

therascreen[®] BRAF Pyro[®] Kit Kézikönyv



2. kiadás



In vitro diagnosztikai használatra



971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

R2



1074213HU



QIAGEN Minta és Vizsgálati Technológiák

A QIAGEN vezető szerepet játszik az innovatív minta- és vizsgálati technológiák terén, lehetővé téve bármely biológiai minta tartalmának izolálását és feltárását. Fejlett, magas színvonalú termékeink és szolgáltatásaink biztosítják a sikert a mintától az eredményig.

A QIAGEN irányadó az alábbi területeken:

- DNS, RNS és fehérje tisztítás
- Nukleinsav és fehérje vizsgálatok
- mikro RNS kutatás és RNSi
- Minta- és vizsgálati technológiák automatizálása

Küldetésünk, hogy Ön kimagasló sikereket és áttöréseket érjen el.
További információért látogasson el honlapunkra: www.qiagen.com

Tartalom

Tervezett felhasználás	4
Összefoglalás és magyarázat	4
A folyamat elve	5
A Kit tartalma	7
Szükséges, de nem biztosított anyagok	9
Figyelmeztetések és óvintézkedések	11
Biztonsági információk	11
Általános óvintézkedések	12
Reagensek tárolása és kezelése	13
Mintakezelés és tárolás	13
A folyamat	14
DNS izolálás	14
1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása	15
2. Protokoll: PCR a <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit-tel szállított PCR reagenssekkel	18
3. Protokoll: A PCR termék kivonása Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökkel	21
4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt	23
5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása	27
6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése	29
Az eredmények értelmezése	32
Az elemzés eredményeinek értelmezése és az alacsony szintű mutációk detektálása	32
Hibaelhárítási útmutató	36
Minőségellenőrzés	39
Korlátozások	39
Referenciák	45
Szimbólumok	45
Kontakt információ	46
A Melléklet: A <i>therascreen</i> BRAF Pyro beállítása	47
B Melléklet: A hulladék tartály és reagens tartók kiürítése	50
Rendelési információk	51

Tervezett felhasználás

A *therascreen* BRAF Pyro Kit egy in vitro nukleinsavszekvenencia-alapú teszt, a humán BRAF gén 600, illetve 464-469-es kodonjában található mutációk mennyiségi Pyroszekvenálása, szöveti mintából származó genomi DNS alapján.

A *therascreen* BRAF Pyro Kit-tel a klinikusok olyan információhoz juthatnak, amivel, nagyobb valószínűséggel ki tudják választani azokat a rákbetegeket, akiknél hatásos lehet az anti-EGFR terápia, mint a panitumumab és cetuximab. In-vitro diagnosztikai használatra.

Csak a PyroMark Q24 rendszeren történő használatra. A PyroMark Q24 rendszer az alábbiakat tartalmazza:

- A PyroMark Q24 készülék és a PyroMark Q24 MDx készülék.
- A PyroMark Q24 Vacuum Workstation és a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- PyroMark Q24 szoftver (2.0) és a PyroMark Q24 MDx szoftver (2.0).

A termék szakemberek számára ajánlott, mint például technikusok és orvosok, akik képzettséggel rendelkeznek in-vitro diagnosztikai folyamatokban, molekuláris biológiai technikákban és ismerik a PyroMark Q24 rendszert.

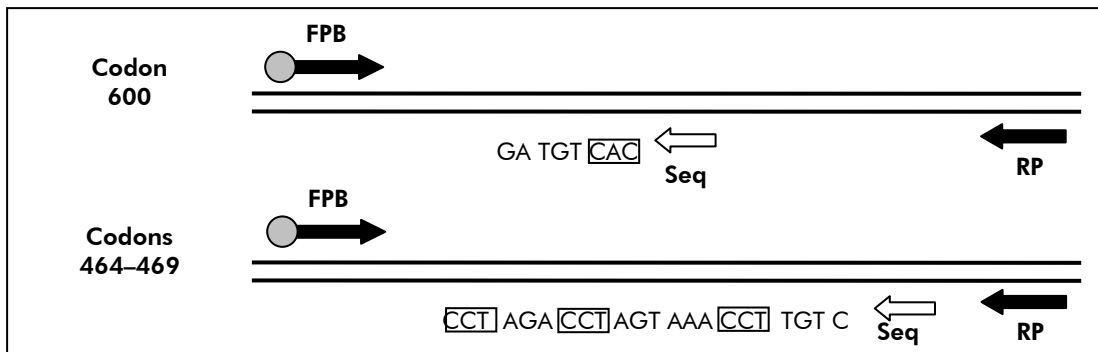
Összefoglalás és magyarázat

The *therascreen* BRAF Pyro Kitet a humán BRAF gén 15-ös exonjának 600, illetve 11-es exonjának 464-469-es kodonjában található mutációk mennyiségi Pyroszekvenálására használhatjuk (1. ábra).

Exon 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCT AGCTACA[GTG]AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTG TCTGGATCCATTTTGTGGATG
Exon 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCCTGATG GGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT[GGA]TCT[GGA]TCATTT[GGA]ACAGT CTACAAGGGAAAGTGGCATG

1. ábra. A humán BRAF gén szekvenált régiójának genetikai tartalma (Ensembl ID ENSG00000157764). A 600, 464, 466, and 469 kodonokat a négyzetek jelzik.

A kit 2 db assay-ből áll: az egyik a 600-as kodonban, a másik a 464–469 kodonokban határozza meg a mutációkat (2. ábra). A két régió PCR által külön-külön kerül amplifikálásra és szekvenálásra ezeken a területeken. A meghatározott pozíciók körüli szekvenciák normalizálási és referencia csúcsként szolgálnak a minőségi és mennyiségi értékeléséhez.



2. ábra. A BRAF vizsgálat illusztrációja. A szekvencia a vad-típusú minta analizált szekvenciáját jelöli. **FP** és **FPB**: Forward PCR primerek (**B** jelöli a biotinilációt); **RP** és **FPB**: Reverse PCR primerek (**B** jelöli a biotinilációt) **Seq**: Szekvenáló primerek.

Mindkét vizsgálat reverz irányban szekvenált.

A termék minden vizsgálatához tartalmaz egy PCR primer mixet és egy szekvenáló primert. A primerek oldat formájában kerülnek szállításra. Minden fiola 24 µl primert vagy primer mix-et tartalmaz.

A folyamat elve

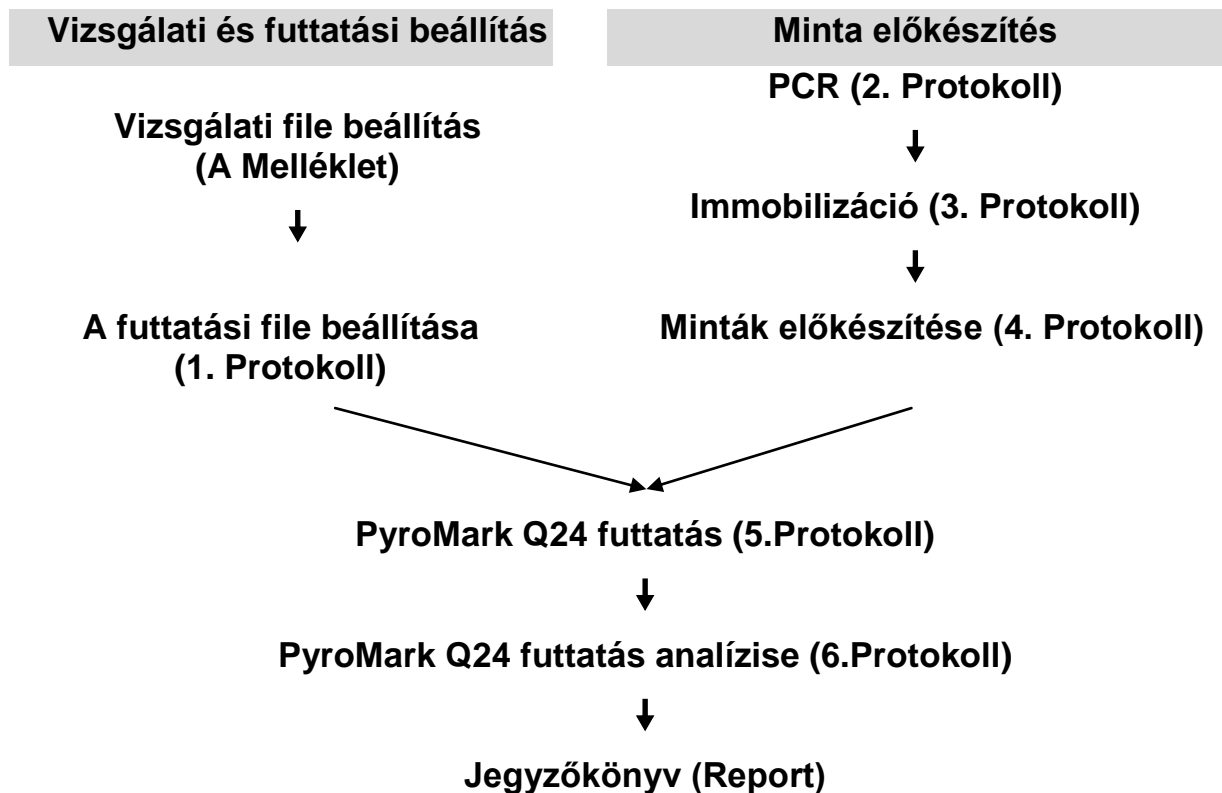
A 6. oldali munkafolyamat a vizsgálatok menetét vázolja. A 600-as és 464-469-es kodonokra célzott primerrel történő PCR után az ampliconok megkötődnek a Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökön. A termék egyszálúsítása után a szekvenáló primerek kapcsolódása következik (annealing). A mintákat ezután a PyroMark Q24 rendszeren analizáljuk egy futtatási-beállítás file és egy futtatási file használatával.

Ajánlott, a BRAF Plug-in Report-ot használni a futtatás analizálásához. Ezt az alábbi e-mail címen lehet igényelni: pyro.plugin@qiagen.com

Habár, a futtatást lehet analizálni a PyroMark Q24 rendszer szerves részét képező analízis modullal is. Ebben az esetben a „Sequence to Analyze” beállítható a ritka mutációk elemzésére a futás után (lásd „6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése”, 29. oldal).

Megjegyzés: A munkafolyamat kissé módosult a theascreen BRAF Pyro Kit Kézikönyv előző verziójához képest (1. kiadás, 2011 július). Lásd „4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt”, 23. oldal..

A *therascreen* BRAF Pyro procedúra munkafolyamata



Kontrollok

A kit tartalmaz egy metilálatlan kontroll DNS-t, mint pozitív kontrollt a PCR-hez és a szekvenáló reakciókhoz. Ez a kontroll DNS „vad” genotípussal rendelkezik azokon a szekvenált területeken, ahol a kit felhasználásra kerül, így biztosítja az eredmények megfelelő értelmezését valamint az alacsony szintű mutációk beazonosítását (lásd: „Az eredmények értelmezése”, 32. oldal). Minden egyes vizsgálatnak tartalmaznia kell egy metilálatlan kontroll DNS mintát is, minden piroszekvenálási futtatás alkalmával.

Továbbá negatív kontrollt (DNS nélküli) is kell tartalmaznia legalább egy vizsgálatnak minden PCR összemérés alkalmával.

