

# Manualul kitului *therascreen*<sup>®</sup> NRAS Pyro<sup>®</sup>



Versiunea 1



Exclusiv pentru diagnosticul in vitro



971530



1061828EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3

MAT

1061828RO



## **Tehnologiile QIAGEN de testare si prelevare de probe**

QIAGEN este principalul furnizor de tehnologii inovatoare pentru testare si prelevare de probe, permitand izolarea si detectarea continuturilor oricarei probe biologice. Produsele si serviciile noastre avansate, de inalta calitate, asigura succesul de la prelevarea probei pana la obtinerea rezultatului.

### **QIAGEN stabileste standardele in:**

- Purificarea ADN-ului si ARN-ului si a proteinelor
- Prelevarea de probe de acid nucleic si proteine
- Cercetare microARN si iARN
- Automatizarea tehnologiilor de prelevare de mostre si probe

Misiunea noastra este de a va permite obtinerea unor succese si progrese remarcabile. Pentru mai multe informatii, vizitati site-ul [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Cuprins

<b>Domeniul de utilizare</b>	<b>5</b>
<b>Rezumat si explicatii</b>	<b>5</b>
<b>Principiul procedurii</b>	<b>6</b>
<b>Controale</b>	<b>8</b>
<b>Materiale furnizate</b>	<b>9</b>
<b>Continutul kitului</b>	<b>9</b>
<b>Materiale necesare dar nefurnizate</b>	<b>11</b>
<b>Mixere recomandate pentru placute</b>	<b>12</b>
<b>Avertizari si precautii</b>	<b>12</b>
<b>Informatii privind securitatea</b>	<b>12</b>
<b>Precautii generale</b>	<b>13</b>
<b>Depozitarea si manevrarea reactivilor</b>	<b>14</b>
<b>Depozitarea si manevrarea probelor</b>	<b>14</b>
<b>Procedura</b>	<b>15</b>
<b>Izolarea ADN-ului</b>	<b>15</b>
<b>Protocolul 1: Configurarea parametrilor de rulare a sistemul PyroMark Q24</b>	<b>16</b>
<b>Protocolul 2: PCR folosind reactivii furnizati in kitul <i>therascreen</i> NRAS Pyro</b>	<b>18</b>
<b>Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta</b>	<b>21</b>
<b>Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pirosecventiere pe PyroMark Q24</b>	<b>23</b>
<b>Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24</b>	<b>27</b>
<b>Protocolul 6: Analiza unei rulari de PyroMark Q24</b>	<b>30</b>
<b>Interpretarea rezultatelor</b>	<b>32</b>
<b>Interpretarea rezultatelor analizei si detectarea mutatiilor cu nivel scazut</b>	<b>32</b>
<b>Ghid de remediere a erorilor</b>	<b>36</b>
<b>Controlul calitatii</b>	<b>38</b>
<b>Limitari</b>	<b>38</b>
<b>Caracteristici de performanta</b>	<b>39</b>
<b>Limita de blanc si limita de detectie</b>	<b>39</b>

<b>Liniaritate</b>	<b>41</b>
<b>Precizie</b>	<b>42</b>
<b>Evaluarea diagnosticului</b>	<b>42</b>
<b>Referinte</b>	<b>44</b>
<b>Simboluri</b>	<b>45</b>
<b>Informatii de contact</b>	<b>46</b>
<b>Anexa A: Configurarea testelor <i>therascreen</i> NRAS Pyro</b>	<b>47</b>
<b>Anexa B: Golirea containerului si canalelor pentru deseuri</b>	<b>50</b>
<b>Informatii privind comanda</b>	<b>51</b>

## Domeniul de utilizare

Kitul *therascreen* NRAS Pyro este un test de detectare a acidului nucleic in vitro, pe baza de secventiere , bazat pe tehnologia Pyrosequencing® pentru detectarea cantitativa a mutatiilor in codonii 12, 13, si 61 ale genei umane NRAS, in ADN-ul genomic derivat din probele de tesut uman.

Kitul *therascreen* NRAS Pyro este destinat sa ofere clinicienilor informatii care sa ajute in selectarea pacientilor cu cancer care sa beneficieze de terapii anti-EGFR. Exclusiv pentru diagnosticare in vitro.

A se utiliza exclusiv cu sistemul PyroMark® Q24. Sistemele PyroMark Q24 includ urmatoarele:

- Instrumentul PyroMark Q24 si instrumentul PyroMark Q24 MDx.
- Statia de lucru in vid PyroMark Q24 Vacuum si statia de lucru in vid PyroMark Q24 MDx Vacuum (cunoscute ca Statia de lucru PyroMark Q24 Vacuum).
- Software PyroMark Q24 (versiunea 2.0) si Software PyroMark Q24 MDx (versiunea 2.0).

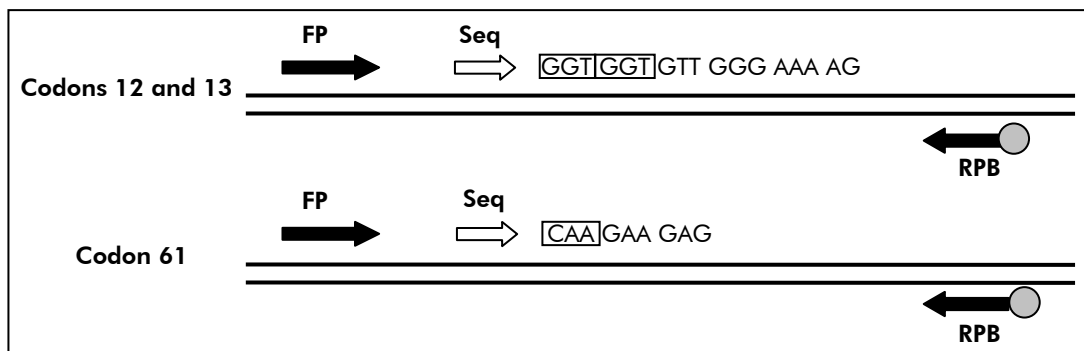
Produsul este destinat pentru a fi folosit de utilizatorii profesioniști precum tehnicieni si medici pregatiti pentru procedee de diagnosticare in vitro, tehnici biologice moleculare si sistemul PyroMark Q24.

## Rezumat si explicatii

Kitul *therascreen* NRAS Pyro Kit permite masuratorile cantitative ale mutatiilor in codonii 12, 13 si 61 ale genei umane NRAS.

Kitul se compune din 2 teste (Figura 1): unul pentru detectarea mutatiilor in codonii 12 si 61 si celalalt pentru detectarea mutatiilor in codonul 61.

Cele 2 regiuni sunt amplificate separat de PCR si sunt secventiate prin regiunea definita. Secventele din jurul pozitiiilor definite servesc drept varfuri de normalizare si referinta pentru cuantificarea si evaluarea calitatii analizei.



**Figura1. Ilustrarea testului NRAS.** Secventa indicate este secventa analizata pentru o proba tip salbatic. **FP**: Primeri PCR Forward; **RPB**: Primeri PCR Reverse (B indica biotinilarea); **Seq**: Primeri secventiere.

Ambele teste sunt ordonate in directia spre inainte.

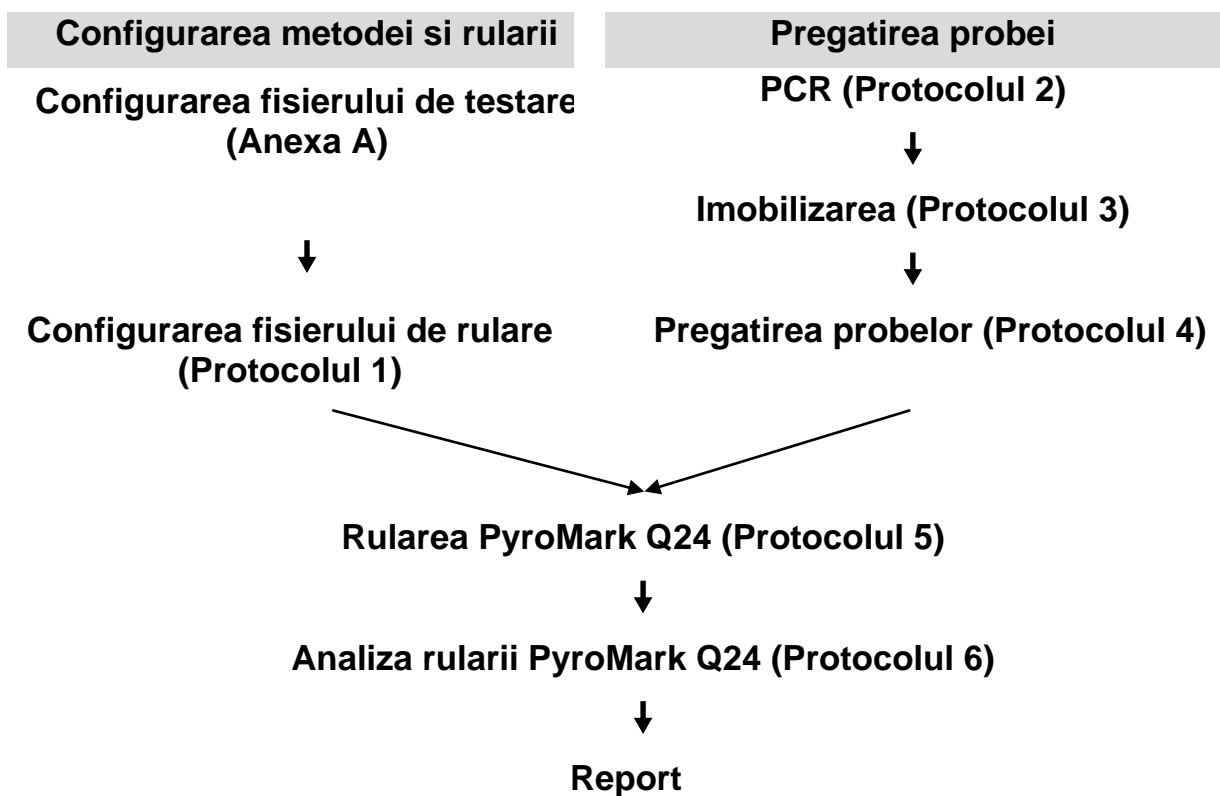
Produsul consta dintr-un mix de primeri PCR si primeri de secventiere pentru fiecare test. Primerii sunt livrati in solutie. Fiecare flacon contine 24 µl din fiecare primer sau mix de primeri.

## Principiul procedurii

Fluxul de lucru de mai jos prezinta procedura de testare. Dupa PCR utilizand primeri de directionare a codonilor 12/13 si a codonului 61, ampliconii sunt immobilizati pe perle de Streptavidin Sepharos<sup>®</sup> de inalta performanta. AND-ul monocatenar este preparat si primerii de secventiere corespunzatori se fixeaza pe AND. Probele sunt apoi analizate pe sistemul PyroMark Q24 folosind un fisier de configurare si un fisier de executie. "Sequence to Analyze" poate fi ajustata pentru detectarea mutatiilor rare dupa executare (vezi "Protocolul 6: ", pagina 30).

Nota: Fluxul de lucru a fost usor modificat in comparatie cu revizia R1 a Manualului Kitului *therascreen NRAS Pyro* (vezi Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pirosecventiere pe PyroMark Q24" pagina 23).

