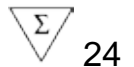


Instrukcja zestawu *therascreen*[®] EGFR Pyro[®] Kit



Wersja 1

IVD

Do diagnostyki in vitro

CE

REF 971480

HB 1061827EN

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3 **MAT** 1061827EN



Technologie badań i analizy firmy QIAGEN

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

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:

- ⌘ Oczyszczania DNA, RNA i białek
- ⌘ Analizy kwasów nukleinowych i białek
- ⌘ Badań nad mikroRNA oraz interferującym RNA
- ⌘ Automatyzacji technologii obróbki próbek i ich analizy

Naszą misją jest umożliwienie Państwu osiągnięcia znakomitych i przełomowych osiągnięć w prowadzonych analizach. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Przeznaczenie zestawu	5
Streszczenie i wyjaśnienie	5
Zasada metody	6
Dostarczane materiały	8
Zawartość zestawu	8
Materiały dostarczane przez użytkownika	10
Uwagi i ostrzeżenia	11
Informacje dot. bezpieczeństwa	11
Ogólne ostrzeżenia	12
Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami	13
Obchodzenie się i przechowywanie próbek	13
Procedura	14
Izolacja DNA	14
Protokół 1: Ustawienia systemu PyroMark Q24	15
Protokół 2: Reakcja PCR z wykorzystaniem odczynników PCR dołączonych do zestawu theascreen EGFR Pyro Kit	17
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR na kulkach pokrytych streptawidyną typu Streptavidin Sepharose Hight Performance (GE Healthcare) przed analizą z wykorzystaniem systemu PyroMark Q24.	20
Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą z wykorzystaniem pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24	22
Protokół 5: Uruchomienie PyroMark Q24	26
Protokół 6: Analiza reakcji z urządzenia PyroMark Q24	28
Interpretacja wyników	31
Interpretacja wyników analizy i wykrycie dalszych mutacji	31
Rozwiązywanie problemów	36
Kontrola jakości	39
Ograniczenia	39
Charakterystyki wydajności	40
Wartość próby ślepej i limit detekcji	40
Liniowość	43
Precyzja	43
Diagnostyka	44

Referencje	48
Symbole	49
Informacje kontaktowe	49
Załącznik A: Nastawianie analiz theascreen EGFR Pyro	50
Załącznik B: Opróżnianie pojemnika na odpady i korytek	54
Informacje dot. składania zamówień	55

Przeznaczenie zestawu

Zestaw *therascreen* EGFR Pyro jest testem *in vitro* opartym na wykrywaniu sekwencji zasad kwasów nukleinowych przy pomocy pirosekwencjonowania, w celu ilościowego oznaczania mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 ludzkiego genu EGFR w genomowym DNA pozyskanym z próbek ludzkich tkanek.

Zestaw *therascreen* EGFR Pyro jest przeznaczony do pozyskiwania informacji, dzięki którym pracownicy kliniczni będą mogli przeprowadzić selekcję pacjentów chorych na raka, u których zastosowanie terapii skierowanych przeciwko EGFR może okazać się najkorzystniejsze.

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

Do użytku z systemem PyroMark® Q24. System PyroMark Q24 zawiera następujące elementy:

- ⌚ Aparat PyroMark Q24 i aparat PyroMark Q24 MDx.
- ⌚ Próżniową stację roboczą PyroMark Q24 i próżniową stację roboczą PyroMark Q24 MDx.
- ⌚ Oprogramowanie PyroMark Q24 (wersja 2.0) i oprogramowanie PyroMark Q24 MDx (wersja 2.0).

Produkt przeznaczony jest do użytku przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy laboratoryjni i lekarze przeszkoleni w procedurach dot. diagnostyki *in vitro*, technik biologii molekularnej i obsługi systemu PyroMark Q24.

Streszczenie i wyjaśnienie

Zestaw *therascreen* EGFR Pyro pozwala na przeprowadzenie ilościowego pomiaru mutacji w kodonach 719, 768, 790 oraz 858-861, jak również delecji i złożonych mutacji w eksonie 19 ludzkiego genu EGFR.

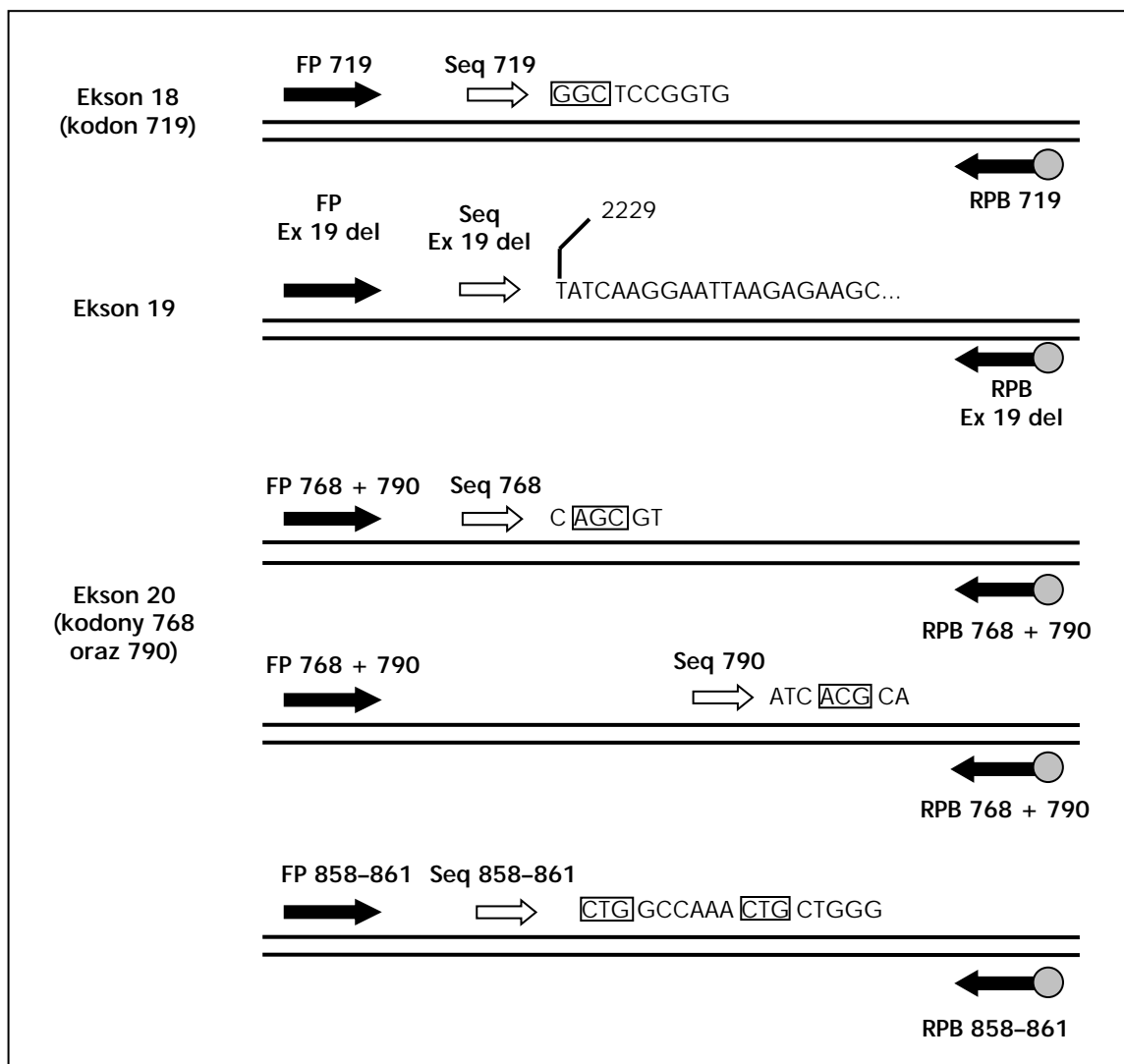
Zestaw składa się z czterech testów PCR (Rysunek 1) służących do wykrycia:

- ⌚ Mutacji w kodonie 719 (ekson 18)
- ⌚ Mutacji w kodonach 768 i 790 (ekson 20)
- ⌚ Mutacji w kodonach 858- 861 (ekson 21)
- ⌚ Delecji i złożonych mutacji w eksonie 19

Cztery wymienione wyżej regiony są amplifikowane oddzielnie przy pomocy PCR i sekwencjonowane w określonych regionach. Amplikon zawierający kodony 768 i 790 jest dzielony na dwie reakcje sekwencjonowania. Sekwencje otaczające określone pozycje służą jako normalizacja i punkt odniesienia do określenia ilości i jakości analizy.

Wszystkie analizy oparte są na sekwencjonowaniu w orientacji do przodu (forward).

Produkt zawiera mieszaninę starterów do PCR i starterów do sekwencjonowania każdego testu. Startery dostarczane są w formie roztworu. Każda fiolka zawiera 24 µl każdego ze starterów lub mieszaniny starterów.



Rys. 1. Graficzne przedstawienie testu EGFR. Prezentowana sekwencja to analizowana sekwencją próbki typu dzikiego. FP: Startery PCR forward; RPB: Startery PCR reverse (B oznacza biotynyłowanie); Seq: Startery sekwencjonowania.

Zasada metody

Schemat poniżej przedstawia zasadę działania testu. Po reakcji PCR z wykorzystaniem starterów dla eksonów 18, 19, 20 i 21, amplikony zostają unieruchomione na kulkach pokrytych streptawidyną (Streptavidin Sepharose® High Performance). Przygotowywane jest jednoniciowe DNA; odpowiadające startery sekwencjonujące przyłączają się do DNA. Próbkę jest następnie analizowana przy pomocy systemu PyroMark Q24, z wykorzystaniem pliku z ustawieniami analizy oraz pliku z analizy.

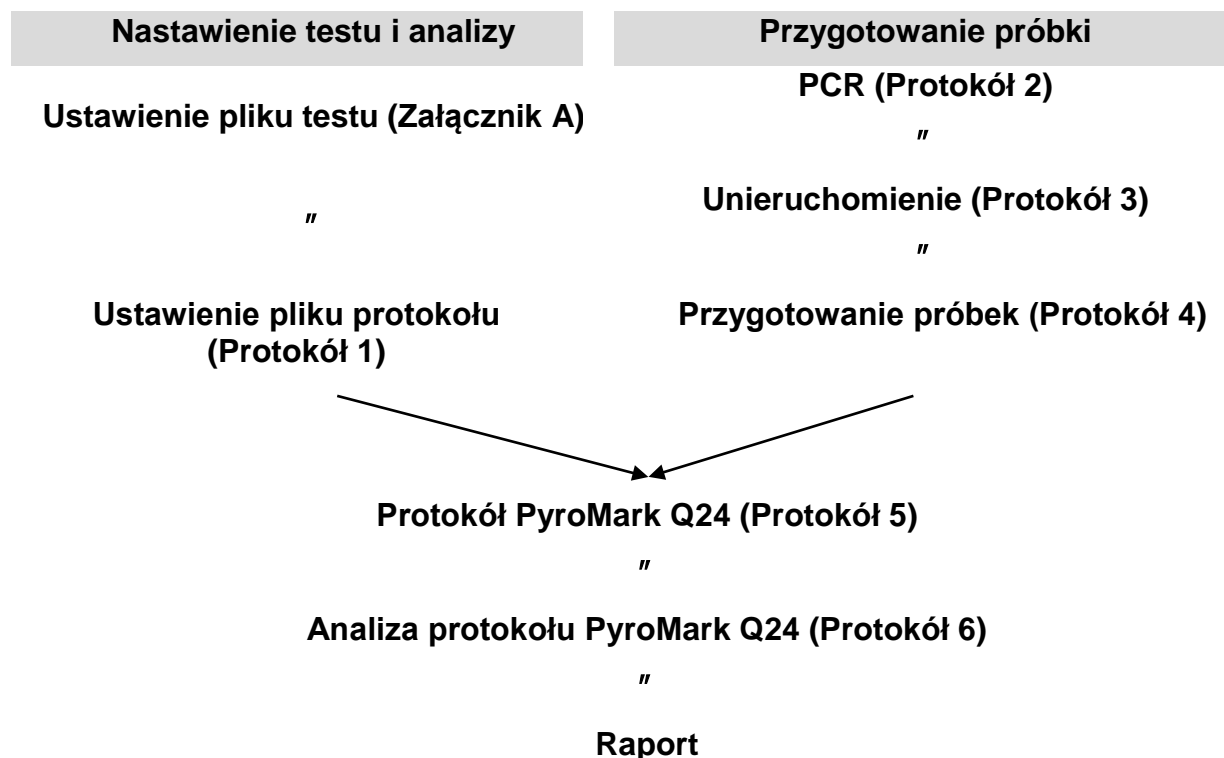
Zaleca się korzystanie z możliwości analizowania przebiegu procesu przez wtyczkę EGFR Plug-in Report, którą można otrzymać drogą mailową poprzez kontakt z pyro.plugin@qiagen.com.

Przebieg procesu można analizować również z wykorzystaniem zintegrowanego narzędzia do analizy, będącego częścią systemu PyroMark Q24. "Sequence to Analyze" (Sekwencja do analizy) może wtedy zostać przystosowana do wykrycia różnych delecji w eksonie 19 i rzadkich mutacji w innych eksonach po

przeprowadzeniu analizy (patrz: „Protokół 6: Analiza analizy na urządzeniu PyroMark Q24”, str. [28](#)).

Uwaga: W niniejszej wersji instrukcji zestawu *EGFR Pyro* zastosowano modyfikację poniższego schematu w porównaniu do wprowadzonej wcześniej korekty R1 (patrz: „Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą z wykorzystaniem pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24”, str. [24](#))

Schemat procedury *therascreen* EGFR Pyro



Kontrole

Niemetylowane DNA kontrolne będące częścią zestawu służy jako kontrola pozytywna reakcji PCR i sekwencjonowania. Jest to DNA o genotypie typu dzikiego w rejonach sekwencjonowanych z wykorzystaniem zestawu; jego zastosowanie jest konieczne do prawidłowej interpretacji wyników i identyfikacji niskopoziomowych mutacji (patrz: Interpretacja Wyników, str. [31](#)). Próbkę z niemetylowanym DNA kontrolnym należy umieścić w każdym badaniu każdego protokołu pirosekwencjonowania.