Biztosított anyagok

A Kit tartalma

therascreen BRAF Pyro Kit (1/2-es doboz)

<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	(24)
Kat. szám	971470
Reakciók száma	24
Seq Primer BRAF 600	24 µl
Seq Primer BRAF 464–469	24 µl
PCR Primer BRAF 600	24 µl
PCR Primer BRAF 464–469	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad [®] Koncentrátum, 10x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1.9 ml
Metilálatlan kontroll DNS, 10 ng/µl	100 µl

therascreen pufferek and reagenszek (2/2-es doboz)

Puffers és reagenszek	
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 \square S	1180 μ l
dCTP	1180 μ l
dGTP	1180 μ l
dTTP	1180 μ l
therascreen <i>BRAF Pyro Kit Kézikönyv</i> (angol nyelvű)	1

* Nátrium-hidroxidot tartalmaz.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Kémiai anyagokkal történő munka során mindig megfelelő laboratóriumi ruházatot szükséges viselni, eldobható kesztyűket, és védőszemüveget. További információkért olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS), amelyek a termék forgalmazójától szerezhető be.

- DNS izoláló kit (lásd „14DNS izolálás”, 14. oldal)
 - Pipetták (állítható)*
 - Steril pipetta hegyek (szűrővel a PCR összeállításához)
 - Asztali mikrocentrifuga*
 - PCR készülék* és hozzáillő PCR csövek
 - Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat. szám 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
 - PyroMark Q24 (kat. szám 9001513 vagy 9001514)*[†]
 - PyroMark Q24 szoftver (kat. szám 9019063 vagy 9019062)[†]
 - PyroMark Q24 Plate (kat. szám 979301)[†]
 - PyroMark Q24 Cartridge (kat. szám 979302)
 - PyroMark Q24 Vacuum Workstation (kat. szám 9001515 és 9001517)*[†]
 - plate mixer* a gyöngyök immobilizálásához
 - Fűthető blokk*, mely képes 80°C-t biztosítani
 - 24-csöves PCR plate vagy strip-ek
 - Strip kupakok
 - Nagytisztaságú víz (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm vagy annak megfelelő)
- Megjegyzés:** Elegendő víz biztosított a kitben a PCR-hez, DNS megkötéshez, az enzim mix és szubsztrát mix feloldásához; a további nagytisztaságú víz a Pyromark mosó puffer, 10x hígításához szükséges.
- Etanol (70%)[‡]

* Bizonyosodjon meg arról, hogy a gyártó javaslatainak megfelelően történt a készülék ellenőrzése és kalibrálása.

[†] CE-IVD jelölés a 98/79/EC EU-s előírásnak megfelelően. Minden más termék a listában a 98/79/EC EU-s Előírás alapján nem CE-IVD jelölésű.

[‡] Ne használjon denaturált alkoholt, mely egyéb anyagokat tartalmaz, mint a metanol és metiletiketont.

Ajánlott plate mixerek

Az 1. táblázatban feltüntetett plate mixerek ajánlottak a *therascreen* BRAF Pyro Kit használatához.

1. táblázat. Plate mixerek, melyek a *therascreen* BRAF Pyro Kit használatához ajánlottak.

Gyártó	Termék	Kat. szám
Eppendorf	Termomixer komfort (alap készülék)	5355 000.011
	Termoblokk MTP-hez	5363 000.012
	Adapter plate 96 x 0.2ml-es PCR csövek mikrotiter plate-ek blokkjaiba illesztéséhez	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag [®] Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Ajánlott 24-well plate-ek

A 2. táblázatban feltüntetett 24-well plate-ek ajánlottak a *therascreen* BRAF Pyro Kit használatához.

2. táblázat. 24-well plate-ek, melyek a therascreen BRAF Pyro Kit használatához ajánlottak.

Gyártó	Termék	Kat. szám
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Biztonsági információk

Kémiai anyagokkal történő munka során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkért, kérjük, olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS). Ezek online elérhetőek praktikus és tömör PDF formátumban a www.qiagen.com/safety oldalon, ahol megtalálható, olvasható és kinyomtatható az SDS az egyes QIAGEN kitekre és kit komponensekre vonatkozóan.

Az alábbi figyelmeztető („H”) és óvintézkedésre vonatkozó („P”) mondatok vonatkoznak a(z) *therascreen* BRAF Pyro Kit termék összetevőire.

PyroMark Denaturation Solution



Figyelem! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Fémekre korrozív hatású lehet. A kiömlött anyagot fel kell itatni a körülvevő anyagok károsodásának megelőzése érdekében. Az eredeti edényben tartandó. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

PyroMark Enzyme Mixture



Tartalmaz: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Veszély! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. A szennyezett

ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

PyroMark Substrate Mixture



Tartalmaz: acetic acid. Figyelem! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

Általános óvintézkedések

Megjegyzés: A felhasználónak mindig figyelmet kell fordítania az alábbiakra.

- Szigorúan meg kell felelni a felhasználói kézikönyv előírásainak a megfelelő eredményért. A reagensek hígítása, másként, mint ahogy azt a kézikönyv írja, nem ajánlott és a teljesítmény csökkenését eredményezi.
- A munkafolyamat kissé módosult (lásd „4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt, 23. oldal) a theascreen BRAF Pyro Kit Kézikönyv R1 revíziójához viszonyítva
- Ezen termék komponensei elegendőek 24 reakció elkészítésére, akár 5 független futtatáshoz.
- Használjon steril pipetta hegyeket szűrővel (a PCR összeállításához).
- Tárolja, illetve nyissa fel a pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok, és amplikonok) különállóan más további reagensektől és adja hozzá a reakció keverékhez egy különálló helységben.
- Olvassa fel az összes komponenst szobahőmérsékleten (15-25°C) az analízis előtt.
- Amikor felolvadt, keverje össze a komponenseket (fel-le pipettázással, vagy vortex-el) és röviden centrifugálja.
- A sikertelen eredmények nem hivatottak a mutációs státusz megítélésére.

Reagensek tárolása és kezelése

A *therascreen* BRAF Pyro Kit-szállítása 2 dobozban történik. A *therascreen* BRAF Pyro Kit (1/2-es doboz) szállítása szárazjégen történik. A PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Koncentrátum, metilálatlan kontroll DNS és primerek tárolása -30 és -15°C között kell, hogy történjen megérkezésük után.

A *therascreen* pufferek és reagensek (2/2-es doboz) tartalma: *therascreen* pufferek, enzim mix, szubsztrát mix, dATP α S, dCTP, dGTP és dTTP (a Pyroszekvenálási analízishez szükséges reagensek); szállításuk jégakkumulátorral történik. Ezen komponenseket 2-8°C-on kell tárolni megérkezés után. Az aktivitási veszteséget minimalizálendő, ajánlott mind az enzim mixet mind a szubsztrát mixet a mellékelt fiolákban tárolni.

Az újraalkotott enzim és szubsztrát mixek legalább 10 napig stabilak 2-8°C-on. Az újraalkotott enzim és szubsztrát mixek lefagyaszthatóak és a fiolákban tárolhatók -30 és -15°C között. Lefagyasztott reagenseket nem lehet kitenni 3-nál több fagyasztási-kiolvasztási folyamatnak.

Megjegyzés: A nukleotidok nem fagyaszthatók.

A *therascreen* BRAF Pyro Kit, ha a fenti kondícióknak megfelelően vannak tárolva, stabil a kit lejárat dátumáig.

Mintakezelés és tárolás

Minden mintát, mint potenciális fertőző anyagot kell kezelni.

A mintaanyagok humán DNS-ek, melyeket vérből és formalin-fixált paraffinba-beágyazott (FFPE) mintákból vontak ki.

A folyamat

DNS izolálás

A rendszer teljesítménye az EZ1[®] DNA Tissue Kit és a QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit-ek használatával lett kialakítva, amelyekkel a formalinban-fixált paraffinba-ágyazott tumor mintákból történt a humán DNS izolálása.

A *therascreen* BRAF Pyro Kit-hez a 3. táblázatban látható QIAGEN kitek ajánlottak DNS tisztításra a megjelölt humán mintatípusokból. Végezze el a DNS tisztítást, a kit kézikönyvében leírt instrukcióknak megfelelően.

3. táblázat. DNS tisztító kitek, melyek ajánlottak a *therascreen* BRAF Pyro Kithez.

Minta típus	Nukleinsav izoláló kit	Kat. szám (QIAGEN)
Paraffinba-ágyazott szövet	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

* Kövesse a protokollt a paraffinba-ágyazott szövet használatakor. Az EZ1 DNA Tissue Kitet kombinálva kell használni az EZ1 Advanced (kat. szám 9001410 vagy 90014119) és az EZ1 Advanced DNS Paraffin Section Kártyával (kat. szám 9018298), vagy az EZ1 Advanced XL (kat. szám 9001492) és az EZ1 Advanced XL DNS Paraffin Section Kártyával (kat. szám 9018700), vagy a BioRobot[®] EZ1 (kat. szám 9000705, nem elérhető többé) és az EZ1 DNS Paraffin Section Kártyával (kat. szám 9015862).

1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása


Kezdés előtti fontos szempontok

- Ha kell, a LOB megerősíthető egy vad-típusú mintával, hogy teljes plate-es eredményhez jussunk. Részleteket a CLSI Irányelv EP17-A „A feltárás és mennyiségi limit meghatározása; jóváhagyott útmutató”-ban találhat.


Kezdés előtti teendők

- Ha a BRAF Plug-In Report nincs installálva, készítsen egy Assay Setup beállítást (lásd „A Melléklet: A *therascreen* BRAF Pyro beállítása”, 47. oldal). Ezt csak egyszer kell elvégezni a *therascreen* BRAF Pyro vizsgálatok első futtatásakor. Abban az esetben, ha a *therascreen* BRAF Plug-In Report már installálva van, az előre definiált Assays Setup-ok elérhetők a PyroMark Q24 szoftverén az alábbi elérési útvonalon: „Example Files/PyroMark Setups/BRAF”. A BRAF Plug-In Report-ot e-mailen is lehet igényelni a pyro.plugin@qiagen.com címen.

Procedúra

1. **Kattintson az  ikonra az eszköztárban.**
Egy új futási file-t kapunk.
2. **Írja be a futási paramétereket (lásd: „Futtatási paraméterek”, 17. oldal).**
3. **Állítsa össze a plate-et, hozzáadva assay-t mind a 600-as kodonhoz mind a 464-469-es kodonhoz a vizsgálandó mintaszámhoz megfelelő well-ekben.**
Megjegyzés: Egy negatív kontroll mintát (DNS minta nélkül) mellékeljen minden PCR összeméréskor legalább 1 vizsgálatban.

Megjegyzés: Mellékeljen egy metilátlan kontroll DNS-t minden egyes vizsgálatához, pyroszekvenálási futásonként (lásd: „Kontrollok”, 6. oldal).

4. **Amikor a futás összeállt és kész a ProMark Q24 futtatásra, nyomtasson egy listát az enzim keverék, szubsztrát keverék és nukleotidok kívánt mennyiségéről, illetve a plate beállításáról. Válassza a „Tools” menüből a „Pre Run Information”-t, amint a jelentés megjelenik, kattintson .**
5. **Zárja be a futtatás file-t és másolja egy pendrive-ra (a rendszer tartozéka) Windows Explorer-t használva.**

Megjegyzés: A nyomtatott Előfuttatási Információt, mintaként használhatja, az összeméréshez (lásd: „3. Protokoll: A PCR termék kivonása Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökkel”, 21. oldal). A plate PyroMark Q24-en történő futtatásához, lásd: „5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 27. oldal.