## Fluxul de lucru al procedurii *therascreen* NRAS Pyro



## Controale

Controlul ADN nemetilat este inclus in kit ca un control pozitiv pentru reactiile PCR si de secventiere. Acest control ADN are un genotip salbatic in regiunile secventiate prin acest kit si este necesar pentru interpretarea corecta a rezultatelor si identificarea mutatiilor de nivel scazut (vezi “ Interpretarea rezultatelor”, pagina 32). Include o proba cu ADN de control nemetilat pentru fiecare test in fiecare incercare Pyrosequencing.

In plus, un control negativ (fata ADN matrita) trebuie inclus in fiecare configurare PCR pentru cel putin un test.




## Materiale furnizate

### Continutul kitului

#### Kitul *therascreen* NRAS Pyro (cutia 1/2)

<b>Kitul <i>therascreen</i> NRAS Pyro (24)</b>	<b>(24)</b>
<b>Nr. catalog.</b>	<b>971530</b>
<b>Numar de reactii</b>	<b>24</b>
Seq Primer NRAS 12/13	24 µl
Seq Primer NRAS 61	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13	24 µl
PCR Primer NRAS 61	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad <sup>®</sup> Concentrate, 10x	1.2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl	100 µl

## Reactivi si solutii tampon *therascreen* (cutia2/2)

<b>Reactivi si solutii tampon <i>therascreen</i></b>		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 vial
Substrate Mixture		1 vial
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Manual		1

\* Contine hidroxid de sodiu.

## Materiale necesare dar nefurnizate

Cand se lucreaza cu substante chimice, trebuie sa purtati intotdeauna un halat de laborator, manusi de unica folosinta si ochelari de protectie. Pentru mai multe informatii, consultati fisele tehnice de securitate (SDS), care pot fi procurate de la furnizorul produsului.

- Kitul de izolare a ADN-ului (vezi "Izolarea ADN-ului" pagina 15)
  - Pipete (reglabile)\*
  - Varfuri de pipeta sterile (cu filtre, pentru configurarea PCR)
  - Microcentrifuga pentru masa de lucru\*
  - Cicler termal\* si tuburi PCR corespunzatoare
  - Streptavidin Sepharose™ de inalta performanta ( GE Healthcare, cat. Nr. 175113-01, [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)).
  - PyroMark Q24 (cat.nr.9001513 sau 9001514)\*†
  - PyroMark Q24 Software (cat. nr. 9019063 sau 9019062)†
  - PyroMark Q24 Placuta (cat. nr. 979301)†
  - PyroMark Q24 Cartus (cat. nr. 979302)†
  - PyroMark Q24 Statie de lucru in vid (cat. nr. 9001515 sau 9001517)\*†
  - Mixer pentru placute \* pentru imobilizare pe perle
  - Bloc termic\* capabil sa atinga 80°C
  - Placuta sau benzi PCR cu 24 godeuri
  - Capace de benzi
  - Apa de inalta puritate (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm sau echivalent).
- Nota:** O cantitate suficienta de apa va fi livrata in kitul pentru PCR, pentru imobilizarea ADN-ului, pentru dizolvarea mixturii de enzime si mixturii de substrat. O cantitate suplimentara de apa de inalta puritate este necesara pentru diluarea solutiei tampon de spalare PyroMark, 10x.
- Etanol (70%)‡

\* Asigurati-va ca instrumentele au fost verificate si calibrate in conformitate cu recomandarile producatorului.

† Marcate CE-IV in conformitate cu Directiva UE 98/79 / CE. Toate celelalte produse enumerate nu sunt marcate CE-IVD pe baza Directivei UE 98/79 / CE.

‡ Nu folositi alcool denaturat, care contine alte substante, cum ar fi metanolul sau metil etil cetona.

## Mixere recomandate pentru placute

Mixerele pentru placute prezentate in Tabelul 1 sunt recomandate pentru utilizarea cu kitul *therascreen* NRAS Pyro Kit.

**Tabelul 1. Mixere pentru placute recomandate pentru utilizarea cu kitul *therascreen* NRAS Pyro Kit**

Producator	Produs	Numar catalog
Eppendorf	Thermomixer comfort (dispozitiv de baza)	5355 000.011
	Thermoblock pentru MTP	5363 000.012
	Placuta de adaptare pentru tuburi de PCR 96 x 0.2ml pentru a fi inserate in blocuri pentru placutele microtiter	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag <sup>®</sup> Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Avertizari si precautii

Exclusiv pentru diagnosticul in vitro

## Informatii privind securitatea

Atunci cand lucrati cu substante chimice, trebuie sa purtati intotdeauna un costum de laborator, manusi de unica folosinta si ochelari de protectie. Pentru mai multe informatii, va rugam consultati fisele tehnice de securitate ale materialului (SDS-uri). Acestea sunt disponibile on-line intr-un format PDF convenabil si compact de pe site-ul [www.qiagen.com/ssafety](http://www.qiagen.com/ssafety), unde puteti gasi, vedea si tipari SDS-urile pentru fiecare kit QIAGEN si fiecare componenta a kitului.

Urmatoarele declaratii de risc si siguranta se aplica componentelor kitului *therascreen* NRAS Pyro Kit.

### Solutia de denaturare PyroMark



Avertizare! Irita ochii. Cauzeaza iritarea grava a ochilor. Poate fi coroziva fata de metale. Absorbti scurgerile pentru a evita deteriorarea materialului. Pastrati doar in recipientul original. Purtati manusi de protectie / imbracaminte de protectie / protectie pentru ochi / protectie pentru fata.

### Mix de enzime PyroMark



Contine: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acid acetic. Pericol! Irita ochii. Cauzeaza iritarea grava a ochilor. La contactul cu ochii: Clatiti cu apa timp de cateva minute. Indepartati lentilele de contact, daca purtati si daca procedura este usoara. Continuati clatirea. In caz de expunere sau daca sunteti ingrijorati: Apelati un Centru de Intoxicare sau un doctor/medic. Indepartati imbracamintea contaminata si spalati-o inainte de a o reutiliza. Purtati manusi de protectie / imbracaminte de protectie / protectie pentru ochi / protectie pentru fata.

### Mix de substrat PyroMark



Contine: acid acetic. Avertizare! Irita pielea. Cauzeaza iritarea grava a ochilor. Daca iritarea ochilor persista: Consultati medicul/atentie. Indepartati imbracamintea contaminata si spalati-o inainte de a o reutiliza. Purtati manusi de protectie / imbracaminte de protectie / protectie pentru ochi / protectie pentru fata.

## Precautii generale

Utilizatorul trebuie a acorde intotdeauna atentie urmatoarelor.

- Respectarea stricta a manualului utilizatorului este necesara pentru obtinerea unor rezultate optime. Diluarea reactivilor, altfel de cat se prevede in acest manual, nu este recomandata si va conduce la reducerea performantei.
- Fluxul de lucru a fost usor modificat (Vezi "Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pirosecventiere pe PyroMark Q24", pagina 23) in comparatie cu revizia R1 a Manualului pentru kitul *therascreen* NRAS Pyro.
- Componentele acestui produs sunt suficiente pentru executarea a 24 de reactii in pana la 5 incercari independente.

- Sa foloseasca varfuri de pipeta sterile si cu filtre (pentru configurarea PCR).
- Sa depoziteze si sa extraga materialele pozitive (esantioane, martori pozitivi si ampliconi) separat de toti ceilalti reactivi, si sa le adauge la amestecul de reactie dintr-o unitate separata din punct de vedere spatial.
- Inainte de inceperea unei prelevari, toate componentele vor fi lasate sa se dezghete bine la temperatura camerei (15-25°C).
- Cand sunt dezghetate, componentele se amesteca (prin pipetare repetata in sus si in jos si prin turbionare pulsatorie) si se centrifugheaza scurt.
- Rezultatele esuate nu constituie o baza pentru determinarea status-ului de mutatie.

## Depozitarea si manevrarea reactivilor

Kitul *therascreen* NRAS Pyro va fi transportat in doua cutii. Kitul *therascreen* NRAS Pyro (cutie 1/ 2) este transportat pe gheata uscata. Amestecul PyroMark PCR Master Mix, Concentratul CoralLoad, ADN-ul de control nemetilic si alti primeri trebuie pastrati intre -30 si -15°C la sosire.

Solutiile tampon si reactivii *therascreen* (cutie 2/2) care contin solutii tampon, mixtura de enzime, mixtura substrat, dATPαS, dCTP, dGTP si dTTP (reactivii pentru analiza Pyrosequencing®) sunt transportati pe pachete reci. Aceste componente trebuie pastrate la 2-8°C la sosire. Pentru a reduce la minim pierderile in activitate, se recomanda ca mixtura de enzime si mixtura substrat sa fie pastrate in flacoanele initiale.

Mixurile de enzima si substrat reconstituite sunt stabile timp de cel putin 10 zile la 2-8°C. Mixurile de enzima si substrat reconstituite pot fi inghetate si pastrate in flacoanele initiale la temperaturi de -30 si -15°C. Reactivii inghetati nu trebuie supusi la mai mult de 3 cicluri de inghetare – dezghetare.

**Nota:** Nucleotidele nu trebuie inghetate.

Kitul *therascreen* NRAS Pyro este stabil pana la data de expirare a kitului daca va fi pastrat in aceste conditii.

## Depozitarea si manevrarea probelor

Toate probele trebuie tratate ca material potential infectios.

Materialul probei este ADN uman extras din sange sau probe incastrate in parafina, fixate in formalina.

Nu trebuie folosite probe umane din timpul unui tratament cu heparina.

Probele de sange care au fost colectate in eprubete si care contin heparina ca anticoagulant, nu vor fi folosite. Heparina afecteaza PCR.

## Procedura

### Izolarea ADN-ului

Performanta sistemului a fost stabilita prin folosirea kitului EZ1 pentru ADN de tesut si kitul QIAamp pentru ADN de tesut FFPE pentru extragerea ADN-ului uman din probele de tumori fixate in formalina si incastrate in parafina. Pentru sistemul QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, performanta a fost stabilita prin utilizarea unor mostre de sange de la donatori sanatosi, strapunse partial cu celule tumorale.

Kiturile QIAGEN prezentate in Tabelul 2 sunt recomandate pentru purificarea ADN-ului din tipurile de mostre umane indicate pentru utilizarea cu kitul *therascreen* NRAS Pyro. Purificarea ADN-ului se face in conformitate cu instructiunile din manualele pentru kituri.

**Tabelul 2. Kiturile de purificare a ADN-ului recomandate pentru utilizarea cu kitul *therascreen* NRAS Pyro**

Materialul probei	Kit de izolare a acidului nucleic	Numar catalog (QIAGEN)
Tesut incastrat in parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sange	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit <sup>†</sup>	61104

\* Respectati protocolul pentru utilizarea cu tesut incastrat in parafina. Kitul pentru ADN din tesut EZ1 va fi folosit in combinatie cu Cardul Advanced EZ1 (cat.nr.9001410 sau 9001411) si Cardul Advanced EZ1 al Sectiunii cu Parafina pentru ADN (nr. cat. 9018298), cu Cardul Advanced XL EZ1 (nr. cat. 9001492) si Cardul EZ1 Advanced XL al Sectiunii cu parafina pentru ADN (nr. cat. 9018700) sau cu BioRobot EZ1 (nr. cat. 9000705; nu mai este disponibil) si cardul EZ1 pentru ADN al Sectiunii cu parafina pentru ADN (cat. Nr. 9015862).

<sup>†</sup> Marcajul CE IVD este in conformitate cu directiva UE 98/79/CE.