Dodatkowo należy umieścić kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) w każdym nastawieniu reakcji PCR lub w co najmniej jednym teście.


Dostarczane materiały

Zawartość zestawu

Zestaw *therascreen* EGFR Pyro Kit (pudełko 1/2)

Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	(24)
Nr katalogowy	971480
Liczba reakcji	24
Starter Seq EGFR 719	24 µl
Starter Seq EGFR Ex 19 Del	24 µl
Starter Seq EGFR 768	24 µl
Starter Seq EGFR 790	24 µl
Starter Seq EGFR 858–861	24 µl
Starter PCR EGFR 719	24 µl
Starter PCR EGFR Ex19 Del	24 µl
Starter PCR EGFR 768+790	24 µl
Starter PCR EGFR 858–861	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	2 x 850 µl
Koncentrat CoralLoad [®] , 10x	1,2 ml
H ₂ O	5 x 1.9 ml
Niemetylowane DNA kontrolne, 10 ng/µl	100 µl

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

Bufory i odczynniki <i>therascreen</i>		
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)		2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny)		2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Roztwór denaturujący) *		2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (Bufor do przemywania), 10x		2 x 25 ml
Enzyme Mix (Mieszanka enzymów)		2 fiołki
Substrate Mix (Mieszanka substratów)		2 fiołki
dATP α S		2 x 1180 μ l
dCTP		2 x 1180 μ l
dGTP		2 x 1180 μ l
dTTP		2 x 1180 μ l
Instrukcja		1

* Zawiera wodorotlenek sodu.

Materiały dostarczane przez użytkownika

Podczas pracy z chemikaliami należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki bezpieczeństwa (SDS), dostępnych u producentów.

- ☉ Zestaw do izolacji DNA (patrz : “Izolacja DNA”, str. [14](#))
- ☉ Pipety (regulowane)*
- ☉ Sterylne końcówki pipet (z filtrami; do nastawień reakcji PCR)
- ☉ Mikrowirówka stołowa*
- ☉ Termocykler* oraz odpowiednie probówki do PCR
- ☉ Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- ☉ PyroMark Q24 (nr kat. 9001513 lub 9001514)*†
- ☉ Oprogramowanie PyroMark Q24 (nr kat. 9019063 lub 9019062)†
- ☉ Płytko PyroMark Q24 (nr kat. 979301)†
- ☉ Kartridż PyroMark Q24 (nr kat. 979302)†
- ☉ Próżniowa Stacja Robocza PyroMark Q24 (nr kat. 9001515 lub 9001517)*†
- ☉ Blok grzewczy* zdolny do osiągnięcia temperatury 80°C
- ☉ 24-dołkowa płytka lub pasek do PCR
- ☉ Zatyczki paska
- ☉ Woda o wysokiej czystości (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm lub jej odpowiednik).
Uwaga: Odpowiednia woda jest dostarczana wraz z zestawami do PCR, immobilizacji DNA i rozpuszczania mieszaniny enzymów oraz mieszaniny substratów; dodatkowa ilość wody o wysokiej czystości jest potrzebna do rozcieńczenia buforu do przemywania PyroMark, 10x.
- ☉ Etanol (70%)‡

* Należy upewnić się, że urządzenia zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

† Oznaczone CE-IVD zgodnie z Dyrektywą Unijną 98/79/EC. Pozostałe wymienione produkty nie posiadają oznaczenia CE-IVD zgodnego z Dyrektywą Unijną 98/79/EC.

‡ Nie używać denaturatu, gdyż zawiera on inne substancje, takie jak metanol czy keton metylo-etylowy.

Rekomendowane wytrząsarki płytek

W przypadku użycia zestawu *therascreen* EGFR Pyro zaleca się korzystanie z wytrząsarek płytek przedstawionych w Tabeli 1.

Tabela 1. Rekomendowane wytrząsarki płytek do wykorzystania z zestawem *therascreen* EGFR Pyro Kit

Producent	Produkt	Numer katalogowy
Eppendorf	Thermomixer comfort (podstawowe urządzenie)	5355 000.011
	Termoblok do MTP	5363 000.012
	Płytki z adapterem na 96 próbówek do PCR o pojemności 0,2 ml, którą można umieścić w blokach płytek do mikromiareczkowania	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Uwagi i ostrzeżenia

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

Informacje dot. bezpieczeństwa

Podczas pracy z chemikaliami należy zawsze nosić odpowiednią odzież laboratoryjną, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki bezpieczeństwa (SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF na stronie www.qiagen.com/safety, gdzie można znaleźć, wyświetlić i wydrukować kartę charakterystyki dla każdego zestawu QIAGEN® i jego składników.

Poniższe wskazówki dotyczące zagrożeń i sygnałów ostrzegawczych odnoszą się do składników zestawu *therascreen* EGFR Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution (Roztwór Denaturujący)



Ostrzeżenie! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. Może powodować korodowanie metali. Rozlaną ciecz należy usunąć celem uniknięcia uszkodzenia materiału. Przechowywać wyłącznie w oryginalnym opakowaniu. Stosować rękawice i odzież ochronną, a także ochronę oczu i twarzy.

PyroMark Enzyme Mix (Mieszanina Enzymów)



Zawiera: (R*,R*)-1,4-Dimerkaptobutano-2,3-diol; kwas octowy. Niebezpieczeństwo! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne uszkodzenie wzroku. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Jeśli poszkodowany nosi soczewki i da się je łatwo usunąć, należy to zrobić. Kontynuować płukanie. W przypadku narażenia na styczość: skontaktować się z CENTRUM ZATRUĆ i/lub lekarzem. Zdjąć zabrudzoną odzież i wyprać przed ponownym użyciem. Stosować rękawice i odzież ochronną, a także ochronę oczu i twarzy.

PyroMark Substrate Mix (Mieszanina Substratów)



Zawiera: kwas octowy. Ostrzeżenie! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. W przypadku utrzymującego się podrażnienia oczu: Zasięgnąć porady medycznej/obserwacji. Zdjąć zabrudzoną odzież i wyprać przed ponownym użyciem. Stosować rękawice i odzież ochronną, a także ochronę oczu i twarzy.

Ogólne ostrzeżenia

Uwaga: Należy zawsze zwracać uwagę na następujące rzeczy:

- ⌚ Do otrzymania optymalnych wyników konieczne jest restrykcyjne postępowanie zgodnie z instrukcją użytkowania. Nie zaleca się rozcieńczania odczynników w sposób inny, niż opisano w instrukcji, gdyż może to skutkować spadkiem wydajności.
- ⌚ Schemat pracy został nieco zmodyfikowany (patrz: " Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą z wykorzystaniem pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24", str. [24](#)) w porównaniu z korektą R1 instrukcji zestawu *therascreen* EGFR Pyro.
- ⌚ Składniki niniejszego produktu wystarczą na przeprowadzenie 24 reakcji w maksymalnie 5 niezależnych procesach.
- ⌚ Należy używać sterylnych końcówek pipet z filtrami (do nastawień PCR).
- ⌚ Materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) należy pobierać i przechowywać oddzielnie od wszystkich innych odczynników i dodawać je do głównej mieszaniny reakcji z dala od siebie.
- ⌚ Wszystkie składniki należy rozmrozić do uzyskania temperatury pokojowej (15-25°C) przed rozpoczęciem analizy.

- ⌚ Po rozmrożeniu należy wymieszać składniki (przez pipetowanie lub wytrząsanie pulsacyjne) i krótko zwirować.
- ⌚ Wyniki badań zakończonych niepowodzeniem nie mogą stanowić podstawy do oceny statusu mutacji.

Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami

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

Bufory i odczynniki *therascreen* (pudełko 2/2) zawierają bufony, mieszaninę enzymów, mieszaninę substratów, dATP α S, dCTP, dGTP i dTTP (odczynniki do analizy przez pirosekwencjonowanie; są one dostarczane na wkładkach chłodzących. Po otrzymaniu składniki te należy przechowywać w $2-8^{\circ}\text{C}$. W celu zminimalizowania utraty aktywności zaleca się przechowywanie mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów w dołączonych fiolkach.

Rekonstruowane mieszaniny enzymów i substratów pozostają stabilne w temp. $2-8^{\circ}\text{C}$ przez min. 10 dni. Rekonstruowane mieszaniny enzymów i substratów można zamrozić i przechowywać w przeznaczonych im fiolkach w temp. -30°C do -15°C . Zamrożone odczynniki nie powinny być ponownie rozmrażane i zamrażane więcej niż 3-krotnie.

Uwaga: Nie powinno się mrozić nukleotydów.

Odpowiednio przechowywany zestaw *therascreen* EGFR Pyro zachowuje stabilności do wskazanej daty przydatności.

Obchodzenie się i przechowywanie próbek

Wszystkie próbki należy traktować, jako materiał potencjalnie zakaźny.

Próbki to ludzkie DNA pozyskane z krwi lub utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (FFPE) próbek.

Nie należy używać próbek pochodzących od osób leczonych heparyną. Nie należy stosować próbek krwi pobranych do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant. Heparyna ma wpływ na przebieg reakcji PCR.

Procedura

Izolacja DNA

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

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

Tabela 2. Sugerowane zestawy do oczyszczania DNA, które można wykorzystać w pracy z zestawem *therascreen* EGFR Pyro Kit

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

* Postępować zgodnie z protokołem przeznaczonym do pracy z tkankami FFPE. Zestaw EZ1 DNA Tissue powinien być używany w połączeniu z EZ1 Advanced (nr kat. 9001410 lub 9001411) i EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018298), z EZ1 Advanced XL (nr kat. 9001492) i z EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018700), lub z BioRobot[®] EZ1 (nr kat. 9000705; niedostępny) i EZ1 DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9015862).

[†] Z oznaczeniem CE-IVD zgodnym z Dyrektywą Unijną nr 98/79/EC.

Protokół 1: Ustawienia systemu PyroMark Q24

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- ☉ Jeśli jest to wymagane, można potwierdzić LOB przez użycie próbki typu dzikiego w celu wygenerowania pełnej płytki wyników. Szczegóły można znaleźć w CLSI Guideline EP17-A “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protokół do określania limitów detekcji i limitów pomiaru ilościowego; zatwierdzony przewodnik).

Przygotowania

- ☉ Jeśli nie zainstalowano wtyczki EGFR Plug-in Report, należy stworzyć Ustawienia Analizy (Assay Setups) (patrz: Załącznik A, str. 57). Należy zrobić to jedynie raz, przed pierwszym uruchomieniem analiz z *therascreen* EGFR Pyro. W przypadku, jeśli wtyczka EGFR Plug-in Report została wcześniej zainstalowana, w przeglądarce skrótów oprogramowania PyroMark Q24 znajdziesz uprzednio zdefiniowane Ustawienia Analizy (Assay Setups) pod ścieżką „Example Files /PyroMark Setups/EGFR”. Wtyczkę EGFR Plug-in Report można uzyskać drogą mailową przez kontakt z pyro.plugin@qiagen.com.

Procedura


1. **Kliknąć  na pasku narzędzi.**

Zostanie utworzony nowy plik analizy.

2. **Wprowadzić parametry analizy (patrz: “Parametry analizy”, str. 19).**
3. **Nastawić płytkę przez dodanie analiz dla 5 różnych reakcji sekwencjonowania w dołkach odpowiadających próbkom, które mają być analizowane.**

Uwaga: Próbką kontroli negatywnej (bez matrycy DNA) musi znaleźć się w każdym nastawieniu reakcji PCR w min. jednym teście.

Uwaga: W każdej analizie opartej na pirosekwencjonowaniu należy umieścić próbkę zawierającą niemetylowane DNA kontrolne (Patrz: “Kontrolne”, strona 7).

4. **Po zaprogramowaniu analizy i w momencie, gdy jest ona gotowa do uruchomienia w systemie PyroMark Q24, należy wydrukować listę wymaganych objętości mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów i nukleotydów, a także ustawienia płytki. Należy wybrać „Pre Run Information” (Informacje przed uruchomieniem) z menu „Tools” (Narzędzia), a po pojawieniu się raportu kliknąć .**

5. **Zamknąć plik analizy i skopiować na pamięć USB (dołączoną do systemu) przy pomocy Windows® Explorer (Eksploratora Windows®).**

Uwaga: Wydrukowane informacje na temat analizy mogą zostać użyte jako wzór nastawienia próbki (patrz: „Potokół 3: Unieruchomienie produktów PCR na kulkach pokrytych streptawidyną (...)”, str. 23)

Aby rozpocząć reakcję na płytce na urządzeniu PyroMark Q24, należy zapoznać się z „Protokołem 5: Uruchomienie PyroMark Q24”, str. 29.

Parametry analizy

Run name: (Nazwa analizy)	Nazwa analizy jest podawana po zapisaniu pliku. Zmiana nazwy pliku zmienia również nazwę analizy.
Instrument method: (Metoda urządzenia)	Należy wybrać metodę urządzenia zgodnie z kartridżem, który ma być użyty do analizy. Patrz: instrukcje dołączone do produktów.
Plate ID: (Identyfikator płytki)	Opcjonalne: Wprowadzanie identyfikatora płytki PyroMark Q24.
Bar code: (Kod kreskowy)	Opcjonalne: Można wprowadzić numer kodu kreskowego płytki lub, jeśli posiadają Państwo czytnik kodów kreskowych podłączony do komputera, można kliknąć kursorem myszy okienko tekstowe "Barcode" (Kod kreskowy) i zeskanować kod.
Kit and Reagent ID: (Identyfikator zestawu i odczynników)	Opcjonalne: Wprowadzanie numeru partii zestawu <i>therascreen</i> EGFR Pyro, który ma być użyty. Numer partii można znaleźć na opakowaniu. Uwaga: Zaleca się wprowadzenie zarówno identyfikatora odczynnika, jak i identyfikatora zestawu po to, by śledzić wszelkie nieoczekiwane problemy z odczynnikami.
Run note: (Notatki)	Opcjonalne: Wprowadzanie notatki o zawartości lub celu analizy.

