

Μάιος 2016

Εγχειρίδιο κιτ *therascreen*[®] RAS Extension Pyro[®]



Έκδοση 1

IVD

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 3 και 4 του ανθρώπινου ογκογονιδίου KRAS και στα εξόνια 2, 3 και 4 του ανθρώπινου ογκογονιδίου NRAS

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R2

MAT

1085873EL



Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	6
Αρχή της διαδικασίας.....	8
Δείγματα ελέγχου	9
Υλικά που παρέχονται	10
Περιεχόμενα του κιτ	10
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	13
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	16
Γενικές προφυλάξεις	16
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	17
Συλλογή δειγμάτων, προετοιμασία για ανάλυση και αποθήκευση.....	18
Διαδικασία.....	20
Απομόνωση DNA	20
Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24	20
Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το κιτ theascreen RAS Extension Pyro	24
Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance	27
Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24	30
Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24	35
Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24	38
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	43

Ενδεικτικά αποτελέσματα.....	48
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	51
Ποιοτικός έλεγχος.....	53
Περιορισμοί.....	53
Χαρακτηριστικά απόδοσης.....	54
Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης.....	54
Μεταλλάξεις GGT > TGT και GGT > GTT στο κωδικόνιο 13 του NRAS.....	56
Γραμμικότητα.....	57
Ακρίβεια.....	58
Διαγνωστική αξιολόγηση.....	61
Βιβλιογραφία.....	65
Σύμβολα.....	66
Πληροφορίες επικοινωνίας.....	67
Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro.....	68
Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων.....	74
Πληροφορίες παραγγελίας.....	76

Προβλεπόμενη χρήση

Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro είναι μια in vitro διαγνωστική εξέταση βασισμένη σε τεχνολογία Pyrosequencing® (αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού) για την ποσοτική ανίχνευση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 59, 61, 117 και 146 του ανθρώπινου ογκογονιδίου KRAS και στα κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117 και 146 του ανθρώπινου ογκογονιδίου NRAS με χρήση DNA από ανθρώπινο ιστό μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου (mCRC) μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE).

Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στην ταυτοποίηση εκείνων των ασθενών με mCRC οι οποίοι έχουν περισσότερες πιθανότητες να ωφεληθούν από θεραπείες κατά του EGFR όπως η κετουξιμάμπη και η πανιτουμουμάμπη (1).

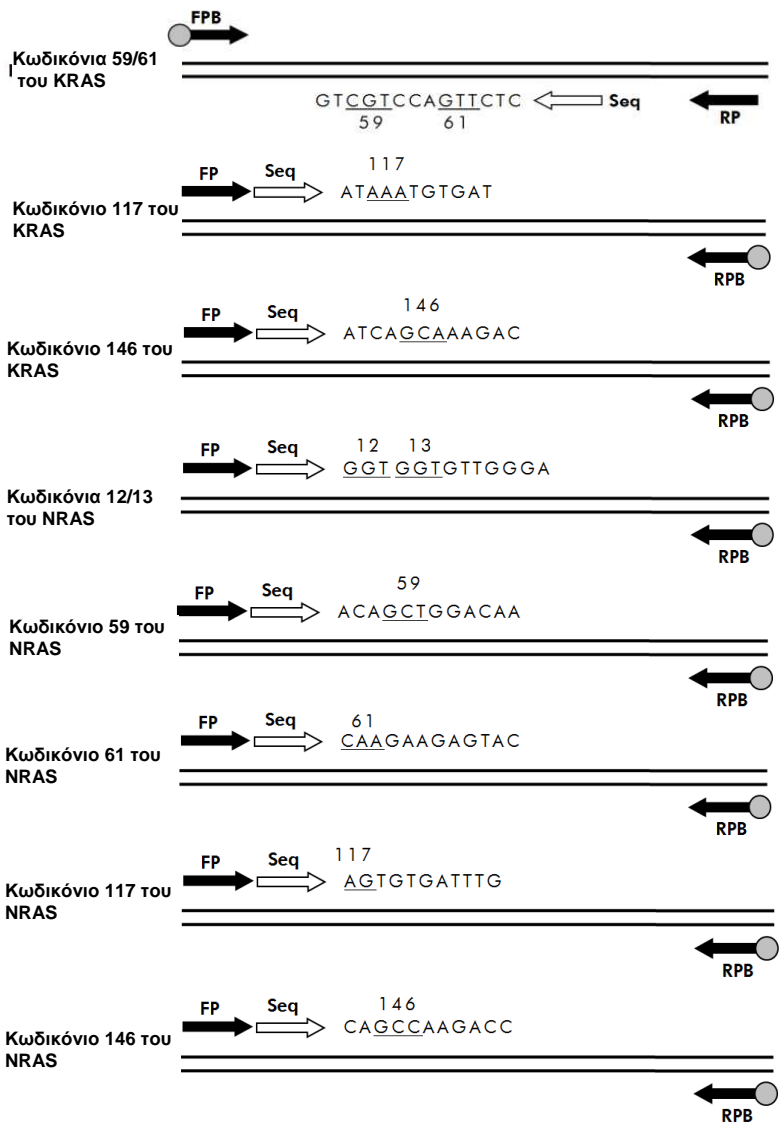
Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro είναι κατάλληλο για χρήση στο σύστημα PyroMark® Q24 μόνο. Τα συστήματα PyroMark Q24 περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

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

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

Σύνοψη και επεξήγηση

Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση των μεταλλάξεων στα εξόνια 3 και 4 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS και στα εξόνια 2, 3 και 4 του ανθρώπινου γονιδίου NRAS. Το κιτ αποτελείται από 8 αναλύσεις (βλ. Εικόνα 1).



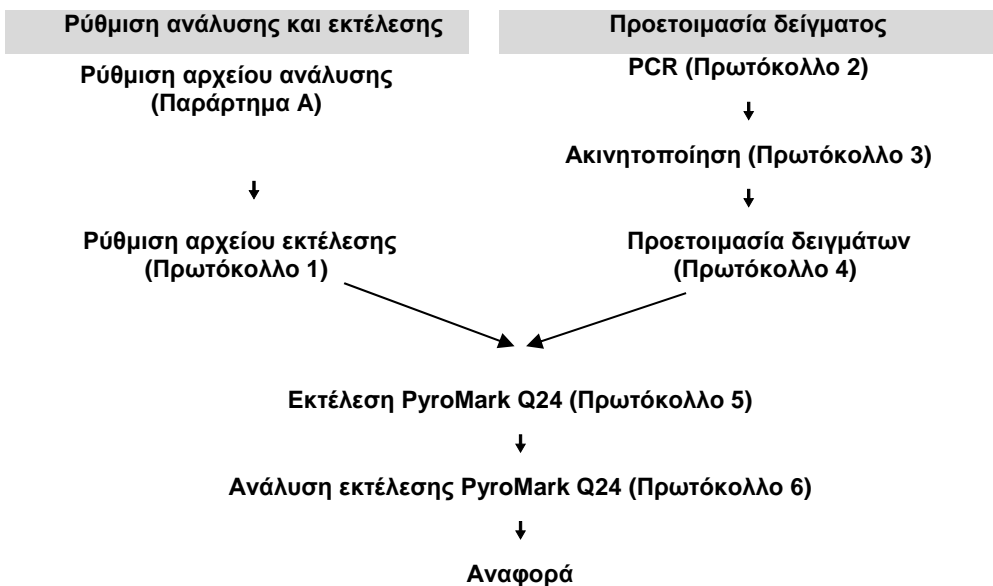
Εικόνα 1. Αναλύσεις του kit *theascreen* RAS Extension Pyro.

Οι 8 περιοχές ενισχύονται ξεχωριστά με αντίδραση PCR και υποβάλλονται σε αλληλούχηση κατά μήκος ολόκληρης της καθορισμένης περιοχής. Μεταλλάξεις στην εξεταζόμενη περιοχή θα δώσουν χαρακτηριστικά πρότυπα στο ίχνος του διαγράμματος αλληλούχησης με πυροφωσφορικό (Pyrogram[®]), τα οποία διακρίνονται από τα ίχνη που δίνουν τα δείγματα άγριου τύπου. Ο Πίνακας 15 παραθέτει τις μεταλλάξεις που μπορούν να αναλυθούν με το λογισμικό PyroMark Q24 (Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro). Οι αναλύσεις για τα κωδικόνια 117 και 146 του KRAS και τα κωδικόνια 12/13, 59, 61, 117 και 146 του NRAS χρησιμοποιούν αλληλούχηση στην ορθόδρομη (πρόσθια) κατεύθυνση, ενώ η ανάλυση για το κωδικόνιο 59/61 του KRAS χρησιμοποιεί αλληλούχηση στην ανάδρομη κατεύθυνση. Το προϊόν αποτελείται από μείγμα εκκινητή PCR και εκκινητή αλληλούχησης για κάθε ανάλυση. Οι εκκινητές παρέχονται σε μορφή διαλύματος και κάθε φιαλίδιο περιέχει 24 μl εκκινητή ή μείγματος εκκινητών.

Αρχή της διαδικασίας

Η Εικόνα 2 παρακάτω δείχνει τη ροή εργασιών της διαδικασίας ανάλυσης. Αφού πραγματοποιηθεί η PCR, χρησιμοποιούνται εκκινητές για τη στόχευση της επιθυμητής περιοχής και τα αμπλικόνια ακινητοποιούνται πάνω σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose[®] High Performance. Προετοιμάζεται μονόκλωνο DNA και οι αντίστοιχοι εκκινητές αλληλούχησης υβριδοποιούνται με το DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα PyroMark Q24 με τη βοήθεια αρχείων ρύθμισης ανάλυσης καθώς και ενός αρχείου εκτέλεσης.

Μπορείτε να ρυθμίσετε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) για την ανίχνευση διαφορετικών μεταλλάξεων μετά την εκτέλεση (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 38, και «Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro», σελίδα 68).



Εικόνα 2. Ποή εργασιών της διαδικασίας για το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro.

Δείγματα ελέγχου

Το δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA περιλαμβάνεται στο κιτ ως δείγμα θετικού ελέγχου για τις αντιδράσεις PCR και αλληλούχησης. Αυτό το DNA ελέγχου έχει γονότυπο άγριου τύπου στις περιοχές που αλληλοχούνται με τη χρήση αυτού του κιτ. Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα του DNA ελέγχου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού. Αυτό είναι απαραίτητο για την ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την αναγνώριση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 38).