Futtatási paraméterek

- Futtatási név: A futtatás megnevezése a file mentésekor kerül megadásra. A file átnevezése szintén megváltoztatja a futtatás megnevezését.
- Műszer metódus: Válassza ki a műszer módszert a cartridge-nak megfelelően, amely a futtatáshoz használva lesz.
- Plate ID: **Opcionális:** Adja meg a PyroMark Q24 Plate ID-ját.
- Vonalkód: **Opcionális:** Adjon meg egy vonalkód számot a plate-hez, vagy ha van egy vonalkód olvasó a computerhez csatlakoztatva, helyezze az egér kurzort a „vonalkód” szöveg dobozra (a dobozra klikkelve) és szkennelje be a vonalkódot.
- Kit ID: **Opcionális:** Adja meg a használni kívánt thescreen BRAF Pyro Kit lot. számát. A lot. szám a termék címkén található.
Megjegyzés: Ajánlott mind a reagens és a kit ID-jait megadni, hogy bármilyen a reagenst érintő problémát nyomon lehessen követni.
- Futtatási jegyzet: **Opcionális:** Adjon meg egy jegyzetet a tartalomról vagy a futtatás céljáról.

Vizsgálati file-ok hozzáadása

Ha egy assay-t egy csőhöz szeretnénk rendelni, akkor vagy:

- Jobb-klikk a csőre és „Load Assay” kiválasztása a tartalom menüből.
- A shortcut browser-ben válassza ki az assay-t majd húzza át azt a csőhöz.

A cső szín-kódos, a betöltött vizsgálatnak megfelelően.

Adjon meg minta ID-eket és megjegyzéseket

Ahhoz, hogy megadjon minta ID-eket vagy megjegyzéseket, válassza ki a cellát és írja be a szöveget.

Egy minta ID vagy egy megjegyzés szerkesztéséhez, vagy válassza ki a cellát (az aktuális tartalom ki lesz választva) vagy klikkeljen duplán a cellára.

2. Protokoll: PCR a *therascreen* BRAF Pyro Kit-tel szállított PCR reagensekkel

Ez a protokoll a PCR amplifikáláshoz szolgál a 600-as valamint egy külön PCR amplifikáláshoz a 464-469-es kodonokban a *therascreen* BRAF Pyro kitet használva.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A PyroMark Master Mix-ben található HotStarTaq[®] DNS polimeráz egy **15 percig** tartó aktivációs lépést igényel **95°C-on**.
- Állítsa össze az összes reakció mixet egy, a DNS izolálástól független helyen, adja a minta DNS-t a PCR-hez, elemezze a PCR terméket, vagy készítse elő a mintát piroszekvenálási analízist megelőzően.
- Használjon eldobható hegyeket, melyek hidrofóbikus szűrőket tartalmaznak a kereszt-szennyeződés minimalizálása érdekében

Kezdés előtti teendők

- Mielőtt felnyitja a PCR primereket tartalmazó csöveket, röviden centrifugálja le azokat, hogy tartalmuk a cső aljára gyűljön.
- Állítsa a kontroll és minta DNS koncentrációját 0.4-2ng/μl-re, ha szükséges.

Procedúra

1. Olvassa fel az összes szükséges komponenst (lásd: 4. táblázat).

Jól keverje össze használat előtt.

2. A 4. táblázatban megadottak szerint készítsen egy reakció mixet minden egyes PCR primer szetthez.

A reakció mix tartalmazza az összes komponenst, ami a PCR-hez szükséges, kivéve a mintát.

Készítsen olyan nagy mennyiségű reakció mixet, amely nagyobb, mint a végrehajtandó PCR vizsgálatok száma.

4. táblázat A reakció mix elkészítése az egyes PCR primer mixekkel

Összetevő	Térfogat/reakció (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Koncentrátum, 10x	2.5
PCR Primer BRAF codon 600 vagy PCR Primer BRAF codons 464–469	1.0
Water (H ₂ O, tartozék)	4.0
Össztérfogat	20.0

3. Keverje össze a reakció mixet és osszon 20µl-t minden egyes PCR csőbe.

Nem szükséges a PCR csöveket jégben tartani, mert a HotStarTaq DNS polimeráz inaktív szobahőmérsékleten.

4. Adjon hozzá 5µl minta DNS-t (2-10 ng genomikus DNS) az egyes PCR csövekhez (lásd: 5. táblázat) és jól keverje össze.

Megjegyzés: Egy negatív kontrollt (DNS nélküli) is kell tartalmaznia legalább egy vizsgálatnak minden PCR összemérés alkalmával.

Megjegyzés: Használjon egy metilátlan kontroll DNS mintát minden egyes pirosekvenális futtatásban (lásd: „Kontrollok

”, 6. oldal).

5. táblázat PCR készítés

Összetétel	Térfogat/reakció (µl)
Reakció mix	20
Minta DNA	5
Össztérfogat	25

5. Programozza be a PCR készüléket a gyártó előírásainak megfelelően, a 6. táblázatban vázolt kondíciókat használva.

6. táblázat Optimalizált PCR protokoll

			Megjegyzések
Kezdeti aktivációs lépés:	15 perc	95°C	A HotStarTaq DNS polimeráz aktiválódik ezzel a fűtési lépéssel.
3-lépéses ciklus:			
Denaturáció	20 másodperc	95°C	
Feltapadás	30 másodperc	53°C	
Láncépítés	20 másodperc	72°C	
Ciklusok száma	42		
Végső extenzió:	5 perc	72°C	

6. Helyezze a PCR csöveket a PCR készülékbe és indítsa el a programot
7. Az amplifikáció után, folytassa a „3. Protokoll: A PCR termék kivonása Streptavidin Sepharose High Performance gyönggyökkel”, 21. oldal.

3. Protokoll: A PCR termék kivonása Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökkel

Ez a protokoll írja le a templát DNS kikötését Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) segítségével a PyroMark Q24 analízis előtt.

Kezdés előtti teendők

- Engedjük, hogy az összes szükséges reagens és oldat felvegye a szobahőmérsékletet (15-25 C°) mielőtt dolgozni kezdünk velük.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A munkafolyamat kissé módosult a *therascreen* BRAF Pyro Kit Kézikönyv előző verziójához képest (1. kiadás, 2011 július).

Procedúra

1. Óvatosan rázza fel a Streptavidin Sepharose High Performance üvegét, amíg homogén oldatot nem kapunk.
2. Készítsen master mix-et a DNS kivonáshoz a 7. táblázatnak megfelelően. Készítsen 10%-kal több mennyiséget, mint ami az összes reakcióhoz kell.

7. táblázat. Master mix a DNS kikötéséhez

Összetétel	Térfogat/minta (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Víz (H ₂ O, tartozék)	28
Össztérfogat	70

Megjegyzés: Ez a protokoll olyan Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyökre vonatkozik, amelynek lot száma 10057037 vagy magasabb. Amennyiben olyan Streptavidin Sepharose High Performance gyöngyöt használunk, amelynek Lot száma alacsonyabb, úgy a mixben növeljük meg mintánként 2 µl-rel a gyöngyök térfogatát, a vizét pedig ennek megfelelően csökkentjük.

3. **Mérjen 70 µl master mix-et a 24 férőhelyes PCR plate vagy a strip csöveibe, amelyet előzőleg megadhat a futási beállításoknál (lásd „1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal).**
4. **Adjon a 2. Protokoll alapján készített biotinilált PCR termékből 10 µl-t a master mix-et tartalmazó csövekbe, amelyeket megadott a futási beállításoknál (lásd „1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal).**

Megjegyzés: A teljes térfogatnak 80 µl-nek kell lennie a master mix és a PCR termék bemérése után.

5. **Zárja le a PCR plate-et (vagy a strip-et) strip sapkával.**

Megjegyzés: Győződjön meg róla, hogy a csövek között nincs szivárgás.

6. **Mozgassa a PCR plate-et 5-10 percig szobahőmérsékleten (15-25 C°) 1400 rpm-vel.**

Megjegyzés: Ezalatt készítse elő a PyroMark Q24 Vacuum Workstation-t a mintatisztításhoz, a *PyroMark Q24 User Manual* alapján.

7. **Közvetlenül folytassa ezzel: „4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt”, 23. oldal.**

Megjegyzés: A szefaróz gyöngyök gyorsan ülepednek. A gyöngyök kifogásának közvetlenül a mozgatót követően kell megtörténnie..

Ha több mint 1 perc telik el a plate vagy a strip mozgatóját követően, akkor újra 1 percig mozgatót kell a gyöngyöket a kifogásuk előtt

4. Protokoll: Mintatisztítás a PyroMark Q24-en történő Pyrosequencing analízis előtt

A PyroMark Q24 Pyrosequencing analízis előtt ez a protokoll írja le az egyszálú DNS előkészítését és a szekvenáló primer templáttal történő összekapcsolását.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A szekvenáló primereket tartalmazó csövek kinyitása előtt röviden centrifugálja le azokat, hogy a tartalom a cső aljára kerüljön.
- Adja a 2 különböző szekvenáló primer-t azonos módon, mint ahogy meghatározta azt a futási beállításban (lásd „1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal), az analizálni kívánt régiótól függően (kodon 600, vagy kodon 464-469).
- A munkafolyamat kissé módosult a *therascreen* BRAF Pyro Kit Kézikönyv előző verziójához képest (1. kiadás, 2011 július, 18. lépés). A 80 C°-os melegítést követően ne rövidítse le a minta kihűlési idejét.
- Rendszeresen végezze el a szűrő szondák funkció tesztjét a *PyroMark Q24 User Manual* alapján és ha kell cserélje ki a szűrő szondákat.

Kezdés előtti teendők

- Helyezze a PyroMark Q24 Plate Holder-t egy 80 C°-ra előmelegített thermoblokkra a 17. lépésnél. Hagyja a második PyroMark Q24 Plate Holder-t szobahőmérsékleten (15-25 C°) a 18. lépéshez.
- A PyroMark Wash Buffer 10x-es koncentrátum. Első használat előtt hígítsa 1x-es oldattá, úgy hogy adjon 225 ml nagy tisztaságú vizet 25 ml 10x-es PyroMark Wash Buffer-hez (végtérfogat 250 ml).

Megjegyzés: Az 1x-es, használatra kész PyroMark Wash Buffer oldat eltartható a jelzett lejárati időig.

Procedúra

- 1. Hígítson elegendő mennyiséget az egyes szekvenáló primerekből Seq Primer BRAF 600 és Seq Primer BRAF 464-469 a PyroMark Q24 Annealing Buffer-t használva a 8. táblázat szerint.**

Hígítson nagyobb mennyiséget a szekvenáló primerekből, mint amennyi az összes minta szekvenálásához szükséges lenne (minták száma + egy extra).

Ne hígítson ki és ne tároljon ennél több szekvenáló primert.

8. táblázat. Példa a szekvenáló primerek hígítására

Összetétel	Térfogat/minta (µl)	Térfogat 9 + 1 reakcióra (µl)
Seq Primer BRAF 600 vagy Seq Primer BRAF 464–469	0.8	8
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Össztérfogat	25	250

- Tegyen 25 µl-t a hígított szekvenáló primer-ből a PyroMark Q24 Plate egyes csöveibe a futási beállításoknak megfelelően (lásd „1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal).**

Megjegyzés: Tartsa az egyik PyroMark Q24 Plate Holder-t (tartozék a PyroMark Q24 Vacuum Workstation-nak) szobahőmérsékleten (15-25 C°) és használja tartóként, a plate előkészítése és mozgatása során.
- Helyezze a 3. Protokoll alapján előkészített PCR plate-et (vagy strip-et) és a PyroMark Q24 Plate-et a munkaasztalra (3. ábra).**

Megjegyzés: Ellenőrizze a plate helyes orientációját, a mintafelvétel alapján.



3. ábra A PCR plate (vagy strip) és a PyroMark Q24 Plate elhelyezése a vákuum munkaasztalon..

- A vákuum bekapcsolásával hozzon létre vákuumot az eszközben.**

5. Óvatosan eressze le a szűrő szondákat a PCR plate-be (vagy strip-be), hogy összegyűjtse a templát DNS-sel kötésben lévő gyöngyöket. Tartsa a szondákat itt 15 másodpercig. Óvatosan emelje fel a vákuum fejet.