Dodawanie plików analizy

Aby dodać analizę do dołki można wykonać jedną z poniższych czynności:

- ☞ Kliknąć prawym przyciskiem na studzienkę i wybrać "Load Assay" (Załaduj analiza) z menu kontekstowego.
- ☞ Wybrać analiza w przeglądarce skrótów, kliknąć je i przenieść na studzienkę.

Dołki są kodowane kolorami zgodnie z przypisanymi do nich analizami.

Wprowadzanie identyfikatorów próbek i notatek

Aby wprowadzić identyfikator próbki lub dodać notatkę, należy wybrać komórkę i wprowadzić tekst.

Edytowanie identyfikatora próbki lub notatki jest możliwe albo przez wybranie komórki (obecna zawartość zostanie zaznaczona), albo podwójne kliknięcie komórki.

Protokół 2: Reakcja PCR z wykorzystaniem odczynników PCR dołączonych do zestawu *therascreen* EGFR Pyro Kit

Ten protokół przeznaczony jest do 4 oddzielnych amplifikacji PCR z wykorzystaniem starterów *therascreen* EGFR Pyro w regionach zawierających kodon 719 (ekson 18), kodony 768 i 790 (ekson 20), kodony 858-861 (ekson 21) lub delecji i złożonych mutacji w eksonie 19.

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- ☉ Polimeraza DNA HotStarTaq® znajdująca się w mastermiksie PyroMark wymaga przeprowadzenia etapu aktywującego (15 minut w 95°C)
- ☉ Wszelkie mieszaniny potrzebne do reakcji należy przygotowywać z dala od miejsca oczyszczania DNA, dodawania matrycy DNA do PCR, analizy produktów PCR lub przygotowywania próbek przed analizą za pomocą pirosekwencjonowania.
- ☉ W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia krzyżowego, należy używać jednorazowych końcówek zawierających filtry hydrofobowe.

Przygotowania

- ☉ Przed otwarciem probówek ze starterami PCR należy je krótko zwirować celem zgromadzenia zawartości na dnie probówki.
- ☉ Jeśli to konieczne, należy doprowadzić stężenie kontroli i próbki DNA do 0,4-2 ng/μl.

Procedura

- 1. Rozmrozić wszystkie potrzebne składniki (patrz: Tabela 3).**
Dobrze wymieszać przed użyciem.
- 2. Przygotować mieszaninę reakcyjną każdego zestawu starterów PCR zgodnie z Tabelą 3.**
Mieszanina reakcyjna zawiera zwykle wszystkie składniki potrzebne do przeprowadzenia reakcji PCR, za wyjątkiem próbki.
Należy przygotować mieszaniny o objętości większej, niż wymagana do przeprowadzenia wszystkich zaplanowanych reakcji PCR.

Tabela 3. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych dla każdej mieszaniny starterów PCR

Składnik	Objętość na reakcję (µl)
2x Mastermix PCR PyroMark PCR	12,5
10x koncentrat CoralLoad	2,5
Starter PCR EGFR 719 lub Starter PCR EGFR Ex19 Del lub Starter PCR EGFR 768 i 790 lub Starter PCR EGFR 858–861	1,0
Woda (H ₂ O, dołączona do zestawu)	4,0
Objętość całkowita	20,0

- 3. Dokładnie wymieszać mieszaninę reakcyjną i dodać 20 µl do każdej próbki PCR.**

Nie ma potrzeby przechowywania próbek do PCR w lodzie, gdyż polimeraza DNA HotStarTaq pozostaje nieaktywna w temperaturze pokojowej.

- 4. Dodać 5 µl matrycy DNA (2–10 ng genomowego DNA) do każdej próbki do PCR (patrz: Tabela 4) i dokładnie wymieszać.**

Uwaga: Próbkę kontroli negatywnej (bez matrycy DNA) powinna znaleźć się w każdym nastawieniu reakcji PCR w min. 1 teście.

Uwaga: W każdej analizie opartej na pirosekwencjonowaniu należy umieścić próbkę zawierającą niemetylowane DNA kontrolne (Patrz: "Kontrole", strona [7](#)).

Tabela 4. Przygotowania do reakcji PCR

Składnik	Objętość na reakcję (µl)
Mieszanina reakcyjna	20
Próbka DNA	5
Objętość całkowita	25

- 5. Termocykler należy zaprogramować zgodnie z instrukcjami producenta, mając na uwadze warunki przedstawione w Tabeli 5.**

Tabela 5. Zoptymalizowany protokół PCR

			Komentarze
Początkowy etap aktywacji:	15 minut	95°C	Polimeraza DNA HotStarTaq jest aktywowana na etapie ogrzewania.
Cykle 3-etapowe:			
Denaturacja	20 sekund	95°C	
Hybrydyzacja	30 sekund	53°C	
Wydłużanie	20 sekund	72°C	
Liczba cykli	42		
Końcowe wydłużanie:	5 minut	72°C	

6. Umieścić próbki do PCR w termocyklerze i rozpocząć program cykli.
7. Po amplifikacji przejść do “Prokołu 3: Unieruchamianie produktów PCR na kulkach pokrytych streptawidyną typu Streptavidin Sepharose Hight Performance”, str. [23](#).

Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR na kulkach pokrytych streptawidyną typu Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) przed analizą z wykorzystaniem systemu PyroMark Q24.

Przygotowania

- ☪ Przed rozpoczęciem należy umożliwić wszystkim wymagany odczynnikom i roztworom uzyskanie temperatury pokojowej (15–25°C).

Procedura

1. Delikatnie wstrząsać butelką zawierającą Streptavidin Sepharose High Performance aż do otrzymania homogenicznego roztworu.
2. Przygotować mastermiks do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 6. Objętość mieszaniny powinna być o 10% większa niż objętość wymagana do przeprowadzenia całkowitej liczby zaplanowanych reakcji.

Tabela 6. Mastermiks do immobilizacji DNA

Składnik	Objętość na próbkę (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer (Bufor wiążący)	40
Woda (H ₂ O, dołączona do zestawu)	28
Objętość całkowita	70

3. Dodać 70 µl mastermiks do dołków 24-dołkowej płytki lub pasków do PCR tak, jak to wcześniej określono w nastawieniu reakcji (patrz: "Protokół 1: Ustawienia systemu PyroMark Q24, str. 17).
4. Dodać 10 µl biotynylowanego produktu PCR z Protokołu 2 do każdej dołki zawierającej mastermiks tak, jak to zdefiniowano w nastawianiu reakcji (patrz: "Protokół 1: Ustawienia systemu PyroMark Q24, str. 17).
Uwaga: Całkowita objętość po dodaniu mastermiks i produktu PCR do dołki powinna wynosić 80 µl.
5. Zabezpieczyć płytki do PCR (lub paski) przy pomocy korków do pasków.
Uwaga: Upewnić się, że pomiędzy studzienkami nie dojdzie do przeciekania.
6. Wytrząsać płytkę PCR w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut w 1400 rpm.
Uwaga: Podczas tego etapu należy przygotować próżniową stację roboczą PyroMark Q24 do przygotowania próbek tak, jak to opisano w instrukcji użytkownika aparatu PyroMark Q24.

7. **Niezwłocznie przejść do “Protokołu 4: Przygotowanie próbek przed analizą z wykorzystaniem pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24”, str. [22](#).**

Uwaga: Kulki pokryte sefarozą szybko opadają. Pobieranie kulek musi nastąpić tuż po ich wytrząsaniu.

Jeśli od wytrząsania płytki (lub paska) upłynęło ponad 60 sekund, przed pobraniem kulek należy je ponownie wytrząsać przez 1 minutę.

Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą z wykorzystaniem pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół służy do przygotowania jednoniciowego DNA i hybrydacji startera sekwencyjnego do matrycy przed zastosowaniem analizy pirosekwencjonowaniem na aparacie PyroMark Q24.

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- ☉ Przed otwarciem próbek ze starterami sekwencyjnymi, należy je krótko zwirować celem zgromadzenia zawartości na dnie próbówki.
- ☉ Dodać 5 różnych starterów sekwencyjnych w tej samej kolejności, jak to określono w ustawieniach płytki (patrz: „Protokół 1: Ustawienia systemu PyroMark Q24”, str. 17), zgodnie z regionem podlegającym analizie (kodon 719 [ekson 18], kodony 768 i 790 [ekson 20], kodony 858–861 [ekson 21] lub ekson 19).
- ☉ Schemat pracy został nieco zmodyfikowany w porównaniu z korektą R1 instrukcji zestawu *therascreen* EGFR Pyro (etap 18). Nie należy skracać czasu chłodzenia próbki po nagraniu do 80°C.
- ☉ Należy na bieżąco przeprowadzać testy funkcjonowania sond filtrujących tak, jak to opisano w instrukcji użytkowania PyroMark Q24 i wymieniać je, kiedy jest to wskazane.

Przygotowania

- ☉ Umieścić pojedynczy uchwyt na płytkę PyroMark Q24 na uprzednio nagrzanym do 80°C bloku grzewczym; będzie on potrzebny na etapie 17. Drugi uchwyt pozostawić w temperaturze pokojowej (15–25°C); będzie on potrzebny na etapie 18.
- ☉ Bufor do przemywania PyroMark dostarczany jest w formie 10x koncentratu. Przed pierwszym użyciem należy go rozcieńczyć do 1x mieszaniny roboczej przez dodanie 225 ml wody o wysokiej czystości do 25 ml 10x buforu do wymywania (objętość końcowa powinna wynosić 250ml).

Uwaga: 1x Roztwór roboczy buforu do wymywania PyroMark pozostaje stabilny w 2–8°C do dnia utraty ważności wskazanego na opakowaniu.

Procedura

1. **Rozcieńczyć odpowiednią ilość każdego startera sekwencyjnego (Starter Seq EGFR 719, Starter Seq EGFR 768, Starter Seq EGFR 790, Starter Seq EGFR 858–861 i Starter Seq EGFR Exon 19 Del) w buforze do hybrydacji PyroMark tak, jak to przedstawiono w Tabeli 7.**

Objętość przygotowywanego rozcieńczonego startera sekwencyjnego powinna być większa niż objętość wymagana do przeprowadzenia sekwencjonowania całkowitej liczby próbek (ilość próbek + jedna dodatkowa).

Tabela 7. Przykład rozcieńczenia starterów sekwencjonujących

Składnik	Objętość na reakcję (µl)	Objętość na 9 + 1 reakcji (µl)
Starter Seq EGFR 719 lub Starter Seq EGFR Ex 19 Del lub Starter Seq EGFR 768 lub Starter Seq EGFR 790 lub Starter Seq EGFR 858–861	0,8	8
Bufor do annealingu PyroMark	24,2	242
Objętość całkowita	25	250

- 2. Dodać 25 µl rozcieńzonego startera sekwencyjnego do każdego dołka płytki PyroMark Q24 tak, jak to wcześniej określono w ustawieniach reakcji (patrz: “Protokół 1: Ustawienia systemu PyroMark Q24, str. 17).**

Uwaga: Jeden z uchwytów płytki PyroMark Q24 (dostarczany razem z próżniową stacją roboczą) należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) i wykorzystywać w czasie przygotowywania i przenoszenia płytki.

- 3. Umieścić płytkę (lub paski) do PCR z Protokołu 3. i płytkę PyroMark Q24 Plate na stacji roboczej (Rys. 2).**

Uwaga: Upewnić się, że płytki znajdują się w tej samej pozycji, co w momencie ładowania próbek.

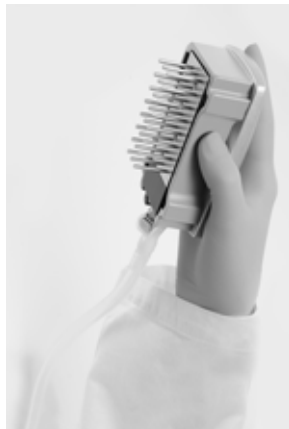


Rys. 2. Umieszczenie płytki (pasków) do PCR oraz płytki PyroMark Q24 na próżniowej stacji roboczej.

- 4. Zastosować działanie podciśnienia na urządzenie przez włączenie próżni.**

5. **Ostrożnie obniżyć sondy filtrujące urządzenia próżniowego do płytki (lub pasków) do PCR po to, by wyłapać kulki zawierające immobilizowaną matrycę. Przytrzymać sondy w tej pozycji przez 15 sekund. Zachować szczególną ostrożność podczas podnoszenia urządzenia próżniowego.**
Uwaga: Kulki sefarozy szybko opadają. Pobranie kulek musi nastąpić tuż po ich wytrząsaniu.

Jeśli od wytrząsania płytki (lub paska) upłynęło ponad 60 sekund, przed pobraniem kulek należy ją ponownie wytrząsać przez 1 minutę.
6. **Przenieść narzędzie próżniowe do korytka zawierającego 40 ml 70% etanolu (Rys. 2). Płukać sondy filtrujące przez 5 sekund.**
7. **Przenieść narzędzie próżniowe do korytka zawierającego 40 ml roztworu denaturującego (Rys. 2). Płukać sondy filtrujące przez 5 sekund.**
8. **Przenieść narzędzie próżniowe do korytka zawierającego 50 ml buforu do wymywania (Rys. 2). Płukać sondy filtrujące przez 10 sekund.**
9. **W celu osuszenia sond filtrujących należy na 5 sekund unieść urządzenie próżniowe w górę i w tył, ponad kąt 90° w pionie (Rys. 3).**
10. **W czasie gdy narzędzie próżniowe jest trzymane nad płytką PyroMark Q24 należy wyłączyć próżnię przestawiając wyłącznik na pozycję Off.**



Rys. 3. Graficzne przedstawienie narzędzia próżniowego podniesionego do pozycji powyżej 90° w pionie.

