan çalışma dosyasını içeren USB belleği bilgisayarın USB portuna takın.
2. USB bellekteki çalışma dosyasını, Windows Explorer kullanarak bilgisayar üzerinde dilediğiniz yere taşıyın.
3. "File" (Dosya) menüsünden "Open" (Aç) seçeneğini seçerek veya dosyaya (  ) kısayol tarayıcısından çift tıklayarak çalışma dosyasını PyroMark Q24 Yazılımının AQ modunda açın.
4. RAS Extension Eklenti Raporunu kullanarak bir Eklenti raporu oluşturun ve "Reports" (Raporlar) menüsünden "AQ Add On Reports/RAS Extension" (AQ Eklenti Raporları/RAS Extension) seçeneğini seçin (bkz. Şekil 6).

**Not:** KRAS geni 61 kodonundaki mutasyonlar, ek olarak ayrı bir KRAS eklentisi ile analiz edilmelidir; bunun için "Reports" (Raporlar) menüsünden "AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61" (AQ Eklenti Raporları/KRAS/Kodon 61) seçeneğini seçmelisiniz (bkz. Şekil 6).



Şekil 6. RAS Extension Eklenti Raporu menüsü.

Kuyucuklar Table 9, sayfa 40'ta LOD'si verilen tüm mutasyonlar için otomatik olarak analiz edilecektir. Sonuçlar bir genel bakış tablosunda (bkz. Şekil 7) gösterilir ve ardından Pyrogram ve analiz kalitesi ile ilgili ayrıntılı sonuçlar görüntülenir.

## Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	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.

### Şekil 7. RAS Extension Eklenti Raporu

#### 5. AQ analizi kullanarak:

**Çalışmayı analiz etmek ve genel bir sonuç almak için Analiz düğmelerinden birini tıklayın.**



Tüm kuyuları analiz edin.

Seçili kuyuyu analiz edin.

Analiz sonuçları (allel frekansları) ve kalite değerlendirmesi, Pyrogram izi üzerindeki değişken pozisyonun üzerinde görüntülenir. Bir çalışmanın analizi hakkında ayrıntılı bilgi için bkz. *PyroMark Q24 User Manual* (PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu).

**Bir rapor oluşturmak için “Reports” (Raporlar) menüsündeki “AQ Full Report” (AQ Tam Rapor) veya “AQ Analysis Results” (AQ Analiz Sonuçları) seçeneklerinden birini seçin.**

**Not:** Güvenilir sonuçlar almak için 30 RLU değerinin üzerinde tekli pik yükseklikleri kullanılmasını öneririz. Test kurulumunda “required peak height for passed quality” (geçer kalite için gerekli pik yüksekliği) olarak 30 RLU değerini ayarlayın ve A pik azaltım faktörünün NRAS geni 61 kodunu analizi için 0,86 olarak ayarlandığından emin olun (bkz. “Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu”, sayfa 64 ve *PyroMark Q24 User Manual* (*PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu*)).

“AQ Analysis Results” (AQ Analiz Sonuçları) raporu, allel niceliğinin belgelenmesi ve yorumlanması için kullanılmalıdır. Pyrogram içinde gösterilen sayılar yuvarlatılmıştır ve tam niceliği göstermez.

**Not:** Pyrogram daima histogram ile karşılaştırılmalıdır; histogram, Pyrogram penceresine sağ tıklayarak görüntülenebilir. Ölçülen pik değerler, histogram çubuklarının yüksekliğiyle eşleşmelidir. Ayrıca bkz. sayfa 39, “Sonuçların Yorumlanması”.

**Standart “Sequence to analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işleminde mutasyon tespit edilmeyen veya “Check” (Kontrol) veya “Failed” (Başarısız) kalite değerlendirmesi alan örneklerin yeniden analiz edilmesi**

Analiz Kurulumunda tanımlanan standart “Sequence to analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi, *therascreen* RAS Extension Pyro testlerinde en sık görülen nokta mutasyonlarını ele alır.

Standart “Sequence to analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işleminde mutasyon tespit edilmeyen veya “Check” (Kontrol) veya “Failed” (Başarısız) kalite değerlendirmesi alan tüm örneklerin, manuel olarak yeniden analiz edilmesini şiddetle öneririz. “Check” (Kontrol) veya “Failed” (Başarısız) kalite değerlendirmeleri, standart “Sequence to analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi tarafından ele alınmayan bir mutasyonu gösterebilir, bu da beklenmeyen referans pikleri oluşturabilir.

Yeniden analiz yapmak ve diğer mutasyonları hedeflemek için, “Analysis Setup” (Analiz Kurulumu) adımına girin ve “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi Ek A'daki Tablo 16 ve Tablo 17'de belirtilen değişkenlere veya diğer nadir veya

---

beklenmeyen mutasyonlara ayarlayın. “Apply Analysis Setup” (Analiz Kurulumunu Uygula) penceresi açıldığında “Apply” (Uygula) seçeneğine ve daha sonra “To All” (Hepsine) seçeneğine tıklayın.

İnsan KRAS ve NRAS genlerindeki güncellenmiş mutasyon frekanslarını, Sanger Institute web sitesinde bulabilirsiniz ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/)).

**Not:** “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işleminde değişiklik yaptıktan sonra, tekli pik yüksekliği eşliğinin 30 RLU olarak ayarlandığından ve A pik azaltım faktörünün NRAS geni 61 kodonu analizi için 0,86 olarak ayarlandığından emin olun (bkz. “Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu”).

**Not:** Sıralanan bölgede diğer bazı nadir veya beklenmedik mutasyonlar mevcut olabilir ve bunlar, beklenmedik mutasyonları göz önünde bulundurarak, alternatif “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi kullanılarak analiz edilebilir.

**Not:** Ölçülen piklerin histogram çubuklarının yüksekliğiyle eşleşmemesi ve nadir veya beklenmedik mutasyonlarla açıklanamaması durumunda, sonuçlar mutasyon durumunun değerlendirilmesi için temel alınamaz. Bu durumda örneği yeniden çalışmanız önerilir.

# Sonuçların Yorumlanması

## Analiz sonuçlarının yorumlanması ve düşük seviyeli mutasyonların tespiti

Tüm Pyrosequencing çalışmalarında her bir test için kontrol DNA'sından örnek kullanın. Bu sonuçların uygun yorumlanması ve düşük seviyeli mutasyonların belirlenebilmesi, aynı zamanda arkaplan düzeylerinin kontrolü için gereklidir. Kontrol örneğinin ölçülen frekansı, boş örnek sınırından (LOB) küçük veya buna eşit olmalıdır. El kitaplarında verilen LOB (boş örnek sınırı) veya LOD (tespit sınırı) değerleri, mutasyon varlığının saptanmasında kullanılabilir. Bu değerler, yabancı tip veya ilgili mutasyon sıralamasına sahip plazmid karışımları kullanılarak elde edilmiştir.