Πρέπει επίσης να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου (χωρίς μήτρα DNA) για μία τουλάχιστον ανάλυση σε κάθε προετοιμασία PCR.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του kit

Κουτί 1/2

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Αρ. καταλόγου	971590
Αριθμός παρασκευών	24
Seq Primer KRAS 59/61 (Εκκινητής αλληλούχησης KRAS 59/61)	24 μl
Seq Primer KRAS 117 (Εκκινητής αλληλούχησης KRAS 117)	24 μl
Seq Primer KRAS 146 (Εκκινητής αλληλούχησης KRAS 146)	24 μl
Seq Primer NRAS 12/13 (Εκκινητής αλληλούχησης NRAS 12/13)	24 μl
Seq Primer NRAS 59 (Εκκινητής αλληλούχησης NRAS 59)	24 μl
Seq Primer NRAS 61 (Εκκινητής αλληλούχησης NRAS 61)	24 μl
Seq Primer NRAS 117 (Εκκινητής αλληλούχησης NRAS 117)	24 μl
Seq Primer NRAS 146 (Εκκινητής αλληλούχησης NRAS 146)	24 μl
PCR Primer KRAS 59/61 (Εκκινητής PCR KRAS 59/61)	24 μl
PCR Primer KRAS 117 (Εκκινητής PCR KRAS 117)	24 μl
PCR Primer KRAS 146 (Εκκινητής PCR KRAS 146)	24 μl
PCR Primer NRAS 12/13 (Εκκινητής PCR NRAS 12/13)	24 μl

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Αρ. καταλόγου	971590
Αριθμός παρασκευών	24
PCR Primer NRAS 59 (Εκκινητής PCR NRAS 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (Εκκινητής PCR NRAS 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (Εκκινητής PCR NRAS 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (Εκκινητής PCR NRAS 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix (Κύριο μείγμα PyroMark PCR), 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate (Συμπύκνωμα CoralLoad®), 10x	1.2 ml
H ₂ O	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA (Δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA), 10 ng/µl	3 x 100 µl

Κουτί 2/2

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια	Ποσότητα
PyroMark Binding Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης PyroMark)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης PyroMark)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Διάλυμα αποδιάταξης PyroMark)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Μείγμα ενζύμων)	2 φιαλίδια
Substrate Mixture (Μείγμα υποστρώματος)	2 φιαλίδια
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
therascreen RAS Extension Pyro Kit Εγχειρίδιο (Αγγλικά)	1

* Contains sodium hydroxide.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

Αντιδραστήρια

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. «Απομόνωση DNA», σελίδα 20)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, αρ. κατ. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q® 18,2 ΜΩ x cm ή ισοδύναμο)

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

- Αιθανόλη (70%)*

Αναλώσιμα

- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα για προετοιμασία PCR)
- Πλάκες PCR 24 βυθισμάτων (βλ. «Συνιστώμενες πλάκες 24 βυθισμάτων», σελίδα 15)
- Αυτοκόλλητη μεμβράνη
- PyroMark Q24 Plate (Πλάκα PyroMark Q24) (αρ. κατ. 979301)[†]
- PyroMark Q24 Cartridge (Φυσίγγιο PyroMark Q24) (αρ. κατ. 979302)[†]

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

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

Εξοπλισμός

- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος*
- Θερμοκυκλοποιητής* και κατάλληλα σωληνάκια PCR
- PyroMark Q24 MDx ή PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001513 ή 9001514)*
- Σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 MDx ή PyroMark Q24 Vacuum Workstation (αρ. κατ. 9001515 ή 9001516 ή 9001518 ή 9001519)*
- Αναδευτήρας πλάκας* για ακινητοποίηση σε σφαιρίδια (βλ. «Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας», σελίδα 15)
- Θερμαντικό μπλοκ* με δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασίας 80°C

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

Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας

Οι αναδευτήρες πλάκας κυκλικής κίνησης που αναφέρει ο Πίνακας 1 συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro.

Πίνακας 1. Αναδευτήρες πλάκας που συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αρ. καταλόγου
Eppendorf	ThermoMixer® C (βασική συσκευή)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Συνιστώμενες πλάκες 24 βυθισμάτων

Οι πλάκες 24 βυθισμάτων που αναφέρει ο Πίνακας 2 συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro.

Πίνακας 2. Πλάκες 24 βυθισμάτων που συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αρ. καταλόγου
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24-well	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

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

Γενικές προφυλάξεις

Πάντα να λαμβάνετε υπόψη τα εξής:

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

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro παρέχεται σε 2 κουτιά. Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro (κουτί 1/2) αποστέλλεται μέσα σε ξηρό πάγο. Το κύριο μείγμα PyroMark PCR, το συμπύκνωμα CorallLoad, το δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA και όλοι οι εκκινητές πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες από -15 έως -25°C μετά την παραλαβή.

Το κουτί ρυθμιστικών διαλυμάτων και αντιδραστηρίων Pyro (κουτί 2/2), που περιέχει τα ρυθμιστικά διαλύματα, το μείγμα ενζύμων, το μείγμα υποστρώματος και τα αντιδραστήρια dATPaS, dCTP, dGTP και dTTP (τα αντιδραστήρια για την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού), αποστέλλεται μαζί με παγοκύστες. Τα συστατικά αυτά πρέπει να αποθηκεύονται στους 2–8°C μετά την παραλαβή. Για να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια δραστηριότητας, συνιστάται η φύλαξη τόσο του μείγματος ενζύμων όσο και του μείγματος υποστρώματος στα παρεχόμενα φιαλίδια.

Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 10 ημέρες στους 2–8°C. Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν στα φιαλίδια τους στους -15 έως -25°C. Τα κατεψυγμένα αντιδραστήρια δεν πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερους από 6 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

Σημείωση: Τα νουκλεοτίδια δεν πρέπει να καταψύχονται.

Εφόσον φυλάσσεται υπό αυτές τις συνθήκες, το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ.

Συλλογή δειγμάτων, προετοιμασία για ανάλυση και αποθήκευση

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

Το υλικό δείγματος πρέπει να είναι γονιδιωματικό DNA ανθρώπινης προέλευσης, που έχει εκχυλιστεί από ιστό FFPE. Η μεταφορά των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την τυπική μεθοδολογία της παθολογοανατομίας, για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

Τα νεοπλασματικά δείγματα είναι ετερογενή και τα δεδομένα από ένα δείγμα νεοπλασίας ενδέχεται να μη συμφωνούν με άλλες τομές της ίδιας νεοπλασίας. Επίσης, τα νεοπλασματικά δείγματα ενδέχεται να περιέχουν μη νεοπλασματικό ιστό. Το DNA από μη νεοπλασματικό ιστό δεν αναμένεται να περιέχει τις μεταλλάξεις που ανιχνεύονται από το kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Προετοιμασία δειγμάτων ιστού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε στεγνά νυστέρια. Μην εκτελείτε αυτό το βήμα σε θάλαμο νηματικής ροής ή απαγωγό εστία.

- Απομακρύνετε με απόξεση το νεοπλασματικό ιστό από τις τομές και μεταφέρετέ τον σε επισημασμένα σωληνάρια μικροφυγόκεντρου, χρησιμοποιώντας καινούριο νυστέρι για κάθε δείγμα.

Προετοιμασία δειγμάτων ιστού για εκχύλιση DNA

- Χρησιμοποιώντας πρότυπα υλικά και μεθόδους, μονιμοποιήστε το δείγμα ιστού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης (NBF) 10% και συνεχίστε με τον εγκλεισμό του

δείγματος ιστού σε παραφίνη. Με τη χρήση μικροτόμου, δημιουργήστε διαδοχικές τομές 5 μm από ένα μπλοκ παραφίνης και τοποθετήστε τις σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες.

- Η αξιολόγηση μιας τομής με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε νεοπλασματικό ιστό και του εμβαδού, πρέπει να γίνεται από εκπαιδευμένο άτομο (π.χ. παθολογοανατόμο). Επισημάνετε τη χρωματισμένη αντικειμενοφόρο πλάκα για να διαχωρίσετε το νεοπλασματικό από το φυσιολογικό ιστό. Χρησιμοποιήστε διαδοχικές τομές για την εκχύλιση DNA.
- Χρησιμοποιήστε τομές με περιεκτικότητα σε νεοπλασματικό ιστό > 20% κατά εμβαδόν για επεξεργασία χωρίς μακροεκτομή (βλ. επόμενο σημείο).
- Για τομές με περιεκτικότητα σε νεοπλασματικό ιστό < 20% κατά εμβαδόν, απαιτείται μακροεκτομή μίας ή περισσότερων τομών. Απορρίψτε το μη νεοπλασματικό ιστό.
- Για τομές εμβαδού < 4 mm², υποβάλλετε δύο ή περισσότερες τομές σε επεξεργασία για να αυξήσετε το συνολικό εμβαδόν της νεοπλασματικής περιοχής τουλάχιστον στα 4 mm² (ισχύει για δείγματα με ή χωρίς μακροεκτομή). Απορρίψτε το μη νεοπλασματικό ιστό.
- Απομακρύνετε με απόξεση την περίσσεια παραφίνης από τον ιστό χρησιμοποιώντας ένα καινούριο, αποστειρωμένο νυστέρι.

Αποθήκευση

Αποθηκεύστε τα μπλοκ FFPE και τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορείτε να αποθηκεύσετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για έως και 4 εβδομάδες πριν από την εκχύλιση DNA.

Μπορείτε να αποθηκεύσετε το γονιδιωματικό DNA σε θερμοκρασία 2–8°C για 1 εβδομάδα μετά την εκχύλιση και, στη συνέχεια, σε θερμοκρασία -15 έως -25°C για έως και 8 εβδομάδες πριν από τη χρήση.

Διαδικασία

Απομόνωση DNA

Το κιτ QIAGEN που αναφέρει ο Πίνακας 3 παρακάτω συνιστάται για τον καθαρισμό DNA από τον υποδεικνυόμενο τύπο ανθρώπινων δειγμάτων, καθώς και για χρήση σε συνδυασμό με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro. Για να χρησιμοποιήσετε το κιτ αυτό, ακολουθήστε τις οδηγίες καθαρισμού DNA στο αντίστοιχο εγχειρίδιο.

Πίνακας 3. Συνιστώμενα κιτ καθαρισμού DNA για χρήση σε συνδυασμό με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro


Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος	Αρ. καταλόγου
Ιστός εγκλεισμένος σε παραφίνη	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη


- Δημιουργήστε μια ρύθμιση ανάλυσης όπως περιγράφεται στο Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro στη σελίδα 68. Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει μία και μοναδική φορά, πριν από την πρώτη εκτέλεση της ανάλυσης RAS Extension Pyro.
- Αποφύγετε την τοποθέτηση δειγμάτων με σήμα υψηλής έντασης δίπλα σε βυθίσματα δειγμάτων ελέγχου χωρίς μήτρα και σε βυθίσματα που αναμένεται να δώσουν χαμηλό σήμα. Διαφορετικά, ενδέχεται να σημειωθεί διασταύρωση σήματος μεταξύ βυθισμάτων καθώς το σήμα από ένα βύθισμα θα ανιχνεύεται σε γειτονικά του.

Διαδικασία

1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων.
Δημιουργείται ένα νέο αρχείο εκτέλεσης.
2. Εισαγάγετε τις παραμέτρους της εκτέλεσης (βλ. «Παράμετροι εκτέλεσης», σελίδα 22).
3. Προετοιμάστε την πλάκα προσθέτοντας αναλύσεις για τις 8 διαφορετικές αναλύσεις του kit *therascreen RAS Extension Pyro* σε βυθίσματα που αντιστοιχούν στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν.

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

Σημείωση: Συμπεριλάβετε ένα δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου ως μάρτυρα άγριου τύπου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Εικόνα 2. Ροή εργασιών της διαδικασίας για το kit *therascreen RAS Extension Pyro*», σελίδα 9).

4. Όταν η ανάλυση έχει ρυθμιστεί και είναι έτοιμη να εκτελεστεί στο σύστημα *PyroMark Q24*, εκτυπώστε μια λίστα με τους απαιτούμενους όγκους μείγματος ενζύμων, μείγματος υποστρώματος και νουκλεοτιδίων καθώς και την καρτέλα με τη διάταξη της πλάκας. Επιλέξτε «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν την εκτέλεση) από το μενού «Tools» (Εργαλεία). Όταν εμφανιστεί η αναφορά, κάντε κλικ στο .
5. Κλείστε το αρχείο εκτέλεσης και αντιγράψτε το σε ένα USB stick (παρέχεται μαζί με το σύστημα) με τη βοήθεια της εφαρμογής *Windows® Explorer*.

Σημείωση: Οι εκτυπωμένες πληροφορίες πριν από την εκτέλεση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόδειγμα για την προετοιμασία της διάταξης δειγμάτων (βλ. «Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια *Streptavidin Sepharose High Performance*», σελίδα 27).

Σημείωση: Για την ανάλυση της πλάκας στο σύστημα *PyroMark Q24*, βλ. «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο *PyroMark Q24*», σελίδα 35.