11. **Uwolnić kulki do płytki PyroMark Q24 przez obniżenie sond filtrujących do rozcieńzonego startera sekwencjonującego i delikatne poruszanie urządzeniem na boki.**
Uwaga: Należy zachować ostrożność i unikać uszkodzenia powierzchni płytki PyroMark Q24 przez jej zadrapanie sondami.
12. **Przenieść narzędzie próżniowe do korytka zawierającego wodę o wysokiej czystości (Rys. 2) i wytrząsać przez 10 sekund.**
13. **Umyć sondy filtrujące przez obniżenie ich do wody o wysokiej czystości (Rys. 2) i zastosowanie próżni. Przeplukać sondy 70 ml wody o wysokiej czystości.**
14. **W celu osuszenia sond filtrujących, należy na 5 sekund unieść urządzenie próżniowe w górę i w tył, ponad kąt 90° w pionie (Rys. 3)**
15. **Wyłączyć próżnię przestawiając wyłącznik na pozycję Off i umieścić urządzenie próżniowe w pozycji P (Parking).**

16. Wyłączyć pompę próżniową.

Uwaga: Pod koniec dnia pracy należy usunąć odpady i pozostałe roztwory, a próżniową stację roboczą PyroMark Q24 sprawdzić pod względem zakurzenia lub zalania płynami (patrz: Załącznik B, str. 55).

17. Podgrzać płytkę PyroMark Q24 z próbkami do temperatury 80°C przez 2 minuty przy pomocy wcześniej nagrzanego uchwyty płytki PyroMark Q24.

18. Usunąć płytkę PyroMark Q24 Plate z gorącego uchwyty i umieścić ją na drugim uchwycie trzymanym w temperaturze pokojowej (15–25°C), co pozwoli na schłodzenie próbki do temperatury pokojowej w ciągu 15-20 minut.

19. Przejść do “Protokołu 5: Uruchomienie PyroMark Q24, str.[26](#).

Protokół 5: Uruchomienie PyroMark Q24

Niniejszy protokół opisuje przygotowanie i ładowanie odczynników PyroMark Q24 do kartridża PyroMark Q24, a także rozpoczęcie i zakończenie pracy na aparacie PyroMark Q24. Szczegółowe informacje nt. ustawiania przebiegu analizy można znaleźć w instrukcji użytkownika PyroMark Q24.

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- ☉ Raport z przed rozpoczęcia pracy urządzenia można znaleźć w menu "Tools" (Narzędzia) w ustawieniach analizy (patrz: "Protokół 1: Ustawienia system PyroMark Q24", str. [17](#)); zawiera on informacje dot. objętości nukleotydów, enzymów i buforu substratu potrzebnych do przeprowadzenia konkretnego testu.

Przygotowania

- ☉ Włączyć PyroMark Q24. Włącznik znajduje się z tyłu urządzenia.

Procedura

- 1. Rozpuścić liofilizowane mieszaniny enzymów i substratów w 620 µl wody każdy (H₂O, w zestawie).**
- 2. Wymieszać zawartość fiolek przez delikatne obracanie.**

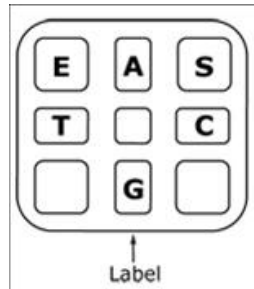
Uwaga: Do mieszania nie używać wortexu.

Uwaga: W celu zapewnienia całkowitego rozpuszczenia mieszaniny należy pozostawić ją na 5-10 minut w temperaturze pokojowej (15–25°C). Przed wypełnieniem kartridża PyroMark Q24 należy upewnić się, że mieszanina nie jest mętna. Jeśli odczynniki nie zostaną użyte natychmiast, fiołki należy umieścić w lodzie lub w lodówce.

- 3. Pozwolić odczynnikom i kartridżowi PyroMark Q24 na osiągnięcie temperatury otoczenia (20–25°C).**
- 4. Umieścić kartridż PyroMark Q24 etykietą do siebie.**
- 5. Uzupełnić kartridż odpowiednimi objętościami mieszanin nukleotydów, enzymów i substratów, zgodnie z Rys. 4.**

Należy upewnić się, że do kartridża nie dostały się żadne pęcherze powietrza z pipety.

*Podczas pracy z chemikaliami należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki bezpieczeństwa (SDS), dostępnych u producentów.



Rys. 4. Ilustracja przedstawiająca kartridż PyroMark Q24 widziany z góry.
 Adnotacje odpowiadają etykietom na fiolkach z odczynnikami. Dodać mieszaninę enzymów (E), mieszaninę substratów (S) i nukleotydy (A, T, C, G) w objętościach odpowiadających informacji znajdującej się w raporcie z nastawienia reakcji, który można znaleźć w menu “Tools” (Narzędzia) w ustawieniach reakcji.

6. Otworzyć klapkę kartridża i umieścić wypełniony kartridż z odczynnikami skierowany etykietą na zewnątrz. Wepchnąć kartridż do końca i w dół.
7. Należy upewnić się, że linia z przodu kartridża jest widoczna, a następnie zamknąć klapkę.
8. Otworzyć ramkę trzymającą płytkę i umieścić płytkę na bloku grzewczym.
9. Zamknąć ramkę i pokrywę urządzenia.
10. Włożyć pamięć USB (zawierającą plik protokołu) do gniazda USB z przodu urządzenia.
 Uwaga: Nie wyciągać pamięci przed zakończeniem analizy.
11. Wybrać “Run” (Uruchom) w głównym menu (przy pomocy przycisków 5 i 6 znajdujących się na ekranie) i nacisnąć “OK”.
12. Wybrać plik analizy przy pomocy przycisków 5 i 6 znajdujących się na ekranie
 Uwaga: Aby wyświetlić zawartość folderu należy wybrać folder i nacisnąć “Select” (Wybierz). Aby wrócić do poprzedniego widoku należy wcisnąć “Back” (Wróć).
13. Po wybraniu pliku analizy, należy wcisnąć “Select” (Wybierz), aby rozpocząć pracę.
14. Po zakończeniu analizy i potwierdzeniu przez urządzenie, że plik z analizą został zapisany na pamięci USB, należy nacisnąć “Close” (Zamknij).
15. Wyjąć pamięć USB.
16. Otworzyć pokrywę urządzenia
17. Otworzyć klapkę kartridża i wyjąć kartridż z odczynnikami przez podniesienie i wyciągnięcie.
18. Zamknąć klapkę.
19. Otworzyć ramkę trzymającą płytkę i usunąć płytkę z bloku grzewczego.
20. Zamknąć ramkę i pokrywę urządzenia.
21. Usunąć płytkę i wyczyścić kartridż zgodnie z instrukcjami zawartymi w karcie produktu dołączonej do kartridża.
22. Przeprowadzić analizę reakcji zgodnie z “Protokołem 6: Analiza reakcji z urządzenia PyroMark Q24”, str. [28](#).

Protokół 6: Analiza reakcji z urządzenia PyroMark Q24

Niniejszy protokół opisuje analizę mutacji zakończonej reakcji EGFR z wykorzystaniem oprogramowania PyroMark Q24.

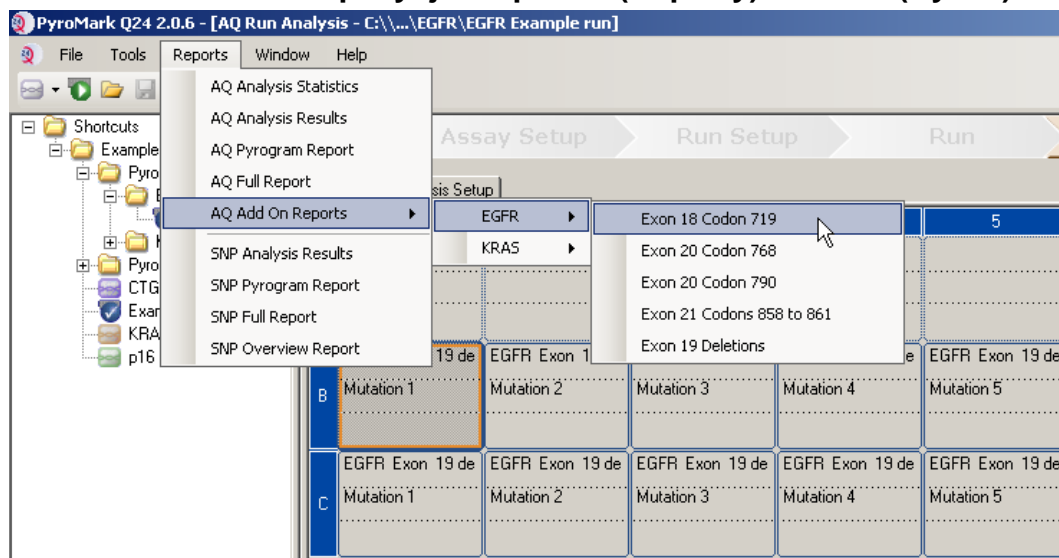
Procedura

1. Włożyć pamięć USB, na której zapisano plik z przeprowadzonej analizy do portu USB komputera.
2. Przenieść plik z pamięci USB do wybranego folderu przy pomocy programu Windows Explorer.
3. Otworzyć plik testu w trybie AQ oprogramowania PyroMark Q24 przez wybranie "Open" (Otwórz) w menu pliku lub podwójne kliknięcie pliku (☑) w przeglądarce skrótów.
4. Istnieją 2 metody analizowania analizy. W przypadku stosowania wtyczki EGFR Plug-in Report, należy przejść do etapu 5. W przypadku stosowania analizy AQ zintegrowanej z PyroMark Q24 - przejść do etapu 6.

Uwaga: Do interpretacji wyników zdecydowanie poleca się stosowanie wtyczki EGFR Plug-in Report. EGFR Plug-in Report można uzyskać przez kontakt drogą mailową pod adresem pyro.plugin@qiagen.com. Użycie tego typu raportu pozwala mieć pewność, że do automatycznego wykrycia wszelkich mutacji i delecji (wliczając w to zidentyfikowanie 20 różnych delecji i mutacji w eksonie 19) wykorzystywane są odpowiednie wartości LOD oraz różnorakie „Sequences to Analyze” (Sekwencje do analizy).

5. Użycie wtyczki EGFR Plug-in Report:

Wybrać "AQ Add On Reports/EGFR" i "Exon 18 Codon 719", "Exon 19 Deletions", "Exon 20 Codon 768", "Exon 20 Codon 790" lub "Exon 21 Codons 858 to 961" z pozycji "Reports" (Raporty) w menu (Rys. 5).



Rys. 5. Okno analizy reakcji w trybie AQ.

Dołki zostaną automatycznie przeanalizowane pod kątem mutacji, których LOD przedstawione jest w Tabeli 8. Wyniki zostaną przedstawione w tabeli podsumowującej (Rys. 6), a także jako szczegółowe wyniki zawierające pyrogramy i analizę jakości.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	del E746-A750	
A2	B105072	Wildtype			
A3	B116390	Mutation	26.6	delL747-P753insS	
A4	B116389	Wildtype			
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	delK745-E749	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	del E746-A750	
A7	WT control	Wildtype			
A8	NTC	Failed Analysis			⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

Rys. 6. Tabela podsumowująca wyniki.

6. Użycie analizy AQ:

Aby przeanalizować analiza EGFR i otrzymać przegląd wyników należy kliknąć jeden z przycisków służących do rozpoczęcia analizy.



Analizuj wszystkie dołki.



Analizuj wybrane dołki.

Wyniki analizy (częstotliwości alleli) i ocena jakości zostaną wyświetlone powyżej pozycji zmiennych na wykresie pyrogramu. Szczegółowe informacje nt. przeprowadzania analizy można znaleźć w instrukcji użytkownika PyroMark Q24.

Aby wygenerować raport należy wybrać pozycję “AQ Full Report” (Pełny raport) lub “AQ Analysis Results” (Wyniki analizy) z menu “Reports” (Raporty)

Uwaga: Standardowa “Sequence to Analyze” (Sekwencja do analizy) zdefiniowana w ustawieniach analizy odnosi się do najczęstszych mutacji w kodonach 719, 768, 790, 858 i 861 i najczęstszych delecji w eksonie 19 (patrz: Załącznik A, str. 51). Jeśli próbka zawiera rzadziej występujące mutacje, to można zmienić sekwencję w taki sposób, by analizie podlegała również mutacja w zadanym miejscu, tak, jak to opisano w Załączniku A.

Sanger Institute prowadzi uaktualnioną bazę częstotliwości mutacji ludzkiego genu EGFR; jest ona dostępna na stronie www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Uwaga: W celu uzyskania rzetelnych wyników zaleca się ustawienie wysokości odcięcia powyżej 20 RLU (w przypadku analizy kodonu 768) i powyżej 30 RLU (w przypadku pozostałych 4 badań). Należy ustawić wartość odpowiednio 20 lub 30 RLU jako „wymaganą wysokość odcięcia w przypadku pozytywnej kontroli jakości” w ustawieniach analizy (patrz: instrukcja użytkownika PyroMark Q24 i Załącznik A).

Uwaga: W celu przeprowadzenia prawidłowej analizy ilościowej kodonów 719 i 790, należy dostosować wysokość słupków na histogramie w ustawieniach analizy (patrz: Załącznik A, str. [51](#)).

Uwaga: Raport “AQ Analysis Results” (Wyniki Analizy AQ) powinien być używany do dokumentowania i interpretacji analizy ilościowej alleli. Liczby wskazane na pyrogramie są zaokrąglone i dlatego też nie pokazują dokładnych ilości.

Uwaga: Pyrogram powinien być zawsze porównywany z histogramem, który można wyświetlić klikając prawym przyciskiem myszy w oknie pyrogramu. Punkty pomiaru powinny odpowiadać wysokościami słupków na histogramie.

Ponowna analiza próbek bez wykrytych mutacji przy standardowej “Sequence to Analyze” (Sekwencji do analizy) lub z oceną jakości oznaczoną jako “Check” (Sprawdź) lub “Failed” (Nie zaliczono)

Zdecydowanie zaleca się ponowną analizę tych próbek, w których nie wykryto żadnych mutacji przy wykorzystaniu standardowej sekwencji do analizy, jak również próbek, które w kontroli jakości uzyskały wynik “Check” (Sprawdź) lub “Failed” (Nie zaliczono). Wyniki takie [“Check” i “Failed”] mogą wskazywać na mutację w innym miejscu, co skutkuje uzyskaniem nieoczekiwanych punktów odniesienia.