PyroMark Q24 Yazılımı veya Eklenti Raporları kullanılarak yapılan analizden 3 sonuç çıkabilir. LOD verileri için bkz. Tablo 9.

- Mutasyon frekansı  $< LOD$ : Mutasyon saptanmadı
- Mutasyon frekansı  $> LOD + \%3$  birim: Mutasyon
- Mutasyon frekansı  $\geq LOD$  ve  $\leq LOD + \%3$  birim: Potansiyel düşük seviyeli mutasyon

**Not:** RAS Extension Eklenti Raporu (bkz. "Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi", sayfa 34 adım 5) kullanılıyorsa ve bu görülürse, bir uyarı verilir.

LOD ila  $LOD + \%3$  birim aralığı, düşük seviyeli mutasyonların optimum koşullarda hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Demetile edilmiş kontrol örneğinde LOB değerinden yüksek bir frekans ölçülmesi, ilgili çalışmada normalden yüksek bir arkaplan düzeyinin göstergesidir; bu da, özellikle düşük mutasyon seviyeleri için, allel niceliğinin belirlenmesini etkileyebilir. Bu nedenle, "Potansiyel düşük seviyeli mutasyon" uyarısı alan sonuçlar dikkatle değerlendirilmelidir.

Potansiyel düşük seviyeli mutasyon uyarısı alan örneklerin, yalnızca demetile edilmiş kontrol DNA'sı ile birlikte tekrar çalışıldıktan sonra doğrulanırsa mutasyon açısından pozitif olduğu düşünülebilir. Bunun için, iki tekrarda da  $\geq$  LOD değerine sahip aynı mutasyonun çıkması ve kontrol örneğinin “No mutation detected” (Hiçbir mutasyon tespit edilmedi) olarak sonuç vermesi gerekir. Aksi takdirde, örnek “No Mutation Detected” (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak değerlendirilmelidir.

Bir mutasyon için artmış arkaplan, el kitabında verilen LOB değerlerinin demetile edilmiş kontrol DNA'sıyla alınan ölçümlerle karşılaştırılmasıyla tespit edilebilir. Demetile edilmiş kontrol DNA'sının ölçülen frekansı ilgili mutasyon için el kitabında verilen LOB değerinden yüksekse, potansiyel düşük seviyeli mutasyon sonucu veren örnekler “No Mutation Detected” (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle, potansiyel düşük seviyeli mutasyon sonucu veren örneklerle ilgili 3 farklı olası senaryo mevcuttur.

1. Bu mutasyon için demetile edilmiş kontrol DNA'sının ölçülen frekansı  $>$  LOB ise: Örnek, tekrarlama gerekmez “Mutation not detected” (Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak değerlendirilebilir.
2. Tekrarlama sonrasında aynı sonuç elde edilemiyorsa: Örnek “Mutation not detected” (Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak değerlendirilir.
3. Çift ve demetile edilmiş kontrol DNA'sı  $<$  LOB'da ilgili mutasyon için aynı sonuçlar yinelenmiştir: Mutasyon tespit edilmiştir.

**Not:** Pyrogram daima histogram ile karşılaştırılmalıdır; histogram, Pyrogram penceresine sağ tıklayarak görüntülenebilir. Ölçülen pik değerler, histogram çubuklarının yüksekliğiyle eşleşmelidir. Pyrogram'lar, beklenmedik piklerin olup olmadığı açısından incelenmelidir. Ölçülen piklerin histogram çubuklarının yüksekliğiyle eşleşmemesi ve nadir veya beklenmedik mutasyonlarla açıklanamaması durumunda, örneğin yeniden çalışılması önerilir. Başarısız sonuçlar, mutasyon durumunun değerlendirmesinde temel oluşturmaz. Geçerli bir mutasyon için, pik yüksekliğindeki bir değişim daima başka bir pik



---

yüksekliğindeki karşılık gelen değişim ile ilgilidir. Tek bir pik yüksekliğindeki değişim, bir mutasyonun varlığı şeklinde değerlendirilmemelidir.

**Not:** Sonuçların yorumlanması için RAS Extension Eklenti Raporunun kullanılması önerilir. Potansiyel düşük seviyeli mutasyon sonucu veren örneklerin daha yakından incelenmesi için, uygulama yazılımında örneğin manuel olarak analiz edilmesini öneririz (örn. kontrol örneğinin mutasyon frekansı ile karşılaştırmak için).

**Not:** Yalnızca KRAS ve NRAS mutasyon durumuna bakılarak kanser hastaları için tedavi kararı verilmemelidir.

**Tablo 9. Spesifik mutasyonlar için belirlenen LOB ve LOD**

Nükleik asit tayini	Amino asit tayini	LOB (% birim)	LOD (% birim)	COSMIC ID* (V70)
<b>KRAS kodon 59 (GCA)</b>				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
<b>KRAS kodon 61 (CAA)</b>				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
<b>KRAS kodon 117 (AAA)</b>				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
<b>KRAS kodon 146 (GCA)</b>				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
<b>NRAS kodon 12 (GGT)</b>				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
<b>NRAS kodon 13 (GGT)</b>				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) <sup>†</sup>	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) <sup>†</sup>	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
<b>NRAS kodon 59 (GCT)</b>				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578

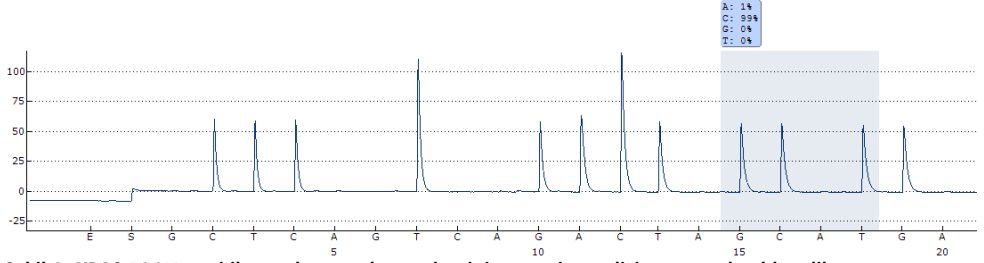
Nükleik asit tayini	Amino asit tayini	LOB (% birim)	LOD (% birim)	COSMIC ID* (V70)
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
<b>NRAS kodon 61 (CAA)</b>				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
<b>NRAS kodon 117 (AAG)</b>				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
<b>NRAS kodon 146 (GCC)</b>				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

\* [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) adresinde bulunan Sanger Institute web sitesindeki Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğundan alınmıştır.