Παράμετροι εκτέλεσης

- **Run name (Όνομα εκτέλεσης):** Το όνομα της εκτέλεσης παρέχεται κατά την αποθήκευση του αρχείου. Εάν αλλάξετε το όνομα του αρχείου, θα αλλάξει και το όνομα της εκτέλεσης.
- **Instrument method (Μέθοδος οργάνου):** Επιλέξτε τη μέθοδο οργάνου ανάλογα με το φυσίγγιο που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση. Ανατρέξτε στις οδηγίες που συνοδεύουν τα προϊόντα.
- **Plate ID (Αναγνωριστικό πλάκας, προαιρετικά):** Εισαγάγετε το αναγνωριστικό της πλάκας PyroMark Q24.
- **Bar code (Γραμμωτός κώδικας, προαιρετικά):** Εισαγάγετε τον γραμμωτό κώδικα για την πλάκα ή, αν υπάρχει συνδεδεμένη συσκευή ανάγνωσης γραμμωτού κώδικα στον υπολογιστή σας, τοποθετήστε τον δρομέα του ποντικιού στο πλαίσιο κειμένου «Barcode» (Γραμμωτός κώδικας) (κάνοντας κλικ στο πλαίσιο) και σαρώστε τον γραμμωτό κώδικα.
- **Kit and Reagent ID (Αναγνωριστικό κιτ και αντιδραστηρίου, προαιρετικά):** Εισαγάγετε τον αριθμό παρτίδας για το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός παρτίδας αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος.
Σημείωση: Σας συνιστούμε να συμπληρώνετε και τους δύο αριθμούς παρτίδας ώστε να είναι δυνατή η ιχνηλάτηση τυχόν απροσδόκητων προβλημάτων με το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro.
- **Run note (Σημείωση εκτέλεσης, προαιρετικά):** Εισαγάγετε μία σημείωση σχετικά με τα συστατικά ή τον σκοπό της εκτέλεσης.

Προσθήκη αρχείων ανάλυσης

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

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

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

Εισαγωγή αναγνωριστικών δειγμάτων και σημειώσεων

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

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

Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Το πρωτόκολλο αυτό προορίζεται για την ενίσχυση, μέσω PCR, 8 ξεχωριστών περιοχών στα εξόνια 3 και 4 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS και στα εξόνια 2, 3 και 4 του ανθρώπινου γονιδίου NRAS με χρήση του kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Η HotStarTaq® DNA πολυμεράση στο κύριο μείγμα PyroMark PCR χρειάζεται ένα βήμα ενεργοποίησης διάρκειας 15 λεπτών στους 95°C.
- Προετοιμάστε όλα τα μείγματα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο από αυτόν που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό DNA, την προσθήκη υλικού μήτρας στην PCR, την ανάλυση των προϊόντων της PCR ή την προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση της αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού.
- Χρησιμοποιήστε ρύγχη μίας χρήσης που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα για να ελαχιστοποιήσετε την πιθανότητα επιμόλυνσης.

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

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

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαιτούμενα συστατικά (βλ. Πίνακα 4, σελίδα 25).
Αναμείξτε τα καλά πριν από τη χρήση.

2. Προετοιμάστε ένα μείγμα αντίδρασης για κάθε σετ εκκινητή PCR όπως περιγράφει ο Πίνακας 4.

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

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

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης για κάθε μείγμα εκκινητή PCR

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 ή PCR Primer KRAS 117 ή PCR Primer KRAS 146 ή PCR Primer NRAS 12/13 ή PCR Primer NRAS 59 ή PCR Primer NRAS 61 ή PCR Primer NRAS 117 ή PCR Primer NRAS 146	1
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	4
Συνολικός όγκος	20

3. Αναμείξτε προσεκτικά το μείγμα αντίδρασης και διοχετεύστε 20 μl σε κάθε σωληνάριο PCR.

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

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

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

Σημείωση: Συμπεριλάβετε ένα δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου ως μάρτυρα άγριου τύπου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Δείγματα ελέγχου», σελίδα 9).

Πίνακας 5. Προετοιμασία της PCR

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

5. Προγραμματίστε τον θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που παραθέτει ο Πίνακας 6.

Πίνακας 6. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο κυκλοποίησης

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

6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια PCR στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης.
7. Μετά την ενίσχυση, προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance», σελίδα 27.
- Τα δείγματα PCR μπορούν να φυλαχθούν στους 2–8°C μέχρι και για 3 ημέρες.

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

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

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Αφήστε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και διαλύματα να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία.
- Ενεργοποιήστε το σύστημα PyroMark Q24 τουλάχιστον 30 λεπτά προτού ξεκινήσει η εκτέλεση αναλύσεων. Ο διακόπτης λειτουργίας βρίσκεται στην πίσω πλευρά του οργάνου.
- Τοποθετήστε έναν συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε ένα θερμαντικό μπλοκ που έχει προθερμανθεί στους 80°C. Αφήστε έναν δεύτερο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).

- Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark παρέχεται υπό μορφή συμπυκνώματος 10x. Πριν από την πρώτη χρήση, αραιώστε το σε διάλυμα εργασίας 1x προσθέτοντας 225 ml νερού υψηλής καθαρότητας σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης PyroMark 10x (τελικός όγκος 250 ml).

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

- Προετοιμάστε τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 για την προετοιμασία δειγμάτων, όπως περιγράφεται στο *PyroMark Q24 User Manual* (εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24).

Διαδικασία

1. Ανακινήστε ελαφρώς τη φιάλη που περιέχει Streptavidin Sepharose High Performance μέχρι να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.

2. Προετοιμάστε το κύριο μείγμα για την ακινητοποίηση του DNA όπως περιγράφει ο Πίνακας 7.

Προετοιμάστε μεγαλύτερο όγκο από αυτόν που απαιτείται για τον συνολικό αριθμό αντιδράσεων που θα εκτελεστούν (επαρκή για τον αριθμό των αντιδράσεων + μία επιπλέον).

Πίνακας 7. Κύριο μείγμα για ακινητοποίηση του DNA

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
PyroMark Binding Buffer	40
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Συνολικός όγκος	70

3. Προσθέστε 70 μl του κύριου μείγματος στα βυθίσματα μιας πλάκας PCR 24 βυθισμάτων, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 20).
Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα ή παλμικό στροβιλισμό για να εξασφαλίσετε την ομοιογένεια του κύριου μείγματος. Μη φυγοκεντρήσετε το κύριο μείγμα.
4. Προσθέστε 10 μl βιοτινυλιωμένου προϊόντος PCR από το Πρωτόκολλο 2 σε κάθε βύθισμα που περιέχει κύριο μείγμα, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το kit theascreen RAS Extension Pyro», σελίδα 24).
Ο συνολικός όγκος ανά βύθισμα πρέπει να ανέρχεται σε 80 μl μετά την προσθήκη του κύριου μείγματος και του προϊόντος PCR.
5. Σφραγίστε την πλάκα PCR με αυτοκόλλητη μεμβράνη.
Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει κίνδυνος διαρροής μεταξύ των βυθισμάτων.

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

Κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, προχωρήστε αμέσως στο «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24», σελίδα 30.

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

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

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάκια με τους εκκινητές αλληλούχησης, φυγοκεντρήστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσθέστε τους διάφορους εκκινητές αλληλούχησης με τον ίδιο τρόπο όπως προκαθορίστηκε για την πλάκα κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 20), ανάλογα με την περιοχή της ανάλυσης.
- Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται.

Διαδικασία

1. Αραιώστε επαρκή ποσότητα από κάθε εκκινητή αλληλούχησης σε ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης PyroMark όπως περιγράφει ο Πίνακας 8.

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

Μην αραιώσετε και φυλάξτε ποσότητα εκκινητή αλληλούχησης μεγαλύτερη απ' όσο χρειάζεται.

Πίνακας 8. Παράδειγμα αραιώσης των εκκινητών αλληλούχησης

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)	Όγκος για 9 + 1 αντιδράσεις (μl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 ή Seq Primer KRAS 117 ή Seq Primer KRAS 146 ή Seq Primer NRAS 12/13 ή Seq Primer NRAS 59 ή Seq Primer NRAS 61 ή Seq Primer NRAS 117 ή Seq Primer NRAS 146	0.8	8
Συνολικός όγκος	25	250

2. Προσθέστε 25 μl από τον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχησης σε κάθε βύθισμα της πλάκας PyroMark Q24, σύμφωνα με τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 20).
Διατηρήστε έναν από τους συγκρατητήρες πλάκας PyroMark Q24 (παρέχεται μαζί με τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) και χρησιμοποιήστε τον ως στήριγμα κατά την προετοιμασία και τη μετακίνηση της πλάκας.
3. Ενεργοποιήστε την αντλία κενού του σταθμού εργασίας υπό κενό PyroMark Q24.
4. Τοποθετήστε την πλάκα PCR από το Πρωτόκολλο 3 και την πλάκα PyroMark Q24 στον σταθμό εργασίας υπό κενό (Εικόνα 3).
Επιθεωρήστε την πλάκα PCR και βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια σεφαρόζης βρίσκονται σε διάλυση. Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα PCR έχει τον ίδιο προσανατολισμό όπως και κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.



Εικόνα 3. Τοποθέτηση της πλάκας PCR και της πλάκας PyroMark Q24 στον σταθμό εργασίας υπό κενό.

5. Εφαρμόστε κενό στο εργαλείο, ενεργοποιώντας την πηγή κενού.
6. Βυθίστε αργά τους δειγματολήπτες με φίλτρο του εργαλείου κενού στην πλάκα PCR για να συλλέξετε τα σφαιρίδια που περιέχουν την ακινητοποιημένη μήτρα. Κρατήστε τους δειγματολήπτες στη θέση αυτή επί 15 δευτερόλεπτα. Προσέξτε ιδιαίτερα όταν ανασηκώνετε το εργαλείο κενού.

Σημείωση: Τα σφαιρίδια σεφαροζης καθιζάνουν γρήγορα. Η συλλογή των σφαιριδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την ανάδευση. Εάν περάσει περισσότερο από 1 λεπτό από την ανάδευση της πλάκας, αναδεύστε ξανά την πλάκα για 1 λεπτό πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων.

Εξετάστε την πλάκα PCR για να βεβαιωθείτε ότι το εργαλείο κενού έχει αναρροφήσει πλήρως όλα τα δείγματα.

7. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 40 ml αιθανόλης 70% (**Λεκανίδιο 1, Εικόνα 3**). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.

8. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 40 ml διαλύματος αποδιάταξης (**λεκανίδιο 2, Εικόνα 3**). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
9. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (**λεκανίδιο 3, Εικόνα 3**). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 10 δευτερόλεπτα.
10. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απεικόνιση του εργαλείου κενού ανυψωμένου πέρα από την κατακόρυφο (90°).

11. Για όσο διάστημα το εργαλείο κενού βρίσκεται πάνω από την πλάκα PyroMark Q24, απενεργοποιήστε την πηγή κενού.
12. Ελευθερώστε τα σφαιρίδια μέσα στην πλάκα PyroMark Q24, χαμηλώνοντας τους δειγματολήπτες με φίλτρο μέσα στον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχησης και μετακινώντας το εργαλείο κενού με απαλές πλευρικές κινήσεις.

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

13. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει το νερό υψηλής καθαρότητας (**λεκανίδιο 4, Εικόνα 3**) και ανακινήστε το για 10 δευτερόλεπτα.
14. Καθαρίστε τους δειγματολήπτες βυθίζοντάς τους σε νερό υψηλής καθαρότητας (**λεκανίδιο 5, Εικόνα 3**) και εφαρμόζοντας κενό. Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με 70 ml νερού υψηλής καθαρότητας.
15. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 4).
16. Απενεργοποιήστε το εργαλείο κενού και τοποθετήστε το στη θέση αναμονής (P).
17. Απενεργοποιήστε την αντλία κενού.