Aby ponownie przeanalizować próbkę celując w rzadsze mutacje, należy w “Analysis Setup” (Ustawieniach analizy) zmienić “Sequence to Analyze” (Sekwencję do analizy) zgodnie z opcjami przedstawionymi w Załączniku A lub innymi rzadkimi/niespotykanymi mutacjami. Należy kliknąć „Apply” (Zastosuj), a następnie „To All”(Do wszystkich), kiedy pojawi się okno “Apply Analysis Setup” (Zastosuj ustawienia analizy).

Uwaga: Po zmienienu “Sequence to Analyze” (Sekwencji do analizy), należy upewnić się, że progi wysokości pojedynczych punktów i wysokości słupków histogramu są odpowiednio skorygowane (patrz: Załącznik A, str. [51](#)).

Uwaga: Jeśli wysokości mierzonych punktów nie odpowiadają wysokościami słupków na histogramie, a różnica ta nie wynika z obecności rzadkiej lub nietypowej mutacji, wynik taki nie może podlegać ocenie pod kątem obecności mutacji. W takim wypadku należy ponownie zbadać próbkę.

Interpretacja wyników

Interpretacja wyników analizy i wykrycie dalszych mutacji

Zaleca się użycie niemetylowanego kontrolnego DNA w przypadku każdej analizy, celem porównania oraz jako kontrolę poziomów tła. Zmierzona częstotliwość próbki kontrolnej powinna być niższa lub równa wartości limitu próby ślepej (LOB).

Wszystkie próbki powinny podlegać ocenie w odniesieniu do limitu detekcji (LOD, patrz: Tabela 8) i interpretacji w następujący sposób:

- ☉ Częstotliwość mutacji < LOD: Typ dziki
- ☉ Częstotliwość mutacji \geq LOD i \leq LOD + 3%: Potencjalna mutacja niższego szczebla

Uwaga: W przypadku, gdy taka sytuacja ma miejsce w czasie analizy z wykorzystaniem wtyczki Plug-in Report (patrz: krok 5 "Protokołu 6: Analiza reakcji na urządzeniu PyroMark Q24", strona [28](#)) pojawi się ostrzeżenie.

Próbki, co do których istnieje podejrzenie występowania mutacji niskiej częstotliwości, powinny być uważane za pozytywne, jeżeli wynik potwierdza się przy ponownym badaniu próbki w duplikacie z próbką z niemetylowanym DNA kontrolnym. Wynik obydwu duplikatów powinien być \geq LOD i różny od próbki kontrolnej. W innym przypadku próbki ocenia się jako typ dziki.

- ☉ Częstotliwość mutacji > LOD + 3%: Mutacja

W przypadku korzystania z wtyczki EGFR Plug-in Report, interpretacja przeprowadzana jest automatycznie.

Uwaga: Zaleca się stosowanie wtyczki EGFR Plug-in Report do interpretacji wyników. W przypadku szczegółowej oceny próbek z potencjalną mutacją niskiej częstotliwości, zaleca się dodatkową, manualną analizę próbki przy pomocy odpowiedniego oprogramowania (np. do porównania z częstotliwością mutacji próbki kontrolnej).

Uwaga: Częstotliwość, której wartość w próbce kontrolnej przekracza LOB, wskazuje na wyższy niż zazwyczaj poziom tła w stosownym badaniu, co może mieć wpływ na obliczanie alleli, zwłaszcza w przypadku mutacji niskiej częstotliwości. W tym przypadku częstotliwości w skali od LOD (Tabela 8) do LOD + 3% nie powinny podlegać ocenie pod kątem mutacji. Próbkę z potencjalną mutacją niskiej częstotliwości należy poddać ponownemu badaniu.

Uwaga: Decyzja o leczeniu pacjentów z nowotworem nie powinna opierać się wyłącznie na wykryciu mutacji genu EGFR.

Tabela 8. LOB i LOD określone dla poszczególnych mutacji

Mutacja	Podstawienie aminokwasu	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V47)
Delecje w eksonie 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Z "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (Katalog Mutacji Somatycznych w Nowotworach), dostępny online na stronie Sanger Institute www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] Wartości LOD delecji w eksonie 19 zostały określone przez dodanie sześciu odchyłeń standardowych wartości próby ślepej do wartości LOB.

Tabela kontynuowana na następnej stronie

Tabela 8. Kontynuacja

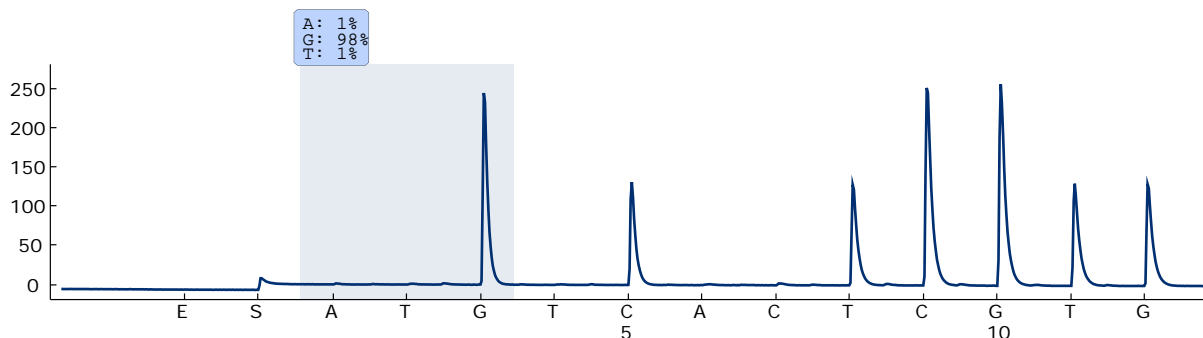
Mutacja	Podstawienie aminokwasu	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V47)
Ekson 18 kodon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Ekson 20 kodon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Ekson 20 kodon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Ekson 21 kodon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Ekson 21 kodon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

*Z "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (Katalog Mutacji Somatycznych w Nowotworach), dostępny online na stronie Sanger Institute www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

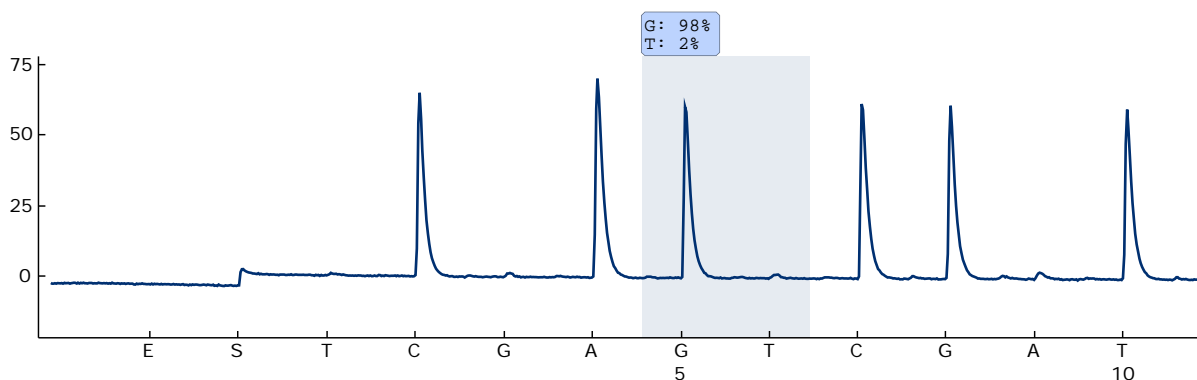
‡ Najniższy poziom mutacji w próbce dający częstotliwość ³ LOD.

Wyniki reprezentatywne

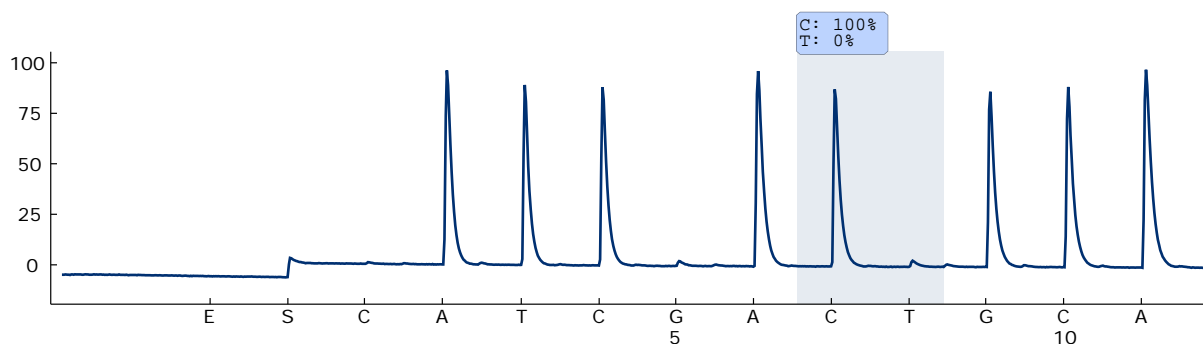
Wyniki reprezentatywne pyrogramów przedstawiono na rysunkach 7–14.



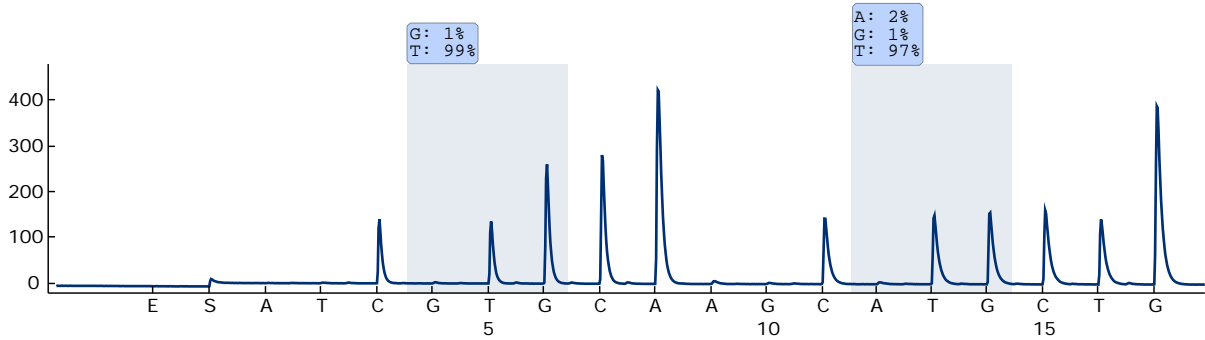
Rys. 7. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki o genotypie typu dzikiego w kodonie 719 z “Sequence to Analyze” (Sekwencją do analizy) DGCTCCGGTGC.



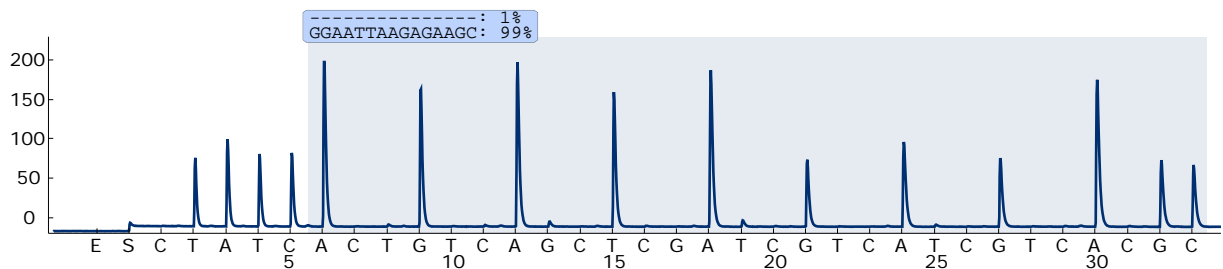
Rys. 8. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki o genotypie typu dzikiego w kodonie 768 z “Sequence to Analyze” (Sekwencją do analizy) CAKCGTG.



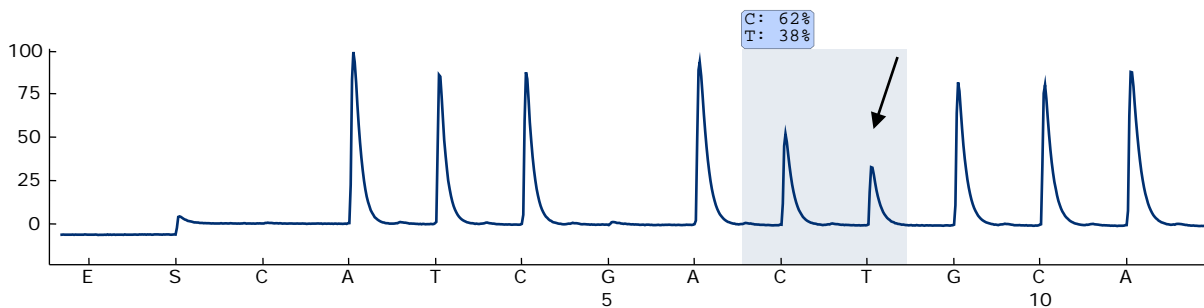
Rys. 9. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki o genotypie typu dzikiego w kodonie 790 z “Sequence to Analyze” (Sekwencją do analizy) ATCAYGCAG.