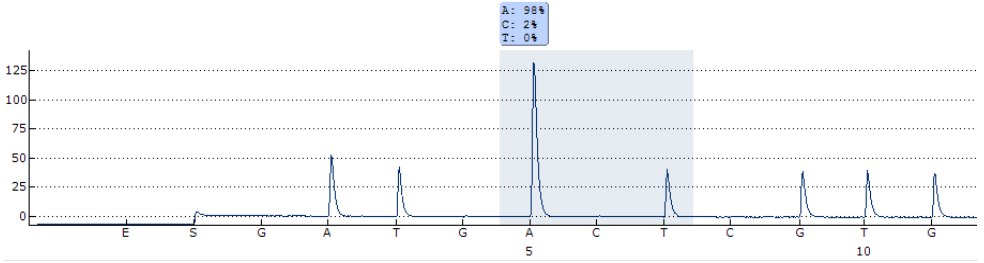
† Örnekte ölçülen frekans  $\geq$  LOD ile sonuçlanan en düşük mutasyon seviyesi.

## Temsili Sonuçlar

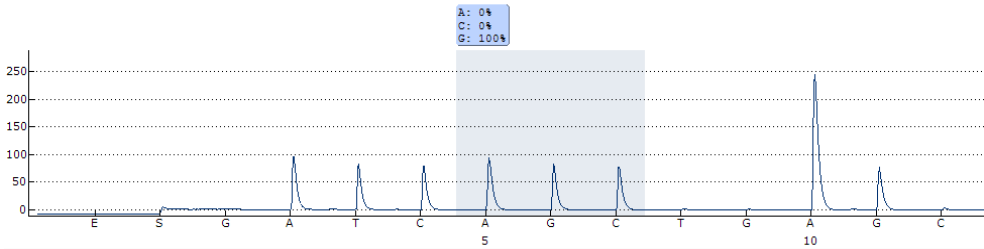
Temsili Pyrogram sonuçları Şekil 8-Şekil 15'te gösterilmektedir.



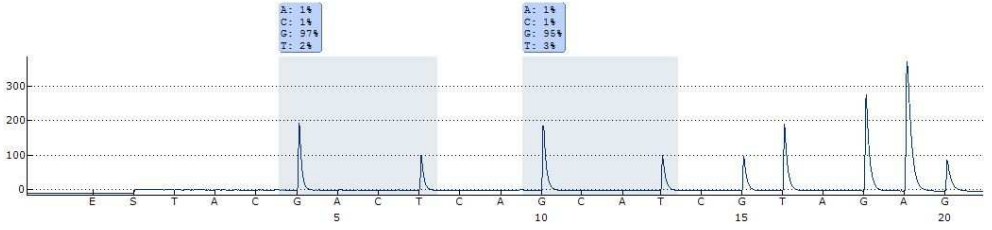
Şekil 8. KRAS 59/61 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



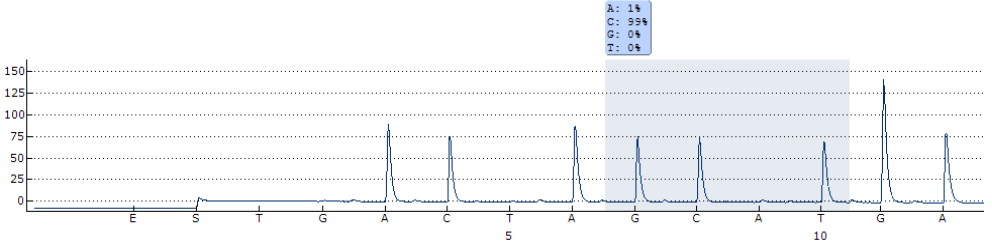
Şekil 9. KRAS 117 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



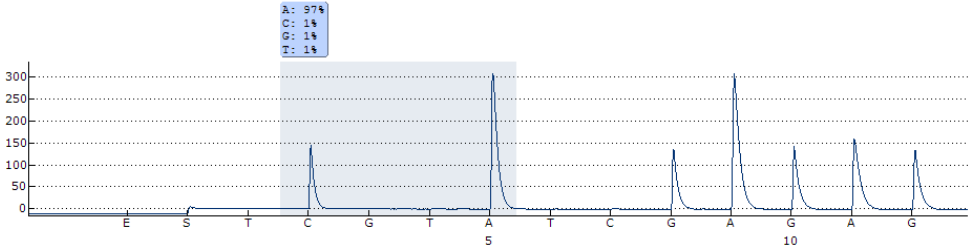
Şekil 10. KRAS 146 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



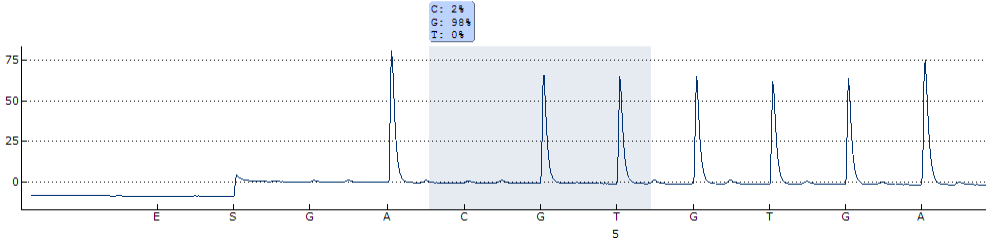
Şekil 11. NRAS 12/13 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



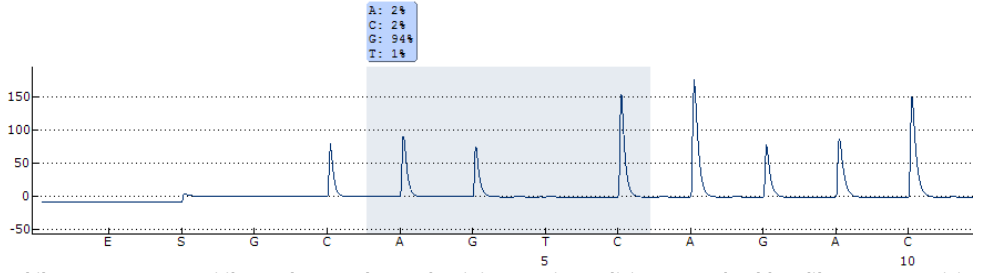
Şekil 12. NRAS 59 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



Şekil 13. NRAS 61 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



Şekil 14. NRAS 117 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.



Şekil 15. NRAS 146 testi ile yapılan örnek ve yabancı tip genotip analizi sonrasında elde edilen Pyrogram izi.

# Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN Teknik Servislerindeki uzmanlar her zaman bu el kitabındaki bilgiler ve protokoller ya da örnek ve test teknolojileriyle ilgili tüm sorularınızı yanıtlamaktan mutluluk duyar (iletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin).