# Protocolul 1: Configurarea parametrilor de rulare a sistemul PyroMark Q24

## Aspect important inainte de pornire

- Daca se cere, LOB poate fi confirmat prin folosirea unei probe de tip salbatic pentru a genera o placuta plina cu rezultate. Pentru detalii consultati ghidul EP17-A al CLSI "Protocol pentru determinarea limitelor de detectare si a limitelor de cuantificare; ghid aprobat".

## Ce trebuie facut inainte de a incepe

- Creati Configurare a unei prelevari / a unui test (vezi anexa A, pagina 44). Aceasta trebuie facuta numai o data, inainte de prima derulare a prelevarilor thetascreen NRAS Pyro.

## Procedura

### 1. Apasati pe din bara de instrumente - toolbar.

Se va crea un nou fisier de executare.

### 2. Introduceti parametrii de rulare (vezi "Parametrii de rulare", pagina 17).

### 3. Configurati placuta prin adaugarea de prelevari de proba pentru codonii 12/13 si codonul 61 in godeurile care corespund probelor pentru analiza.

**Nota:** O proba de control negativa (fara ADN matrita) ar trebui inclusa in orice configurare PRC pentru cel putin un test.

**Nota:** Includeti o proba cu ADN de control nemetilic pentru fiecare test in fiecare test de Pirosecventiere (vezi "Controale", pagina 8).

### 4. Cand testarea este fixata si gata de derulare pe Sistemul PyroMark Q24 tipariti o lista cu volumele cerute de amestec de enzime, amestec de sub-straturi si nucleotide si configurarea placutei. Se selecteaza "Pre Run Information" din meniul "Tools" si cand apare raportul, dati click pe .

### 5. Inchideti fisierul de incercare si copiat-l pe un stick USB (oferit impreuna cu sistemul) folosind programul Windows® Explorer.

Informatia tiparita Pre Run poate fi folosita ca model pentru configurarea testarii (vezi "Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta", pagina 21).

Pentru analiza placutei pe PyroMark Q24, vezi "Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24", pagina 27.



## Parametrii de rulare

Denumirea rularii:	Denumirea rularii este data cand fisierul este salvat. Redenumirea fisierului schimba si denumirea rularii.
Metoda de instrumentare:	Selectati metoda de instrumentare in conformitate cu cartusul care va fi folosit pentru derularea testarii; vezi instructiunile oferite impreuna cu produsele.
ID placuta:	<b>Optional:</b> se introduce ID-ul placutei PyroMark Q24.
Cod de bare:	<b>Optional:</b> se introduce codul de bare pentru placuta daca aveti un cititor de cod de bare conectat la computerul dvs, se pune cursorul mousului in text box-ul "Barcode" (se da click pe box) si se scaneaza codul de bare.
ID-ul Kitului si reactivului:	<b>Optional:</b> se introduce numarul lotului pentru kitul <i>therascreen</i> NRAS Pyro care trebuie folosit. Numarul lotului poate fi gasit pe eticheta produsului. <b>Nota:</b> Recomandam introducerea ID-ului reactivului si al kitului astfel incat orice fel de probleme neprevazute cu reactivii sa poata fi urmarite.
Nota rularii:	<b>Optional:</b> introduceti o mentiune privind continuturile sau scopul incercarii.

## Adaugarea fisierelor de testare

Pentru a adauga un test intr-un godeu puteti face urmatoarele:

- Dati click dreapta pe godeu si selectati "Load Assay" din meniul contextului.
- Selectati testul in browserul de shortcut, dati click si trageți testul spre godeu.

Un godeu are un cod de culori conform testului introdus in godeu.

## Introducerea ID-urilor de probe si notele

Pentru a introduce un ID al probei sau o nota, selectati celula si introduceti textul.

Pentru a edita un ID sau o nota, selectati celula (continutul obisnuit va fi selectat) sau dati dublu click pe celula.

## **Protocolul 2: PCR folosind reactivii furnizati in kitul *therascreen* NRAS Pyro**

Acest protocol este pentru amplificari PCR ale regiunilor ce contin codonul 12 si 13 si o amplificare PCR separata a regiunii ce contine codonul 61 folosind kitul *therascreen* NRAS Pyro.

### **Puncte importante inainte de incepere**

- Polimeraza ADN, HotStarTaq in amestecul PyroMark Master Mix necesita o etapa de activare de **15 min la 95°C**.
- Configurati toate amestecurile de reactie intr-o zona separata de cea folosita pentru purificarea ADN, adaugand ADN matrila (model) la PCR, analiza produsului PCR sau prepararea probelor inainte de analiza de Pirosecventiere.
- Folositi varfuri de unica folosinta care contin filtre hidrofobe, pentru a minimaliza contaminarea incrucisata.

### **Ce trebuie facut inainte de a incepe**

- Inainte de deschiderea eprubetelor cu primeri PCR, se centrifugheaza scurt pentru a colecta continutul pe fundul eprubetelor.
- Daca este cazul, reglati concentratia ADN-ului de control si matrila la 0,4-2 ng/ $\mu$ l.

### **Procedura**

#### **1. Dezghetati toate componentele necesare (vezi Tabelul 3).**

Amestecati bine inainte de folosire.

#### **2. Se prepara un amestec de reactie pentru fiecare set primer PCR stabilit in conformitate cu Tabelul 3.**

Amestecul de reactie contine de regula, toate componentele necesare pentru PCR, cu exceptia probei.

Se prepara un volum de amestec de reactie mai mare decat cel cerut pentru numarul total de probe PCR ce trebuie efectuate.

**Tabelul 3. Prepararea amestecului de reactie pentru fiecare amestec de primeri PCR**

<b>Component</b>	<b>Volum/reactie (µl)</b>
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer NRAS 12/13 sau PCR Primer NRAS 61	1.0
Water (H <sub>2</sub> O, furnizata)	4.0
<b>Volum total</b>	<b>20.0</b>

**3. Amestecati bine amestecul de reactie si distribuiti 20 µl in fiecare eprubeta PCR.**

Nu este necesara pastrarea eprubetelor PCR pe gheata, deoarece Polimeraza ADN HotStarTaq este inactiva la temperatura camerei.

**4. Adaugati 5 µl de ADN matrita (2-10 ng de ADN genomic) in eprubetele individuale PCR (vezi tabelul 4) si amestecati foarte bine.**

**Nota:** Intotdeauna trebuie sa fie inclus un control negativ (fara ADN matrita) in fiecare configurare PCR pentru cel putin o proba.

**Nota:** Includeti o proba cu ADN de control nemetilata (nedenaturat) pentru fiecare in fiecare analiza de Pirosecventiere (vezi "Controale", pagina 8).

**Tabelul 4. Prepararea PCR**

<b>Componenta</b>	<b>Volum/reactie (µl)</b>
Amestec de reactie	20
Proba ADN	5
<b>Volum total</b>	<b>25</b>

**5. Programati aparatului de ciclare termica in conformitate cu instructiunile producatorului, folosind conditiile subliniate in Tabelul 5.**

**Tabelul 5. Protocol de ciclare optimizat**

			<b>Observatii</b>
<b>Etapa initiala de activare:</b>	15 minute	95°C	Polimeraza HotStarTaq DNA este activata de aceasta etapa de incalzire.
<b>Ciclare in 3 etape:</b>			
Denaturarea	20 secunde	95°C	
Alinierea	30 secunde	53°C	
Extinderea	20 secunde	72°C	
Numar de cicluri	42		
<b>Extinderea finala:</b>	5 minute	72°C	

- 6. Pozitionati eprubetele PCR in aparatul de ciclare termica si porniti programul de ciclare.**
- 7. Dupa amplificare, se va continua** cu "Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta", pagina 21.

## Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta

Acest protocol este pentru imobilizarea ADN-ului matrita pe Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta (GE Healthcare) inainte de analiza efectuata pe sistemul PyroMark Q24.

### Ce trebuie facut inainte de a incepe

- Inainte de pornire permiteti tuturor reactivilor si solutiilor necesare sa atinga temperatura ambientala (15-25°C).

### Procedura

1. Agitati usor sticla ce contine Streptavidin Sepharose de Inalta performanta, pana cand se obtine o solutie omogena.
2. Preparati un amestec master pentru imobilizarea ADN-ului in conformitate cu Tabelul 6. Preparati un volum cu 10% mai mare decat cel cerut pentru numarul total de reactii ce trebuie efectuate.

Tabelul 6. Amestec master pentru imobilizarea ADN

Componenta	Volum/proba (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Water (H <sub>2</sub> O, furnizata)	28
<b>Volum total</b>	<b>70</b>

3. Adaugati 70 µl din amestecul master in godeurile unei placute PCR cu 24 godeuri sau pe benzi, asa cum se arata in configurarea incercarii (vezi "Protocolul 1: Configurarea parametrilor de rulare a sistemul PyroMark Q24", pagina 16).
4. Adaugati 10 µl de produs PCR biotinitat din Protocolul 2, in fiecare godeu care contine amestec master asa cum s-a predefinit in configurarea testarii (vezi "Protocolul 2: PCR folosind reactivii furnizati in kitul *therascreen* NRAS Pyro", pagina 18).

Volumul total per godeu trebuie sa fie de 80 µl dupa adaugarea amestecului master si a produsului PCR.

5. Etansati placuta PCR (sau benzile) prin folosirea capacelor de banda.

Asigurati-va ca nu sunt posibile scurgeri printre godeuri.

**6. Agitati placuta PCR la temperatura camerei (15-25°C) timp de 5-10 min la 1400 rot/min.**

In timpul acestei etape, pregatiti statia de lucru in vid PyroMark Q24 Vacuum pentru prepararea probelor, asa cum se descrie in *Manualul Utilizatorului PyroMark Q24*.

**7. Treceti imediat la “Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pirosecventiere pe PyroMark Q24”, pagina 23.**

**Nota:** Particulele de Sepharose se sedimenteaza rapid. Captarea acestora trebuie sa se produca imediat dupa agitare.

Daca a trecut mai mult de 1 min de cand a fost agitata placuta (sau benzile), trebuie sa agitati din nou timp de 1 min inainte de captarea particulelor.

## Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pirosecventiere pe PyroMark Q24

Acest protocol este pentru pregatirea unui ADN mono-catenar si atasarea primerului de secventiere de matrila inainte de analiza Pyrosequencing pe PyroMark Q24.

### Puncte importante inainte de a incepe

- Inaintea deschiderii eprubetelor cu primeri de secventiere se centrifugheaza scurt pentru a colecta continutul pe fundul eprubetelor.
- Se adauga 2 primeri de secventiere diferiti in acelasi tipar asa cum a fost pre-definit pentru placuta, in stabilirea procesului de testare (vezi "Protocolul 1: Configurarea parametrilor de rulare a sistemul PyroMark Q24", pagina 16), in functie de regiunea analizei (codonii 12 si 13 sau codonul 61).
- Fluxul de lucru a fost usor modificat in comparatie cu revizia R1 a Manualului pentru kitul *therascreen NRAS Pyro* (etapa 18). NU scurtati timpul de racire a probelor dupa incalzirea la 80°C.
- Efectuati regulat testul functiei pentru sondele cu filtru conform descrierilor din *Manualul Utilizatorului PyroMark* si schimbati sondele cu filtru conform indicatiilor.