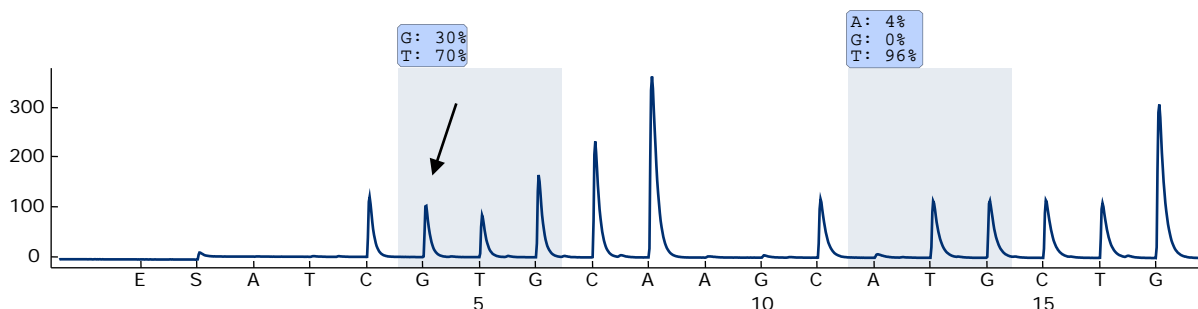
Rys. 10. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki o genotypie typu dzikiego w kodonach 858–861 z “Sequence to Analyze” (Sekwencją do analizy) CKGGCCAAACDGCTGGGT.



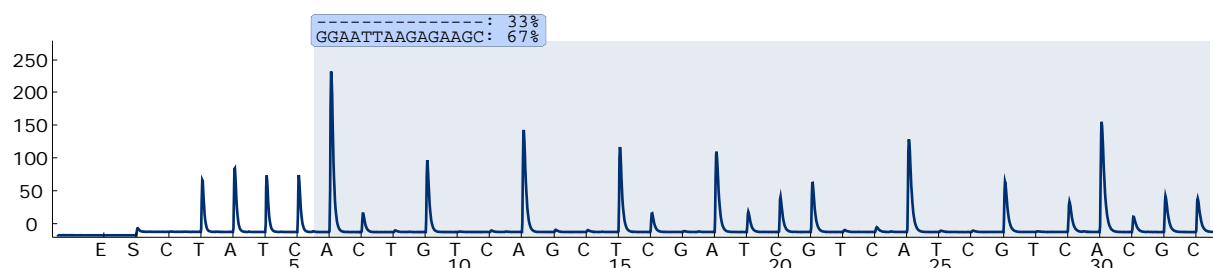
Rys. 11. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki o genotypie typu dzikiego w eksonie 19.



Rys. 12. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki z mutacją ACG → ATG w 2 zasadzie kodonu 790 (wskazana strzałką).



Rys. 13. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki z mutacją CTG à CGG w 2 zasadzie kodonu 858 (wskazana strzałką).



Rys. 14. Wykres pyrogramu uzyskany po przeanalizowaniu próbki z delecją 2235del15 w eksonie 19.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Naukowcy z Działu Pomocy Technicznej firmy QIAGEN www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx z chęcią odpowiedzą na wszystkie Państwa pytania dotyczące zarówno informacji i opisów protokołów zawartych w tej instrukcji obsługi, jak i technologii wykonania oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej okładce lub na stronie www.qiagen.com).

Uwaga: W przypadku problemów związanych z obsługą urządzenia, należy zapoznać się z instrukcją aparatu PyroMark Q24.

Komenatrze i sugestie

Sygnaly w kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

- | | |
|---|--|
| a) Przeciekanie sygnału między studzienkami | Sygnal z jednego dołka jest wykrywany w sąsiednim. Należy unikać umieszczania próbek z intensywnym sygnałem obok dołków z kontrolą bez matrycy. |
| b) Zanieczyszczenie PCR | Używać sterylnych końcówek pipet z filtrami. Materiały takie jak próbki, kontrole czy amplikony należy pobierać i przechowywać z dala od odczytników do reakcji PCR. |

Słaba lub nieoczekiwana sekwencja

- a) Niska jakość genomowego DNA Niska jakość genomowego DNA może skutkować niepowodzeniem reakcji PCR. Próbkę PCR należy analizować z wykorzystaniem techniki elektroforetycznej (np. QIAxcel® System lub techniki elektroforetyczne na żelu agarozowym).

Status wyniku “Check” (Sprawdź) lub “Failed” (Nie zaliczono)

- a) Niskie piki Błędy w obsłudze w czasie nastawiania PCR lub przygotowywania próbki do pirosekwencjonowania mogą skutkować uzyskaniem niskich pików. Należy przeprowadzić test funkcjonalności sond filtrujących, zgodnie ze wskazaniem zawartymi w instrukcji obsługi aparatu PyroMark Q24 w zwykłych warunkach, a także wymienić sondy filtrujące, jeśli jest to wskazane.
- W przypadku ostrzeżenia “Check” (Sprawdź) należy uważnie porównać pyrogram z histogramem, który można wyświetlić klikając prawym przyciskiem w oknie pyrogramu. Jeśli zmierzone piki odpowiadają wysokości słupków histogramu, wynik jest poprawny. W przeciwnym wypadku, należy przeprowadzić ponowną analizę próbki.
- b) W “Sequence to Analyze” (Sekwencji do analizy) nie wykryto mutacji Dostosować sekwencję w ustawieniach analizy (patrz: Załącznik A, str. [51](#)) i przeprowadzić ponowną analizę testu.
- c) Nieoczekiwana rzadka mutacja Ocena jakości o statusie “Check”(Sprawdź) lub “Failed”(Nie zaliczono) może być spowodowana nieoczekiwanym schematem punktów szczytowych. Może on wskazywać na nieoczekiwaną mutację, która nie podlega analizie zgodnej z “Sequences to Analyze” (Sekwencjami do analizy). Takie próbki należy przeanalizować z wykorzystaniem alternatywnych sekwencji obejmujących nieoczekiwane mutacje.
- d) Ostrzeżenie o wysokim odchyleniu wysokości punktu dla dozowania x Pyrogram należy uważnie porównać z histogramem, który można wyświetlić klikając prawym przyciskiem w oknie pyrogramu. Jeśli zmierzone punkty nie odpowiadają wysokości słupków histogramu i nie da się tego wytłumaczyć rzadkimi mutacjami, należy przeprowadzić ponowną analizę próbki.

Komentarze i sugestie

- d) Ostrzeżenie
“Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8”
pojawiające się w czasie analizy w kodonie 790
- e) Ostrzeżenie
“Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10” -
pojawiające się w czasie analizy w kodonach 790
- f) Ostrzeżenie “Uncertain due to high peak height deviation at dispensation: 23.”
pojawiające się w przypadku wykrycia delekcji 2235del15.
- Sygnal w tle dozowania T8 jest niższy od spodziewanego poziomu. Należy przywrócić wysokość histogramu do wartości domyślnej (1,00, możliwe wyłącznie w przypadku analizy z wykorzystaniem narzędzia integralnego z oprogramowaniem PyroMark Q24 Software).
- Wysoki poziom mutacji CTG>CGG w kodonie 858 (L858R) może skutkować zwiększonym tłem w dozowaniach G-10 i A-12 oraz częstotliwością powyżej LOD w przypadku mutacji ATG>CAG w kodonie 861 (L861Q). W tym przypadku wiarygodna jest jedynie wskazana mutacja L585R, a ostrzeżenie oraz status jakości “Check”(Sprawdź) można zignorować.
- Uwaga:** Wtyczka EGFR Plug-in Report wskaże tylko jedną mutację (tj. mutację z najwyższą częstotliwością).
- Wysoki poziom delekcji 2235del15 może skutkować pojawieniem się ostrzeżenia. W tym wypadku wskazana mutacja może zostać uznana za wiarygodną, a ostrzeżenie oraz status jakości “Check”(Sprawdź) można zignorować.

Wysokie tło

- a) Nieprawidłowe przechowywanie nukleotydów
- b) Krótki czas chłodzenia próbki przez analizę z wykorzystaniem pirosekwencjonowania
- c) Zanieczyszczenie kartridża
- Nukleotydy przechowywać w 2–8°C. Przechowywanie w temp. od –15 do –25°C może powodować wzrost tła.
- Próbkę należy pozostawić w uchwycie płytki PyroMark Q24 w temperaturze pokojowej na 10–15 minut. Nie skracać czasu chłodzenia.
- Ostrożnie wyczyścić kartridż tak, jak to opisano w karcie produktu. Kartridż przechowywać z dala od światła i pyłu.

Brak sygnału kontroli pozytywnej (niemetylowane DNA kontrolne)

- a) Niedostateczna ilość mieszaniny enzymów lub substratów w stosunku do ilości dołków
- Upewnić się, że kartridż PyroMark Q24 został uzupełniony zgodnie z informacjami z przygotowań do analizy (“Pre Run Information”) w menu “Tools” (Narzędzia).

Komentarze i sugestie

- | | |
|--|--|
| b) Odczynniki nieprawidłowo przechowywane lub nieprawidłowo rozcieńczane | Odczynniki <i>therascreen</i> przygotować zgodnie z instrukcją podaną w "Protokole 5: Uruchomienie PyroMark Q24", str. 26 . |
| c) Niepowodzenie reakcji PCR lub przygotowania próbki | Błędy w obsłudze w czasie nastawiania PCR, programowania cyklera PCR lub przygotowania próbki do pirosekwencjonowania mogą skutkować brakiem sygnałów. Należy przeprowadzić test funkcjonalności sond filtrujących, zgodnie ze wskazaniami zawartymi w instrukcji obsługi aparatu PyroMark Q24 pod zwykłymi warunkami, a także wymienić sondy filtrujące, jeśli jest to wskazane. Powtórzyć reakcję PCR i analizę pirosekwencjonowaniem. |

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN, każda seria zestawu *therascreen* EGFR Pyro jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

Ograniczenia

Wszelkie wygenerowane wyniki diagnostyczne muszą być interpretowane w połączeniu z innymi wynikami badań laboratoryjnych i klinicznych.

Zwalidowanie wydajności systemu, z uwzględnieniem procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte przez analizy w celu oceny działania prowadzonych przez firmę QIAGEN, leży w gestii użytkownika.

Charakterystyki wydajności

Wartość próby ślepej i limit detekcji

Wartości limitu próby ślepej (LOB) i limitu detekcji (LOD) zostały określone dla danej liczby mutacji z wykorzystaniem mieszanin plazmidów (Tabela 9). LOB i LOD zostały określone zgodnie z zaleceniami Instytutu Clinical and Laboratory Standards (CLSI) zawartymi w: Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Wskazania EP17-A "Protokół określania limitów detekcji i wartości próby ślepej; zatwierdzone wytyczne"). a- i b-błędy (odpowiednio: fałszywe pozytywne i fałszywe negatywne) zostały określone na poziomie 5%. LOD niektórych rzadkich delecji w eksonie 19 został określony przez dodanie sześciu odchyień standardowych pomiarów ślepych do wartości LOB.

Wartości LOB przedstawiają zmierzone częstotliwości otrzymane z próbki typu dzikiego. Wartości LOD przedstawiają najniższy sygnał (z mierzonych częstotliwości), który może być uważany za pozytywny dla danej mutacji.

Mutacja CTG → CGG w kodonie 858

W przypadku mutacji CTG → CGG w kodonie 858, pomiary próbek z niskimi poziomami mutacji nie przedstawiają rozkładu Gaussa. Z tego powodu LOD zostało określone przy pomocy innej metody, zgodnie z zaleceniami zawartymi w CLSI Guideline EP17-A. Najniższy sygnał wskazujący na obecność mutacji (LOD) w tych pozycjach został określony na 2% powyżej odpowiedniego poziomu początkowego zdefiniowanego przez 95 percentyl pomiarów ślepych. Podczas analizy próbki z poziomem mutacji o wartości %, 95% wyników (n=72) dało sygnał, który można uznać za pozytywny (3 LOD, tj. 3 2,6%).

Tabela 9. LOB i LOD określone dla poszczególnych mutacji

Mutacja	Podstawienie aminokwasu	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V47)
Delecje w eksonie 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Z "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (Katalog Mutacji Somatycznych w Nowotworach), dostępny online na stronie Sanger Institute www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] LOD przedstawionych delecji w eksonie 19 został określony przez dodanie sześciu odchyłeń standardowych próby ślepej do wartości LOB

Tabela kontynuowana na następnej stronie.

Tabela 9. Kontynuacja

Mutacja	Podstawienie aminokwasu	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V47)
Ekson 18 kodon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Ekson 20 kodon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Ekson 20 kodon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Ekson 21 kodon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Ekson 21 kodon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Z "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (Katalog Mutacji Somatycznych w Nowotworach), dostępny online na stronie Sanger Institute www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

‡ Najniższy poziom mutacji w próbce dający częstotliwość ³ LOD.

Uwaga: Niniejsze wartości zostały oparte na analizach, w których jako matrycy do amplifikacji PCR użyto mieszanin plazmidów niosących typ dziki sekwencji lub odpowiednią sekwencję mutacji.

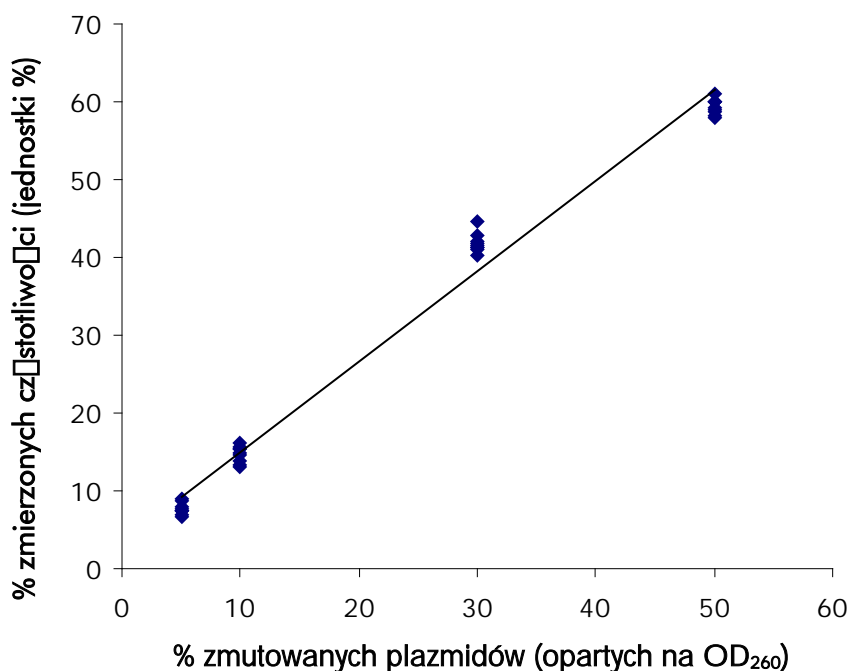
Uwaga: Zaleca się sprawdzenie wydajności metody w laboratorium.