Σημείωση: Στο τέλος της εργάσιμης ημέρας, τα υγρά απόβλητα και τα υπολείμματα διαλυμάτων θα πρέπει να απορριφθούν και ο σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 να ελεγχθεί για τυχόν σκόνη και διαρροές. Βλ. «Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων», σελίδα 74.

18. Θερμάνετε την πλάκα PyroMark Q24 με τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας τον προθερμασμένο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24.
19. Αφαιρέστε την πλάκα PyroMark Q24 από τον θερμό συγκρατητήρα και τοποθετήστε τη σε έναν δεύτερο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 ο οποίος είχε παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), όπου θα αφήσετε τα δείγματα να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου επί 10–15 λεπτά.
Προχωρήστε απευθείας στο «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 35.

Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24

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

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Η αναφορά πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, που βρίσκεται στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 20), παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους όγκους των νουκλεοτιδίων, των ενζύμων και του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος που απαιτούνται για μια συγκεκριμένη εκτέλεση ανάλυσης.
- Φορτώστε ρύγχη μίας χρήσης (χωρίς υδρόφοβα φίλτρα) στο φυσίγγιο ώστε να εξασφαλιστεί η ορθή λειτουργία του φυσιγγίου.

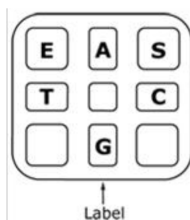
Διαδικασία

1. Διαλύστε τα μείγματα λυοφιλιωμένων ενζύμων και υποστρώματος σε 620 μl νερού (H₂O, παρέχεται).
2. Αναμείξτε περιστρέφοντας προσεκτικά το φιαλίδιο.

Σημείωση: Μη στροβιλίζετε!

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

3. Αφήστε τα αντιδραστήρια και το φυσίγγιο PyroMark Q24 να περιέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20–25°C).
 4. Τοποθετήστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με την ετικέτα στραμμένη προς το μέρος σας.
 5. Γεμίστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με τον απαιτούμενο όγκο μειγμάτων νουκλεοτιδίων, ενζύμων και υποστρώματος σύμφωνα με την Εικόνα 5 στη σελίδα 36.
- Βεβαιωθείτε ότι δεν μεταφέρονται φυσαλίδες αέρα από την πιπέτα στο φυσίγγιο.



Εικόνα 5. Απεικόνιση του φυσιγγίου PyroMark Q24 από την επάνω πλευρά. Οι ενδείξεις αντιστοιχούν στην ετικέτα στα φιαλίδια των αντιδραστηρίων. Προσθέστε το μείγμα ενζύμων (E), το μείγμα υποστρώματος (S) και τα νουκλεοτίδια (A, T, C, G) σύμφωνα με τις πληροφορίες όγκων που παρέχονται στην αναφορά πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση ανάλυσης.

6. Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και εισαγάγετε το γεμάτο φυσίγγιο αντιδραστηρίου με την ετικέτα προς τα έξω. Πιέστε το φυσίγγιο εντελώς προς τα μέσα και, στη συνέχεια, πιέστε το προς τα κάτω.
7. Βεβαιωθείτε ότι η γραμμή είναι ορατή μπροστά από το φυσίγγιο και κλείστε το διάφραγμα.
8. Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και τοποθετήστε την πλάκα στο θερμομαντικό μπλοκ.
9. Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.
10. Εισαγάγετε το USB stick (που περιέχει το αρχείο εκτέλεσης) στη θύρα USB στο μπροστινό μέρος του οργάνου.

Μην αφαιρέσετε το USB stick πριν ολοκληρωθεί η εκτέλεση.

11. Επιλέξτε «Run» (Εκτέλεση) στο κύριο μενού (χρησιμοποιώντας τα κουμπιά ▲ και ▼ στην οθόνη) και πατήστε «OK».
12. Επιλέξτε το αρχείο εκτέλεσης χρησιμοποιώντας τα κουμπιά ▲ και ▼ στην οθόνη.
Για να προβάλετε τα περιεχόμενα ενός φακέλου, επιλέξτε τον φάκελο και πατήστε «Select» (Επιλογή). Για να επιστρέψετε στην προηγούμενη προβολή, πατήστε «Back» (Πίσω).
13. Όταν έχει επιλεγεί το αρχείο κύκλου, πατήστε «Select» (Επιλογή), για να ξεκινήσει η εκτέλεση.
14. Όταν ολοκληρωθεί η εκτέλεση και το όργανο επιβεβαιώσει ότι το αρχείο εκτέλεσης έχει αποθηκευτεί στο USB stick, πατήστε «Close» (Κλείσιμο).
15. Αφαιρέστε το USB stick.
16. Ανοίξτε το καπάκι του οργάνου.
17. Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και αφαιρέστε το φυσίγγιο αντιδραστηρίων ανασηκώνοντας το και τραβώντας το προς τα έξω.
18. Κλείστε το διάφραγμα.
19. Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και αφαιρέστε την πλάκα από το θερμαντικό μπλοκ.
20. Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.
21. Απορρίψτε την πλάκα και καθαρίστε το φυσίγγιο σύμφωνα με τις οδηγίες στο δελτίο προϊόντος που συνοδεύει το φυσίγγιο.
22. Αναλύστε την εκτέλεση σύμφωνα με το «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 38.

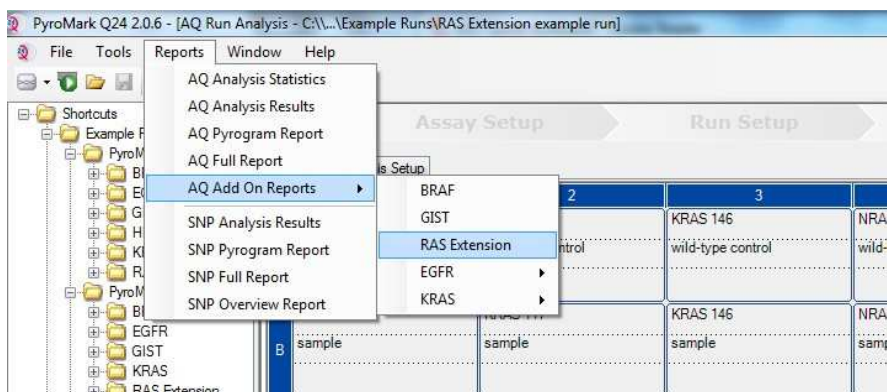
Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την ανάλυση μεταλλάξεων σε μια ολοκληρωμένη εκτέλεση thetascreen RAS Extension Pyro με τη βοήθεια του λογισμικού PyroMark Q24.

Διαδικασία

1. Εισαγάγετε στη θύρα USB του υπολογιστή το USB stick που περιέχει το αρχείο του διεξαχθέντος κύκλου.
2. Μεταφέρετε το αρχείο εκτέλεσης από το USB stick στην επιθυμητή θέση στον υπολογιστή με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows Explorer.
3. Ανοίξτε το αρχείο εκτέλεσης στον τρόπο λειτουργίας AQ του λογισμικού PyroMark Q24, είτε επιλέγοντας «Open» (Άνοιγμα) στο μενού «File» (Αρχείο) είτε με διπλό κλικ στο αρχείο (📁) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων.
4. Χρησιμοποιώντας το RAS Extension Plug-In Report για να δημιουργήσετε μια αναφορά προσθέτου, επιλέξτε «AQ Add On Reports/RAS Extension» (Αναφορές προσθέτου AQ/RAS Extension) από το «Reports» (Αναφορές) στο μενού (βλ. Εικόνα 6).

Σημείωση: Οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 του KRAS πρέπει επιπλέον να αναλυθούν με το ξεχωριστό πρόσθετο (plug-in) KRAS μέσω της επιλογής «AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61» (Αναφορές προσθέτου AQ/KRAS/Κωδικόνιο 61) από το «Reports» (Αναφορές) στο μενού (βλ. Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Μενού RAS Extension Plug-In Report.

Τα βυθίσματα θα αναλυθούν αυτόματα για όλες τις μεταλλάξεις για τις οποίες ο Πίνακας 9, σελίδα 46 δίνει μια τιμή LOD. Τα αποτελέσματα θα προβληθούν σε συνοπτικό πίνακα (βλ. Εικόνα 7), ακολουθούμενα από τα λεπτομερή αποτελέσματα, στα οποία περιλαμβάνονται τα διαγράμματα αλληλούχησης με πυροφωσφορικό (Pyrogram) και η ποιότητα ανάλυσης.

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.

Εικόνα 7. Αναφορά RAS Extension Plug-In Report

5. Χρήση της ανάλυσης AQ:

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



Ανάλυση όλων των βυθισμάτων.

Ανάλυση του επιλεγμένου βυθίσματος.

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

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

Σημείωση: Για αξιόπιστα αποτελέσματα, συνιστώνται ύψη μονής κορυφής άνω των 30 RLU. Ορίστε τις 30 RLU ως το απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα (required peak height for passed quality) στη ρύθμιση ανάλυσης και βεβαιωθείτε ότι ο συντελεστής μείωσης κορυφής A (A-peak reduction factor) έχει ρυθμιστεί στο 0,86 για την ανάλυση του κωδικονίου 61 του NRAS (βλ. «Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro», σελίδα 68, και το *εγχειρίδιο χρήσης PyroMark Q24*). Η αναφορά αποτελεσμάτων ανάλυσης AQ (AQ Analysis Results) πρέπει να χρησιμοποιείται για την τεκμηρίωση και την ερμηνεία της ποσοτικοποίησης αλληλόμορφων. Οι αριθμοί που φαίνονται στο Pyrogram είναι στρογγυλοποιημένοι και δεν αντιπροσωπεύουν με ακρίβεια την ποσοτικοποίηση.

Σημείωση: Το Pyrogram θα πρέπει να αντιπαραβάλλεται πάντοτε με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Οι μετρηθείσες κορυφές πρέπει να συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος. Βλ. επίσης σελίδα 43 «Ερμηνεία αποτελεσμάτων». **Επαναληπτική ανάλυση δειγμάτων χωρίς ανίχνευση μετάλλαξης με τυπική ρύθμιση «Sequence to analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) ή με ποιοτική αξιολόγηση «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία).**

Η τυπική αλληλουχία προς ανάλυση (Sequence to Analyze), όπως αυτή έχει οριστεί στη ρύθμιση ανάλυσης, καλύπτει τις πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις στις αναλύσεις *therascreen* RAS Extension Pyro.

Συνιστάται ιδιαίτερα η μη αυτόματη επαναληπτική ανάλυση όλων των δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη με την τυπική ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση), καθώς και των δειγμάτων με ποιοτική αξιολόγηση «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία). Οι ποιοτικές αξιολογήσεις «Check» (Έλεγχος) και «Failed» (Αποτυχία) μπορεί να υποδεικνύουν την παρουσία μιας μετάλλαξης που δεν εξετάζεται με την τυπική ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση), με αποτέλεσμα να προκύπτουν μη αναμενόμενες κορυφές αναφοράς.

Για την επαναληπτική ανάλυση και τη στόχευση άλλων μεταλλάξεων, μεταβείτε στο «Analysis Setup» (Ρύθμιση ανάλυσης) και αντικαταστήστε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) με τις παραλλαγές που περιγράφει ο Πίνακας 16 και ο Πίνακας 17 στο Παράρτημα Α ή με παραλλαγές για άλλες σπάνιες ή μη αναμενόμενες μεταλλάξεις. Κάντε κλικ στο «Apply» (Εφαρμογή) και, στη συνέχεια, στο «To All» (Σε όλα) όταν εμφανιστεί το παράθυρο «Apply Analysis Setup» (Εφαρμογή ρύθμισης ανάλυσης).