## Yorum ve öneriler

### “Check” (Kontrol) veya “Failed” (Başarısız) sonucu

- a) Düşük pik yüksekliği
- Pyrosequencing işlemi öncesindeki PCR kurulumu veya örnek hazırlama aşamasında yapılan hatalar, düşük piklere sebep olabilir.
- Örneklerin vakum cihazı tarafından tamamen alınması önemlidir. Vakum cihazının örneklerle doğru yavaşça indirildiğinden ve immobilizasyon için kullanılan PCR plakasının veya şeritlerinin tüm örnekleri alabilecek bir şekilde sahip olduğundan emin olun.
- PyroMark Q24 User Manual*'da (PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu) belirtildiği şekilde, düzenli aralıklarla filtre problemleri için fonksiyon testi yapın ve filtre problemleri değiştirin.
- “Check” (Kontrol) uyarısı almanız durumunda, Pyrogram sonuçlarını, Pyrogram penceresine sağ tıklayarak görebileceğiniz histogramla dikkatlice karşılaştırın. Ölçülen pikler histogram çubuklarının yüksekliğiyle eşleşiyorsa sonuç geçerlidir. Aksi takdirde örneği yeniden çalışmanızı öneririz.
- b) “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) içinde mutasyon belirlenmedi
- Test kurulumunda “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemini ayarlayın (bkz. “Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu”, sayfa 64 ve çalışmayı yeniden analiz edin. “Sequences to Analyze” (Analiz Edilecek Sıralar) işleminin kapsamadığı mutasyonlar, düzen simülasyon aracı ile belirlenebilir.
- c) Beklenmedik mutasyon
- nadir
- Beklenmedik bir pik düzeni, “Check” (Kontrol) veya “Failed” (Başarısız) kalite değerlendirmesine yol açabilir. Bu da, “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi tarafından analiz edilmeyen, beklenmedik bir mutasyona işaret edebilir. Bu örnekler, beklenmedik mutasyonlar da düşünülerek alternatif “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi ile analiz edilmelidir. “Sequences to Analyze” (Analiz Edilecek Sıralar) işleminin kapsamadığı mutasyonlar, düzen simülasyon aracı ile belirlenebilir.

## Yorum ve öneriler

- d) Dağıtım için yüksek pik yüksekliği sapma uyarısı Pyrogram histogram ile dikkatlice karşılaştırılmalıdır; histogram, Pyrogram penceresine sağ tıklayarak görüntülenebilir. Ölçülen piklerin histogram çubuklarının yüksekliğiyle eşleşmemesi ve nadir mutasyonlarla açıklanamaması durumunda, örneğin yeniden çalışılması önerilir.

### Yüksek arkaplan

- a) Nükleotidlerin yanlış depolanması Nükleotidleri 2–8°C arasında saklayın. -15 ila -25°C'de saklamak arkaplanın yükselmesine neden olabilir.
- b) Pyrosequencing analizi öncesinde soğutma süresinin kısa tutulması Örnekleri, PyroMark Q24 plaka tutucuda 10–15 dakika boyunca oda sıcaklığında tutun. Soğutma süresini kısaltmayın.
- c) Kartuş kontaminasyonu Kartuşu, ürün kılavuzunda tarif edildiği şekilde dikkatlice temizleyin. Kartuşu tozdan ve ışıktan koruyarak saklayın.

### Pozitif kontrolde (demetile edilmiş kontrol DNA'sı) sinyal yok

- a) Tüm kuyular için yeterli olmayan enzim veya substrat karışımı PyroMark Q24 Kartuşunu "Tools" (Araçlar) menüsündeki "Pre Run Information" (Çalışma Öncesi Bilgiler) kısmında uygun olarak doldurun.
- b) Reaktiflerin yanlış saklanması veya seyreltilmesi Reaktifleri, "Reaktifi Saklama ve Kullanma", sayfa 15'deki ve "Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması", sayfa 31 içindeki talimatlar uyarınca hazırlayın.
- c) PCR veya örnek hazırlama hatası Kartuşu, ürün kılavuzunda tarif edildiği şekilde dikkatlice temizleyin. Kartuşu tozdan ve ışıktan koruyarak saklayın.



# Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *therascreen* RAS Extension Pyro Kit'in her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir.

## Sınırlamalar

Test KRAS veya NRAS genlerinde 37 mutasyon tespit etmek üzere tasarlanmıştır. "Mutasyon Tespit Edilmedi" olarak bildirilen sonuçlara sahip örnekler, testin tespit etmediği KRAS veya NRAS mutasyonlarını barındırabilir.

Mutasyonların tespit edilmesi, örneğin bütünlüğüne ve numune içindeki çoğaltılabilir DNA miktarına bağlıdır.

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanan bir prosedürde kullanılır. Tüm PCR prosedürlerinde olduğu gibi, örnekler test ortamındaki harici DNA kaynakları ve pozitif kontrol içinde DNA tarafından kontamine edilebilir. Kontrol ve reaksiyon karışımı reaktiflerinin kontamine olmasını önlemek için çok dikkatli olun.

Elde edilmiş herhangi bir tanı amaçlı sonucun diğer klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte yorumlanması gerekir.

# Performans Özellikleri

## Boş örnek sınırı ve tespit sınırı

Boş örnek sınırı (LOB) ve tespit sınırı (LOD), plazmid karışımları kullanılarak bir dizi mutasyon için belirlenmiştir (Tablo 10). LOB ve LOD, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline"* (NRAS 12, 13, 61 kodonları ve KRAS 61 kodonu için) ve *EP17-A2 "Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition"* (diğer tüm kodonlar için) içindeki önerilere göre belirlenmiştir.  $\alpha$  ve  $\beta$  hataları (sırasıyla hatalı pozitif ve hatalı negatif), %5 olarak ayarlanmıştır. LOB değerleri, yabancı tip bir örnekle belirlenmiş ölçülen frekansı temsil eder. LOD değerleri, ilgili mutasyon için pozitif olarak değerlendirilebilecek en düşük sinyali (ölçülen frekans) temsil eder.

**Tablo 10. Spesifik mutasyonlar için belirlenen LOB ve LOD**

Nükleik asit tayini	Amino asit tayini	LOB (% birim)	LOD (% birim)	COSMIC ID* (V70)
<b>KRAS kodon 59 (GCA)</b>				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
<b>KRAS kodon 61 (CAA)</b>				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
<b>KRAS kodon 117 (AAA)</b>				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
<b>KRAS kodon 146 (GCA)</b>				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
<b>NRAS kodon 12 (GGT)</b>				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
<b>NRAS kodon 13 (GGT)</b>				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) <sup>†</sup>	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) <sup>†</sup>	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

Nükleik asit tayini	Amino asit tayini	LOB (% birim)	LOD (% birim)	COSMIC ID* (V70)
<b>NRAS kodon 59 (GCT)</b>				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
<b>NRAS kodon 61 (CAA)</b>				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
<b>NRAS kodon 117 (AAG)</b>				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
<b>NRAS kodon 146 (GCC)</b>				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

\* [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) adresinde bulunan Sanger Institute web sitesindeki Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğundan alınmıştır.