### Ce trebuie facut inainte de pornire

- Pozitionati suportul placutei PyroMark Q24 pe un bloc termic preincalzit la 80°C pentru utilizare in etapa 17. Lasati un al doilea suport de placute PyroMark Q24 la temperatura camerei (15-25°C) pentru utilizarea in etapa 18.
- Solutia tampon de spalare PyroMark este livrata ca un concentrat de 10x. Inainte de utilizare pentru prima data, se dilueaza intr-o solutie de lucru de 1x prin adaugare de 225 ml apa de inalta puritate la 25 ml Solutie tampon de spalare PyroMark 10x (volumul final de 250 ml).  
1x solutia tampon pentru spalare PyroMark este stabila la o gama de temperatura de la 2 la 8°C pana la data expirarii indicata.

### Procedura

1. **Se dilueaza o cantitate suficienta din fiecare primer de secventiere, Seq Primer NRAS 12/13 si Seq Primer NRAS 61 in solutia tampon de atasare PyroMark, asa cum se arata in tabelul 7.**

Se prepara o cantitate de primer diluat, mai mare decat cea ceruta pentru numarul total de mostre de proba care trebuie secventiate (pentru numarul de probe + una in plus).

**Tabelul 7. Exemplu de diluare a primerilor de secventiere**

<b>Componenta</b>	<b>Volum/proba (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Volum pentru 9 + 1 reactii (<math>\mu</math>l)</b>
Seq Primer NRAS 12/13 sau Seq Primer NRAS 61	0.8	8
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
<b>Volum total</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

- 2. Adaugati 25  $\mu$ l de primer de secventiere diluat in fiecare godeu de pe placuta PyroMark Q24 in conformitate cu configurarea derularii testarii (vezi “Protocolul 1: Configurarea parametrilor de rulare a sistemul PyroMark Q24”, pagina 16).**

Pastrati unul din suportii placutei PyroMark Q24 (livrat impreuna cu Statia de lucru in vid PyroMark Q24 Vacuum) la temperatura camerei (15-25°C), si folositi-l ca suport atunci cand pregatiti si deplasati placuta.

- 3. Asezati pe masa de lucru placuta PCR (sau benzile) din Protocolul 3 si Placuta PyroMark Q24 (Figura 2).**

Asigurati-va ca placuta este orientata in aceeasi directie ca si atunci cand au fost incarcate probele.



**Figura 2. Pozitionarea placutei PCR (sau benzilor) si placutei PyroMark Q24 pe statia de lucru in vid.**



4. **Aplicati vid asupra instrumentului prin apasarea butonului pentru vid.**
5. **Coborati cu grija sondele cu filtru in placuta PCR (sau benzi) pentru a capta particulele care contin sabloanele immobilizate. Mentineti sondele timp de 15 secunde in acelasi loc. Aveti grija cand scoateti instrumentul de vid.**

**Nota:** Particulele de Sepharose se sedimenteaza rapid. Captarea acestora trebuie sa fie efectuata imediat dupa agitare.

Daca a trecut mai mult de 1 minut de la agitarea placutei (sau benzilor), agitati din nou timp de 1 minut inainte de captarea particulelor.

6. **Transferati instrumentul spre canalul care contine 40 ml de etanol 70% (Figura 2). Clatini sondele cu filtru timp de 5 secunde.**
7. **Transferati instrumentul spre canalul ce contine 40 ml Solutie de Denaturare (Figura 2). Clatini sondele cu filtru timp de 5 secunde.**
8. **Transferati instrumentul spre canalul care contine 50 ml Solutie tampon de spalare (Figura 2). Clatini sondele cu filtru timp de 10 secunde.**
9. **Ridicati instrumentul in sus si spre spate, peste 90° vertical, timp de 5 secunde pentru a drena lichidul din sondele cu filtru (vezi Figura 3).**

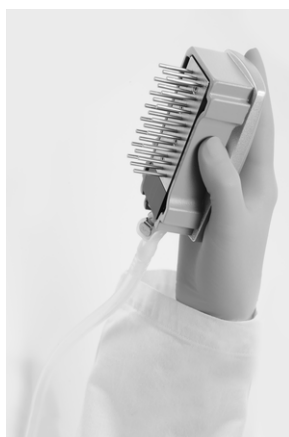


Figura 3. Imaginea instrumentului de vid ridicat pe verticala peste 90°.

10. **In timp ce instrumentul este tinut deasupra Placutei PyroMark Q24, se apasa butonul de vid de pe instrument pentru a-l inchide (Off).**
11. **Se elibereaza particulele in placuta PyroMark Q24 prin introducerea sondelor in primerul diluat de secventiere si agitarea usoara a instrumentului dintr-o parte in alta.**  
Aveti grija sa nu deteriorati suprafata placutei PyroMark Q24 zgariind-o cu sondele cu filtru.
12. **Transferati instrumentul de vid prin canalul care contine apa de puritate ridicata (Figura 2) si agitati instrumentul timp de 10 secunde.**

13. Spalati sondele cu filtru prin scufundare in apa de puritate ridicata (Figura 2) si prin aplicare de vid. Clatiti sondele cu 70 ml apa de puritate ridicata.
14. Ridicati instrumentul de vid in sus si spre spate, peste 90° vertical, timp de 5 secunde pentru a drena lichidul din sondele cu filtru (Figura 3)
15. Apasati butonul de vid de pe instrument pentru a-l inchide (Off) si asezati instrumentul in pozitia Parking (P).
16. Opriti pompa de vid  
**Nota:** La sfarsitul unei zile de lucru, deseurile lichide si solutiile ramase trebuie eliminate si statia de lucru PyroMark Q24 MDx Vacuum trebuie controlata in privinta prafului si scurgerilor, vezi Anexa B, pagina 47.
17. Incalziti placuta PyroMark Q24 cu probe la 80°C timp de 2 minute, folosind suportul de placute PyroMark Q24 preincalzit.
18. Indepartati placuta PyroMark Q24 de pe suportul fierbinte si lasati probele sa se raceasca la temperatura camerei (15-25°C) timp de cel putin 10-15 minute.
19. Continuatii cu “Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24”, pagina 27.

## Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24

Acest protocol descrie pregătirea și încărcarea reactivilor PyroMark Gold în cartusul PyroMark Q24 și începerea și terminarea unei prelevări pe Sistemul PyroMark Q24. Pentru o descriere detaliată asupra setării unei testări, consultați *Manualul Utilizatorului PyroMark Q24*.

### Punct important înainte de a începe

- Raportul de informare Pre Run, din meniul “Tools” la setarea testării (vezi “Protocolul 1: Configurarea parametrilor de rulare a sistemului PyroMark Q24”, pagina 16), oferă informații despre volumul de nucleotide, enzime și soluție tampon substrat, necesare pentru un test specific.

### Ce trebuie făcut înainte

- Switch on the PyroMark Q24. The power switch is located at the rear of the instrument.

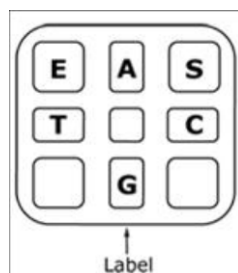
### Procedura

- 1. Se dizolvă mixturile de enzime și substrat înghețate - uscate în 620 μl apă (furnizată).**
- 2. Amestecați ușor flaconul prin rotire.**  
A nu se vortexa!

Pentru a vă asigura că amestecul este complet dizolvat, lăsați timp de 5-10 minute la temperatura camerei (15-25°C). Asigurați-vă că soluția nu este tulbură înainte de a fi introdusă în cartusul PyroMark Q24. Dacă reactivii nu trebuie folosiți imediat, așezați flacoanele cu reactiv pe gheață\* sau în frigider.

- 3. Lăsați reactivii și cartusul PyroMark Q24 să ajungă la temperatura ambiantă (20-25°C).**
- 4. Așezați Cartusul PyroMark Q24 cu eticheta spre dumneavoastră.**
- 5. Încărcați Cartusul PyroMark Q24 cu cantitățile corespunzătoare de nucleotide, enzime și amestecuri de substrat, conform figurii 4.**  
Asigurați-vă că nu vor fi transferate bule de aer din pipeta în cartus.

\* Când lucrați cu substanțe chimice, purtați întotdeauna un costum de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție. Pentru mai multe informații, consultați fișele tehnice ale materialului (SDS) disponibile de la furnizorul produsului.



**Figura 4. Imaginea Cartusului PyroMark Q24 vazut de sus.** Adnotarile corespund etichetelor de pe flacoanele cu reactivi. Se adauga amestecul de enzime (**E**), amestecul de substrat (**S**), si nucleotide (A,T,C,G) in conformitate cu informatiile despre volum date in raportul informative Pre Run, din meniul “Tools” la Configurarea functionarii.


6. **Deschideti usa cartusului si introduceti cartusul umplut cu reactiv, cu eticheta orientata in afara. Impingeti complet cartusul si apoi apasati-l in jos.**
7. **Asigurati-va ca linia este vizibila in partea frontala a cartusului si inchideti usa.**
8. **Deschideti cadrul de sustinere al placutei si asezati placuta pe blocul termic.**
9. **Inchideti cadrul de sustinere al placutei si capacul instrumentului.**
10. **Introduceti stickul USB (care contine fisierul de incercare) in portul USB din partea frontala a instrumentului.**  
Nu scoateti stickul USB inainte ca testarea sa se fi incheiat.
11. **Selectati “Run” din meniul principal (folosind butoanele de pe ecran ▲ si ▼) si apasati “OK”.**
12. **Selectati fisierul de incercare folosind butoanele de pe ecran ▲ si ▼.**  
Pentru a vedea continutul unui folder, selectati folderul si apasati “Select”.  
Pentru revenire la imaginea anterioara, apasati “Back”.
13. **Cand fisierul de incercari este selectat, apasati “Start” pentru a porni incercarea.**
14. **Cand incercarea este incheiata si instrumentul confirma faptul ca fisierul de incercare a fost salvat pe stickul USB, apasati “Close”.**
15. **Scoateti stickul USB.**
16. **Deschideti capacul instrumentului.**
17. **Deschideti usa cartusului si scoateti cartusul cu reactiv prin ridicare si tragere in afara.**
18. **Inchideti usa.**
19. **Deschideti cadrul de sustinere a placii si scoateti placuta de pe blocul termic.**
20. **Inchideti cadrul de sustinere al placii si capacul instrumentului**
21. **Inlaturati placuta si curatati cartusul conform instructiunilor din fisa produsului care a fost livrata impreuna cu acesta.**

**22. Analizati incercarea in conformitate cu “Protocolul 6: Analiza unei rulari de PyroMark Q24”, pagina 30.**

## Protocolul 6: Analiza unei rulari de PyroMark Q24

Acest protocol descrie analiza mutatiei la o incercare NRAS terminata, folosind softul PyroMark Q24.

### Procedura

1. Se introduce stickul USB (care contine fisierul cu testarile procesate) in portul USB al computerului.
2. Se muta fisierul de incercare de pe stickul USB in locul dorit din computer, folosind Windows Explorer.
3. Deschideti fisierul de incercari in modul AQ din softul PyroMark Q24 fie prin selectarea "Open" in meniul "File" fie prin dublu click pe fisier  in browserul de shortcut.
4. Verificati daca factorul de reducere A-peak (bara cu parametrii de analiza in Analysis Setup tab) este setat de 0.86 pentru testele codonului 61 NRAS.
5. Pentru analizarea testarii si pentru obtinerea unei priviri de ansamblu asupra rezultatelor dati un singur click pe butoanele de analiza



Analizati toate godeurile.



Analizati godeurile selectate.