Ενημερωμένες συχνότητες μεταλλάξεων στα ανθρώπινα γονίδια KRAS και NRAS παρέχονται στο Διαδίκτυο από το Ινστιτούτο Sanger, στη διεύθυνση www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Σημείωση: Αφού αλλάξετε τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση), βεβαιωθείτε ότι το κατώφλιο για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί στις 30 RLU και ότι ο συντελεστής μείωσης κορυφής A έχει ρυθμιστεί στο 0,86 για την ανάλυση του κωδικονίου 61 του NRAS (βλ. «Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro»).

Σημείωση: Στην αλληλουχημένη περιοχή πιθανόν να υπάρχουν πρόσθετες σπάνιες ή μη αναμενόμενες μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να αναλυθούν με χρήση εναλλακτικών αλληλουχιών «Sequence to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση), που εξετάζουν μη αναμενόμενες μεταλλάξεις.

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

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου

Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα του DNA ελέγχου για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού. Αυτό είναι απαραίτητο για την ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την αναγνώριση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου, αλλά και ως μάρτυρας για τα επίπεδα υποβάθρου. Η μετρούμενη συχνότητα του δείγματος ελέγχου θα πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από το όριο τυφλού (LOB). Οι τιμές LOB (όριο τυφλού) και LOD (όριο ανίχνευσης) που δίνονται στα εγχειρίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν προσδιορίζεται η παρουσία μιας μετάλλαξης. Αυτές οι τιμές υπολογίστηκαν με χρήση μιγμάτων πλασμιδίων που έφεραν την αλληλουχία άγριου τύπου ή την αντίστοιχη μεταλλαγμένη αλληλουχία.

Μετά από ανάλυση με το λογισμικό PyroMark Q24 ή τις αναφορές Plug-In Reports, μπορούν να ληφθούν 3 πιθανά αποτελέσματα. Για τα δεδομένα LOD, βλ. Πίνακα 9.

- Συχνότητα μετάλλαξης $< \text{LOD}$: Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
- Συχνότητα μετάλλαξης $> \text{LOD} + 3$ εκατοστιαίες μονάδες: Μετάλλαξη
- Συχνότητα μετάλλαξης $\geq \text{LOD}$ και $\leq \text{LOD} + 3$ εκατοστιαίες μονάδες: Πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου

Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείτε το RAS Extension Plug-in Report (βλ. βήμα 5 στο «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 38) και προκύψει αυτό, θα εμφανιστεί μια προειδοποίηση.

Η περιοχή τιμών από το LOD έως το $\text{LOD} + 3$ εκατοστιαίες μονάδες επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου με υψηλή ευαισθησία υπό ιδανικές συνθήκες.

Εάν μετρηθεί συχνότητα μεγαλύτερη από το LOB στο μη μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, τότε το επίπεδο του υποβάθρου στην αντίστοιχη εκτέλεση αλληλούχησης είναι υψηλότερο από το συνηθισμένο και άρα ενδέχεται να επηρεαστεί η ποσοτική εκτίμηση των αλληλόμορφων, ιδίως για μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που συνοδεύονται από την προειδοποίηση «Potential low level mutation» (Πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου) πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά.

Τα δείγματα με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου θα πρέπει να θεωρούνται θετικά για τη μετάλλαξη αυτή μόνον εάν αυτό επιβεβαιωθεί με επανάληψη της αλληλούχησης εις διπλούν, μαζί με το μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου. Τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων θα πρέπει να αναφέρουν την ίδια μετάλλαξη με τιμές \geq LOD, ενώ το δείγμα ελέγχου θα πρέπει να δίνει αποτέλεσμα «No mutation detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη). Διαφορετικά, το δείγμα θα πρέπει να χαρακτηριστεί «No mutation detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη).

Η παρουσία αυξημένου υπόβαθρου για μια μετάλλαξη μπορεί να διαπιστωθεί με σύγκριση των τιμών LOB που αναφέρονται στο εγχειρίδιο με τις μετρήσεις που λαμβάνονται με το μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου. Τα δείγματα με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου θα πρέπει να χαρακτηριστούν «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) χωρίς να εκτελεστεί επανάληψη εάν η συχνότητα που μετρήθηκε με το μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου είναι υψηλότερη από την τιμή LOB που δίνεται στο εγχειρίδιο για την αντίστοιχη μετάλλαξη. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση που αναφέρεται πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου υπάρχουν 3 διαφορετικά ενδεχόμενα.

1. Συχνότητα μέτρησης με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου $>$ LOB για αυτή τη μετάλλαξη: Το δείγμα μπορεί να χαρακτηριστεί «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) χωρίς επανάληψη.
2. Δεν λαμβάνεται το ίδιο αποτέλεσμα κατά την επανάληψη: Χαρακτηρίστε το δείγμα «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη).

3. Λαμβάνονται τα ίδια αποτελέσματα κατά την επανάληψη και το μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου έχει τιμή < LOB για την αντίστοιχη μετάλλαξη: Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη.

Σημείωση: Το Pyrogram θα πρέπει να αντιπαραβάλλεται πάντοτε με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Οι μετρηθείσες κορυφές πρέπει να συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος. Τα Pyrogram πρέπει να εξετάζονται για να εντοπιστούν τυχόν απροσδόκητες κορυφές. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές δεν συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν εξηγούνται από σπάνιες ή μη αναμενόμενες μεταλλάξεις, συνιστάται η επαναληπτική αλληλούχηση του δείγματος. Τα αποτελέσματα των αποτυχημένων αντιδράσεων αλληλούχησης δεν αποτελούν σωστή βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης. Σε περίπτωση πραγματικής μετάλλαξης, η μεταβολή στο ύψος μιας κορυφής συνοδεύεται πάντοτε από αντίστοιχη μεταβολή στο ύψος κάποιας άλλης κορυφής. Η μεταβολή στο ύψος μόνο μίας κορυφής δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως ένδειξη πιθανής μετάλλαξης.

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

Σημείωση: Η απόφαση για τη θεραπευτική αγωγή καρκινοπαθών ασθενών δεν πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στην κατάσταση μεταλλάξεων του KRAS και του NRAS.

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

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέως	Αντικατάσταση αμινοξέως	LOB (εκατοστιαίες μονάδες)	LOD (εκατοστιαίες μονάδες)	COSMIC ID* (V70)
KRAS κωδικόνιο 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS κωδικόνιο 61 (CAA)				
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
KRAS κωδικόνιο 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS κωδικόνιο 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS κωδικόνιο 12 (GGT)				
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
NRAS κωδικόνιο 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569

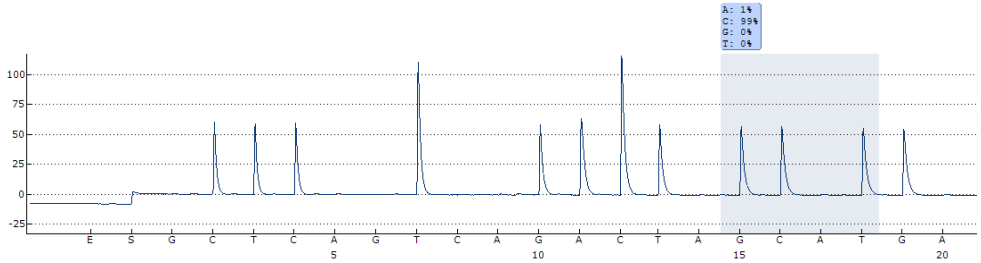
Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (εκατοστιαίες μονάδες)	LOD (εκατοστιαίες μονάδες)	COSMIC ID* (V70)
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS κωδικόνιο 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS κωδικόνιο 61 (CAA)				
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
NRAS κωδικόνιο 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS κωδικόνιο 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

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

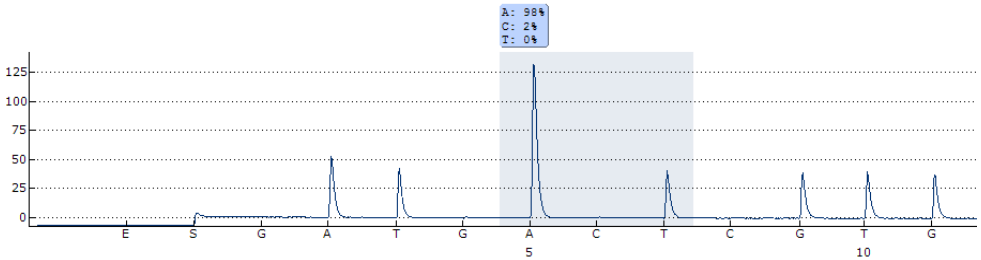
† Το χαμηλότερο επίπεδο μετάλλαξης σε ένα δείγμα που οδηγεί σε μέτρηση συχνότητας \geq LOD.

Ενδεικτικά αποτελέσματα

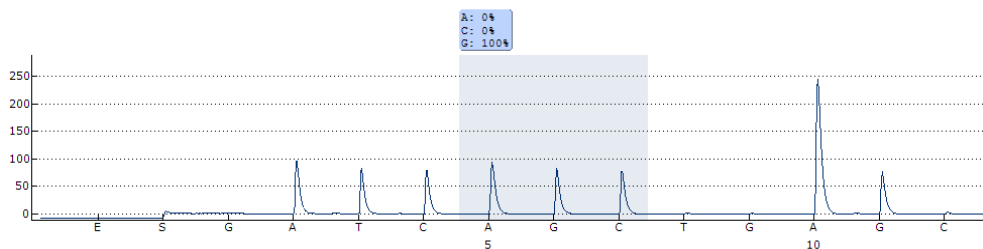
Ενδεικτικά αποτελέσματα Pyrogram παρουσιάζονται στις Εικόνες 8–15.



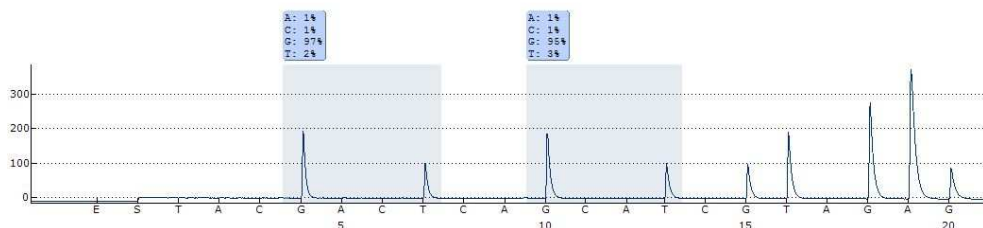
Εικόνα 8. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση KRAS 59/61.



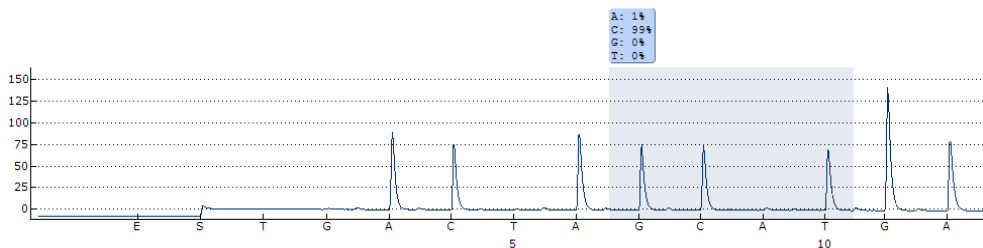
Εικόνα 9. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση KRAS 117.