† Örnekte ölçülen frekans  $\geq$  LOD ile sonuçlanan en düşük mutasyon seviyesi.

## NRAS kodon 13 içinde GGT > TGT ve GGT > GTT mutasyonları

Bu mutasyonlar için yapılan boş ölçümler genellikle %0 birim şeklindedir ve Gaussian olmayan dağılıma işaret eder. Bu nedenle LOD, CLSI Guideline EP17-A içindeki öneriler doğrultusunda farklı bir yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu konulardaki mutasyon varlığına işaret eden en düşük sinyal (LOD), boş ölçümlerin %95'lik kısmı tarafından tanımlanan ilgili taban seviyesinin %2 birim üzerinde olacak şekilde ayarlanmıştır. Tablo 9'da parantez içinde verilmiş mutasyon düzeyine sahip bir örneği incelerken, sonuçların %95'i (n = 72) pozitif sayılabilecek bir sinyal vermiştir ( $\geq$  LOD). LOB/LOD için bkz. 10.

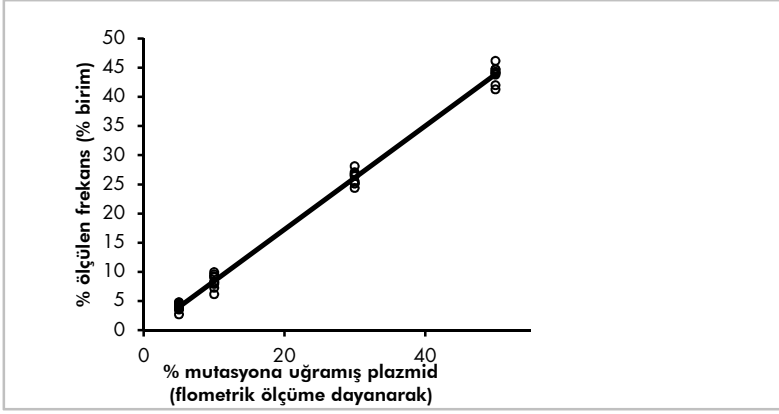
**Not:** NRAS geni 12, 13 ve 61 kodonlarının PCR ve Pyrosequencing primerleri, *therascreen* NRAS Pyro Kit (kat. no. 971530) içinden değişiklik yapılmaksızın alınmıştır. Bu NRAS kodonları için performans verileri değişiklik göstermez.

## Doğrusallık

Doğrusallık; KRAS 59 kodonundaki 176C>G, KRAS 117 kodonundaki 351A>T, KRAS 146 kodonundaki 436G>C, NRAS 12 kodonundaki 34G>A, NRAS 13 kodonundaki 37G>A, NRAS 59 kodonundaki 175G>A, NRAS 61 kodonundaki 182A>G, NRAS 117 kodonundaki 351G>C ve NRAS 146 kodonundaki 437C>T mutasyonlarının yabani tip veya mutant sıralamasını taşıyan plazmid karışımlar kullanılarak belirlenmiştir. Bu plazmidler, 4 seviye mutasyon verecek oranlarda karıştırılmıştır (%5, 10, 30 ve 50). Her bir karışım, *therascreen* RAS Extension Pyro Kit'te 3 farklı lot içinde, 3 Pyrosequencing çalışmasıyla 3'er kere analiz edilmiştir.

Sonuçlar (her mutasyon seviyesi için  $n = 9$ ), Analyse-it® Yazılımı v2.21 kullanılarak, CLSI Guideline EP6-A2 "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" uyarınca analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 16'da gösterilmektedir.

Sonuçlar, test edilen %5 ila 50 mutasyon düzeyinde %5 birimlik kabul edilebilir doğrusallık sapması kapsamında doğrusaldır. KRAS geni 59, 117, 146 kodonları ve NRAS geni 12, 13, 59, 61, 117, 146 kodonları içindeki dahil edilen tüm mutasyonlar için benzer sonuçlar alınmıştır.



Şekil 16. KRAS geni 59 kodonundaki 176C>G mutasyonunun doğrusallığı.

KRAS geni 59, 117, 146 kodonları ve NRAS geni 12, 13, 59, 61, 117, 146 kodonları içindeki dahil edilen tüm mutasyonlar için benzer sonuçlar alınmıştır.

## Hassasiyet

Hassasiyet verileri, testlerin toplam değişkenliğinin belirlenebilmesini sağlar ve yukarıda belirtilen plazmid karışımları ile 3 farklı düzeyde 3'er tekrar yapılması sonucu elde edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik (test içi ve partiler arası değişkenlik), doğrusallığın belirlenmesinde kullanılan verilere dayanarak hesaplanmıştır (*therascreen* RAS Extension Pyro Kit'in farklı lotlarında aynı gün içinde 3 çalışma). Orta düzey hassasiyet (laboratuvar içi değişkenlik), 3 farklı günde aynı laboratuvarında 3 çalışma yapılarak belirlenmiştir. Çalışmalar farklı kullanıcılar tarafından, PyroMark Q24 cihazları ve birçok *therascreen* RAS Extension Pyro Kit kullanılarak yapılmıştır. Yeniden üretilebilirlik (laboratuvarlar arası değişkenlik), her bir laboratuvarında 2 ayrı çalışmada farklı *therascreen* RAS Extension Pyro Kit lotları kullanılarak hesaplanmıştır.

Hassasiyet tahminleri, ölçülen mutasyon frekanslarının standart sapmasının % birim cinsinden karşılığı ile ifade edilir (Tablo 11).

**Tablo 11. Mutasyonların hassasiyeti\***

% Mutasyona uğramış plazmid†	Tekrarlanabilirlik		Orta düzey hassasiyet		Yeniden üretilebilirlik	
	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD
<b>KRAS geni 59 kodonundaki 176C&gt;G</b>						
5	4.0	0.7	3.8	0.6	4.2	1.1
10	8.4	1.2	8.5	1.0	8.4	1.4
30	26.1	1.2	26.3	1.1	26.8	1.2
50	43.9	1.5	44.0	0.7	43.7	1.3
<b>KRAS geni 117 kodonundaki 351A&gt;T</b>						
5	5.5	1.6	5.5	2.2	7.1	2.0
10	11.0	1.7	10.8	1.4	12.5	2.9
30	30.6	1.7	30.6	2.0	31.9	2.7
50	52.8	2.0	53.5	1.3	54.5	1.6
<b>KRAS geni 146 kodonundaki 436G&gt;C</b>						
5	4.2	0.6	4.1	0.5	3.7	1.2
10	9.6	0.9	9.1	0.9	8.6	1.3
30	29.0	0.9	28.8	1.0	28.1	1.1
50	47.5	1.5	46.8	0.7	45.6	1.9
<b>NRAS geni 12 kodonundaki 34G&gt;A†</b>						
5	7.5	1.2	7.3	1.0	6.7	1.3
10	14.6	1.3	13.5	1.1	13.7	1.3
30	37.8	1.9	37.9	1.5	36.1	2.9
50	59.8	1.7	60.4	2.0	57.5	3.1
<b>NRAS geni 59 kodonundaki 175G&gt;A</b>						
5	7.8	0.9	7.3	0.5	7.1	1.3
10	11.9	1.0	11.6	2.0	12.5	1.7