Megjegyzés: A szefaróz gyöngyök gyorsan ülepednek. Ha több mint 1 perc telik el a plate vagy a strip mozgatását követően, akkor újra 1 percig mozgatni kell a gyöngyöket a kifogásuk előtt.

Vizsgálja meg a PCR plate-et, hogy a vákuum az összes mintát felszívta-e.

6. Helyezze a vákuum fejet a 40 ml, 70%-os etanolt tartalmazó kádba (3. ábra). Öblítse el a szűrő szondákat 5 másodpercen keresztül.
7. Helyezze a vákuum fejet a 40 ml, Denaturation Solution-t tartalmazó kádba (3. ábra). Öblítse el a szűrő szondákat 5 másodpercen keresztül.
8. Helyezze a vákuum fejet az 50 ml, Wash Buffer-t tartalmazó kádba (3. ábra). Öblítse el a szűrő szondákat 10 másodpercen keresztül.
9. Emelje fel a vákuum fejet, majd 5 másodpercig döntse hátra, a függőleges 90°-on túl, hogy a folyadék lecsurogjon a szűrő szondákból (4. ábra).



4. ábra A vákuum fej hátradöntésének illusztrációja, a függőleges 90°-on túl.

10. Miközben a vákuum fejet a PyroMark Q24 Plate fölé tartja zárja le a vákuum kapcsolót az eszközön (Off).
11. Oldja le a gyöngyöket a PyroMark Q24 Plate-be, úgy hogy engedje a szűrő szondákat a hígított szekvenáló primer-be, majd óvatosan mozgassa az eszközt egyik oldalról a másikra.
Megjegyzés: Vigyázzon, nehogy felsértse a PyroMark Q24 Plate felszínét, megkarcolva azt a szűrő szondákkal.
12. Helyezze a vákuum fejet nagy tisztaságú vizet tartalmazó kádba (3. ábra) és mozgassa azt 10 másodpercig.
13. Nagy tisztaságú vízbe merítve (3. ábra) és vákuumot alkalmazva mossa át a szűrő szondákat. Öblítse a szondákat 70 ml nagy tisztaságú vízzel.

14. **Emelje fel a vákuum fejet, majd 5 másodpercig döntse hátra, a függőleges 90°-on túl, hogy a folyadék lecsurogjon a szűrő szondákból (4. ábra).**
15. **Zárja le a vákuum kapcsolót az eszközön (Off) és helyezze vákuum fejet a Parking (P) pozícióba.**
16. **Kapcsolja ki a vákuum pumpát.**
Megjegyzés: A munkanap végén kidobhatja a keletkezett folyékony hulladékot és a megmaradt oldatokat, valamint ellenőrizheti, hogy maradt-e por illetve folyadék általi szennyeződés a PyroMark Q24 Vacuum Workstation-on (lásd B Melléklet, 50. oldal).
17. **Az előmelegített PyroMark Q24 Plate Holder segítségével melegítse fel a mintákat tartalmazó PyroMark Q24 Plate-et 2 percig 80 C°-ra.**
18. **Vegye le a PyroMark Q24 Plate-et a meleg plate tartóról és helyezze a másik PyroMark Q24 Plate Holder-re, ami szobahőmérsékleten (15-25 C°) volt tartva és hagyja, hogy a minták 10-15 perc alatt szobahőmérsékletűre hűljenek.**
19. **Folytassa ezzel: „5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 27. oldal.**

5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása

A protokoll leírja a PyroMark Gold Q24 reagensek előkészítését és betöltését a PyroMark Q24 Cartridge-ba, valamint egy PyroMark Q24 futás elindítását és leállítását. A futtatás beállításáról részletes leírást a *PyroMark Q24 Felhasználói Kézikönyvében* talál.

Kezdés előtti fontos szempontok

- A Pre Run információs riport, ami a futási beállításoknál a „Tools” menüben található (lásd „1. Protokoll: A PyroMark Q24 rendszer futási beállítása”, 15. oldal), információt ad arról, hogy mennyi nukleotid, enzim és szubsztrát puffer szükséges egy specifikus futáshoz.

Kezdés előtti teendők

- Kapcsolja be a PyroMark Q24 készüléket. A bekapcsoló gombot a készülék hátsó oldalán találja.

Procedúra

1. Oldja fel a fagyasztva-szárított enzim és szubsztrát mixeket is 620 µl vízben (H₂O, tartozék).
2. Az összekeveredés érdekében forgassa meg óvatosan a csövet.

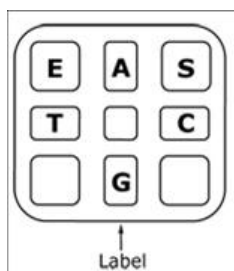
Megjegyzés: Ne vortexelje!

Megjegyzés: A biztos beoldódás érdekében hagyja a csövet szobahőmérsékleten (15-25 C°) 5-10 percig. Győződjön meg róla, hogy az oldat ne legyen zavaros, mielőtt a PyroMark Q24 Cartridge-ba tölti. Ha nem használja fel azonnal a reagenseket, tegye jégre* vagy hűtőbe.

3. Biztosítsa, hogy a reagensek és a PyroMark Q24 Cartridge elérje a környezeti hőmérsékletet (20-25 C°).
4. Fordítsa a PyroMark Q24 Cartridge-ot a jelzett oldalával maga felé.
5. Töltse fel a PyroMark Q24 Cartridge-ot a szükséges mennyiségű nukleotidokkal, enzim és szubsztrát mixekkel az 5. Ábrának megfelelően.

Vigyázzon, hogy ne kerüljön buborék a cartridge-ba a pipettázáskor.

* Amikor vegyi anyagokkal dolgozik, mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkért olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS), amelyek a termék forgalmazójától szerezhetők be.



5. ábra. A PyroMark Q24 Cartridge felülnézeti képe. A jelölések az egyes reagens tartó csöveknek megfelelőek. A futási beállítások „Tools” menüjében található Pre Run információs riport alapján, mérje be a megfelelő mennyiségű enzim mix-et (E), szubsztrát mix-et (S) és nukleotidokat (A, T, C, G). A „Label” a címke felőli oldalt jelenti.

6. **Nyissa ki a cartridge kaput, helyezze be a feltöltött reagens cartridge-ot a jelzett oldalával kifelé. Tolja be teljesen a cartridge-ot, majd nyomja le.**
7. **Biztosítsa, hogy a vonal legyen látható a cartridge előtt és zárja a kaput.**
8. **Nyissa ki a plate-tartó keretet és helyezze a plate-et a fűthető blokkra.**
9. **Zárja a plate-tartó keretet és a készülék fedelét.**
10. **Tegye a futási file tartalmú USB eszközt a készülék elején lévő port-ba.**
Megjegyzés: Ne vegye ki az USB eszközt a futás befejezése előtt.
11. **Válassza a „Run” parancsot a főmenüben (az érintőképernyő ▲ és ▼ gombjaival), majd nyomja meg az „OK”-t.**
12. **Válassza ki a futási file-t az érintőképernyő ▲ és ▼ gombjaival.**
Megjegyzés: A mappa tartalmának megtekintéséhez válassza ki a mappát és nyomja meg a „Select”-et. Az előző nézethez nyomja meg a „Back” gombot.
13. **Ha kiválasztotta a futási file-t, a futás elindításához nyomjon „Select”-et.**
14. **Ha a futás befejeződött és a készülék megerősítette, hogy a futási file-t az USB eszközre mentette, nyomjon „Close”-t.**
15. **Húzza ki az USB eszközt.**
16. **Nyissa fel a készülék fedelét.**
17. **Nyissa ki a cartridge kaput és vegye ki a reagens cartridge-ot, úgy hogy először emelje fel, majd húzza kifelé.**
18. **Zárja a kaput.**
19. **Nyissa ki a plate-tartó keretet és vegye ki a plate-et a fűthető blokkról.**
20. **Zárja le a plate-tartó keretet és a készülék fedelét.**
21. **Dobja ki a plate-et és tisztítsa ki a cartridge-ot a mellékelt terméklapon található utasítások alapján.**
22. **Elemesse a futást a 29. oldalon található „6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése” alapján.**

6. Protokoll: PyroMark Q24 futás elemzése

A protokoll leírja a BRAF futás mutáció elemzését a PyroMark Q24 szoftverrel.

Procedúra

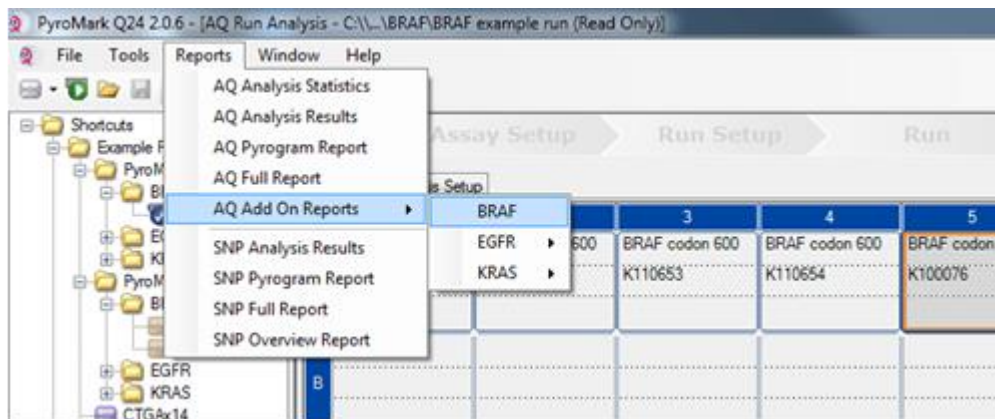
1. Helyezze be a számítógép USB portjába a feldogozott futási file-t tartalmazó USB eszközt.
2. Windows Explorert használva helyezze el a futási file-t a számítógépen.
3. Nyissa meg a futási file-t a PyroMark Q24 Software AQ módjában, úgy hogy a „File” menüből kiválasztja az „Open”-t, vagy úgy hogy kettőt klikkel a file-ra (👉) az egyszerűsített keresőben.
4. Kétféleképpen elemezheti a futást. Ha a BRAF Plug-in Report-ot használja, menjen az 5. pontra. Ha a PyroMark Q24 integrált, AQ analízist választja, folytassa a 6. ponttal.

Megjegyzés: A BRAF Plug-in Report használata kifejezetten ajánlott az eredmények értelmezéséhez. A BRAF Plug-in Report elérhető e-mailban: pyro.plugin@qiagen.com. Ez a riport biztosítja, hogy a megfelelő LOD értékek (9. táblázat) és a különböző „Sequence to Analyze” elemzések felhasználásával az összes mutáció automatikusan detektálható legyen.

Megjegyzés: BRAF 600-as és 469-es kodonjában található komplex mutációkat nem lehet elemezni A Pyromark Q24 software AQ analízis módban. Ajánlott a BRAF plugin használata a 600-as és 469 kodonban található komplex mutációk elemzéséhez.

Megjegyzés: Lehetséges, hogy néhány, a 600-as kodonban található mutáció, valamint a G469A és G469S változás nem különíthető el precízen 10%-os mutációs szint alatt.

5. **A BRAF plug-in report használata**
A Report készítéséhez válassza ki az AQ Add On Reports/BRAF pontot a menüben (lásd a 6. ábrát)



6. ábra BRAF Plugin Report menü

A 9. táblázatban található LOD értékkel rendelkező mutációk mindegyike automatikusan analizálódik. Az eredmények egy átfogó táblázatban jelennek meg (7. ábra), amelyet a részletes eredmények követnek a programokkal és analízis minőségi jellemzőivel

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	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.