Rezultatele analizei (frecvente specifice mutatiei) si evaluarea calitatii sunt afisate deasupra pozitiei variabile pe traseul Pyrogram®. Pentru mai multe detalii asupra analizarii unei incercari, consultati *Manualul Utilizatorului PyroMark Q24*.

6. Pentru a genera un raport, selectati „AQ Full Report” sau „AQ Analysis Results” din meniul “Reports”.

Cele mai frecvente mutatii pentru fiecare din cele trei codoni NRAS analizate se intalnesc in nucleotidul 35 (baza secundara a codonului 12), nucleotidul 38 (baza secundara a codonului 13) si nucleotidul 182 (baza secundara a codonului 61). "Secventa de analizat" standard asa cum este definita in configurarea analizei, se adreseaza cel mai frecvent mutatiilor din aceste pozitii (vezi Anexa A, pagina 47). Daca o proba contine o mutatie pe nucleotidul 34, nucleotidul 37, nucleotidul 181, nucleotidul 183, "Secventa de analizat" poate fi modificata pentru a analiza de asemenea starea de mutatie in aceasta pozitie, asa cum se descrie in Anexa A.

Frecventele actualizate ale mutatiilor in gena umana NTAS in codonii 12/13 si 61 sunt oferite on-line de Institutul Sanger pe site-ul [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Nota:** Pentru rezultate de incredere, recomandam inaltimi maxime peste 30 RLU. Setati 30 la configurarea testarii ca “inaltimea maxima ceruta pentru calitatea corespunzatoare” (vezi *Manualul utilizatorului PyroMark Q24 si Anexa A*).

**Nota:** Raportul “AQ Analysis Results” trebuie folosit pentru documentarea si interpretarea cuantificarii genei alela. Numerele prezentate in Pyrograma sunt rotunjite si nu arata cuantificarea exacta.

**Nota:** Pyrograma trebuie intotdeauna comparata cu histograma ce poate fi afisata daca dati click dreapta in fereastra cu Pictograme. Valorile maxime masurate se vor potrivi cu inaltimea barelor histogramei.

### **Reanalizarea probelor fara nicio mutatie detectata in nucleotidul 35, 38 sau 182 cu evaluarea calitatii “Check “ si “Failed”**

Recomandam insistent sa reanalizati toate probele fara mutatie detectata cu standardul “Sequence to Analyze” in nucleotidul 35, 38 sau 182, precum si probele care au primit evaluarea calitatii “Check “ sau “Failed”. Evaluările calitatii “Check “ si “Failed” pot indica o mutatie in alta pozitie decat nucleotidul 35, 38 sau 182, care duce la devieri ale varfului de referinta. De exemplu, o valoare de varf in oricare din cele 3 distribuii in testele pe codonii 12/13 indica faptul ca o mutatie este prezenta in nucleotidul 34 al codonului 12.

Pentru a reanaliza si viza mutatii la nucleotidele 34 si 37, duceti-va la “Analysis Setup” si schimbati “Sequence to Analyze” din **GNTGNTGTTGGGAAAAGC** in **NGTNGTGTTGGGAAAAGC**. Apasati “Apply” si apoi apasati “To All” cand apare fereastra “Apply Analysis Setup”.

Pentru a reanaliza si viza mutatii la nucleotide 181, duceti-va la “Analysis Setup” si schimbati “Sequence to Analyze” din **CNAGAAGAGTA** in **VAAGAAGAGTA**.

Pentru a reanaliza si viza mutatii la nucleotide 183, schimbati “Sequence to Analyze” la **CANGAAGAGTA**. Apasati “Apply”, si apoi apasati “To All” cand apare fereastra “Apply Analysis Setup”.

**Nota:** Dupa schimbarea “Sequence to Analyze”, asigurati-va ca pragul pentru inaltimea de varf single este de 30 RLU. In plus, asigurati-va ca factorul de reducere A-peak este setat la 0.86 pentru analiza codonului 61 NRAS.

**Nota:** Daca valorile maxime masurate nu se potrivesc cu inaltimea barelor histogramei si nu pot fi explicate prin mutatii rare sau neasteptate, se recomanda retestarea probei.

## Interpretarea rezultatelor

### Interpretarea rezultatelor analizei si detectarea mutatiilor cu nivel scazut

Recomandam insistent ca pentru comparatie, sa fie inclusa in fiecare testare un ADN de control nemetilat si astfel un control pentru nivelurile din fundal. Frecventa masurata a probei de control trebuie sa fie mai mica sau egala cu limita de blanc (LOB).

Toate probele trebuie examinate in raport cu limita de detectie (LOD, a se vedea Tabelul 8) si interpretate dupa cum urmeaza:

- Frecventa mutatiei  $< \text{LOD}$ : tip salbatic
- Frecventa mutatiei  $\geq \text{LOD}$  si  $\leq \text{LOD} + 3\%$  unitati: mutatie potentiala de nivel scazut
- Frecventa mutatiei  $> \text{LOD} + 3\%$  unitati: Mutatie

Probele cu o mutatie potentiala de nivel scazut raportata vor fi considerate a fi pozitive pentru mutatie daca se confirma prin retestarea in duplicat impreuna cu o proba cu ADN de control nemetilat. Rezultatele ambelor duplicate trebuie sa fie  $\geq \text{LOD}$  si diferite de proba de control. In caz contrar, proba va fi considerata de tip salbatic.

O frecventa masurata de peste LOB in proba de control indica un nivel mai ridicat decat de obicei a mediului local in testarea respectiva ce ar putea avea un impact asupra cuantificarii amplificatiei specifice mutatiei, in special pentru nivelurile scazute de mutatie. In acest caz, frecventele masurate in gama LOD (Tabel 8) –  $\text{LOD} + 3\%$  unitati nu reprezinta o baza pentru analiza status-ului de mutatie. Se recomanda retestarea probelor cu o mutatie potentiala de nivel scazut.

**Nota:** Decizia de tratament pentru pacientii afectati de cancer nu trebuie sa se fundamenteze doar pe status-ul mutatiei NRAS.



**Tabelul 8. LOB si LOD determinate pentru mutatii specifice**

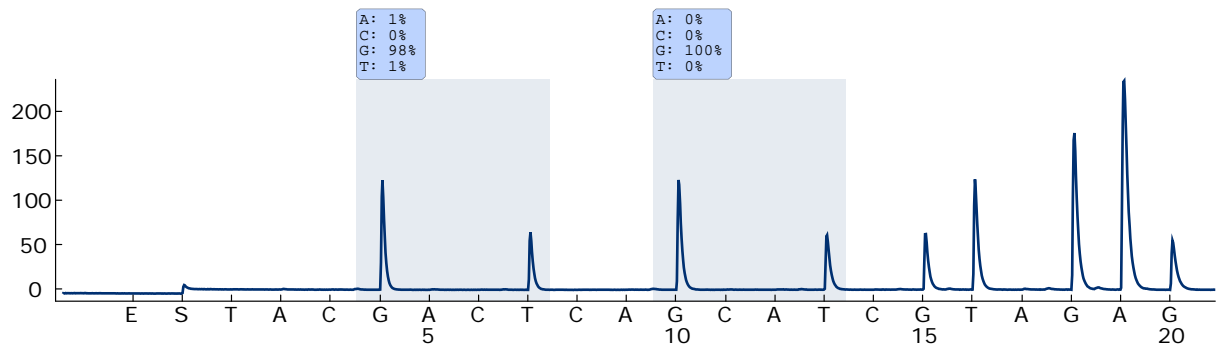
<b>Substituirea acidului nucleic</b>	<b>Substituirea Amino acid</b>	<b>LOB (% unitati)</b>	<b>LOD (% unitati)</b>	<b>COSMIC ID* (V47)</b>
<b>Codon 12 (GGT)</b>				
AGT	G12S	1.4	3.4	563
TGT	G12C	0.6	2.5	562
CGT	G12R	0.4	2.4	561
GAT	G12D	1.8	3.8	564
GTT	G12V	3.8	8.8	566
GCT	G12A	0.5	2.5	565
<b>Codon 13 (GGT)</b>				
AGT	G13S	1.2	3.2	571
TGT	G13C	1.2	3.2 (4) <sup>†</sup>	570
CGT	G13R	0.3	2.3	569
GAT	G13D	0.8	2.8	573
GTT	G13V	0.0	2.0 (5) <sup>†</sup>	574
GCT	G13A	0.8	2.8	575
<b>Codon 61 (CAA)</b>				
AAA	Q61K	4.1	6.7	580
CGA	Q61R	0.8	2.2	584
CTA	Q61L	0.7	2.1	583
CAT	Q61H	0.4	1.8	585
CAC	Q61H	5.4	8.0	586
CAG	Q61Q	2.1	5.8	587

\* Din Catalogul Mutatiilor Somatice in Cancer, disponibil on-line de la Institutul Sanger pe at [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

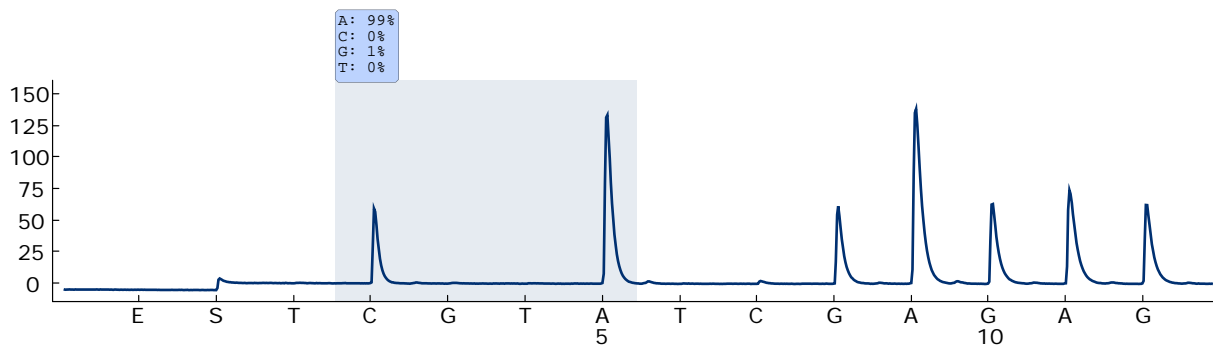
<sup>†</sup> Nivelul cel mai scazut de mutatie intr-o proba ce a rezultat intr-o frecventa masurata  $\geq$ LOD.

## Rezultate reprezentative

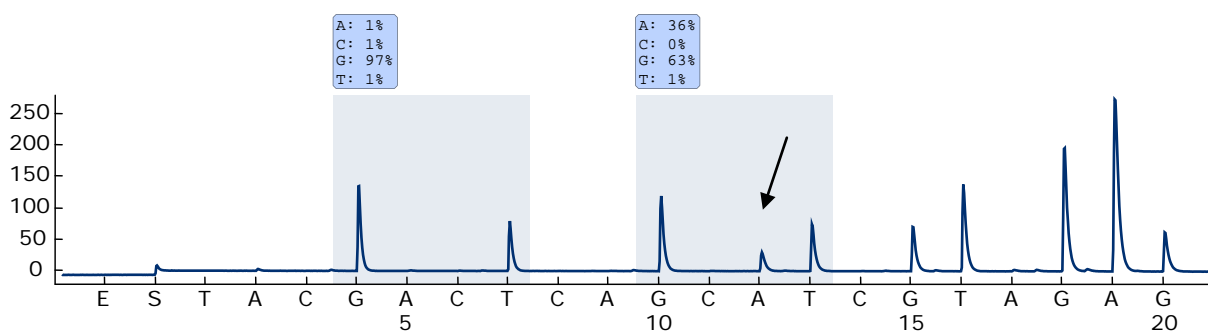
Rezultatele reprezentative ale Pyrogramei sunt date in Figurile 5-9.