% Mutasyona uğramış plazmid†	Tekrarlanabilirlik		Orta düzey hassasiyet		Yeniden üretilebilirlik	
	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD
30	29.5	1.1	29.6	1.2	29.9	1.9
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4
<b>NRAS kodon 61 içinde 182A &gt; G</b>						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
<b>NRAS geni 117 kodonundaki 351G&gt;C</b>						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
<b>NRAS geni 146 kodonundaki 437C&gt;T</b>						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

\* Tüm değerler % birim cinsinden verilmiştir. SD: standart sapma (tekrarlanabilirlik ve orta düzey hassasiyet için n = 9, yeniden üretilebilirlik için n = 12).

† NRAS 12 kodonundaki 34G>A için OD260'a göre yapılan flometrik ölçüme dayanarak.



## Diyagnostik değerlendirme

*therascreen* RAS Extension Pyro Kit, 2 farklı araştırmada Sanger sıralaması ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

İlk araştırma, *therascreen* NRAS Pyro kitin Sanger sıralaması ile kıyaslanarak değerlendirilmesi için yapılmıştır. Formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) 100 adet tümör örneğinden kemik iliği DNA'sı alınmış ve 12/13 kodonlarındaki ve 61 kodonundaki mutasyonlar açısından analiz edilmiştir.

NRAS 12/13 ve 61 kodonlarını kapsayan tüm *therascreen* NRAS Pyro kit testleri, değiştirilmeden *therascreen* RAS Extension Pyro Kit'e dahil edildiği için *therascreen* NRAS Pyro kit değerlendirmesinden alınan sonuçlar gösterilmektedir.

İkinci araştırmada, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) 110 adet mCRC tümör örneğinden DNA alınmış ve insan KRAS geni 59, 61, 117 ve 146 kodonlarında ve insan NRAS geni 59, 117 ve 146 kodonlarında görülen mutasyonlar açısından analiz edilmiştir. Düşük frekanslı mutasyonlar, yabancı tip FFPE DNA ile ykseltilmş plazmid DNA kullanılarak analiz edilmiştir.

İki araştırmada da DNA, QIAamp DNA FFPE Doku Kiti kullanılarak izole edilmiş ve daha sonra PyroMark Q24'teki *therascreen* RAS Extension Pyro Kit içinde yer alan testler kullanılarak analiz edilmiştir. Sanger sıralamasını Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer gerçekleştirmiştir.

### NRAS geni 12, 13 ve 61 kodonlarının değerlendirmesi

Sanger sıralaması ile analiz edilen 100 örnekten 97'sinde hem 12/13 hem 61 kodonları için mutasyon tespit edilmiştir. 100 örnekten 4'nde, 12 veya 13 kodonundan birinde Sanger sıralaması kullanılarak mutasyon tespit edilmiştir.

100 örnekten 2'sinde, *therascreen* NRAS Pyro Kit kullanılarak mutasyon durumu yeniden üretilmiş ve mutasyon saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 12'de gösterilmektedir. 61 kodonunda hiçbir mutasyon tespit edilmemiştir.

Her iki yöntemde de başarısız sonuç veren örnekler hariç tutulduğunda, *therascreen* NRAS Pyro Kit ve Sanger sıralaması, 12/13 ve 61 kodonları için sırasıyla %98 ve %100 uyumluluk göstermiştir. Bkz. Tablo 12.

**Tablo 12. NRAS 12, 13 ve 61 için analiz edilen örneklerin sonuçları**

		Sanger sıralaması				Toplam
		12/13 kodonundaki mutant	61 kodonundaki mutant	Yabani tip	Bilinmiyor	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	12/13 kodonundaki mutant	2	-	-	-	2
	61 kodonundaki mutant	-	-	-	-	-
	Yabani tip	2	-	90	3	95
	Bilinmiyor	-	-	3	-	3
	Toplam	4	-	93	3	100

KRAS geni 59, 61, 117, 146 kodonlarının ve NRAS geni 59, 117, 146 kodonlarının değerlendirilmesi

Formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) 110 adet mCRC tümör örneğinden DNA alınmış ve insan KRAS geni 59, 61, 117 ve 146 kodonlarında ve insan NRAS geni 59, 117 ve 146 kodonlarında görülen mutasyonlar açısından analiz edilmiştir. Klinik örneklerdeki beklenen düşük miktar dolayısıyla, *therascreen* RAS Extension Kit'in kapsadığı tüm mutasyonlar, yabani tip FFPE DNA ile yükseltilmiş plazmid DNA örnekleri kullanan 56 örnekte daha analiz edilmiştir. Tüm mutasyonlar, hem Pyrosequencing hem Sanger sıralaması ile tespit edilmiştir.

---

Analiz edilen 166 örnek içinden 137 örnek için *therascreen* RAS Extension Pyro Kitten ile Sanger Sıralamasından alınan sonuçlar uyumludur (%83).

Uyumsuz örnekler birçok faktörle açıklanabilmektedir.

Yüksek arkaplan nedeniyle 20 örneğin NRAS 59 Sanger Sıralaması başarısız olmuştur.

KRAS 59 kodonunda 1, KRAS 61 kodonunda 3 örnek için Sanger sıralaması mutasyon saptamamıştır. Bu 4 mutasyon, Pyrosequencing işleminde düşük frekanslı sonuç vermiştir (%7,5–13,1). Bu durum, Sanger Sıralamasının (%15–20) Pyrosequencing (%5) işlemine göre daha düşük hassasiyete sahip olmasıyla açıklanabilir (2). Diğer tüm geçerli örnekler her iki teknik için yabancı tiptir.

Örneklerden bir tanesi, çift mutasyon (KRAS 59–61) tespit edildiğinden ötürü Pyrosequencing için bilinmiyor olarak sınıflandırılmıştır .

Yükselmiş plazmid DNA içeren dört örnek, KRAS kodlama sıralaması 350 konumunda ek bir A>G mutasyonu sergilemiştir ve *therascreen* RAS Extension Pyro Kit bunu kapsamamaktadır. Mutasyonlar manuel analizle tespit edilmiştir.