7. ábra BRAF plugin report

Felirat az ábrában: Felkiáltójel: A részletes eredményeket lásd alább. MEGJEGYZÉS: Az eredményeket validálni kell a kapott és elvárt csúcsmagasságok (szürke oszlopok) összehasonlításával. További információért az adatok kiértékeléséhez és eredmények értelmezéséhez olvassa el a kézikönyvet.

6. Az AQ analízis használata:

A futás elemzéséhez és az átfogó eredmények megjelenítéséhez kattintson az Analyze gombra.



Összes cső elemzése.



Kiválasztott cső elemzése.

Az elemzés eredménye (allél gyakoriságok) és minőségi értékelések a változókéony régiók felett jelennek meg a Pyrogram[®] lenyomatnál. További részletekért lásd a *PyroMark Q24 Felhasználói Kézikönyvet*.

7. A riport készítéséhez válassza az “AQ Full Report” vagy az ‘AQ Analysis Results’ pontot a “Reports” menüben.

Megjegyzés: Megbízható eredményhez az ajánlott egyszeri csúcsmagasság legalább 30 RLU (relatív lumineszcencia érték). A 30-as RLU érték beállításához állítsa a “required peak height for passed quality” értéket az vizsgálat összeállításánál (lásd az A mellékletet és a *PyroMark Q24 Felhasználói Kézikönyvet*).

Megjegyzés: Az “AQ Analysis results” riportot kell az allél kvantifikáció dokumentálására és értelmezésére használni. A pirogramban látható számok csak kerekített értékek és nem mutatják a pontos mennyiségi értékelést.

Megjegyzés: A pirogramot mindig össze kell vetni a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pirogram ablakból. A mért csúcsnak egyeznie kell a hisztogram oszlop magasságával.

Újbóli elemzések olyan mintáknál, ahol nem volt GTG → GAG mutáció vagy, ahol a minőségi értékek „Check=Ellenőrzendő” vagy „Failed=Sikertelen” lettek

A leggyakoribb BRAF mutáció a GTG → GAG változás az 1799-es nukleotidnál (600-as kodon második bázisa). Emiatt ez a standard mutáció az elemzendő szekvenciánál (Sequence to Analyze), ami az esszé összeállításban található (lásd az „A Melléklet: A *therascreen* BRAF Pyro beállítása”, 47. oldal).

Ajánlott minden olyan minta újraelemzése, ahol a standard “Sequence to Analyze” esetén nincsen mutáció, vagy amelyeknél a minta a “Check=Ellenőrzendő” vagy “Fail=Sikertelen” minősítést kapta, illetve ahol a csúcsok nem egyeznek az elvárt (hisztogram) értékekkel. A “Check=Ellenőrzendő” vagy “Fail=Sikertelen” minősítés olyan mutációt jelezhet, amelyet a standard elemzendő szekvencia (Sequence to Analyze) nem vizsgál.

Az 1798-as nukleotid vagy a 600-as kodon 1798-as nukleotid mutációjának elemzéséhez és az újraelemzéshez változtassa meg az analizálandó szekvenciát (“Sequence to Analyze”) az “Analysis setup”-ban az egyik további analizálandó szekvenciára, amelyet az „A Melléklet: A *therascreen* BRAF Pyro beállítása” fejezetben talál, 47. oldal). Kattintson az “Apply” gombra, majd válassza ki a “To All=összesre” opciót, amikor az “Apply Analysis Window” megjelenik.

A frissített mutációs frekvencia adatok a humán BRAF gén 600-as kodonjában on-line megtalálhatók a Sanger Intézet honlapján: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Megjegyzés: Az analizálandó szekvencia (Sequence to Analyze) megváltoztatása után az egyedi csúcsmagasság küszöbértékét ne felejtjük el 30 RLU-ra állítani.

Megjegyzés: További ritka vagy nem várt mutációk is lehetnek a szekvenált régióban, amelyet alternatív, a nem várt mutációkat figyelembe vevő, elemzendő szekvenciával (Sequence to Analyse) vizsgálhatunk.

Megjegyzés: Ha a mért csúcsmagasságok nem egyeznek a hisztogrammal és nem magyarázhatók ritka vagy váratlan mutációkkal, akkor ajánlott a minták újbóli futtatása, szekvenálása.

Az eredmények értelmezése

Az elemzés eredményeinek értelmezése és az alacsony szintű mutációk detektálása

Az összehasonlítás, valamint a háttér szint ellenőrzése miatt kiemelten ajánlott metilátlan kontroll DNS vizsgálata minden futás alkalmával. A mért gyakoriságnak a kontroll minta esetén kisebbnek vagy egyenlőnek kell lennie az üres minta határértékénél (LOB).

Minden mintát meg kell vizsgálni a detektálási küszöböt figyelembe véve (LOD, 9. táblázat) és a következőképpen kell értelmezni.

- Mutációs gyakoriság <LOD: Nincs mutáció Nem detektált
- Mutációs gyakoriság \geq LOD és \leq LOD + 3 % egység: Lehetséges alacsony szintű mutáció

Megjegyzés: Amennyiben a BRAF Plug-in Report-ot használja (lásd 5. lépés az „5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása” részben, 27. oldal) és a fenti eset fordul elő, figyelmeztetés fog megjelenni a riportban.

Amennyiben a riportban lehetséges alacsony szintű mutáció jelenik meg egy mintára, az csak akkor fogadható el mutációra pozitívnak, amennyiben ez megerősítést nyer egy duplikált újrafuttatás során, ahol kontrollként nem-metilált kontroll DNS is szerepel. A duplikált futtatás esetén mindkét esetben LOD-nél nagyobb vagy egyenlő mutációs gyakoriságot kell kapni és mért értéknek különböznie kell a kontroll mintától. Minden egyéb esetben, a mintára a “Mutáció nem detektált” értékelést kell adni.

- Mutációs gyakoriság $>$ LOD + 3 % egység: Mutáció

Amennyiben a BRAF Plug-in Report-ot használja a fentiek automatikusan megállapításra kerülnek.

Megjegyzés: A BRAF Plug-in Report használata ajánlott az eredmények értékeléséhez. A jelzett, lehetséges, alacsony gyakoriságú mutációt hordozó minták közelebbi vizsgálatához, ajánlott a további kézi analízis a szoftver segítségével (pl.: viszonyítás a kontroll minta mutációs gyakoriságához).

Megjegyzés: Néhány, a 600-as kodonban, elemzendő mutáció esetén, valamint a G469A és G469S változásnál előfordulhat, hogy a változás nem azonosítható precízen, amennyiben a mutáció szintje 10% alatt van.

Megjegyzés: Az LOB-nél magasabb gyakoriság a kontroll minta esetében átlagosnál magasabb háttér értéket jelez az adott futtatásban, amely befolyásolhatja az allél gyakoriság meghatározását, különösen az alacsony szintű mutációk esetében. Ebben az esetben, a LOD (9. táblázat) és LOD + 3 % közé eső mért gyakoriságok nem szolgálhatnak alapul a mutációs szint meghatározásánál. Ajánlott ilyen esetekben az alacsony szintű mutációt mutató minták újrafuttatása.

Megjegyzés: Tumoros beteg esetében egy kezelési döntés sosem alapulhat csupán a BRAF mutációs státuszán.

9. táblázat Specifikus mutációk esetén meghatározott LOB és LOD értékek

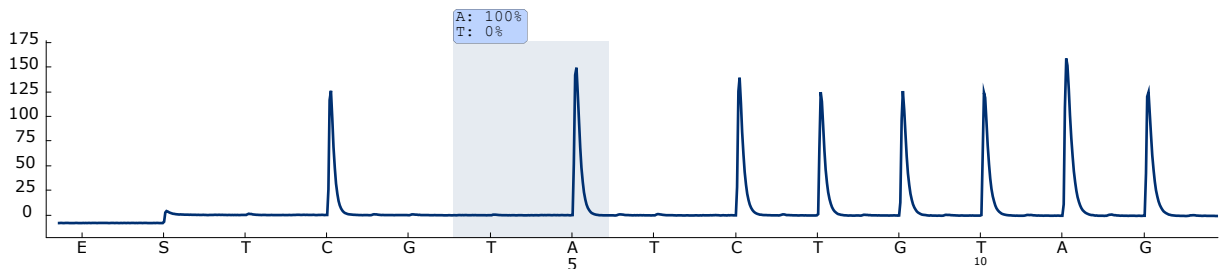
Nukleinsav helyettesítés	Aminosav helyettesítés	LOB (% egység)	LOD (% egység)	COSMIC ID* (V46)
600-as kodon (CTG) reverz orientációban vizsgálva (CAC)				
1799T>A	V600E	0.4	2.4	476
1799T>G	V600G	0.1	2.1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0.2	2.2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0.4	2.4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ekomplex	0.4	2.4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2.3	4.3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0.1	2.1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0.2	2.2	474
469-es kodon (CGA) reverz orientációban vizsgálva (TCC)				
1406G>A	G469E	1.1	3.1	461
1406G>C	G469A	1.2	3.8	460
1406G>T	G469V	1.1	3.1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1.5	3.5	458
466-os kodon (GGA) reverz orientációban vizsgálva (TCC)				
1397G>A	G466E	4.1	8.6	453
1397G>T	G466V	1.3	3.3	451
464-es kodon (GGA) reverz orientációban vizsgálva (TCC)				
1391G>A	G464E	1.3	3.4	449
1391G>T	G464V	0.3	2.3	450

* A "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (Rákban található szomatikus mutációk katalógusa) adatbázisból, amely a Sanger Intézet honlapján érhető el on-line: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

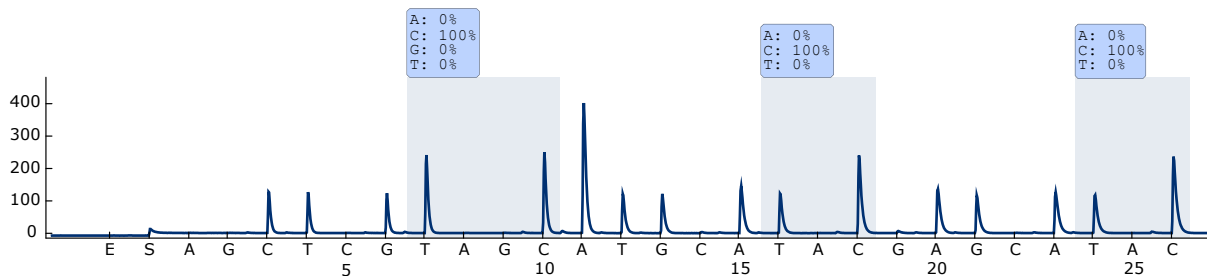
† A legalacsonyabb szintű mutáció, amely a mintában LOD-nél nagyobb mért gyakoriságot eredményez.

Reprezentatív eredmények

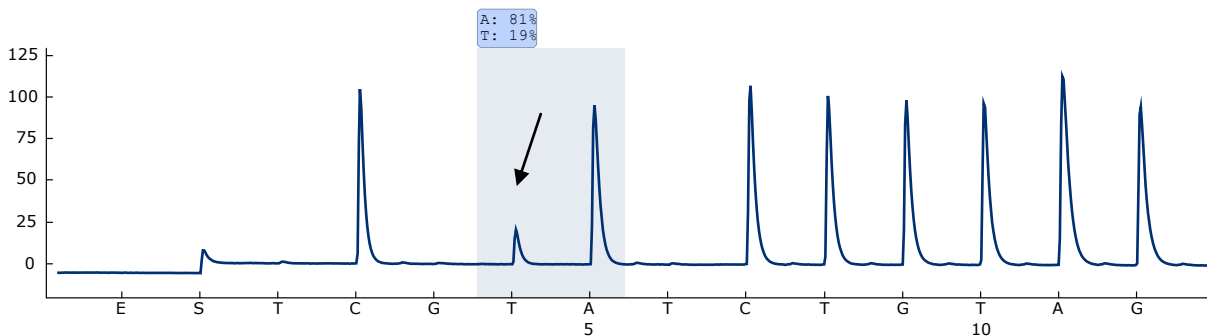
Reprezentatív pirogram eredmények a 8-10. ábrákon láthatók.