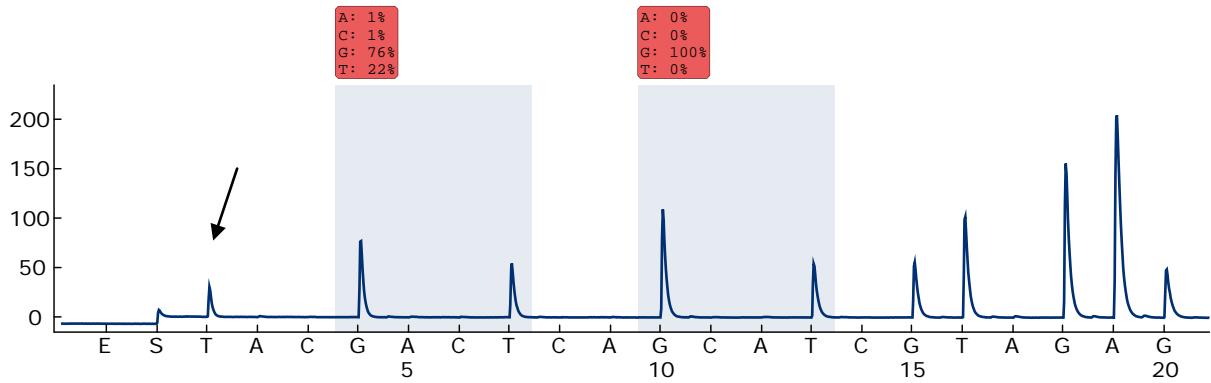
**Figura 5.** Traseul Pyrogramei obtinut dupa analiza unei probe cu un genotip salbatic in codonul 12-13.



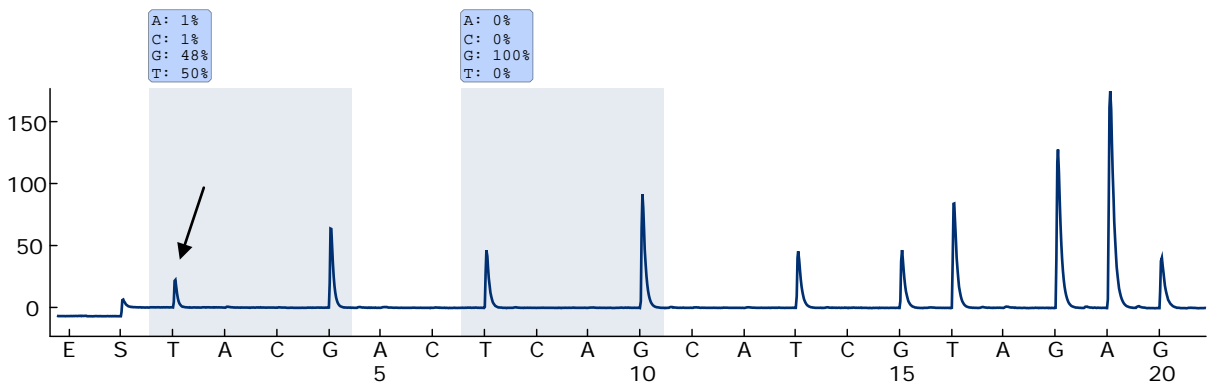
**Figura 6.** Traseul Pyrogramei obtinut dupa analiza unei probe cu un genotip salbatic in codonul 61.



**Figura 7.** Traseul Pyrogramei obtinut dupa analiza unei probe cu mutatie GGT → GAT in baza 2 a codonului 13 (nucleotid 38, marcat cu o sageata) cu “Sequence to Analyze” *GNTGNTGTTGGGAAAAGC*.



**Figura 8. Traseul Pyrogramei obtinut dupa analiza unei probe cu mutatie GGT → AGT in baza 1 a codonului 12 (nucleotid 34, marcat cu o sageata) cu “Sequence to Analyze” *GNTGNTGTTGGGAAAAGC* vizand baza 2 in codonul 12 (nucleotid 35). Culoarea rosie indica faptul ca aceasta secventa este neasteptata si trebuie verificata.**



**Figura 9. Traseul Pyrogramei si rezultatul obtinut dupa reanalizarea probei in Figura 8. Mutatia GGT → AGT a fost reanalizata cu “Sequence to Analyze” *NGTNGTGTTGGGAAAAGC* vizand baza 1 in codonul 12 (nucleiodi 34).**

## Ghid de remediere a erorilor

Acest ghid poate fi util in solutionarea oricaror probleme ce pot aparea. Pentru mai multe informatii vedeti si pagina cu Intrebări Adresate Frecvent din cadrul Centrului de Suport Tehnic al dumneavoastra:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Oamenii de stiinta de la QIAGEN Technical Services [Servicii Tehnice QIAGEN] sunt intotdeauna gata sa va raspunda cu placere la orice fel de intrebari despre informatiile si protocoalele din acest manual sau despre tehnologiile de testare si prelevare de probe (pentru informatii de contact, vezi de asemenea coperta din spate sau vizitati [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Nota:** Consultati Manualul aparatului *PyroMark Q24* pentru remedierea erorilor generale ale instrumentului.

### Observatii si sugestii

---

Semnale in cadrul controlului fara matrita(control negativ)

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| a) Intermodulatie intre godeuri | Semnalul de la o godeu este detectat in godeu vecin. Evitati asezarea de probe cu intensitati ridicate de semnal imediat langa godeurile de control fara matrita. |
| b) Contaminarea PCR             | Folositi varfuri de pipeta sterile, cu filtre. Pastrati si extrageti materialele precum probe, solutii de control si ampliconi separat de reactivii PCR.          |

### Secventa slaba sau neasteptata

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| a) Calitate slaba a ADN-ului genomic | ADN-ul genomic de slaba calitate poate cauza esuarea PCR genomic. Analizati probele PCR folosind o tehnica de electroforeza (ex. sistemul QIAxcel® sau electroforeza cu gel de agaroză). |
|--------------------------------------|--|

Rezultatul "Verificat" sau "Esuat"

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| a) Inaltimea varfului scazuta | Remedierea erorilor in configurarea PCR sau in pregatirea probei inainte de Pyrosequencing poate genera valori scazute. Efectuati regulat testul functional pentru sondele cu filtru, conform indicatiilor din Manualul de utilizare PyroMark Q24 si schimbati sondele cu filtru conform indicatiilor.<br><br>In cazul avertizarii „Check”, comparati cu grija Pyrograma cu histograma ce pot fi afisate cu un click dreapta in fereastra Pyrogramei. Daca valorile maxime masurate se potrivesc cu barele histografei, rezultatul este valid. In caz contrar, va recomandam sa retestati proba. |
|-------------------------------|--|

## Observatii si sugestii

---

- b) Mutatie nedefinita in “ Sequence to Analyze”  
Reglati Secventa de analizat din setarile testului (vezi Anexa A, page 45) si reanalizati testarea.
- c) Mutatie rara neasteptata  
O evaluare a calitatii “Reusita” sau “Esuata” poate fi cauzata de un model neasteptat de niveluri maxime. Aceasta poate indica o mutatie neasteptata, care nu este analizata de “ Sequence to Analyze”. Aceste mostre de proba trebuie analizate folosind alternativa “ Sequence to Analyze” luand in considerare mutatii neasteptate.
- d) Avertizare de deviatie ridicata a inaltimi maxime la distribuire  
Pyrograma trebuie intotdeauna comparata cu histograma ce poate fi afisata daca dati click dreapta in fereastra cu Pictograme. Daca valorile maxime masurate nu se potrivesc cu inaltimea barelor histogramei si nu pot fi explicate prin mutatii rare, se recomanda re-incerarea probei.

### Fundal ridicat

- a) Pastrare incorecta a nucleotidelor  
Pastrati nucleotidele la temperatura de 2-8 °C. Pastrarea nucleotidelor la -15°C la -25°C poate cauza o crestere pe fond.
- b) Timp scurt de racire inainte de analiza Pyrosequencing  
Pastrati probele pe un suport de placute PyroMark Q24 la temperatura camerei pentru 10-15 minute. Nu scurtati timpul de racire.
- c) Contaminarea cartusului  
Curatati cu grija cartusul, conform instructiunilor din fisa de date. Protejati cartusul de lumina soarelui si de praf.

Nu exista semnale in controlul pozitiv (ADN de control nemetilic)

- a) Insuficienta amestecului de enzima sau substrat mix pentru toate godeurile  
Asigurati-va ca este plin Cartusul PyroMark Q24 conform informatiei “pre Run” din meniul “Tools”.
- b) Reactivi incorect depozitati sau diluati  
Pregatiti Reactivii therascreen conform instructiunilor din “Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24”, pagina 27.

## Observatii si sugestii

---

- |  |  |
|--|--|
| c) Nereusita prepararii PCR sau a probei | Remediarea erorilor in setarile PCR, programarea ciclului PCR sau a probelor inainte de Pyro-secventiere poate genera absenta semnalelor. Efectuati testele functionale pentru sondele cu filtru conform indicatiilor din Manualul PyroMark Q24 si schimbati sondele cu filtru conform instructiunilor. Repetati analiza PCR si a Pyro-secventierii. |
|--|--|

## Controlul calitatii

In conformitate cu Sistemul de Management al Calitatii al QIAGEN, certificat ISO, fiecare lot de kit PyroMark NRAS este testat pentru specificatiile prestabilite pentru asigurarea calitatii consistente a produsului.

## Limitari

Orice rezultate generate de diagnostic trebuie sa fie interpretate in coroborare cu alte rezultate clinice sau de laborator.

Este raspunderea utilizatorului sa valideze performanta sistemului pentru orice proceduri folosite in laboratorul acestuia, care nu sunt acoperite de studiile de performanta QIAGEN.

## Caracteristici de performanta

### Limita de blanc si limita de detectie

Limita de blanc (LOB) si limita de detectie (LOD) au fost determinate pentru un numar de mutatii folosind amestecurile de plasmide (Tabelul 9). LOB si LOD au fost determinate in conformitate cu recomandarile Institutului pentru Standarde Clinice si de Laborator (CLSI), Ghidul EP17-A "Protocolul pentru determinarea limitelor de detectare si a limitelor de cuantificare; ghid aprobat". Erorile  $\alpha$  si  $\beta$  (fals pozitiv, respectiv fals negativ) au fost stabilite la 5%. Valorile LOB reprezinta frecventa masurata obtinuta cu o mostra de tip salbatic. Valorile LOD reprezinta cel mai scazut semnal (frecventa masurata) care poate fi considerata a fi pozitiva pentru respectiva mutatie.