**Tablo 13. KRAS geni 59, 61, 117, 146 kodonlarının ve NRAS geni 59, 117, 146 kodonları için analiz edilen örneklerden alınan sonuçlar**

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS <sup>a</sup>	NRAS <sup>b</sup>	wt	Bilin- miyor	Top- lam	
iherascreen RAS Extension Pyro Kit	KRAS 59	8	-	-	-	-	-	1	9	
	KRAS 61	-	6	-	-	-	2	1	9	
	KRAS 117	-	-	4	-	-	-	-	4	
	KRAS 146	-	-	-	3	4	-	-	7	
	KRAS <sup>a</sup>	-	-	-	-	16	-	-	16	
	NRAS <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	28	-	28	
	wt	-	-	-	-	-	-	71	16	87
	UK	1	-	-	-	-	-	3	2	6
	<b>Toplam</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>20</b>	<b>28</b>	<b>76</b>	<b>20</b>	<b>166</b>

WT: Yabani tip

<sup>a</sup> KRAS 117 ve 146 mutasyonlarının her ikisini taşıyan yükseltilmiş KRAS örnekleri.

<sup>b</sup> NRAS 59, 117 ve 146 mutasyonlarını taşıyan yükseltilmiş NRAS örnekleri.

\* Bir adet örnek KRAS 146 için mutant olarak tespit edilmiş fakat NRAS 117 için geçersiz sonuç vermiştir.

Testlerin her bir kodon için Hassasiyeti ve Özgüllüğü Tablo 14'te verilmektedir.

**Tablo 14. KRAS geni 59, 61, 117, 146 kodonlarının ve NRAS geni 59, 117, 146 kodonlarının Hassasiyeti ve Özgüllüğü**

	Hassasiyet	Özgüllük	Kapsanan mutasyon
Mutation KRAS 59	100%	99%	175G>A / 176C>G
Mutation KRAS 61	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Mutation KRAS 117	100%	100%	351A>C / 351A>T
Mutation KRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Mutation NRAS 59	100%	100%	175G>A / 176C>G
Mutation NRAS 117	100%	100%	351G>C / 351G>T
Mutation NRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T















**Not:** Performans özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan tüm çalışmalarda, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) dokudan izole edilen 10 ng DNA'dan alınan örneklerde normal olarak görüldüğü üzere sinyal 30 RLU değerinin üzerinde çıkmıştır. Pyrosequencing verileri, KRAS geni 59, 117, 146 kodonları ve NRAS geni 59, 117, 146 kodonları için RAS Extension Eklenti Raporu kullanılarak analiz edilmiştir.

## Referanslar

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023.
2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

# Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
 $\Sigma$	<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir
	Son kullanma
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	
	Katalog numarası
	Lot numarası
	Materyal numarası
	Bileşenler
	İçerik
	Numara
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	Sıcaklık sınırlaması
	Üretici
	Kullanım talimatlarına bakın

**Sembol****Sembol tanımı**

---



Dikkat

## İletişim Bilgileri

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)** adresindeki Teknik Destek Merkezi'ne bakın, 00800-22-44-6000 numarasını arayın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine veya yerel dağıtıcılara başvurun (arka kapağa bakın veya **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** adresini ziyaret edin).

# Ek A: *therascreen* RAS Extension Pyro Testlerinin Kurulumu

RAS Extension Eklenti Raporu yüklenmişse, KRAS 59/61, 117 ve 146 ve NRAS 12/13, 59, 61, 117 ve 146 kodonları için kullanılan önceden tanımlanmış Test Kurulumları, PyroMark Q24 yazılımının tarayıcı kısayolunda bulunmaktadır. “Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension” (Örnek Dosyalar/PyroMark Kurulumları/RAS Extension) yolunu izleyin. Bu durumda aşağıdaki adımların uygulanması gerekmez.

RAS Extension Eklenti Raporu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde “Protocol Files” (Protokol Dosyaları) bölümündeki “Product Resources” (Ürün Kaynakları) sekmesi altında yer alan ilgili katalog sayfasından indirilebilir.

Manuel analizden önce RAS Extension Eklenti Raporunun kullanılmasını şiddetle tavsiye ederiz.

Eklenti yükledikten sonra veya her yeni yazılım yüklendiğinde veya var olan yazılım yükseltildiğinde, eklentinin doğru çalışıp çalışmadığı RAS Extension Plug-In Quick Guide (RAS Extension Eklenti Hızlı Başvuru Kılavuzu) yardımıyla kontrol edilmelidir.

RAS Extension Eklenti Raporu yüklenmemişse, *therascreen* RAS Extension Pyro testini ilk defa çalıştırmadan önce testin manuel olarak kurulması gerekir. KRAS 59/61, 117 ve 146 ile NRAS 12, 13, 59, 61, 117 ve 146 kodonları için PyroMark Q24 yazılımı kullanarak yapılacak test kurulumu aşağıdaki tarif edilmiştir.



## Prosedür

1.  araç çubuğuna tıklayın ve “New AQ Assay” (Yeni AQ Testi) seçeneğini seçin.
2. Tablo 15 da, her sekiz RAS Extension Pyro testi için “Sequences to Analyze” (Analiz Edilecek Sıralar) işlemi gösterilmektedir. “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) alanına teste özel sıralamayı girin.
3. “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemi, farklı konumlardaki mutasyonların analiz edilmesi amacıyla çalışmadan sonra da değiştirilebilir (bkz. “Protokol 6: PyroMark Q24 çalışmasının analizi”, sayfa 34).
4. Diğer nükleotidlerde de mutasyon olup olmadığını kontrol etmek için, “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemini Tablo 15 uyarınca değiştirin. “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) işlemini çalışmadan sonra değiştirmek mümkündür (kilitli değilse).  
**Not:** Tekli pik yüksekliği eşliğinin 30 RLU olarak ayarlandığından emin olun. Ek olarak, A pik azaltım faktörünün NRAS heni 61 kodonunun analizi için 0,86 olarak ayarlandığından emin olun.
5. Tablo 15 dan faydalanarak teste özel “Dispensation Order” (Dağıtım Emri) bilgisini manuel olarak girin.  
**Not:** “Generate Dispensation Order” (Dağıtım Emri Oluştur) düğmesini kullanmayın. Hem “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) hem “Dispensation Order” (Dağıtım Emri) manuel olarak girilmelidir.
6. “Analysis Parameters” (Analiz Parametreleri) sekmesine tıklayın, “Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality.” (Pik Yükseklik Eşliği – Geçer kalite için gerekli pik yüksekliği) değerini 30 olarak yükseltin.
7. Araç çubuğunda  simgesine tıklayın ve testi “KRAS 59/61” veya “KRAS 117” veya “KRAS 146” veya “NRAS 12/13” veya “NRAS 59” veya “NRAS 61” veya “NRAS 117” veya NRAS 146” olarak kaydedin.