8. ábra. Vad típusú genotípus pirogram lenyomata a 600-as kodonnál, a vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) *CWCTGTAGC*.



9. ábra. Vad típusú genotípus pirogram lenyomata a 464-469.es kodonoknál, a vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) *CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA*.



10. ábra. Pirogram lenyomat egy a 600-as kodon 2. nukleotidjában lévő (1799. nukleotid, nyíllal jelölve az ábrán) *GTG → GAG (V600E)* mutációt tartalmazó minta esetén, ahol a vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) *CWCTGTAGC*.

Hibaelhárítási útmutató

Ez a rész segíthet megoldani a felmerülő problémákat. További információkért lásd a Technical Support Center Gyakran Ismételt Kérdések lapját: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN Technical Services kutatói mindig örömmel válaszolnak bármilyen kérdésére, akár információkkal vagy protokollokkal kapcsolatban ezt a kézikönyvet illetően, akár a sample and assay technologies témakörben (elérhetőségeket a hátoldalon talál, vagy látogasson el a: www.qiagen.com-ra).

Megjegyzés: A készülékre vonatkozó általános hibaelhárítást a *PyroMark Q24 Felhasználói Kézikönyvben* talál.

Megjegyzések és javaslatok

Jel detektálása a templát nélküli mintában (negatív kontroll)

- | | |
|------------------------------|---|
| a) Csövek közötti keresztzaj | Egy cső jele detektálható a szomszédos csőben. Kerülje el, hogy nagy jelintenzitású minta kerüljön a templát nélküli minta mellé. |
| b) PCR szennyeződés | Használjon steril, szűrős pipetta hegyet. Tárolja és csomagolja a mintákat, a kontrollokat és az amplitonokat külön a PCR reagensektől. |

Rossz minőségű vagy váratlan szekvenciák

- | | |
|------------------------------|--|
| a) Rossz minőségű genomi DNS | A rossz minőségű genomi DNS okozhatja a PCR sikertelenségét. A PCR minták vizsgálatához használjon elektroforézis technikát (pl.: QIAxcel [®] rendszert, vagy agaróz gélelektroforézist). |
|------------------------------|--|

„Check=Ellenőrzendő” vagy „Failed=Sikertelen” eredmény

- | | |
|---------------------------|--|
| a) Alacsony csúcsmagasság | PCR összemérés- vagy Pyroszekvenálás előtti mintapreparálás során bekövetkező hiba eredményez alacsony csúcsokat.

Végezzen funkció tesztet a szűrő szondákkal és cserélje ki azokat, ha szükséges.

„Check=Ellenőrzendő” figyelmeztetéskor figyelmesen vesse össze a Pyrogram-ot a hisztogrammal, amely jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. Ha a mért csúcs megegyezik a hisztogram oszlop magasságával az eredmény érvényes. Más esetben javasolt újra futtatni a mintát. |
|---------------------------|--|

Megjegyzések és javaslatok

- b) Mutáció nincs meghatározva a vizsgálandó szekvenciában (Sequence to Analyze) Állítsa be a `sequence to analyze-t` a vizsgálati beállításban (lásd A Melléklet, A *therascreen* BRAF Pyro vizsgálat beállítása részben, 46. oldal) és elemezze újra a futást.
- c) Váratlan ritka mutáció „Check=Ellenőrzendő” vagy „Failed=Sikertelen” minőség értékelést okozhat egy nem várt csúcs mintázat. Ez jelezhet egy váratlan mutációt, amelyet nem analizál a beadott vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze). Ezek a minták manuálisan analizálhatóak a PyroMark Q24 Software használatával, a nem várt mutációk figyelembe vételével.
- d) Nagy csúcsmagasság eltérésre vonatkozó figyelmeztetés egy diszpenzációnál A Pyrogram-ot figyelmesen össze kell vetni a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. Ha a mért csúcsok nem egyeznek a hisztogram oszlop magasságával és nem magyarázhatóak ritka mutációkkal, javasolt újra futtatni a mintát.
- e) Nagy csúcsmagasság eltérésre vonatkozó figyelmeztetés a 6. diszpenzációnál a 600-as kodon vizsgálat esetén a **CAYCTGTAGC** vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) esetén A Pyrogram-ot figyelmesen össze kell vetni a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. Abban az esetben, amikor a T6-os diszpenzációnál a háttér érték a várt értéknél alacsonyabb és a további mért csúcsmagasságok megfelelnek a hisztogram oszlopok magasságainak, a “Check=Ellenőrzendő” vagy “Failed=Sikertelen” minőségellenőrzési üzenetek figyelmen kívül hagyhatók.
- f) Nagy csúcsmagasság eltérésre vonatkozó figyelmeztetés a 3. és 4. diszpenzáció esetén a 600-as kodon vizsgálata esetén a **CVCTGTAGC** vizsgálandó szekvenciával (Sequence to Analyze) A Pyrogram-ot figyelmesen össze kell vetni a hisztogrammal, amely egy jobb-klikkel előhívható a Pyrogram ablakból. Abban az esetben, amikor a G3 vagy T4 diszpenzációnál a háttér érték a várt értéknél alacsonyabb és a további mért csúcsmagasságok megfelelnek a hisztogram oszlopok magasságainak, a “Check=Ellenőrzendő” vagy “Failed=Sikertelen” minőségellenőrzési üzenetek figyelmen kívül hagyhatók.

Megjegyzések és javaslatok

- g) A szekvencia kevesebb referencia csúcsot tartalmaz, mint szükséges figyelmeztető üzenet megjelenése a 600-as kodon vizsgálatánál, ha a vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze)
CVCTGTAGC
- Abban az esetben, ha a mért csúcsmagasságok illeszkednek a hisztogram oszlopok magasságához, a "Check=Ellenőrzendő" minőségellenőrzési üzenet figyelmen kívül hagyható.

Magas háttér

- a) A nukleotidok nem megfelelő tárolása
- Tárolja a nukleotidokat 2-8 C° között. A -15 és -25 C° közötti tárolás háttér növekedését okoz.
- b) A minták Pyroszekvenálási analízis előtti túl rövid hűtése
- Hagyja a mintákat a PyroMark Q24 Plate Holder-en szobahőmérsékleten (15-25 C°) 10-15 percig. Ne rövidítse le a hűtési időt.
- c) A cartridge szennyeződése
- Óvatosan tisztítsa a cartridge-ot, a terméklapnak megfelelően. Tárolja a cartridge-ot portól és fénytől védve.

Nincs jel a pozitív kontrollban (metilálatlan kontroll DNS)

- a) Elégtelen enzim vagy szubsztrát mix a csövekben
- Biztosítsa a PyroMark Q24 Cartridge feltöltését a „Tools” menüben található „Pre Run Information”-nak megfelelően.
- b) A reagenseket nem megfelelően tárolta vagy hígította
- Készítse elő a *therascreen* reagenseket az 5. Protokollban leírtak szerint „5. Protokoll: A PyroMark Q24 futtatása”, 27. oldal.
- c) PCR vagy minta preparálási hiba
- PCR összemérés-, PCR készülék programozás- vagy Pyroszekvenálás előtti mintapreparálás során bekövetkező hiba következménye, hogy nincs jel. Végezzen funkció tesztet a szűrő szondákkal a PyroMark Q24 Felhasználói Kézikönyve alapján és cserélje ki azokat, ha szükséges. Ismétlje meg a PCR-t és a Pyroszekvenálási elemzést.

Minőségellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített Minőség Menedzsment Rendszere szerint, a *therascreen* BRAF Pyro Kit minden sarzsát, előre meghatározott specifikáció alapján tesztelik, hogy biztosítsák a mindig egyenletes termék minőséget.

Korlátozások

Bármilyen létrehozott diagnosztikai eredményt, más klinikai vagy laboratóriumi eredmények figyelembevételével együtt kell értelmezni.

A felhasználó felelős az összes laboratóriumban használt folyamat rendszerteljesítményének validálásáért, amelyeket a QIAGEN teljesítmény vizsgálata nem fed le.

Teljesítményjellemzők

Az üres minta határértéke és a detektálás határa

Az üres minta határait (Limit of blank – LOB), illetve a detektálási határokat (Limit of detection – LOD) számos mutációra meghatározták plazmid keverékek segítségével (10. táblázat). Mind a LOB, mind a LOD értékeit a Laboratóriumi Szabványok Intézet (CLSI) EP17-A Irányelve „A detektálási határok és kvantifikálási szabályok meghatározására vonatkozó protokoll; minősített irányelv”-ben leírt ajánlásai alapján határozták meg. Az α és β hibákat (hibás negatív és hibás pozitív) 5%-ra állították. A LOB értékek a vad típusú mintával kapott, mért frekvenciát fejezik ki. A LOD értékek a legalacsonyabb, pozitívnak minősíthető jelet (mért frekvencia) képviselik egy adott mutációra

A 600-as kodon mutációi (GTG → GGG) és (GTG → GCG) és a 464-es kodon mutációi (GGA → GAA)

Ezeknél a mutációknál, az üres mérések vagy konzisztensen közel voltak a 0 % egységhez (n=72), nem Gauss-eloszlást eredményezve vagy az alacsony szintű mutációt hordozó mintáknál az eredmények nem Gauss eloszlást követtek. A LOD értéket ezért más módszerrel határozták meg a CLSI EP17-A Irányelv alapján. A legalacsonyabb jelet, ami a mutáció jelenlétét jelzi (LOD) ezekben a pozíciókban, 2 % egységgel a megfelelő alapvonal fölé állították be, amit az üres minták mérése során a 95-ös percentilis alapján határoztak meg (a mérések 95 %-a ez alá az érték alá esik). Amikor a 10. táblázatban a zárójelben megadott mutációs szintű mintákat vizsgálták, akkor az eredmények 95 %-a (n=72) pozitívnak minősíthető jelet/eredményt adott (\geq LOD).

10. táblázat. A specifikus mutációkra meghatározott LOB és LOD értékek

Nukleinsav helyettesítés	Aminosav helyettesítés	LOB (% egység)	LOD (% egység)	COSMIC ID* (V46)
600-as kodon (GTG) reverz orientációban vizsgálva (CAC)				
1799T>A	V600E	0.4	2.4	476
1799T>G	V600G	0.1	2.1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0.2	2.2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0.4	2.4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ekomplex	0.4	2.4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2.3	4.3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0.1	2.1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0.2	2.2	474
469-es kodon (GGA), reverz orientációban vizsgálva (TCC)				
1406G>A	G469E	1.1	3.1	461
1406G>C	G469A	1.2	3.8	460
1406G>T	G469V	1.1	3.1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1.5	3.5	458
466-os kodon (GGA), reverz orientációban vizsgálva (TCC)				
1397G>A	G466E	4.1	8.6	453
1397G>T	G466V	1.3	3.3	451
464-es kodon (GGA), reverz orientációban vizsgálva (TCC)				
1391G>A	G464E	1.3	3.4	449
1391G>T	G464V	0.3	2.3	450

* A "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (Rákban található szomatikus mutációk katalógusa) adatbázisból, amely a Sanger Intézet honlapján érhető el on-line: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† A legalacsonyabb szintű mutációs szint, amely a mintában LOD-nál nagyobb mért gyakoriságot eredményez.

Megjegyzés: Ezek az értékek olyan futtatásokon alapulnak, ahol a PCR templát, vad típusú és a megfelelő mutációkat hordozó plazmidok keveréke volt.