### Mutatia GGT → TGT si GGT → GTT in codonul 13

Pentru aceste mutatii, masuratorile in gol au fost in principal 0% unitati, ducand la o distribuire non-Gaussiana. LOD a fost determinat prin folosirea unei metode diferite, in conformitate cu recomandarile din Ghidul EP17-A al CLSI. Semnalul cel mai scazut care indica prezenta unei mutatii (LOD) in aceste pozitii a fost stabilit la unitati 2% peste nivelul respectiv al liniei de baza, asa cum este definit prin masuratorile in gol de 95 procente. Cand se analizeaza o mostra cu un nivel de mutatie indicat intre paranteze in Tabelul 9, 95% din rezultate (n=72) au dat un semnal care poate fi privit ca fiind pozitiv ( $\geq$  LOD)

**Tabelul 9. LOB si LOD determinat pentru mutatii specifice**

<b>Substituirea acidului nucleic</b>	<b>Substituirea Amino acid</b>	<b>LOB (% unitati)</b>	<b>LOD (% unitati)</b>	<b>COSMIC ID* (V47)</b>
<b>Codon 12 (GGT)</b>				
AGT	G12S	1.4	3.4	563
TGT	G12C	0.6	2.5	562
CGT	G12R	0.4	2.4	561
GAT	G12D	1.8	3.8	564
GTT	G12V	3.8	8.8	566
GCT	G12A	0.5	2.5	565
<b>Codon 13 (GGT)</b>				
AGT	G13S	1.2	3.2	571
TGT	G13C	1.2	3.2 (4) <sup>†</sup>	570
CGT	G13R	0.3	2.3	569
GAT	G13D	0.8	2.8	573
GTT	G13V	0.0	2.0 (5) <sup>†</sup>	574
GCT	G13A	0.8	2.8	575
<b>Codon 61 (CAA)</b>				
AAA	Q61K	4.1	6.7	580
CGA	Q61R	0.8	2.2	584
CTA	Q61L	0.7	2.1	583
CAT	Q61H	0.4	1.8	585
CAC	Q61H	5.4	8.0	586
CAG	Q61Q	2.1	5.8	587

\* Din Catalogul Mutatiilor Somatice in Cancer, disponibil on-line de la Institutul Sanger pe at [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

<sup>†</sup> Nivelul cel mai scazut de mutatie intr-o proba ce a rezultat intr-o frecventa masurata  $\geq$ LOD.



**Nota:** Aceste valori se bazeaza pe incercari in care mixturile de plasmide ce poarta secventa de mutatie de tip salbatic au fost utilizate ca matrite pentru amplificarea PCR.

Se recomanda ca metoda de performanta sa fie confirmata in laborator

## Liniaritate

Linearitatea s-a stabilit utilizand mixturi de plasmide cu secventa de mutatie de tip salbatic sau de alt tip GGT>GAT in codonile 12 si 13 si mutatia CAA>CGA in codonul 61. Plasmidele au fost amestecate in proportii care sa permita patru niveluri de mutatii (5, 10, 30 si 50%). Fiecare amestec a fost analizat cu trei loturi diferite a kitului theascreen NRAS Pyro in trei incercari de Pyro-secventiere cu trei replici fiecare.

Rezultatele (n=9 pentru fiecare nivel de mutatie) au fost analizate in conformitate cu Ghidul CLSI EP6-A „Evaluarea linearitatii procedurilor de masurare cantitative: o abordare statistica; ghid aprobat” utilizand Software-ul Analize-it versiunea 2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) si sunt prezentate in Figura 10 pentru mutatiile GGT>GAT in codonul 12

Rezultatele au fost lineare intr-o neliniaritate permisa de 5% unitati in gama testata nivelul mutatiei fiind de la 5 la 50%. Rezultate similare au fost obtinute pentru mutatiile GGT>GAT in codonul 13 si CAA>CGA in codonul 61.

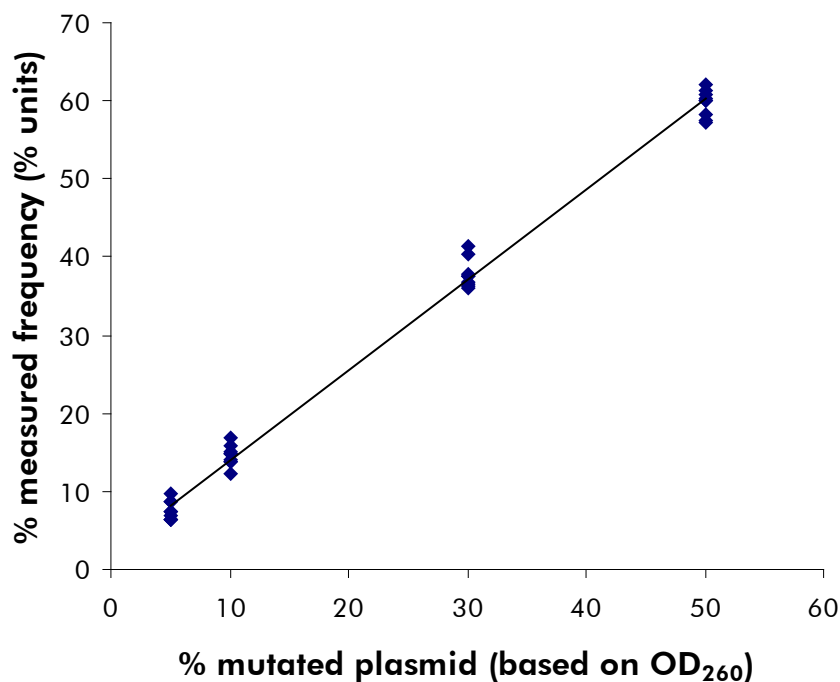


Figura 10. Liniaritatea mutatiei GGT → GAT in codonul 12.

## Precizie

Datele privind precizia permit stabilirea variabilitatii totale a testelor si au fost obtinute in trei niveluri diferite prin analiza amestecurilor de plasmida mentionate mai sus cu trei replici fiecare.

Repetabilitatea (variabilitate intra-test si inter-lot) a fost calculata in baza datelor pentru determinarea linearitatii (trei incercari in aceeasi zi utilizand loturi diferite a kitului theascreen NRAS Pyro). Precizia intermediara (variabilitate intra-laborator) a fost stabilita in trei incercari in acelasi laborator in trei zile diferite cu operatori diferiti, instrumente PyroMark Q24 si loturi kitului theascreen NRAS Pyro. Reproducibilitatea (variabilitate inter-laborator) a fost calculata prin doua incercari intr-un laborator intern si unul extern utilizand loturi diferite ale kitului theascreen NRAS Pyro.

Estimarile de precizie sunt exprimate ca deviatie standard a frecventelor masurate de mutatie in % unitati (Tabelul 10). Repetabilitatea, precizia intermediara si reproductibilitatea pentru GGT>GAT in codon 12 a fost de 1.2–1.9, 1.0–2.0, si 1.3–3.1 % unitati, in intervalul masurat al nivelului de mutatie 5-50%. Rezultate similare au fost obtinute pentru mutatiile GGT>GAT in codonul 13 si CAA>CGA in codon 61

**Tabelul 10. Precizia pentru mutatia GGT>GAT in codon 12\***

% plasmida mutanta <sup>†</sup>	Repetabilitate		Precizie intermediara		Reproducibility	
	Medie	SD	Medie	SD	Mean	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

\* \* Toate valorile sunt exprimate in unitati %..

<sup>†</sup> Bazat pe maturatoarea OD<sub>260</sub>, SD: deviatie standard (n=pentru repetabilitate si precizie intermediara, n=12 pentru reproductibilitate).

## Evaluarea diagnosticului

Kitul theascreen NRAS Pyro a fost evaluat in comparatie cu secventierea Sanger ADN-ul a fost extras din 100 probe de tumori fixate in formalina si

incastrate in parafina de maduva osoasa si analizate pentru mutatii in codonii 12/13 si codonul 61.

ADN-ul a fost izolat utilizand kitul de tesut QIAamp DNA FFPE. Analizele Pyrosequencing au fost efectuate cu un kit *therascreen* NRAS Pyro pe PyroMark Q24, si secventierea Sanger a fost realizata pe Analizatorul Genetic ABI™ 3130.

Din cele 100 de probe analizate prin secventierea Sanger status-ul de mutatie a fost determinat in 97 de probe atat pentru codonul 12/13 cat si pentru codonul 61. Cu Kitul *therascreen* NRAS Pyro, s-a putut stabili status-ul mutational in 97 si 98 probe pentru codonul 12/13 si respectiv codonul 61.

In patru din cele 100 de probe, o mutatie in codonul 12 sau in codonul 13 a fost detectata prin secventierea Sanger. In doua din aceste probe, status-ul mutational a putut fi reprodus cu Kitul *therascreen* NRAS Pyro in timp ce pentru doua probe nu s-a raportat nicio mutatie. Rezultatele sunt ilustrate in Tabelele 11 si 12. In codonul 61 nu s-a detectat nicio mutatie.

Cu exceptia probelor care au esuat in una sau in ambele metode, Kitul *therascreen* NRAS Pyro a indicat o concordanta de 98% si 100% a rezultatelor pentru codonii 12/13 si codonul 61 (Tabelul 11 si 12).

**Tabelul 11. Rezultatele probelor de maduva osoasa pentru codonii 12/13**

		Secventiere Sanger			
		Mutant	Salbatic	Necunoscut	Total
Kitul <i>therascreen</i> NRAS Pyro	Mutant	2	0	0	2
	Salbatic	2	90	3	95
	Necunoscut	0	3	0	3
	Total	4	93	3	100

**Tabelul 12. Rezultatele probelor de maduva osoasa pentru codonul 61**

		Secventiere Sanger			
		Mutant	Salbatic	Necunoscut	Total
Kitul <i>therascreen</i> NRAS Pyro	Mutant	0	0	0	0
	Salbatic	0	95	3	98
	Necunoscut	0	2	0	2
	Total	0	97	3	100

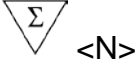













**Nota:** In toate incercarile utilizate pentru determinarea caracteristicilor de performanta, semnalul a fost peste 30 RLU, obtinut de regula din 10 ng de ADN izolat din tesut fixat in formalina si incastrat in parafina.

## Referinte

QIAGEN pastreaza online o baza de date larga si actualizata, despre publicatiile stiintifice care utilizeaza produse QIAGEN. Optiunile de cautare vaste va permit sa gasiti articolele de care aveti nevoie, fie printr-o simpla cautare de cuvinte cheie fie prin specificarea aplicarii, zonei de cercetare, titlului, etc.

Pentru o lista de referinte completa, vizitati Baza de Date de Referinta QIAGEN, pe [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) sau contactati Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul dvs. local.

## Simboluri

	Contine reactivi pentru testele <N> teste
	Se foloseste de catre
	Aparatura medicala pentru diagnostic in vitro
	Catalog numarul
	Lot numarul
	Material numarul
	Componente
	Contine
	Numar
	Hidroxid de sodiu
	Numar global de articol comercial
	Limita de temperatura
	Producator
	Cititi instructiunile pentru utilizare

## **Informatii de contact**

Asistenta tehnica si mai multe informatii veti gasi la Centrul nostru de Suport Tehnic la [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) sau sunand la unul din departamentele Qiagen de Serviciu Tehnic sau la distribuitorii locali (vezi coperta din spate sau vizitati site-ul [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Anexa A: Configurarea testelor *therascreen* NRAS Pyro

Înainte de utilizarea pentru prima dată a Kitului *therascreen* NRAS Pyro, fișierul de testare trebuie configurat. Configurați încercarea pentru codonii NRAS 12/13 și codonul 61 utilizând Software-ul PyroMark Q24, conform descrierii de mai jos.

## Procedura

### Codonii NRAS 12 și 13

**A1.** Apasați pe  din toolbar și selectați “New AQ Assay”.

**A2.** Editați următoarea secvență în “Sequence to Analyze”:

***GNTGNTGTTGGGAAAAGC***

Cele mai frecvente mutații în codonii 12 și 13 vor fi detectate în nucleotidul 35 și 38 (poziția a doua) folosind această “Sequence to Analyze”.