**Tablo 15. Test kurulumu: *therascreen* RAS Extension Pyro Kit içindeki sekiz test için “Sequence to Analyze” (Analiz Edilecek Sıra) ve “Dispensation Order” (Dağıtım Emri)**

<b><i>therascreen</i> RAS Extension testi</b>	<b>Analiz Edilecek Sıra</b>	<b>Dağıtım Emri</b>
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

**Tablo 16.** İnsan KRAS geninde *therascreen RAS Extension Pyro Kit* tarafından ilgili "Sequence to Analyze" (Analiz Edilecek Sıra) ile tespit edilmiş yaygın görülen mutasyonlar

<b>Nükleik asit tayini</b>	<b>Amino asit tayini</b>	<b>Analiz Edilecek Sıra</b>	<b>Cosmic ID* (V70)</b>
<b>KRAS kodon 59 (GCA)</b>			
175G>A	A59T	CTCTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTGACCTNCTGT	28518
<b>KRAS kodon 61 (CAA)</b>			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
<b>KRAS kodon 117 (AAA)</b>			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
<b>KRAS kodon 146 (GCA)</b>			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

\* [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) adresinde bulunan Sanger Institute web sitesindeki Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğundan alınmıştır.


**Tablo 17. İnsan NRAS geninde therascreen RAS Extension Pyro Kit tarafından ilgili "Sequence to Analyze" (Analiz Edilecek Sıra) ile tespit edilmiş yaygın görülen mutasyonlar**

Nükleik asit tayini	Amino asit tayini	Analiz Edilecek Sıra	Cosmic ID* (V70)
<b>NRAS kodon 12 (GGT)</b>			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	565
<b>NRAS kodon 13 (GGT)</b>			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	575
<b>NRAS kodon 59 (GCT)</b>			
175G>A	A59T	ACAVCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	-
<b>NRAS kodon 117 (AAG)</b>			
351G>C	K117N	ABTGTGATT	-
351G>T	K117N	ABTGTGATT	-
<b>NRAS kodon 61 (CAA)</b>			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586

Nükleik asit tayini	Amino asit tayini	Analiz Edilecek Sıra	Cosmic ID* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
<b>NRAS kodon 146 (GCC)</b>			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

\* [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) adresinde bulunan Sanger Institute web sitesindeki Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğundan alınmıştır.

## Ek B: Atık Konteynerinin ve Olukların Boşaltılması

 <p>UYARI</p>	<p>Tehlikeli kimyasallar</p> <p>Vakum istasyonu ile birlikte kullanılan Denatürasyon Solüsyonu, gözlerde ve ciltte iritasyona sebep olabilen sodyum hidroksit içerir.</p> <p>Kullanırken daima gözlük, eldiven ve laboratuvar önlüğü takın.</p> <p>Sorumlu merci (örn. laboratuvar müdürü), çalışma ortamının güvenli olduğunu ve cihaz kullanıcılarının tehlikeli düzeylerde zehirli maddeye (kimyasal veya biyolojik) maruz kalmadığını temin etmek adına, Güvenlik Veri Sayfaları (SDS'ler) veya OSHA,* ACGIH† ve COSHH‡ belgeleri uyarınca gerekli önlemleri almak zorundadır.</p> <p>Dumana karşı havalandırma ve atıkların imha edilmesi, tüm geçerli ulusal, bölgesel ve yerel sağlık ve güvenlik düzenlemeleri ve yasaları uyarınca gerçekleştirilmelidir.</p>
---	--

\* OSHA: Mesleki Güvenlik ve Sağlık Dairesi (Occupational Safety and Health Administration) (ABD).

† ACGIH: Ulusal Endüstriyel Hijyenistler Konferansı (American Conference of Government Industrial Hygienists) (ABD).

‡ COSHH: Sağlık Açısından Tehlikeli Maddelerin Kontrolü (Control of Substances Hazardous to Health) (Birleşik Krallık).

Laboratuvar atıklarının imhası için geçerli ulusal, bölgesel ve yerel çevre mevzuatlarına uyduğunuzdan emin olun.

### Başlamadan önce önemli nokta

- Bu protokol yüksek saflıkta su kullanılmasını gerektirir.

---

## Prosedür

1. Vakum cihazına vakum uygulanmadığından emin olun. Vakumun kapalı konumda (Off) ve vakum pompasının kapatılmış olduğundan emin olun.
2. Oluklarda kalmış olabilecek solüsyonu temizleyin.
3. Olukları yüksek saflıkta su ile yıkayın veya gerekiyorsa değiştirin.
4. Atık konteynerini boşaltın.
5. Boruların bağlantısını kesmeden kapak çıkarılabilir.

Vakum istasyonunun temizlenmesi gerekiyorsa (örneğin toz veya dökülme nedeniyle), *PyroMark Q24 User Manual*'a (PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu) başvurun.

# Sipariş Bilgileri

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	24 reaksiyon için: Sıralama Primerleri, PCR Primerleri, Demetile Edilmiş Kontrol DNA'sı, PyroMark PCR Ana Karışımı, CoralLoad Konsantresi, Tamponlar ve Reaktifler	971590
PyroMark Q24 MDx	24 örneğin paralel olarak Pyrosequencing işlemine tabi tutulması için sıralama bazlı tespit platformu	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	PCR ürününden tek iplikli şablona kadar 24 örneğin paralel olarak hazırlanması için Vakum İstasyonu	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Analiz yazılımı	9019063
<b>Aksesuarlar</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 kuyulu sıralama reaksiyon plakası	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Nükleotidlerin ve reaktiflerin dağıtılması için kartuşlar	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	PyroMark Vakum İstasyonu Q96 ve Q24 için yeniden kullanılabilir filtre problemleri	979010
PyroMark Control Oligo	Sistemin kurulum kontrolü için	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Sistemin performans doğrulaması için	979304



Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<b>İlgili ürünler</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNA örneği için: 50 QIAamp MinElute® Sütunu, Proteinaz K, Tamponlar, Toplama Tüpleri (2 ml)	56404

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanıcı kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri ve yerel dağıtıcınızdan istenebilir.

---

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, thetascreen® (QIAGEN Grup); Analyse-it® (Analyse-it Software Ltd); Applied Biosystems®, Variomag® (Thermo Fisher Scientific); Axxygen® (Corning Inc.); FrameStar® (4titude Ltd); Milli-Q® (Merck Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); SmartBlock™, ThermoMixer® (Eppendorf AG); Windows® (Microsoft Corporation).

#### **thetascreen RAS Extension Pyro Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi**

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca panelin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu panel ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu panelin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu panel ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu panel ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenler dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Panelin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya panel ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

16 Mayıs HB-1882-002 © 2016 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

---

Ordering [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technical Support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)