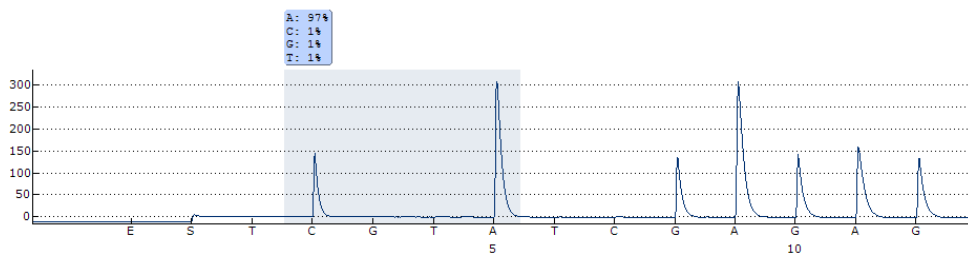
Εικόνα 10. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση KRAS 146.



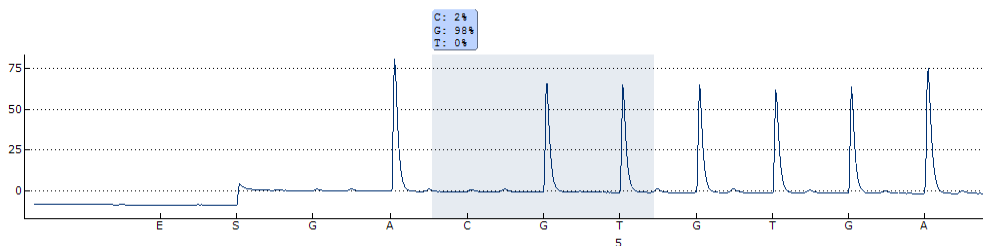
Εικόνα 11. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση NRAS 12/13.



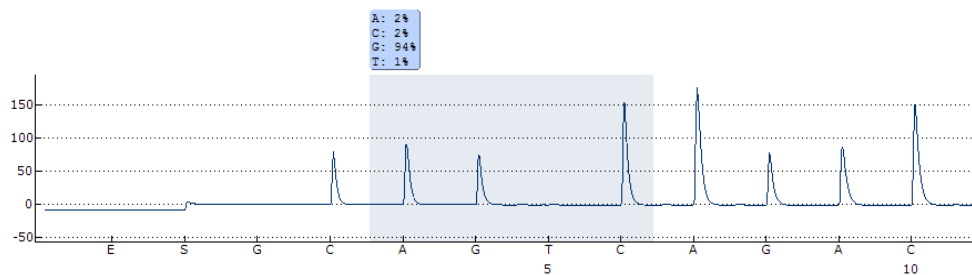
Εικόνα 12. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση NRAS 59.



Εικόνα 13. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση NRAS 61.



Εικόνα 14. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση NRAS 117.



Εικόνα 15. Ήχος Pyrogram που προκύπτει από την εξέταση ενός δείγματος με γονότυπο άγριου τύπου με την ανάλυση NRAS 146.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε ερωτήσεις σχετικά με τα πρωτόκολλα αυτού του εγχειριδίου ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Σχόλια και συστάσεις

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

- α) Χαμηλό ύψος κορυφής
- Τυχόν σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού είναι πιθανό να οδηγήσουν σε χαμηλές τιμές κορυφής.
- Τα δείγματα πρέπει οπωσδήποτε να αναρροφώνται πλήρως με το εργαλείο κενού. Βεβαιωθείτε ότι το εργαλείο κενού εισάγεται αργά μέσα στα δείγματα και ότι η γεωμετρία της πλάκας ή των ταινιών PCR που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση επιτρέπει την πλήρη αναρρόφηση των δειγμάτων.
- Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδειχθεί.
- Εάν εμφανιστεί προειδοποίηση «Check» (Έλεγχος), συγκρίνετε προσεκτικά το Pyrogram με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να εμφανίσετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος, το αποτέλεσμα είναι έγκυρο. Διαφορετικά, συνιστάται η επαναληπτική ανάλυση του δείγματος.
- β) Η μετάλλαξη δεν ορίζεται
- στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση)
- Προσαρμόστε την παράμετρο «Sequence to Analyze» στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. «Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro», σελίδα 68) και επαναλάβετε την ανάλυση της εκτέλεσης. Οι μεταλλάξεις που δεν καλύπτονται από τη ρύθμιση «Sequences to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση) μπορούν να ταυτοποιηθούν με το εργαλείο προσομοίωσης μοτίβων.

Σχόλια και συστάσεις

- γ) Μη αναμενόμενη σπάνια μετάλλαξη
Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης «Check» (Ελεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία) μπορεί να οφείλονται σε μη αναμενόμενο μοτίβο κορυφών. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία μιας μη αναμενόμενης μετάλλαξης, η οποία δεν αναλύεται με την παρεχόμενη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση). Τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αναλυθούν χρησιμοποιώντας την εναλλακτική ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία μη αναμενόμενων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις που δεν καλύπτονται από τη ρύθμιση «Sequences to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση) μπορούν να ταυτοποιηθούν με το εργαλείο προσομοίωσης μοτίβων.
- δ) Προειδοποίηση μεγάλης απόκλισης ύψους κορυφής για κάποια προσθήκη αντιδραστηρίων
Το Pyrogram θα πρέπει να αντιπαραβάλλεται προσεκτικά με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές δεν συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν εξηγούνται από σπάνιες μεταλλάξεις, συνιστάται η επαναληπτική ανάλυση του δείγματος.

Υψηλό υπόβαθρο

- α) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης των νουκλεοτιδίων
Φυλάσσετε τα νουκλεοτίδια σε θερμοκρασία 2–8°C. Η αποθήκευση σε θερμοκρασία –15 έως –25°C μπορεί να προκαλέσει αύξηση του υποβάθρου.
- β) Σύντομος χρόνος ψύξης των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού
Αφήστε τα δείγματα σε έναν συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου επί 10–15 λεπτά. Μη συντομεύετε τον χρόνο ψύξης.
- γ) Μόλυνση του φυσιγγίου
Καθαρίστε προσεκτικά το φυσιγγίο όπως περιγράφεται στο δελτίο του προϊόντος. Φυλάξτε το φυσιγγίο σε θέση προστατευμένη από το φως και τη σκόνη.

Απουσία σημάτων στο θετικό ορό ελέγχου (ορός ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA)

- α) Ανεπαρκής ποσότητα μείγματος ενζύμων ή υποστρώματος για όλα τα βυθίσματα
Βεβαιωθείτε ότι η πλήρωση του φυσιγγίου PyroMark Q24 εκτελείται σύμφωνα με το «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν την εκτέλεση) στο μενού «Tools» (Εργαλεία).
- β) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης ή αραίωσης των αντιδραστηρίων
Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με τις οδηγίες στις παραγράφους «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 17, και «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 35.
- γ) Αποτυχία προετοιμασίας της PCR ή των δειγμάτων
Καθαρίστε προσεκτικά το φυσιγγίο όπως περιγράφεται στο δελτίο του προϊόντος. Φυλάξτε το φυσιγγίο σε θέση προστατευμένη από το φως και τη σκόνη.

Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro έχει ελεγχθεί με βάση προκαθορισμένες προδιαγραφές ώστε να διασφαλιστεί η σταθερή ποιότητα των προϊόντων.

Περιορισμοί

Η εξέταση έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση 37 μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS ή NRAS. Τα δείγματα με αποτελέσματα που αναφέρονται ως «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) ενδέχεται να φέρουν μεταλλάξεις KRAS ή NRAS που δεν ανιχνεύονται με τη μέθοδο.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων εξαρτάται από την ακεραιότητα του δείγματος και την ποσότητα του ενισχύσιμου DNA που υπάρχει στο δείγμα.

Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro χρησιμοποιείται σε μια διαδικασία στην οποία εφαρμόζεται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Όπως συμβαίνει σε όλες τις διαδικασίες PCR, τα δείγματα ενδέχεται να μολυνθούν από εξωτερικές πηγές DNA στο περιβάλλον εξέτασης και το DNA στο θετικό ορό ελέγχου. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων μίγματος αντίδρασης.

Οποιαδήποτε διαγνωστικά αποτελέσματα προκύπτουν πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα.

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

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το όριο τυφλού (LOB) και το όριο ανίχνευσης (LOD) έχουν προσδιοριστεί για μια σειρά μεταλλάξεων με τη χρήση μειγμάτων πλασμιδίων (Πίνακας 10). Τα LOB και LOD προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις που παρέχονται με τα έγγραφα *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline”* [Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI), οδηγία EP17-A: Πρωτόκολλο για τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού, εγκεκριμένη οδηγία) (κωδικόνια 12, 13, 61 του NRAS και κωδικόνιο 61 του KRAS) και *EP17-A2 “Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition”* (EP17-A2: Αξιολόγηση δυνατοτήτων ανίχνευσης για διαδικασίες εργαστηριακών μετρήσεων, εγκεκριμένη οδηγία – δεύτερη έκδοση) (όλα τα υπόλοιπα κωδικόνια). Τα σφάλματα α και β (ψευδώς θετικό και ψευδώς αρνητικό αντίστοιχα) καθορίστηκαν στο 5%. Οι τιμές LOB αντιπροσωπεύουν τη μετρηθείσα συχνότητα που προέκυψε από ένα δείγμα άγριου τύπου. Οι τιμές LOD αντιπροσωπεύουν το ελάχιστο σήμα (μετρηθείσα συχνότητα) που μπορεί να θεωρηθεί θετικό για την αντίστοιχη μετάλλαξη.

Πίνακας 10. Όρια LOB και LOD που καθορίστηκαν για συγκεκριμένες μεταλλάξεις

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέως	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (εκατοστιαίες μονάδες)	LOD (εκατοστιαίες μονάδες)	COSMIC ID* (V70)
KRAS κωδικόνιο 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS κωδικόνιο 61 (CAA)				
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
KRAS κωδικόνιο 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS κωδικόνιο 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS κωδικόνιο 12 (GGT)				
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
NRAS κωδικόνιο 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (εκατοστιαίες μονάδες)	LOD (εκατοστιαίες μονάδες)	COSMIC ID* (V70)
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS κωδικόνιο 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS κωδικόνιο 61 (CAA)				
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
NRAS κωδικόνιο 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS κωδικόνιο 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

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

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

Μεταλλάξεις GGT > TGT και GGT > GTT στο κωδικόνιο 13 του NRAS

Για αυτές τις μεταλλάξεις, οι μετρήσεις τυφλού ήταν κατά κανόνα 0% μονάδες με αποτέλεσμα να προκύψει μη κανονική (κατά Gauss) κατανομή. Για το λόγο αυτό, το όριο LOD καθορίστηκε με τη χρήση διαφορετικής μεθόδου, σύμφωνα με τις συστάσεις της Οδηγίας EP17-A του CLSI. Το χαμηλότερο σήμα που υποδεικνύει την παρουσία

μετάλλαξης (LOD) στις θέσεις αυτές καθορίστηκε σε 2 ποσοστιαίες μονάδες πάνω από το αντίστοιχο επίπεδο γραμμής αναφοράς, όπως καθορίστηκε από το 95ο εκατοστημόριο των μετρήσεων τυφλού. Όταν αναλύθηκε δείγμα με το επίπεδο μετάλλαξης που δίνεται σε παρενθέσεις στον Πίνακα 9, το 95% των αποτελεσμάτων (n=72) έδωσε σήμα που μπορεί να θεωρηθεί θετικό (\geq LOD). Για τα LOB/LOD βλ. Πίνακα 9.