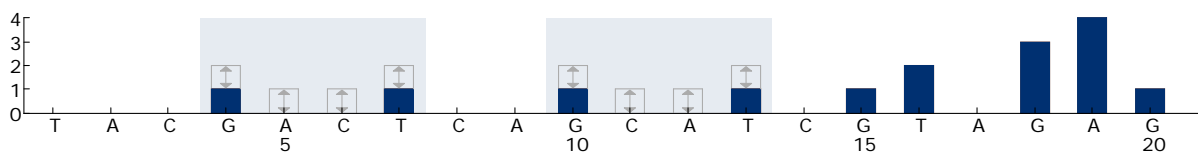
“Sequence to Analyze” poate fi schimbată după derularea testării, în analiza pentru mutații pe diferite poziții

Pentru a verifica dacă sunt prezente mutații în nucleotidele 34 sau 37 (prima poziție) se schimbă “Sequence to Analyze” în următoarea secvență  
***NGTNGTGTGGGAAAAGC***

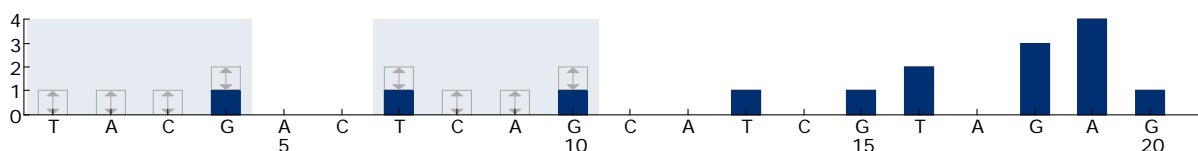
**Nota:** Asigurați-vă că pragul pentru înălțimea valorii maxime single este stabilit la 30 RLU.

**A3.** Introduceți manual următoarea “Dispensation Order”.

***TACGACTCAGCATCGTAGAG***



**Figura 11.** Histograma pentru codonii 12 (nucleotid 35) și 13 (nucleotid 38) cu “Sequence to Analyze” *GNTGNTGTTGGGAAAAGC*.



**Figura 12.** Histograma pentru codonii 12 (nucleotid 34) și 13 (nucleotid 37) “Sequence to Analyze” *NGTNGTGTGGGAAAAGC*.

- A4. Dati click pe “Analysis Parameters”, si mariti “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” la 30.**
- A5. Apasati  in toolbar, si salvati testul ca “NRAScodons 12+13”.**

### Codonul NRAS 61

**A1. Apasati pe  din toolbar si selectati “New AQ Assay”.**

**A2. Editati urmatoarea secventa in “Sequence to Analyze”.**  
**CNAGAAGAGTA**

Cele mai frecvente mutatii in codonul 61 vor fi detectate in nucleotidul 182 (pozitia a doua) folosind aceasta “Sequence to Analyze”.

“Sequence to Analyze” poate fi schimbata dupa derularea incercarii, in analiza pentru mutatii pe diferite pozitii.

Pentru a verifica daca sunt prezente mutatii in nucleotidul 181 (prima pozitie) se schimba “Sequence to Analyze” in urmatoarea secventa:

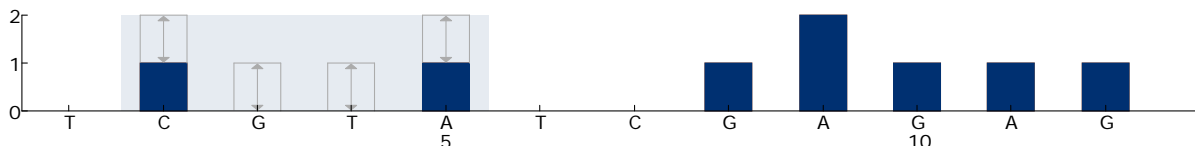
**VAAGAAGAGTA**

Pentru a verifica daca sunt prezente mutatii in nucleotidul 183 (prima pozitie) se schimba “Sequence to Analyze” in urmatoarea secventa:

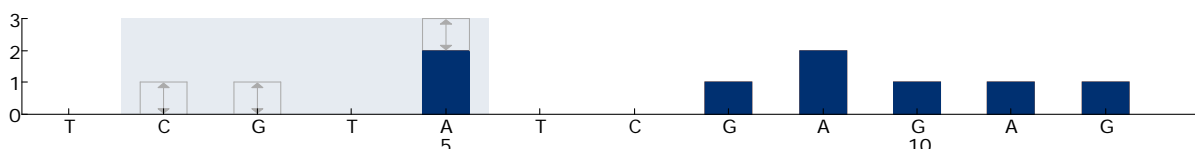
**CANGAAGAGTA**

**Nota:** Asigurati-va ca pragul pentru inaltimea valorii maxime single este stabilit la 30 RLU. In plus, asigurati-va ca factorul de reducere A-peak este setat la 0.86 pentru analiza codonului 61 NRAS.

**A3. Introduceti manual urmatoarea “Dispensation Order”:**  
**TCGTATCGAGAG**

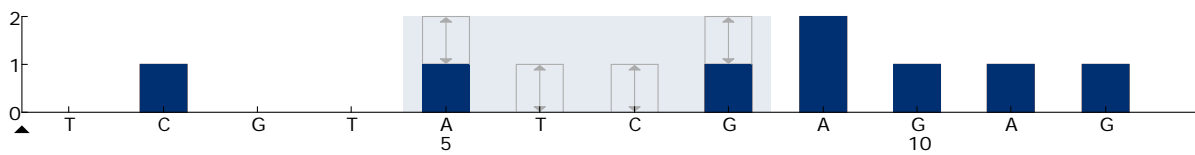


**Figura 13. Histograma pentru codonul 61 (nucleotid 182) cu “Sequence to Analyze” CNAGAAGAGTA.**





**Figure 14. Histogram for codon 61 (nucleotide 181) with the “Sequence to Analyze” VAAGAAGAGTA.**




**Figure 15. Histogram for codon 61 (nucleotide 183) with the “Sequence to Analyze” CANGAAGAGTA.**

**A4. Dati click pe tabelul “Analysis Parameters”, si mariti “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” la 30.**

**A5. Dati click pe tabelul “Analysis Parameters”, si scadeti “A-peak reduction factor:” la 0.86.**

**A6. Apasati  in toolbar, si salvati testul ca “NRAScodon 61”.**

## Anexa B: Golirea containerului si canalelor pentru deseuri

<b>WARNING</b> 	<b>Substante chimice periculoase</b> Solutia de denaturare folosita pe statia de lucru in vid contine hidroxid de sodiu, care irita ochii si pielea. Se vor purta intotdeauna manusi de protectie, ochelari de protectie si un halat de laborator. Organul responsabil (ex. Directorul laboratorului) trebuie sa masurile de precautie necesare pentru a se asigura ca spatiul de lucru inconjurator este sigur si ca operatorii instrumentului nu sunt expusi unor niveluri periculoase ale substantelor toxice (chimice sau biologice) asa cum sunt definite in Fisele Tehnice de Securitate ale Materialului (SDS-uri) aplicabile sau documentele OSHA, * ACGIH, † sau COSHH ‡ Sistemul de ventilare pentru fum si aruncarea deseurilor trebuie sa corespunda tuturor regulamentelor si legilor nationale, statale si locale privind sanatatea si siguranta
---	--

\* OSHA : Administratia de Siguranta si Sanatate Ocupationala (SUA)

† ACGIH: Conferinta Igienistilor Industriali Guvernamentali din America (SUA)

‡COSHH : controlul substantelor periculoase pentru sanatate (Marea Britanie).

Asigurati-va ca sunt respectate regulamentele federale, statale si locale de mediu pentru aruncarea deseurilor de laborator.

### Punct important inainte de pornire

- Acest protocol necesita apa de inalta puritate

### Procedura

- B1. Asigurati-va ca nu se aplica vid asupra instrumentului de vid.**  
Asigurati-va ca vidul este inchis (Off) si pompa de vid este oprita.
- B2. Aruncati orice solutii lasate in jgheaburi.**
- B3. Clatini jgheaburile cu apa de inalta puritate, sau inlocuiti-le daca este cazul.**
- B4. Goliti containerul pentru deseuri.**  
Capacul poate fi scos fara deconectarea tuburilor.
- B5. Daca statia de lucru in vid trebuie curatata (de exemplu, datorita prafului sau scurgerilor) trebuie respectate instructiunile din Manualul Utilizatorului *PyroMark Q24*.**

## Informatii privind comanda

Produs	Continut	Cat. nr.
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	Pentru 24 reactii pe sisteme PyroMark Q24: Seq Primer, PCR Primer, Control ADN nemetilic, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrat, Solutie tampon de legatura PyroMark, Solutie de atasare PyroMark, Solutie de denaturare PyroMark, Solutie tampon de spalare PyroMark, Mixtura de enzime, mixtura de substrat, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP, si H <sub>2</sub> O.	971530
PyroMark Q24 MDx	Platforma de detectare bazata pe secventiere pentru analiza Pyrosequencing a 24 mostre in paralel	9001513
PyroMark Q24	Platforma de detectare bazata pe ordonare pentru analiza Pyrosequencing a 24 mostre in paralel	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Statia de lucru in vid (220V) pentru pregatirea a 24 mostre in paralel, de la produsul PCR la matrita monocatenara	9001517* 9001515 <sup>†</sup>
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Statia de lucru in vid (220V) pentru pregatirea a 24 mostre in paralel, de la produsul PCR la matrita monocatenara	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicatii	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de analiza	9019062
<b>Accesorii</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placuta de reactie prin secventiere in 24 godeuri	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartusele pentru distribuirea nucleotidelor si reactivilor	979302

\* doar UK.

<sup>†</sup> Restul lumii

<b>Produs</b>	<b>Continut</b>	<b>Cat. nr.</b>
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Probe cu filtre refolosibile pentru statia de lucru in vid PyroMark Vacuum Q96 si Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Pentru verificarea instalarii sistemului	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pentru realizarea confirmarii sistemului	979304
<b>Produse conexe</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pentru 50 preparate ADN : 50 QIAamp MinElute Coloane, solutii tampon, Proteinaza K, eprubete de colectare (2ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	pentru 48 preparate : Cartuse de reactivi (tesut), varfuri cu filtru, de unica folosinta, suportii de varfuri de unica folosinta, eprubete pentru mostre (2ml) , eprubete pentru eluare (1,5 ml), solutie tampon G2, proteinaza K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	pentru 50 preparate: QIAamp coloane Mini Spin, solutii tampon, reactivi, eprubete, conectori de vid	61104

Pentru informatii actualizate privind licenta si pentru precizarile legale specifice produsului, vezi manualul respectiv al kitului QIAGEN sau manualul utilizatorului. Manualele kitului QIAGEN si manualele utilizatorului sunt disponibile pe [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sau pot fi cerute de la Serviciile Tehnice QIAGEN sau de la distribuitorul dvs. local.

Aceasta pagina a fost lasat goala in mod intentionat



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

#### Limited License Agreement

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the *therascreen* NRAS Pyro Kit to the following terms:

1. The *therascreen* NRAS Pyro Kit may be used solely in accordance with the *therascreen NRAS Pyro Kit Handbook* and for use with components contained in the kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the *therascreen NRAS Pyro Kit Handbook* and additional protocols available at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

For updated license terms, see [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Brazil** ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

**Italy** ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

**Korea (South)** ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

**Spain** ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

**USA** ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