Liniowość

Liniowość została określona z wykorzystaniem mieszanin plazmidów niosących typ dziki odpowiedniej sekwencji mutacji GGC>AGC w kodonie 719, ACG>ATG w kodonie 790, CTG>CGG w kodonie 858 i delecji 2235del15 i 2236del15 w eksonie 19. Plazmidy zostały wymieszane w proporcjach dających cztery poziomy mutacji (5, 10, 30 i 50%). Każda mieszanina była analizowana z trzema seriami zestawu *therascreen* EGFR Pyro w trzech analizach pirosekwencjonowania, każde w potrójnym powtórzeniu.

Wyniki analizy delecji (n=9 dla każdego poziomu mutacji) zostały przeanalizowane zgodnie z CLSI Guideline EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Ocena liniowości procedur pomiarów ilościowych: podejście statystyczne; zatwierdzone wytyczne) z wykorzystaniem oprogramowania Analyse-it® Software v2.21 i zostały przedstawione na Rys. 15 (delecja 2235del15 w eksonie 19).

Wyniki były liniowe z dopuszczalną nieliniowością na poziomie 5% w testowanym przedziale poziomu mutacji od 5 do 50%. Podobne wyniki uzyskano dla mutacji GGC>AGC w kodonie 719, ACG>ATG w kodonie 790, CTG>CGG w kodonie 858 i delecji 2236del15 w eksonie 19.



Rys. 15. Liniowość delecji 2235del15 w eksonie 19.

Precyzja

Dane dot. precyzji pozwalają na określenie całkowitej liczby zmiennych w analizach; zostały one uzyskane na trzech różnych poziomach analizy wspomnianej wcześniej mieszaniny plazmidów, z potrójną repliką każdy.

Powtarzalność (zmiennosc w obrębie analizy i pomiędzy partiami) została obliczona na podstawie danych z określania liniowości (trzy analizy przeprowadzone tego samego dnia z wykorzystaniem różnych partii zestawu *therascreen* EGFR Pyro). Precyzja pośrednia (zmiennosc w obrębie laboratorium) została określona na

podstawie trzech badań przeprowadzonych w jednym laboratorium w ciągu trzech różnych dni przez różne osoby, aparaty PyroMark Q24 i partie zestawu *therascreen* EGFR Pyro. Reprodukcyjność (zmiennosc pomiędzy laboratoriami) została obliczona na podstawie dwóch badań przeprowadzonych w wewnętrznym i zewnętrznym laboratorium każde, z wykorzystaniem różnych partii zestawu *therascreen* EGFR Pyro.

Szacunki dotyczące precyzji są prezentowane jako odchylenie standardowe częstotliwości mierzonych mutacji w jednostkach % (Tabela 10). Powtarzalność, precyzja pośrednia i reprodukcyjność delekcji 2235del15 w eksonie 19 wynosiła odpowiednio 0,8-1,2, 0,7-2,9 oraz 0,7-1,8 % w przedziale pomiaru poziomu mutacji wynoszącym od 5 do 50%. Podobne wyniki uzyskano w przypadku mutacji GGC>AGC w kodonie 719, ACG>ATG w kodonie 790, CTG>CGG w kodonie 858 i delekcji 2236del15 w eksonie 19.

Tabela 10. Precyzja wykrywania delekcji 2235del15 w eksonie 19*

% zmutowanych plazmidów†	Powtarzalność		Precyzja pośrednia		Odtwarzalność	
	Średnia	OS	Średnia	OS	Średnia	OS
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

* Wszystkie wartości podawane są w jednostkach procentowych. OS: odchylenie standardowe (n=9).

† Na podstawie pomiaru OD₂₆₀.

Diagnostyka

Zestaw *therascreen* EGFR Pyro Kit został oceniony przez porównanie do sekwencjonowania Sanger'a i zestawu *therascreen* EGFR RGQ. DNA zostało pozyskane ze 100 próbek guza utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) z niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. NSCLC) i przeanalizowane pod kątem obecności mutacji w kodonach 719, 768, 790 oraz 858-861, a także delekcji i złożonych mutacji w eksonie 19.

DNA wyizolowano przy pomocy zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *therascreen* EGFR Pyro na aparacie PyroMark Q24, zestawu *therascreen* EGFR RGQ na aparacie Rotor Gene-Q 5plex HRM serii II oraz sekwencjonowania Sanger'a przeprowadzonego na analizatorze ABI® 3130 Genetic Analyzer.

Na 100 analizowanych próbek, w 97 przypadkach status mutacji został określony we wszystkich kodonach i eksonie 19 (z wykorzystaniem trzech metod). W przypadku dwóch próbek nie udało się określić statusu kodonu 768 (metoda pirosekwencjonowania), a w przypadku jednej z próbek, mimo zastosowania trzech metod, nie uzyskano informacji o większości kodonów, co pozwala twierdzić, że jakość DNA była zbyt niska, żeby przeprowadzić amplifikację.

Wszystkie trzy metody pozwoliły na wykrycie odpornej mutacji T790M w jednej z próbek, podczas gdy mutacja L861Q w innej próbce została wykryta jedynie przez pirosekwencjonowanie. Analizy pirosekwencjonowania, Rotor-Gene Q i sekwencjonowanie Sanger'a pozwoliły na wykrycie odpowiednio trzynastu, dwunastu i szesnastu delecji i złożonych mutacji w eksonie 19. Trzy z delecji w eksonie 19 wykryte przez sekwencjonowanie Sanger'a nie zostały wykryte ani przez pirosekwencjonowanie, ani analizę Rotor-Gene Q. Mutacja L858R została wykryta w trzech próbkach przy użyciu każdej z trzech metod, w dwóch próbkach przez pirosekwencjonowanie i jedną z pozostałych metod, w jednej próbce wyłącznie przez pirosekwencjonowanie i w jednej wyłącznie przez analizę Rotor-Gene Q. Wyniki przedstawiono w Tabelach 11-14.

Żadna z trzech metod nie wykryła mutacji w kodonach 719 i 768 w żadnej ze 100 próbek.

Wyłączając próbki, których analiza przy pomocy jednej lub więcej metod skończyła się niepowodzeniem, zestaw *therascreen* EGFR Pyro i sekwencjonowanie Sanger'a wykazują 100%, 98%, 99% i 97% zgodność w wynikach dotyczących odpowiednio kodonów 790, 858, 861 i eksonu 19, podczas gdy zestawy *therascreen* EGFR Pyro i *therascreen* EGFR RGQ wykazują 100%, 97%, 99% i 99% zgodność w wynikach dotyczących odpowiednio kodonów 790, 858, 861 i eksonu 19 (Tabele 11-14).

Tabela 11. Wyniki analizowanych próbek guza NDRP dla kodonu 790

		Sekwencjonowanie Sanger'a			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	1	0	1	2
	Typ dziki	0	98	0	98
	Nieznany	0	0	0	0
	Suma	1	98	1	100
		Zestaw <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	1	0	1	2
	Typ dziki	0	98	0	98
	Nieznany	0	0	0	0
	Suma	1	98	1	100

Tabela 12. Wyniki analizowanych próbek guza NDRP dla kodonu 858

		Sekwencjonowanie Sanger'a			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	4	2	0	6
	Typ dziki	0	93	0	93
	Nieznany	0	0	1	1
	Suma	4	95	1	100
		Zestaw <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	4	2	0	6
	Typ dziki	1	92	0	93
	Nieznany	0	1	0	1
	Suma	5	95	0	100

Tabela 13. Wyniki analizowanych próbek guza NDRP dla kodonu 861

		Sekwencjonowanie Sanger'a			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	0	1	0	1
	Typ dziki	0	98	0	98
	Nieznany	0	1	0	1
	Suma	0	100	0	100
		Zestaw <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Typ dziki	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	0	1	0	1
	Typ dziki	0	98	0	98
	Nieznany	0	0	1	1
	Suma	0	99	1	100

Tabela 14. Wyniki analizowanych próbek guza NDRP dla eksonu 19

		Sekwencjonowanie Sanger'a			
		Mutant	Typ dzikie	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	13	0	0	13
	Typ dzikie	3	84	0	87
	Nieznany	0	0	0	0
	Suma	16	84	0	100
		Zestaw <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutant	Typ dzikie	Nieznany	Suma
Zestaw <i>therascreen</i> EGFR Pyro	Mutant	12	1	0	13
	Typ dzikie	0	86	1	87
	Nieznany	0	0	0	0
	Suma	12	87	1	100

Uwaga: We wszystkich analizach wykorzystanych do określenia charakterystyki wydajności sygnał analizy w kodonie 768 wynosił ponad 20 RLU i ponad 30 RLU w pozostałych czterech analizach, co jest standardem w przypadku 10 ng DNA wyizolowanego z tkanki utrwalonej w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). Dane z pirosekwencjonowania zostały przeanalizowane z wykorzystaniem wtyczki EGFR Plug-in Report.

Referencje

Firma QIAGEN posiada obszerną, aktualną bazę publikacji naukowych dostępnych online; publikacje te opisują analizy przeprowadzone z wykorzystaniem produktów QIAGEN. Czytelne opcje wyszukiwania pozwalają na zależenie potrzebnych Państwu artykułów poprzez zastosowanie słowa kluczowego lub konkretnego obszaru zastosowania, tytułu, itp.

Pełna lista odniesień znajduje się w Bazie Referencji QIAGEN dostępnej online na stronie www.qiagen.com/RefDB/search.asp; zachęcamy również do kontaktowania się w tej kwestii z Serwisami Technicznymi QIAGEN lub lokalnymi dystrybutorami.

Symbole

	Zawiera odczynniki wystarczające na przeprowadzenie <N> testów
	Zużyć przed
	Sprzęt medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	Wodorotlenek sodu
	Globalny Numer Jednostki Handlowej
	Ograniczenia Temperaturowe
	Producent
	Przed użyciem zapoznać się z instrukcją

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania wsparcia technicznego oraz wszelkich dodatkowych informacji, prosimy o kontakt z Centrum Wsparcia Technicznego na stronie www.qiagen.com/Support, kontakt telefoniczny z jednym z Działów Serwisu Technicznego firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz: tylna okładka lub www.qiagen.com).

Załącznik A: Nastawianie analiz *therascreen* EGFR Pyro

W przypadku, gdy wtyczka EGFR Plug-in Report została zainstalowana, w przeglądarce skrótów oprogramowania PyroMark Q24 pod ścieżką “Example Files/PyroMark Setups/EGFR” (Przykładowe pliki/Ustawienia PyroMark/EGFR) dostępne są gotowe ustawienia analizy kodonów 719, 768, 790, 858-861 i eksonu 19. Nie ma wtedy potrzeby przeprowadzania poniższych kroków. Wtyczkę można uzyskać drogą mailową przez kontakt pod adresem pyro.plugin@qiagen.com.

Zdecydowanie zaleca się korzystanie z wtyczki EGFR Plug-in Report zamiast analizy manualnej. Nie ma możliwości manualnego dodania złożonych mutacji do “Sequence to Analyze” (Sekwencji do analizy) i dlatego też muszą być one analizowane z wykorzystaniem wtyczki. Po instalacji wtyczki lub za każdym razem, gdy instalowane jest nowe oprogramowanie, lub istniejące oprogramowanie podlega aktualizacji, należy zweryfikować poprawność działania wtyczki tak, jak to opisano w wytycznych EGFR Plug-In Quick Guide.

Jeżeli wtyczka EGFR Plug-in Report nie została zainstalowana, należy ręcznie wprowadzić ustawienia pliku analizy *therascreen* EGFR Pyro przed przeprowadzeniem go po raz pierwszy. Analiza EGFR kodonu 719, 768, 790, 858-861 i delecji w eksonie 19 z wykorzystaniem oprogramowania PyroMark Q24 należy zaprogramować tak, jak to pokazano poniżej.

Procedura

EGFR kodon 719

A1. Kliknąć  w oknie narzędzi i wybrać “New AQ Assay”.

A2. Wprowadzić następującą sekwencję w polu “Sequence to Analyze”:

DGCTCCGGTGC

Uwaga: Ta sekwencja pozwoli na wykrycie najczęstszych mutacji w kodonie 719 w nukleotydzie 2155.

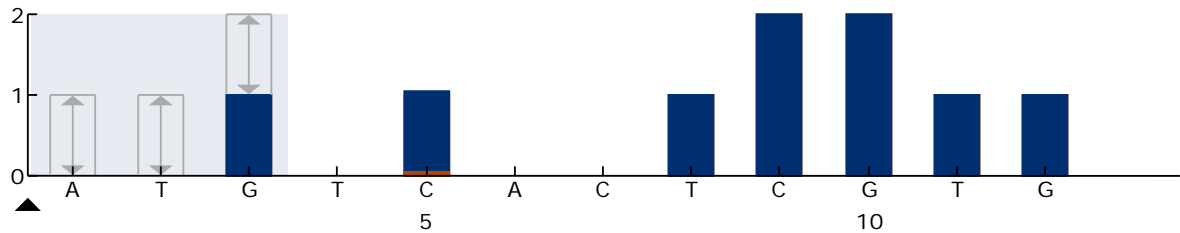
Sekwencję podlegającą analizie można zmienić po przeprowadzeniu analizy, celem analizy mutacji w nukleotydzie 2156. Aby sprawdzić obecność mutacji w nukleotydzie 2156 sekwencję do analizy należy zmienić na

GSCTCCGGTGC

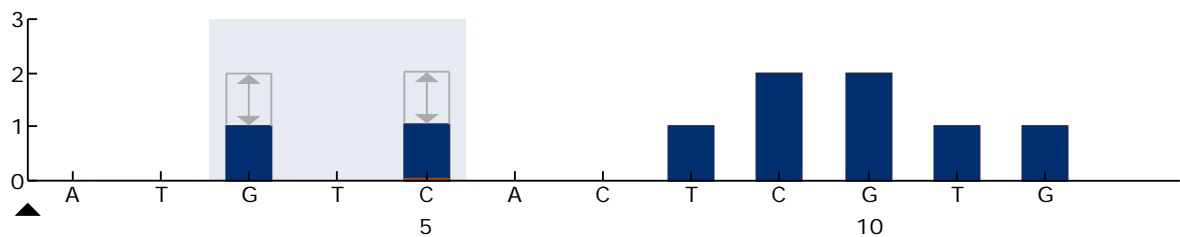
Uwaga: Należy upewnić się, że wartość odcięcia została ustawiona na 30 RLU. Dodatkowo należy upewnić się, że wysokości słupków histogramu są odpowiednio dopasowane (patrz: instrukcja poniżej).