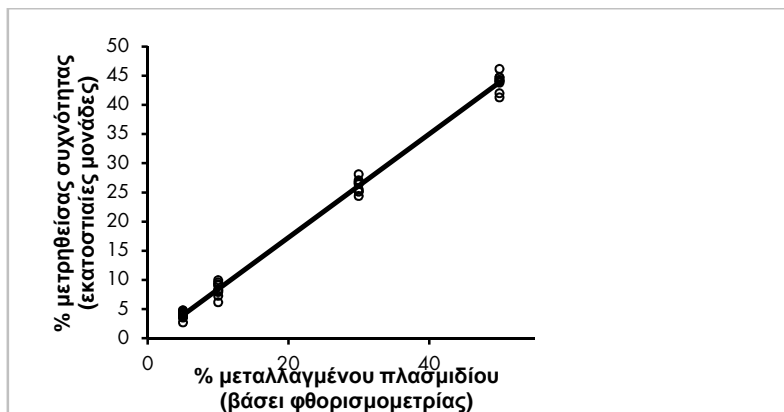
Σημείωση: Οι εκκινητές PCR και αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού για τα κωδικόνια 12, 13 και 61 του NRAS λαμβάνονται χωρίς αλλαγές από το kit *therascreen* NRAS Pyro (αρ. κατ. 971530). Τα δεδομένα απόδοσης για αυτά τα κωδικόνια του NRAS δεν μεταβάλλονται.

Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα προσδιορίστηκε με χρήση μειγμάτων πλασμιδίων που φέρουν την αλληλουχία άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αλληλουχία για τις μεταλλάξεις 176C>G στο κωδικόνιο 59 του KRAS, 351A>T στο κωδικόνιο 117 του KRAS, 436G>C στο κωδικόνιο 146 του KRAS, 34G>A στο κωδικόνιο 12 του NRAS, 37G>A στο κωδικόνιο 13 του NRAS, 175G>A στο κωδικόνιο 59 του NRAS, 182A>G στο κωδικόνιο 61 του NRAS, 351G>C στο κωδικόνιο 117 του NRAS και 437C>T στο κωδικόνιο 146 του NRAS. Τα πλασμίδια αναμείχθηκαν σε αναλογίες τέτοιες ώστε να προκύψουν 4 επίπεδα μετάλλαξης (5, 10, 30 και 50%). Κάθε μείγμα αναλύθηκε με 3 διαφορετικές παρτίδες του kit *therascreen* RAS Extension Pyro, σε 3 εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού, με 3 επαναλήψεις στην καθεμία.

Τα αποτελέσματα (n=9 για κάθε επίπεδο μετάλλαξης) αναλύθηκαν σύμφωνα με την οδηγία EP6-A2 “Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline” (Αξιολόγηση της γραμμικότητας των διαδικασιών ποσοτικής μέτρησης: μια στατιστική προσέγγιση – εγκεκριμένη οδηγία) του CLSI, με χρήση του λογισμικού Analyse-it® v2.21. Αυτά τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 16.

Τα αποτελέσματα ήταν γραμμικά εντός του επιτρεπόμενου ορίου μη γραμμικότητας των 5 εκατοστιαίων μονάδων για την ελεγχθείσα περιοχή τιμών επιπέδου μετάλλαξης (από 5% έως 50%). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για όλες τις εξεταζόμενες μεταλλάξεις στα κωδικόνια 59, 117 και 146 του KRAS καθώς και τα κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117 και 146 του NRAS.



Εικόνα 16. Γραμμικότητα της μετάλλαξης 176C>G στο κωδικόνιο 59 του KRAS.

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για όλες τις εξεταζόμενες μεταλλάξεις στα κωδικόνια 59, 117 και 146 του KRAS καθώς και τα κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117 και 146 του NRAS.

Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας επιτρέπουν τον προσδιορισμό της συνολικής μεταβλητότητας των μεθόδων ανάλυσης και προέκυψαν σε 3 διαφορετικά επίπεδα, μέσω ανάλυσης των προαναφερθέντων μειγμάτων πλασμιδίων, σε 3 επαναλήψεις το καθένα.

Η επαναληψιμότητα (μεταβλητότητα εντός μεθόδου και μεταξύ παρτίδων) υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα προσδιορισμού γραμμικότητας (3 εκτελέσεις ανάλυσης την ίδια ημέρα με χρήση διαφορετικών παρτίδων του kit *therascreen* RAS Extension Pyro). Η ενδιάμεση

ακρίβεια (μεταβλητότητα εντός εργαστηρίου) προσδιορίστηκε από 3 εκτελέσεις στο ίδιο εργαστήριο σε 3 διαφορετικές ημέρες. Οι εκτελέσεις πραγματοποιήθηκαν από διαφορετικούς χειριστές με χρήση συστημάτων PyroMark Q24 και πολλών διαφορετικών κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro. Η αναπαραγωγιμότητα (μεταβλητότητα μεταξύ εργαστηρίων) υπολογίστηκε με 2 εκτελέσεις ανάλυσης σε δύο ανεξάρτητα εργαστήρια και με χρήση διαφορετικών παρτίδων του κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro.

Οι εκτιμήσεις ακρίβειας εκφράζονται ως τιμές τυπικής απόκλισης των μετρούμενων συχνοτήτων μετάλλαξης, σε εκατοστιαίες μονάδες (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Ακρίβεια μεταλλάξεων*

% μεταλλαγμένου πλάσμιδιου [†]	Επαναληψιμότητα		Ενδιάμεση ακρίβεια		Αναπαραγωγιμότητα	
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD
176C>G στο κωδικόνιο 59 του KRAS						
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
351A>T στο κωδικόνιο 117 του KRAS						
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
436G>C στο κωδικόνιο 146 του KRAS						
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
34G>A στο κωδικόνιο 12 του NRAS[†]						

% μεταλλαγμένου πλασμιδίου [†]	Επαναληψιμότητα		Ενδιάμεση ακρίβεια		Αναπαραγωγιμότητα	
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD
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
175G>A στο κωδικόνιο 59 του NRAS						
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
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
182A > G στο κωδικόνιο 61 του NRAS						
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
351G>C στο κωδικόνιο 117 του NRAS						
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
437C>T στο κωδικόνιο 146 του NRAS						
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

* Όλες οι τιμές παρέχονται σε ποσοστιαίες μονάδες. SD: τυπική απόκλιση (n=9 για την επαναληψιμότητα και την ενδιάμεση ακρίβεια, n=12 για την αναπαραγωγιμότητα).

[†] Βάσει φθορισμομετρίας – για την 34G>A στο κωδικόνιο 12 του NRAS βάσει της OD₂₆₀.

Διαγνωστική αξιολόγηση

Το κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro αξιολογήθηκε σε σύγκριση με την αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger σε 2 διαφορετικές μελέτες.

Είχε πραγματοποιηθεί παλαιότερα μια πρώτη μελέτη για την αξιολόγηση του κιτ *therascreen* NRAS Pyro σε σύγκριση με την αλληλούχηση κατά Sanger. DNA απομονώθηκε από 100 δείγματα όγκων μυελού οστών μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) και αναλύθηκε ως προς την παρουσία μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12/13 και στο κωδικόνιο 61.

Δεδομένου ότι οι αναλύσεις που εξετάζουν τα κωδικόνια 12/13 και 61 του NRAS στο κιτ *therascreen* NRAS Pyro συμπεριλαμβάνονται χωρίς αλλαγή στο κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro, δίνονται τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση του κιτ *therascreen* NRAS Pyro.

Για τη δεύτερη μελέτη, DNA απομονώθηκε από 110 δείγματα όγκων mCRC μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) και αναλύθηκε ως προς την παρουσία μεταλλάξεων στα κωδικόνια 59, 61, 117 και 146 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS και τα κωδικόνια 59, 117 και 146 του ανθρώπινου γονιδίου NRAS. Οι μεταλλάξεις χαμηλής συχνότητας αναλύθηκαν με χρήση πλασμιδιακού DNA στο οποίο είχε προστεθεί DNA άγριου τύπου από FFPE.

Και στις δύο μελέτες, το DNA απομονώθηκε με τη βοήθεια του κιτ QIAamp DNA FFPE Tissue και κατόπιν αναλύθηκε με τις αναλύσεις που περιλαμβάνονται στο κιτ *therascreen* RAS Extension Pyro με το σύστημα PyroMark Q24. Η αλληλούχηση κατά Sanger πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer.

Αξιολόγηση των κωδικονίων 12, 13 και 61 του NRAS

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger, η κατάσταση μετάλλαξης προσδιορίστηκε σε 97 δείγματα για τα κωδικόνια 12/13 και για το κωδικόνιο 61. Σε 4 από τα 100 δείγματα εντοπίστηκε μια μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 ή στο κωδικόνιο 13 με τη μέθοδο Sanger.

Σε 2 από τα 100 δείγματα, η κατάσταση μετάλλαξης αναπαράχθηκε με το κιτ *therascreen* NRAS Pyro και δεν αναφέρθηκε μετάλλαξη. Ο Πίνακας 12 παρουσιάζει τα αποτελέσματα. Δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη στο κωδικόνιο 61.

Εάν εξαιρεθούν τα δείγματα στα οποία απέτυχε η μία ή και οι δύο μέθοδοι, το κιτ *therascreen* NRAS Pyro και η αλληλούχηση κατά Sanger παρουσιάζουν συμφωνία κατά 98% και 100% στα αποτελέσματα για τα κωδικόνια 12/13 και το κωδικόνιο 61 αντίστοιχα. Βλ. Πίνακας 12.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα αναλυθέντων δειγμάτων για τα NRAS 12, 13 και 61

		Αλληλούχηση κατά Sanger				Σύνολο
		Μεταλλαγμένο στο κωδικόνιο 12/13	Μεταλλαγμένο στο κωδικόνιο 61	Άγριου τύπου	Άγνωστο	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Μεταλλαγμένο στο κωδικόνιο 12/13	2	–	–	–	2
	Μεταλλαγμένο στο κωδικόνιο 61	–	–	–	–	–
	Άγριου τύπου	2	–	90	3	95
	Άγνωστο	–	–	3	–	3
	Σύνολο	4	–	93	3	100

Αξιολόγηση των κωδικονίων 59, 61, 117, 146 του KRAS και των κωδικονίων 59, 117, 146 του NRAS

DNA απομονώθηκε από 110 δείγματα όγκων mCRC μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) και αναλύθηκε ως προς την παρουσία μεταλλάξεων στα κωδικόνια 59, 61, 117 και 146 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS και τα κωδικόνια 59, 117 και 146 του ανθρώπινου γονιδίου NRAS. Λόγω της αναμενόμενης χαμηλής αφθονίας τους στα κλινικά δείγματα, όλες οι μεταλλάξεις που εξετάζονται με το kit *therascreen* RAS Extension αναλύθηκαν σε 56 πρόσθετα δείγματα με χρήση πλασμιδιακού DNA που είχε προστεθεί σε DNA άγριου τύπου από FFPE. Όλες οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν τόσο με την αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού όσο και με την αλληλούχηση κατά Sanger.

Από τα 166 δείγματα που αναλύθηκαν, συμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ του kit *therascreen* RAS Extension Pyro και της μεθόδου Sanger παρατηρήθηκε συνολικά σε 137 δείγματα (83%).

Οι περιπτώσεις ασυμφωνίας μπορούν να εξηγηθούν ως οφειλόμενες σε διάφορους παράγοντες.

Λόγω του υψηλού σήματος υποβάθρου, απέτυχε η ανάλυση 20 δειγμάτων ως προς το NRAS 59 με τη μέθοδο Sanger.

Η μέθοδος Sanger δεν ανίχνευσε μεταλλάξεις στα KRAS 59 και KRAS 61 σε 1 και 3 δείγματα αντίστοιχα. Και οι 4 μεταλλάξεις έδωσαν αποτελέσματα χαμηλής συχνότητας κατά την αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού (7,5–13,1%). Αυτό εξηγείται από τη χαμηλότερη ευαισθησία της αλληλούχησης κατά Sanger (15–20%) σε σύγκριση με την αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού (5%) (2). Όλα τα υπόλοιπα έγκυρα δείγματα βρέθηκαν άγριου τύπου και με τις δύο τεχνικές.