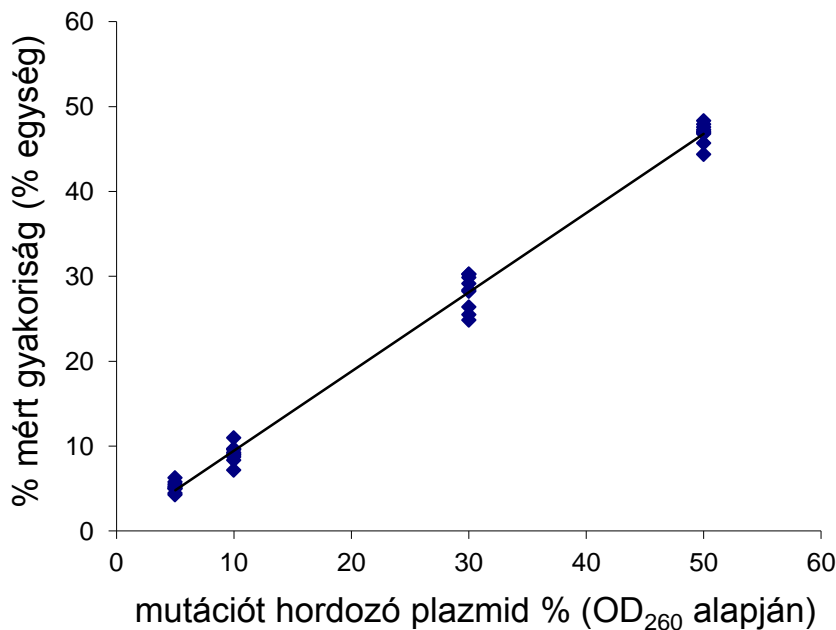
Megjegyzés: Ajánlott a módszer teljesítményének ellenőrzése a laboratóriumban.

Linearitás

A linearitás meghatározásához plazmid keverékeket használtak, amelyek a vad típusú BRAF vagy a 600-as kodon V600E (GTG → GAG) mutációs szekvenciát hordozták. A plazmidokat olyan arányban keverték, amely 4 mutációs szintet (5, 10, 30 és 50%) eredményezett. Minden keveréket 4 különböző sarzsból származó *therascreen* BRAF Pyro Kittel vizsgálták, 3 piroszekvenálót futtatással és 3 ismétlésben (minden mintánál).

Az eredményeket (n=9 minden mutációs szintre) a CLSI EP6-A ajánlásnak megfelelően elemezték (Kvantitatív mérések linearitásának meghatározási módszerei: statisztikai megközelítés, elfogadott vezérfonal) az Analyse-it[®] Software v2.21 segítségével. Az eredmények a 11. ábrán láthatók a 600-as kodon V600E (GTG → GAG) mutációjára

Az eredmények lineárisak (a megengedett 5%-os nem-linearitást figyelembe véve) a vizsgált 5-50%-os mutációs szinteken.



11. ábra. Linearitás a 600-as kodon V600E (GTG → GAG) mutációs vizsgálatára

Precizitás

A precizitási adat lehetővé teszi a vizsgálat teljes variabilitásának meghatározását, melyet 3 különböző szinten határoztak meg a fent említett plazmid keverékek elemzésével, 3 ismétlésben mindegyik esetén.

Az ismételhetőséget (vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti) linearitási adatok alapján határozták meg (3 futtatás ugyanazon a napon, különböző lot

számú *therascreen* BRAF Pyro Kit használatával). Az intermedier precizitást (laboratóriumok közötti variabilitást) laboratóriumonként 3 futtatással, 3 különböző napon, 3 különböző PyroMark Q24 készülékkel és kezelővel és különböző sarzsból származó *therascreen* BRAF Pyro Kittel állapították meg. A reprodukálhatóságot (laboratóriumok közötti variabilitást) 2-2 futtatás alapján egy külső és belső laboratóriumban, különböző sarzsszámú *therascreen* BRAF Pyro Kittel határozták meg.

A precizitás becslését, a mért mutációs frekvenciák standard deviációinak meghatározásával (% egységben megadva) határozták meg (11. táblázat). Az ismételhetőség, köztes precizitás és reprodukálhatóság a 600-as kodon V600E (GTG → GAG) mutációra 0,6-2,1, 0,7-1,8 és 0,8-2,1 % egység volt az 5-50%-os mutációs szint tartományban.

11. táblázat. A 600-as kodon V600E (GTG → GAG) meghatározási precizitása*

Mutált plazmid % †	Ismételhetőség		Intermedier precizitás		Reprodukálhatóság	
	Közép	SD	Közép	SD	Közép	SD
5	5.2	0.6	4.4	0.7	5.1	0.8
10	9.1	1.0	9.6	1.0	9.6	1.3
30	28.1	2.1	27.9	1.8	28.3	2.1
50	46.9	1.2	46.3	1.5	47.9	1.7

* Minden érték % egységben megadva. SD: standard deviáció (n=9).

† OD₂₆₀ mérés alapján.

Diagnosztikai kiértékelés

A *therascreen* BRAF Pyro Kit kiértékelése a Sanger szekvenálás összehasonlításával történt. A DNS izolálás 100 formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) bőr tumor mintából történt, melyeket a 600-as és 464-469-es kodonok mutációinak elemzésével vizsgáltak.

A DNS izolálás a QIAamp DNA FFPE Tissue Kittel történt. A piroszekvenálási elemzést a *therascreen* BRAF Pyro Kittel végezték a PyroMark Q24 rendszeren, míg a Sanger szekvenálást az ABI™ 3130 Genetic Analyzer-rel végezték.

A 100 minta analízise során, a 600-as kodon és a 464-469-es kodonok mutációs státusza 99 esetben került megállapításra Sanger szekvenálással és a *therascreen* BRAF Pyro Kittel (12. és 13. táblázat).

100 mintából 4 esetén a V600E (GTG → GAG) mutációt ki lehetett mutatni a Sanger szekvenálással. A 4 mintából 3 esetén az eredmény megegyezett a

therascreen BRAF Pyro Kittel kapottal, míg 1 esetben a piroszekvenálási elemzés nem sikerült a 600-as kodon esetén, az alacsony piroszekvenálási csúcsok miatt. A 464-469 kodon vizsgálatban megfelelő, bár számottevően kisebb pirogram csúcsok jöttek, mint a többi minta esetén. Ez jelezte, hogy a DNS minősége rossz volt. Egyetlen ritka mutációt sem detektáltak a 464-469-es kodonokban egyik módszerrel sem

Az egy minta kivételével (amely egy vizsgálatban nem adott eredményt), a *therascreen* BRAF Pyro Kit és Sanger szekvenálási eredmények 100%-ban egyeztek (teljes konkordancia) mind a 600-as kodon, mind a 464-469-es kodonok vizsgálatakor (12. és 13. táblázat).

12. táblázat. A 600-as kodon mutációs vizsgálati eredményei bőr tumor minták esetén

		Sanger szekvenálás			
		Mutáns	Vad típus	Ismeretlen	Összes
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutáns	3	0	0	3
	Vad típus	0	96	0	96
	Ismeretlen	1	0	0	1
	Összes	4	96	0	100

13. táblázat. A 464-469-es kodonok mutációs vizsgálati eredményei bőr tumor minták esetén

		Sanger szekvenálás			
		Mutáns	Vad típus	Ismeretlen	Összes
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutáns	0	0	0	0
	Vad típus	0	99	0	99
	Ismeretlen	0	1	0	1
	Összes	0	99	0	100

Megjegyzés: Minden, a teljesítményjellemzők meghatározásához végzett futtatásban, a jel 30 RLU felett volt, jellemzően a formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetekből izolált, piroszekvenáláshoz használt 10 ng DNS templát esetében tapasztaltakhoz. A piroszekvenálási adatok elemzése a BRAF Plug-in Report-tal történt.

Referenciák

A QIAGEN széleskörű, naprakész online adatbázissal rendelkezik a QIAGEN termékeivel kapcsolatos tudományos publikációkról. Az átfogó keresőfunkció által könnyen megtalálja a keresett cikket egy egyszerű kulcsszó beütésével vagy a szűkítő funkció segítségével – applikációra, kutatási területre, címre, stb. vonatkozólag.

A referenciák teljes listájáért kérjük, keresse fel a QIAGEN Referencia Online Adatbázist a www.qiagen.com/RefDB/search.asp címen vagy konzultáljon a QIAGEN Technical Services-vel, vagy a helyi disztribútorával.

Szimbólumok

A következő szimbólumok megjelenhetnek a csomagoláson vagy a címkéken:



<N>

<N> tesztre elegendő reagenst tartalmaz



Eddig felhasználandó



In vitro diagnosztikai orvosi készülék



Katalógus szám



Lot szám



Anyagszám



Összetevők



Tartalmaz



Szám



Nátrium-hidroxid



Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)



Hőmérséklet korlátozás



Gyártó



Nézze meg a használati útmutatót

Kontakt információ

Technikai segítségért illetve további információért kérjük, keresse fel a Technical Support Központot: www.qiagen.com/Support, vagy keresse a QIAGEN Technical Service Osztályt vagy helyi disztribútorát (lásd hátsó oldal vagy www.qiagen.com).

A Melléklet: A *therascreen* BRAF Pyro beállítása

Amennyiben a BRAF Plug-in Report már telepítve van a gépre, akkor előre definiált vizsgálatok (assay setup) állnak rendelkezésre a 600-as, 464-469-es kodonokra, a PyroMark Q24 szoftver böngészőjében (bal oldal), az “Example Files/PyroMark Setups/BRAF” útvonal alatt. Ebben az esetben nem kell a telepítést (további részek) elvégezni. A BRAF Plug-in Report email-en keresztül igényelhető a következő címről: pyro.plugin@qiagen.com.

Kifejezetten ajánlott a BRAF Plug-in Report használata, szemben a manuális módszerrel. Komplex mutációt nem lehet manuálisan hozzáadni az elemzendő szekvenciához (Sequence to Analyze) és azokat csak a Plug-in segítségével lehet elemezni. A plug-in telepítése után, vagy amikor a szoftver újra telepítésre kerül, ellenőrizni kell a BRAF Plug-in helyes működését a “BRAF Plug-in Quick Guide” alapján.

Amennyiben a BRAF Plug-in Report nincsen telepítve, akkor a vizsgálati (assay) fájlt manuálisan kell létrehozni, mielőtt a *therascreen* BRAF Pyro vizsgálatot először futtatnánk. Hozzuk létre a vizsgálati fájlt (assay) a BRAF 600-as, 464-469-es kodonjára a PyroMark Q24 programmal, a következők szerint.

Folyamat

BRAF 600-as kodon

- A1. Kattintson a -ra az eszköztárban és válassza a “New AQ Assay”-t.
- A2. Gépelje be a következő szekvenciát az elemzendő szekvencia helyre, “Sequence to Analyze”.

CWCTGTAGC

Megjegyzés: A 600-as kodon leggyakoribb mutációja a GTG → GAG változás az 1799-es nukleotid pozícióban (második kodon pozíció).

A vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) a futás után is megváltoztatható, más helyen lévő mutációk vizsgálatához.

Az 1798-as pozícióban lévő mutáció meglétének ellenőrzésére változtassuk meg a vizsgálandó szekvenciát (Sequence to Analyze) a következőre.

CAYTGTAGC

További, az 1799-es helyen lévő, ritka mutációk kimutatására, a vizsgálandó szekvenciához (Sequence to Analyze) a **CVCTGTAGC** nukleotid sorrendet is vizsgálni kell.