A3. Ręcznie wprowadzić następujący “Dispensation Order” (Kolejność dozowania):


ATGTCAC TCGTG




Rys. 16. Histogram kodonu 719 (nukleotyd 2155) z analizowaną sekwencją *DGCTCCGGTGC*. Czerwony prostokąt na dole słupka dyspensacji C5 ilustruje dopasowanie wysokości słupka histogramu.

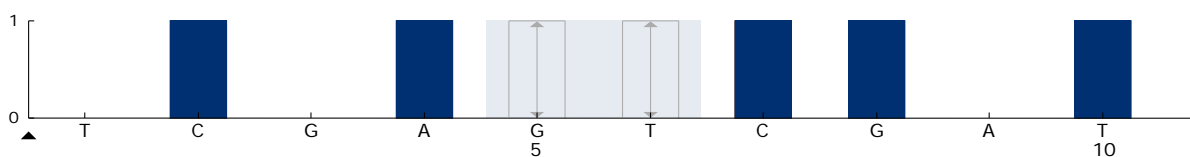


Rys. 17. Histogram kodonu 719 (nukleotyd 2156) z analizowaną sekwencją *GSCTCCGGTGC*. Czerwony prostokąt na dole słupka dozowania C5 ilustruje dopasowanie wysokości słupka histogramu.

- A4.** Kliknąć zakładkę “Analysis Parameters” (Parametry analizy) i zwiększyć “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Próg odcięcia – Wymagana wysokość odcięcia o odpowiedniej jakości) do 30.
- A5.** Na histogramie: przesunąć kursor myszy w górny róg słupka dozowania C5 i kliknąć, jednocześnie trzymając wciśnięty klawisz „Ctrl”. Pojawi się małe okienko pokazujące domyślną wysokość słupka histogramu (1,00). Zwiększyć poziom do 1,04 w przypadku sekwencji *DGCTCCGGTGC* i do 2,04 w przypadku sekwencji *GSCTCCGGTGC*.
- A6.** Kliknąć  w okienku narzędziowym i zapisać analizę jako “EGFR codon 719”.

EGFR kodon 768

- A1.** Kliknąć  oknie narzędzi i wybrać “New AQ Assay”.
- A2.** Wprowadzić następującą sekwencję w polu “Sequence to Analyze”:
CAKCGTG
- A3.** Ręcznie wprowadzić następujący “Dispensation Order” (Kolejność dozowania):
TCGAGTCGAT



Rys. 18. Histogram kodonu 768 (nukleotydy 2303) z analizowaną sekwencją **CAKCGTG**.

A6. Kliknąć  w okienku narzędziowym i zapisać analizę jako **“EGFR codon 768”**.

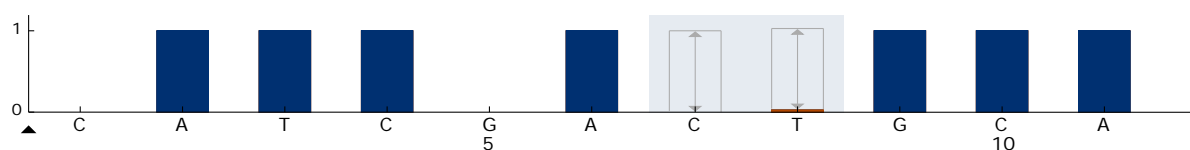
EGFR kodon 790

A1. Kliknąć  oknie narzędzi i wybrać **“New AQ Assay”**.

A2. Wprowadzić następującą sekwencję w polu **“Sequence to Analyze”**:
ATCAYGCAG

A3. Ręcznie wprowadzić następujący **“Dispensation Order”** (Kolejność dozowania):

CATCGACTGCA



Rys. 19. Histogram kodonu 790 (nukleotydy 2369) z analizowaną sekwencją **ATCAYGCAG**. Czerwony prostokąt na dole słupka dozowania T8 ilustruje dopasowanie wysokości słupka histogramu.

A4. Kliknąć zakładkę **“Analysis Parameters”** (Parametry analizy) i zwiększyć **“Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:”** (Próg odcięcia – Wymagana wysokość punktu o odpowiedniej jakości) do **30**.

A5. Na histogramie: przesunąć kursor myszy w górny róg słupka dozowania T8 i kliknąć, jednocześnie trzymając wciśnięty klawisz **„Ctrl”**. Pojawi się małe okienko pokazujące domyślną wysokość słupka histogramu (**1,00**). Zwiększyć poziom do **1,03**.

A6. Kliknąć  w okienku narzędziowym i zapisać analizę jako **„EGFR codon 790”**.

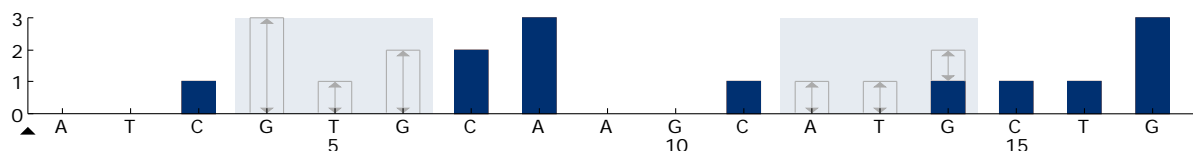
EGFR kodony 858–861

A1. Kliknąć  oknie narzędzi i wybrać **“New AQ Assay”**.


A2. Wprowadzić następującą sekwencję w polu **“Sequence to Analyze”**:
CKGGCCAAACDGCTGGGT

A3. Ręcznie wprowadzić następujący **“Dispensation Order”** (Kolejność dozowania):

ATCGTGCAAGCATGCTG



Rys. 20. Histogram kodonów 858–861 z analizowaną sekwencją **CKGGCCAAACDGCTGGGT**.

- A4.** Kliknąć zakładkę “Analysis Parameters” (Parametry analizy) i zwiększyć “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Próg odcięcia – Wymagana wysokość odcięcia o odpowiedniej jakości) do 30.
- A5.** Kliknąć  w okienku narzędziowym i zapisać analizę jako “EGFR codons 858–861”.

EGFR ekson 19 del

A1. Kliknąć  oknie narzędzi i wybrać “New AQ Assay”.

A2. Wprowadzić następującą sekwencję w polu “Sequence to Analyze”:

TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

Najczęstszą delecją w eksonie 19 jest 2235del15. Aby przeanalizować ekson pod kątem innych delecji, należy zmienić sekwencję podlegającą analizie zgodnie z odpowiednią, zdefiniowaną delecją.

Użyć sekwencji typu dzikiego:

**TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCC
TCGAT**

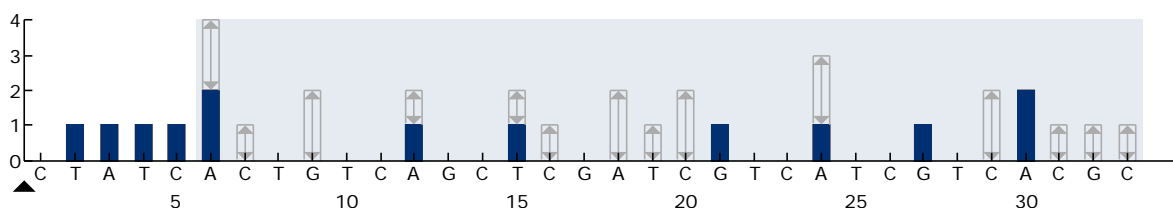
i dodać kwadratowe nawiasy w tam, gdzie zaczyna się i kończy delecja.

Drugą najczęstszą delecją w eksonie 19 jest 2236del15; w tym przypadku należy zmienić sekwencję na następującą:


TATCAAG[GAATTAAGAGAAGCA]ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

A3. Ręcznie wprowadzić następującą “Dispensation Order” (Kolejność dozowania):


CTATCACTGTCAGCTCGATCGTCATCGTCACGC



Rys. 21. Histogram delecji w eksonie 19.

- A4.** Kliknąć zakładkę “Analysis Parameters” (Parametry analizy) i zwiększyć “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Próg odcięcia – Wymagana wysokość odcięcia o odpowiedniej jakości) do 30.
- A5.** Kliknąć  w okienku narzędziowym i zapisać analizę jako “EGFR Exon 19 del”.

Załącznik B: Opróżnianie pojemnika na odpady i korytek

<p>OSTRZEŻENIE</p> 	<p>Niebezpieczne substancje chemiczne</p> <p>Roztwór do denaturacji (Denaturation Solution) stosowany w stacji roboczej zawiera wodorotlenek sodu, który działa drażniąco na oczy i skórę</p> <p>Należy zawsze nosić okulary ochronne, rękawice i fartuch laboratoryjny.</p> <p>Osoba odpowiedzialna (np. kierownik laboratorium) musi podjąć niezbędne środki ostrożności w celu zapewnienia, że otoczenie w miejscu pracy jest bezpieczne i że operatorzy urządzenia są odpowiednio przeszkoleni. Nie mogą oni być narażeni na działanie niebezpiecznych poziomów substancji toksycznych, jak określono w obowiązujących Kartach Charakterystyki Substancji Niebezpiecznych (MSDS) lub OSHA*, ACGIH† czy COSHH‡.</p> <p>Więcej informacji znajduje się na stronie www.giagen.com/support/msds.aspx</p> <p>Wietrzenie i unieszkodliwianie odpadów musi być przeprowadzane zgodnie ze wszystkimi krajowymi, stanowymi i lokalnymi przepisami dot. zdrowia i bezpieczeństwa pracy.</p>
---	--

* OSHA: Administracja Bezpieczeństwa i Higieny Pracy (Stany Zjednoczone).

† ACGIH: Amerykańska Konferencja Rządowych Higienistów Przemysłowych (Stany Zjednoczone)

‡ COSHH: Kontrola substancji zagrażających zdrowiu (Wielka Brytania).

Należy przestrzegać państwowych, stanowych i lokalnych przepisów dotyczących usuwania odpadów laboratoryjnych.

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- ☉ Poniższy protokół wymaga użycia wody o wysokiej czystości (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com lub jej odpowiednik).

Procedura

- B1. Należy upewnić się, że próżniowa stacja robocza nie wytwarza próżni, tzn. wyłącznik znajduje się w pozycji Off, a pompa próżniowa jest wyłączona.**
- B2. Usunąć wszelkie pozostałe substancje z korytek.**
- B3. Przepłukać korytka wodą o wysokim stopniu czystości lub wymienić je, jeśli jest taka konieczność.**
- B4. Opróżnić pojemnik na odpady.**
Uwaga: Pokrywę można zdjąć bez konieczności odłączania przewodów.
- B5. Jeśli istnieje potrzeba wyczyszczenia próżniowej stacji roboczej (np. z powodu kurzu lub rozlanej cieczy), należy postępować zgodnie z Instrukcją Użytkownika Aparatu PyroMark Q24.**

Informacje dot. składania zamówień

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit (24)	Do 24 reakcji w systemach PyroMark Q24: Startery Seq, startery PCR, niemetylowane DNA kontrolne, mastermix PyroMark PCR, koncentrat CoralLoad, bufor wiążący PyroMark, bufor do hybrydyzacji PyroMark, roztwór denaturujący PyroMark, bufor do przemywania PyroMark, mieszanina enzymów, mieszanina substratów, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP i H ₂ O	971480
PyroMark Q24 MDx	Platforma do wykrywania sekwencji zasad metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001513
PyroMark Q24	Platforma do wykrywania sekwencji zasad metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Próżniowa stacja robocza (220 V) do jednoczesnego przygotowania 24 próbek (z produktów do matrycy jednoniciowej)	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Próżniowa stacja robocza (220 V) do jednoczesnego przygotowania 24 próbek (z produktów do matrycy jednoniciowej)	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Oprogramowanie do aplikacji	9019063
PyroMark Q24 Software	Oprogramowanie do analizy	9019062
Akcesoria		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-studzienkowa płytko do reakcji sekwencjonowania	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartridże do dozowania nukleotydów i odczynników	979302

* Tylko w Wielkiej Brytanii.

† Reszta świata.

Produkt	Zawartość	Nr kat.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Wielorazowe sondy filtrujące do stosowania z urządzeniami PyroMark Vacuum Workstation Q96 i Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Do sprawdzenia poprawności instalacji systemu	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Do potwierdzenia wydajności systemu	979304
Powiązane produkty		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Do 50 izolacji DNA: 50 kolumniek QIAamp MinElute®, proteinaza K, bufory, probówki do elucji (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Do 48 izolacji DNA: Kartridż z odczynnikami (Tkanki), Jednorazowe końcówki z filtrami, jednorazowe uchwyty końcówek, probówki na próbki (2 ml), probówki do elucji (1,5 ml), bufor G2, proteinaza K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Do 50 przygotowań: Kolumny wirowniczej QIAamp Mini, bufory, odczynniki, probówki, przyłączki VacConnectors	61104

Aktualne informacje dotyczące licencji, a także zastrzeżenia dotyczące użytkowania produktu znajdują się w instrukcji obsługi lub instrukcji użytkowania stosownego zestawu firmy QIAGEN, które można znaleźć na stronie www.qiagen.com, uzyskać w Serwisach Techniczny (QIAGEN Technical Services) lub u lokalnego dystrybutora

Strona celowo pozostawiona pustą

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

Ograniczona umowa licencyjna

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

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

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

© 2015 QIAGEN, all rights reserved.

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)