Ένα δείγμα χαρακτηρίστηκε «άγνωστο» με τη μέθοδο πυροφωσφορικού επειδή ανιχνεύτηκε διπλή μετάλλαξη (KRAS 59–61).

Τέσσερα δείγματα που περιείχαν πρόσθετο πλασμιδιακό DNA εμφάνισαν μια επιπλέον μετάλλαξη A>G στη θέση 350 της κωδικής αλληλουχίας του KRAS, η οποία δεν εξετάζεται από το kit *therascreen* RAS Extension Pyro. Οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν μετά από μη αυτόματη ανάλυση.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων για τα κωδικόνια 59, 61, 117, 146 του KRAS και τα κωδικόνια 59, 117, 146 του NRAS

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	Άγρ. τύπ.	Άγνω- στο	Σύ- νολο
<i>therascreen</i> 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 ^a	–	–	–	–	16	–	–	16
	NRAS ^b	–	–	–	–	–	28	–	28
	Άγρ.τύπ.	–	–	–	–	–	71	16	87
	Άγνωστο	1	–	–	–	–	3	2	6
	Σύνολο	9	6	4	3	20	28	76	20

Άγρ.τύπ.: Άγριου τύπου

^a Δείγματα με προσθήκη KRAS που έφεραν μεταλλάξεις KRAS 117 και 146.

^β Δείγματα με προσθήκη NRAS που έφεραν μεταλλάξεις στα NRAS 59, 117 και 146.

* Ένα δείγμα βρέθηκε μεταλλαγμένο για το KRAS 146 αλλά έδωσε άκυρο αποτέλεσμα για το NRAS 117.

Ο Πίνακας 14 περιγράφει την ευαισθησία και την ειδικότητα των μεθόδων ανά κωδικόνιο.

Πίνακας 14. Ευαισθησία και ειδικότητα των αναλύσεων για τα κωδικόνια 59, 61, 117, 146 του KRAS και τα κωδικόνια 59, 117, 146 του NRAS

	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Εξεταζόμενη μετάλλαξη
Μετάλλαξη KRAS 59	100%	99%	175G>A / 176C>G
Μετάλλαξη KRAS 61	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Μετάλλαξη KRAS 117	100%	100%	351A>C / 351A>T
Μετάλλαξη KRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Μετάλλαξη NRAS 59	100%	100%	175G>A / 176C>G
Μετάλλαξη NRAS 117	100%	100%	351G>C / 351G>T
Μετάλλαξη NRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
















Σημείωση: Σε όλες τις εκτελέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης, το σήμα ήταν πάνω από 30 RLU, όπως κατά κανόνα προκύπτει από 10 ng DNA που απομονώθηκε από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE). Τα δεδομένα αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού αναλύθηκαν με τη βοήθεια του RAS Extension Plug-in Report για τα κωδικόνια 59, 117 και 146 του KRAS καθώς και τα κωδικόνια 59, 117 και 146 του NRAS.

Βιβλιογραφία

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.

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στην συσκευασία και την επισήμανση.

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
 <N>	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού
	Συστατικά
	Περιεχόμενα
	Αριθμός
	Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας
	Περιορισμοί θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης
	Προσοχή

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/Support, καλέστε το 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή τους κατά τόπους αντιπροσώπους (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* RAS Extension Pyro

Εάν έχει εγκατασταθεί το RAS Extension Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες ρυθμίσεις ανάλυσης για τα κωδικόνια 59/61, 117 και 146 του KRAS και τα κωδικόνια 12/13, 59, 61, 117 και 146 του NRAS στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του λογισμικού PyroMark Q24. Ακολουθήστε τη διαδρομή «Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension» (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/RAS Extension). Σε αυτήν την περίπτωση, τα παρακάτω βήματα δεν χρειάζεται να εκτελεστούν.


Μπορείτε να πραγματοποιήσετε λήψη του RAS Extension Plug-in Report από τη σχετική σελίδα καταλόγου στη διεύθυνση www.qiagen.com, στην καρτέλα «Product Resources» (Πόροι προϊόντος), στην ενότητα «Protocol Files» (Αρχεία πρωτοκόλλου).

Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση του RAS Extension Plug-in Report αντί της μη αυτόματης ανάλυσης.

Μετά την εγκατάσταση του προσθέτου (plug-in) ή κάθε φορά που γίνεται αναβάθμιση ή εγκατάσταση νέου λογισμικού στον υπολογιστή, η σωστή λειτουργία του plug-in πρέπει να επαληθεύεται όπως περιγράφεται στον συνοπτικό οδηγό RAS Extension Plug-In Quick Guide.

Εάν δεν έχει εγκατασταθεί το RAS Extension Plug-in Report, το αρχείο ανάλυσης πρέπει να ρυθμιστεί μη αυτόματα πριν από την πρώτη εκτέλεση της ανάλυσης *therascreen* RAS Extension Pyro. Ρυθμίστε την ανάλυση για τα κωδικόνια 59/61, 117 και 146 του KRAS και τα κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117 και 146 του NRAS χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24 όπως περιγράφεται παρακάτω.


Διαδικασία

1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέα ανάλυση AQ).
2. Ο Πίνακας 9 δείχνει τις αλληλουχίες προς ανάλυση (Sequences to Analyze) και για τις οκτώ αναλύσεις RAS Extension Pyro. Πληκτρολογήστε την αλληλουχία για τη συγκεκριμένη ανάλυση στο πεδίο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
3. Η ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί επίσης να τροποποιηθεί μετά την εκτέλεση ώστε να αναλυθούν μεταλλάξεις σε διαφορετικές θέσεις (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 38).
4. Για να ελέγξετε εάν υπάρχουν μεταλλάξεις σε άλλα νουκλεοτίδια, αλλάξτε τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) όπως καθορίζεται στον Πίνακα 10. Η αλλαγή της ρύθμισης «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να γίνει μετά την εκτέλεση (εφόσον δεν έχει κλειδωθεί).

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU. Επίσης, βεβαιωθείτε ότι ο συντελεστής μείωσης κορυφής A έχει ρυθμιστεί στο 0,86 για την ανάλυση του κωδικονίου 61 του NRAS.

5. Πληκτρολογήστε τη σειρά χορήγησης (Dispensation Order) που φαίνεται στον Πίνακα 9 για τη συγκεκριμένη ανάλυση.

Σημείωση: Μη χρησιμοποιήσετε το κουμπί «Generate Dispensation Order» (Παραγωγή σειράς χορήγησης). Οι ρυθμίσεις «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) και «Dispensation Order» (Σειρά χορήγησης) πρέπει να πληκτρολογηθούν μη αυτόματα.

6. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.
7. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση με το όνομα «KRAS 59/61» ή «KRAS 117» ή «KRAS 146» ή «NRAS 12/13» ή «NRAS 59» ή «NRAS 61» ή «NRAS 117» ή «NRAS 146».

Πίνακας 15. Ρύθμιση ανάλυσης: «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) και «Dispensation Order» (Σειρά χορήγησης) για τις οκτώ αναλύσεις του kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Ανάλυση <i>therascreen</i> RAS Extension	Αλληλουχία προς ανάλυση	Σειρά χορήγησης
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	ABTGTGATTT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Πίνακας 16. Κοινές μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο KRAS που ανιχνεύονται με το kit *therascreen* RAS Extension Pyro με την αντίστοιχη αλληλουχία προς ανάλυση (Sequence to Analyze)

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	Αλληλουχία προς ανάλυση	COSMIC ID* (V70)
KRAS κωδικόνιο 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS κωδικόνιο 61 (CAA)			
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
KRAS κωδικόνιο 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	Αλληλουχία προς ανάλυση	COSMIC ID* (V70)
KRAS κωδικόνιο 146 (GCA)			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAGA	19900

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

Πίνακας 17. Κοινές μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο NRAS που ανιχνεύονται με το kit *therascreen RAS Extension Pyro* με την αντίστοιχη αλληλουχία προς ανάλυση (Sequence to Analyze)

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	Αλληλουχία προς ανάλυση	Cosmic ID* (V70)
NRAS κωδικόνιο 12 (GGT)			
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
NRAS κωδικόνιο 13 (GGT)			
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
NRAS κωδικόνιο 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACA VCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	–
NRAS κωδικόνιο 117 (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATT	–
351G>T	K117N	ABTGTGATT	–
NRAS κωδικόνιο 61 (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	Αλληλουχία προς ανάλυση	Cosmic ID* (V70)
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS κωδικόνιο 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

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

Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων



ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Επικίνδυνα χημικά

Το διάλυμα αποδιάταξης που χρησιμοποιείται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, το οποίο προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια και το δέρμα.

Φοράτε πάντοτε προστατευτικά γυαλιά, γάντια και εργαστηριακή ποδιά.

Η αρμόδια αρχή (π.χ. ο υπεύθυνος του εργαστηρίου) πρέπει να λαμβάνει τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χώρος εργασίας είναι ασφαλής και ότι οι χειριστές των οργάνων δεν εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα τοξικών ουσιών (χημικών ή βιολογικών), όπως καθορίζεται στα ισχύοντα δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS) ή τα έγγραφα των OSHA*, ACGIH† και COSHH‡.

Ο εξαιρισμός για τις αναθυμιάσεις και η απόρριψη των αποβλήτων πρέπει συμμορφώνονται με τους εθνικούς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς και νόμους σχετικά με την υγεία και την ασφάλεια.

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

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

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

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

Σημαντική πληροφορία πριν από την έναρξη

- Για το πρωτόκολλο αυτό απαιτείται νερό υψηλής καθαρότητας.

Διαδικασία

1. Βεβαιωθείτε ότι στο εργαλείο κενού δεν εφαρμόζεται κενό. Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία κενού και η αντλία κενού είναι απενεργοποιημένες (Off).
2. Απορρίψτε τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων που υπάρχουν στα λεκανίδια.
3. Εκτελέστε έκπλυση των λεκανιδίων με νερό υψηλής καθαρότητας ή αντικαταστήστε τα, αν είναι απαραίτητο.
4. Αδειάστε τον περιέκτη αποβλήτων.
5. Το καπάκι μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς αποσύνδεση της σωλήνωσης.

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

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: εκκινητές αλληλούχησης, εκκινητές PCR, μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου, κύριο μείγμα PyroMark PCR, συμπύκνωμα CoraLoad, ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια	971590
PyroMark Q24 MDx	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Λογισμικό ανάλυσης	9019063
Βοηθητικός εξοπλισμός		
PyroMark Q24 Plate (100)	Πλάκα αντίδρασης αλληλούχησης 24 βυθισμάτων	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Φυσίγγια για την προσθήκη νουκλεοτιδίων και αντιδραστηρίων	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Επαναχρησιμοποιούμενοι δειγματολήπτες με φίλτρο για τους σταθμούς εργασίας υπό κενό PyroMark Q96 και Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Για έλεγχο εγκατάστασης του συστήματος	979303

PyroMark Q24 Validation Oligo

Για επιβεβαίωση απόδοσης του συστήματος

979304

Σχετικά προϊόντα

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)

Για 50 προπαρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp MinElute[®], πρωτεϊνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)

56404

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

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

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

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή των παρακάτω όρων εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο σετ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα συμπληρωματικά πρωτόκολλα παρέχονται από χρήστες της QIAGEN για χρήση από χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν δοκιμαστεί σχολαστικά ούτε έχουν βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση επί αυτών, ούτε εγγυάται πως αυτά δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επαντεξεργασία, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του σετ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τυχόν ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιώνεται για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικά με το σετ ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στον ιστότοπο www.qiagen.com.

Μάιος-16 HB-1882-002 © 2016 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com