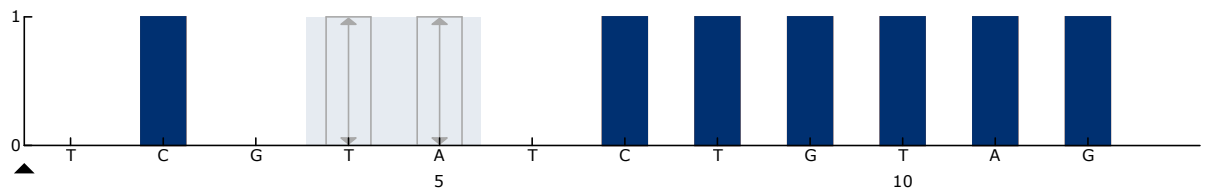
Megjegyzés: Állítsuk az egyszeri csúcs-magasságot (single height peak) 30 RLU-ra.

Megjegyzés: A BRAF 600-as kodon komplex mutációi nem elemezhetők a PyroMark Q24-es program AQ (allél kvantifikálás) és Sequence to Analyze

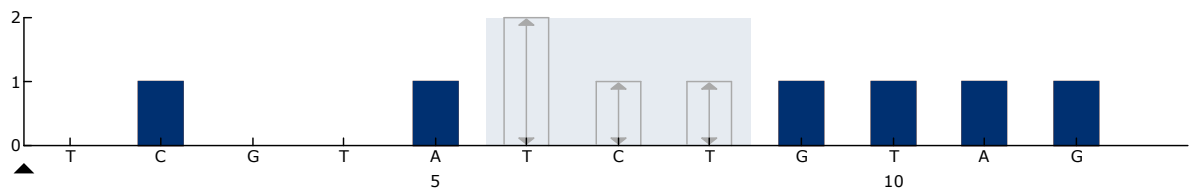
funkciójával. Javasolt a BRAF Plug-in Report használata a 600-as kodon komplex mutációinak vizsgálatához.

A3. Manuálisan vigyük be a következő adagolási sorrendet (Dispensation Order).

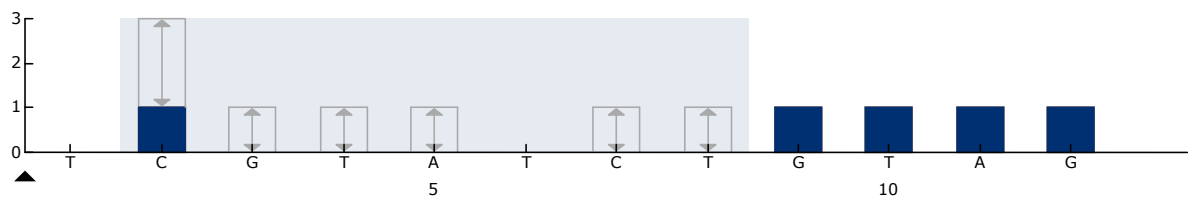
TCGTATCTGTAG



12. ábra. A 600-as kodon hisztogramja (1799-es nukleotid) a CWCTGTAGC vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) esetén.



13. ábra. A 600-as kodon hisztogramja (1798-as nukleotid) a CAYTGTAGC vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) esetén.



14. ábra. A 600-as kodon hisztogramja (1799-es nukleotid) a CVCTGTAGC vizsgálandó szekvencia (Sequence to Analyze) esetén.

- A4. Kattintson az “Analysis Parameters” fülre és növelje a “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” értéket 30-ra. (Szükséges csúcs magasság az elfogadott minőségi értékhez.)**
- A5. Kattintson a -re az eszköztárban, majd mentse el a vizsgálatot (assay) “BRAFCodon 600” néven.**

BRAF 64–469-es kodonok

A1. Kattintson a -ra az eszköztárban és válassza a “New AQ Assay”-t.

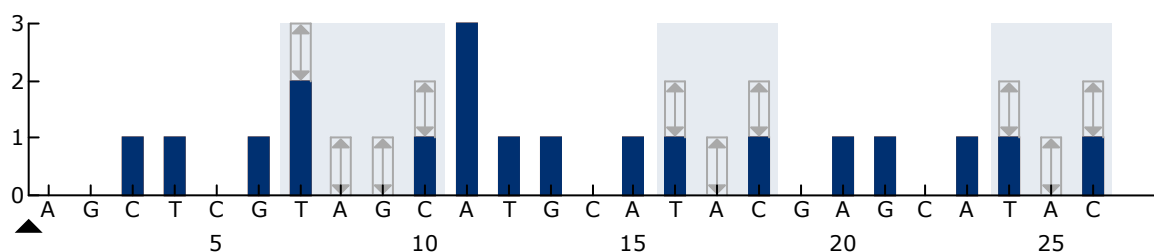
A2. Írja be a vizsgálandó szekvencia helyre (Sequence to Analyze) a következőt.

CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

Megjegyzés: A BRAF 469-es kodon komplex mutációi nem elemezhetők a PyroMark Q24-es program AQ (allél kvantifikálás) és Sequece to Analyze funkciójával. Javasolt a BRAF Plug-in Report használata a 469-es kodon komplex mutációinak vizsgálatához.


A3. Kézzel írjuk be a következő adagolási sorrendet “Dispensation Order”.

AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAC




15. ábra. A 464-469-es kodon (1391-es nukleotid [464-es kodon], 1397-es nukleotid [466-os kodon] és 1406-os nukleotid [469-es kodon] hisztogramja.

A4. Kattintson az “Analysis Parameters” fülre és növelje meg a “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” értéket 30-ra.

A5. Kattintson a -re az eszköztárban és mentse el a vizsgálatot (assay) “*BRAFcodons 464–469*” néven.

B Melléklet: A hulladék tartály és reagens tartók kiürítése

WARNING 	Veszélyes Vegyi Anyagok A vákuum munkaállomásnál használt denaturáló oldat nátrium hidroxid tartalmú, ami szemre és bőrre irritáló hatású. Mindig viseljen biztonsági szemüveget, kesztyűt és köpenyt. A felelős testületnek (pl.: laboratórium menedzser) meg kell tennie a szükséges elővigyázatossági lépéseket, hogy biztosítsa a környező munkahely biztonságosságát és azt, hogy a műszert kezelő személyzet ne legyen kitéve veszélyes szintű toxikus anyagnak (vegyi vagy biológiai), ahogyan azt az Anyagbiztonsági Adatlapon (SDSs), az OSHA*, ACGIH† vagy COSHH‡ dokumentumokban meghatározták. A gázok/gőzök kiszellőzését/eltávolítását és a veszélyes hulladékok elhelyezését a nemzeti, állami és helyi egészségügyi és biztonsági szabályozások és törvények alapján kell megoldani.
---	---

* OSHA: Foglalkozás-Biztonsági és Egészségügyi Apparátus (Amerikai Egyesült Államok)

† ACGIH: Ipari Higiéniai Kormányzat Amerikai Kongresszusa (Amerikai Egyesült Államok)

‡ COSHH: Egészségre Veszélyes Anyagok Kontrollja (Egyesült Királyság)

A laboratóriumi hulladékok elhelyezésével kapcsolatban vegye figyelembe a szövetségi, állami és helyi környezetvédelmi szabályozásokat.

Fontos szempont a kezdés előtt

- A protokoll nagytisztaságú vizet igényel.

Folyamat

- B1. Gondoskodjon róla, hogy a vákuum eszköz ne legyen vákuum alatt. A vákuum legyen kikapcsolva (Off) és a vákuum pumpát is kapcsolja ki.**
- B2. Ürítse ki a műanyag tartályban lévő anyagokat.**
- B3. Öblítse el a tartályokat nagytisztaságú vízzel vagy cserélje ki azokat, ha szükséges.**
- B4. Ürítse ki a hulladéktartályt.**
Megjegyzés: A kupak eltávolítható a cső leválasztása nélkül is.
- B5. Amennyiben a vákuum munkaállomást tisztítani kell (például por vagy folyadék kiömlés miatt), kérjük, kövesse a *PyroMark Q24 kézikönyvében* leírtakat.**

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Kat. szám.
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	For 24 reactions on PyroMark Q24 systems: Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP□S, dCTP, dGTP, dTTP, and H ₂ O	971470
PyroMark Q24 MDx	Sequence based detection platform for Pyrosequencing of 24 samples in parallel	9001513
PyroMark Q24	Sequence based detection platform for Pyrosequencing of 24 samples in parallel	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vacuum Workstation (220 V) for preparing 24 samples in parallel, from PCR product to single-stranded template	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vacuum Workstation (220 V) for preparing 24 samples in parallel, from PCR product to single-stranded template	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Application software	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysis software	9019062
Accessories		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-well sequencing reaction plate	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartridges for dispensing nucleotides and reagents	979302

* Csak az Egyesült Királyságban

† A világ többi részén

Termék	Tartalom	Kat. szám.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Reusable filter probes for PyroMark Vacuum Workstation Q96 and Q24	979010
PyroMark Control Oligo	For installation check of system	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	For performance confirmation of system	979304
Related products		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	For 50 DNA preps: 50 QIAamp MinElute [®] Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	For 48 preps: Reagent Cartridges (Tissue), Disposable Filter-Tips, Disposable Tip-Holders, Sample Tubes (2 ml), Elution Tubes (1.5 ml), Buffer G2, Proteinase K	953034

A legfrissebb licenc információért és termék specifikus jogi nyilatkozatért, kérjük, nézze meg a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvet, vagy használati utasítást. A QIAGEN kit kézikönyvek és használati útmutatók megtalálhatóak a www.qiagen.com címen, lekérhetőek a QIAGEN Technical Service-től vagy a helyi disztribútortól.

Szándékosan üresen hagyva

Szándékosan üresen hagyva

Szándékosan üresen hagyva

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

Az ebben a dokumentumban található regisztrált nevek, védjegyek stb., nem tekinthetők jog által nem védetteknek, még akkor sem, ha ez nem kerül kifejezetten kinyilvánításra.

Felelősség kizárása

Nem használható az endometriózis kialakulás rizikójának meghatározására.

Korlátozott licenz megállapodás

A jelen termék használatával a *therascreen* BRAF Pyro Kit vásárlója vagy felhasználója beleegyezik a következő megállapodásba:

1. A *therascreen* BRAF Pyro Kit csak a *therascreen* BRAF Pyro Kit felhasználói kézikönyvben leírtaknak megfelelően, csak a kitben megtalálható összetevőkkel használható. A QIAGEN nem ad jogot arra, szellemi tulajdonjoga alapján, hogy a kitben nem lévő összetevőket beépítsék vagy használják a kithoz, kivéve, ha azt a *therascreen* BRAF Pyro Kit kézikönyvben, vagy további protokollokban leírták, melyek a www.qiagen.com helyen elérhetők
2. A kifejezetten megjelenített licensen kívül, a QIAGEN nem vállal felelősséget arra, hogy a kit és/vagy annak használata nem sérti harmadik fél jogát.
3. Ez a kit és összetevői egyszeri használatra engedélyezettek, nem használhatók fel újra, nem újíthatók fel vagy nem adhatók el újra.
4. A QIAGEN visszautasít minden más kifejezett vagy arra utaló licenst, amelyet kifejezetten nem nyilvánított ki.
5. A kit megvásárlója vagy felhasználója egyetért azzal, hogy nem egyezik bele és nem ad engedélyt arra senki másnak, hogy olyan lépéseket tegyenek, melyek a fent leírtakhoz vagy a fent megtiltott cselekményhez vezethetnek. A QIAGEN kényszerítheti a Korlátozott licenz megállapodás betartását bármilyen bíróságon és minden nyomozati és jogi költséget, beleértve az ügyvédi költséget is jogában áll megtéríttetni, ha a fenti Korlátozott licenz megállapodás betartásával kapcsolatban lépéseket kell tennie, vagy bármilyen, a kit és/vagy összetevőivel kapcsolatos, szellemi tulajdonjoga sérülne.

A legfrissebb licenz információkat keresse a www.qiagen.com honlapon.

© 2015 QIAGEN, minden jog fenntartva

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

