

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]



Έκδοση 1

IVD

Για in vitro διαγνωστική χρήση



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R2 **MAT** 1075556EL



Τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης της QIAGEN

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιουδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στις αναλύσεις νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	5
Αρχή της διαδικασίας	7
Δείγματα ελέγχου	8
Υλικά που παρέχονται	9
Περιεχόμενα του kit	9
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	12
Πληροφορίες ασφαλείας	13
Γενικές προφυλάξεις	13
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	14
Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων	14
Διαδικασία	14
Απομόνωση DNA	14
Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24	16
Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	19
Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance	22
Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24	24
Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24	29
Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24	32
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	36
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου	36
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	40
Ποιοτικός έλεγχος	43
Περιορισμοί	43
Χαρακτηριστικά απόδοσης	43
Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης	43
Γραμμικότητα	45
Ακρίβεια	47

Διαγνωστική αξιολόγηση	48
Βιβλιογραφία	50
Σύμβολα	51
Πληροφορίες επικοινωνίας	51
Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro53	
Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων	57
Πληροφορίες παραγγελίας	59

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro είναι μια *in vitro* εξέταση ανίχνευσης αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων, η οποία βασίζεται στον προσδιορισμό αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού (Pyrosequencing®), για την ποσοτική ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του ανθρώπινου γονιδίου *KIT* και στο εξόνιο 18 του ανθρώπινου γονιδίου *PDGFRA* σε γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από δείγματα ανθρώπινου ιστού.

Το kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro προσφέρει στους κλινικούς ιατρούς χρήσιμες πληροφορίες για την αντιμετώπιση ασθενών που έχουν διαγνωστεί με όγκο του στρώματος της γαστρεντερικής οδού (gastrointestinal stromal tumor, GIST) οι οποίοι έχουν περισσότερες πιθανότητες να ωφεληθούν από φάρμακα που δρουν πάνω σε οδούς σηματοδότησης, όπως π.χ. η ιματινίμπη. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Για χρήση μόνο σε συνδυασμό με το σύστημα PyroMark® Q24. Τα συστήματα PyroMark Q24 περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

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

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

Το προϊόν αυτό δεν προορίζεται για χρήση με δείγματα από πνευμονικό ιστό.

Σύνοψη και επεξήγηση

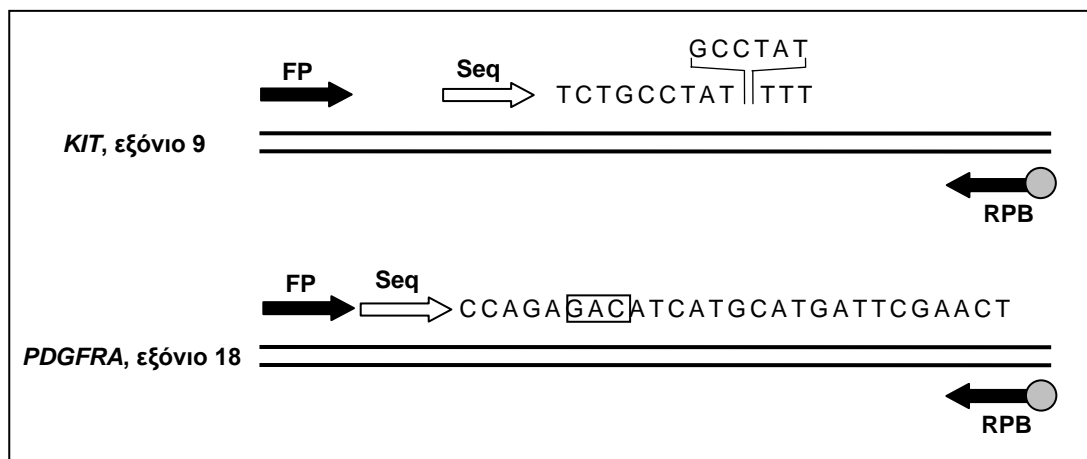
Το kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση των μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *KIT* και στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* (βλ. Εικόνα 1). Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *KIT* επιτρέπει τη χρήση της κατάλληλης δόσης της ιματινίμπης, ενώ η ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* βοηθά στον αποκλεισμό άλλων πιθανών γονοτύπων, λιγότερο ευαίσθητων ή ανθεκτικών (1–3).

<i>KIT</i> , εξόνιο 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
<i>PDGFRA</i> , εξόνιο 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTTCGAACTATGTGTGCAAGGCAGT

Εικόνα 1. Γονιδιωματικό περιβάλλον των αλληλουχημένων περιοχών των γονιδίων *KIT* και *PDGFRA* του ανθρώπου (αρ. Ensembl ID ENSG00000157404 και ENSG00000134853). Το κωδικόνιο 503 του γονιδίου *KIT* και το κωδικόνιο 842 του γονιδίου *PDGFRA* σημειώνονται με πλαίσια.

Το kit περιλαμβάνει δύο αναλύσεις: μία για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *KIT* και μια δεύτερη για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* (βλ. Εικόνα 2). Οι δύο περιοχές ενισχύονται ξεχωριστά με αντίδραση PCR και υποβάλλονται σε αλληλούχηση κατά μήκος ολόκληρης της καθορισμένης περιοχής. Οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις καθορισμένες θέσεις χρησιμοποιούνται ως κορυφές κανονικοποίησης και αναφοράς για την ποσοτικοποίηση και την ποιοτική αξιολόγηση της ανάλυσης.

Σημείωση: Και στις δύο αναλύσεις, η αλληλούχηση γίνεται προς την πρόσθια κατεύθυνση.



Εικόνα 2. Απεικόνιση των αναλύσεων *KIT/PDGFRA*.** Η αλληλουχία που υποδεικνύεται είναι η αναλυθείσα αλληλουχία για ένα δείγμα φυσικού τύπου (wild-type). Φαίνεται η θέση και η αλληλουχία του διπλασιασμού των 6 br στο εξόνιο 9 του *KIT*. Το πλαίσιο υποδεικνύει το κωδικόνιο 842 του εξονίου 18 του *PDGFRA*. **FP:** Πρόσθιοι εκκινητές PCR, **RPB:** Αντίστροφοι εκκινητές PCR (το B συμβολίζει τη βιοτινυλίωση), **Seq:** Εκκινητές αλληλούχησης.

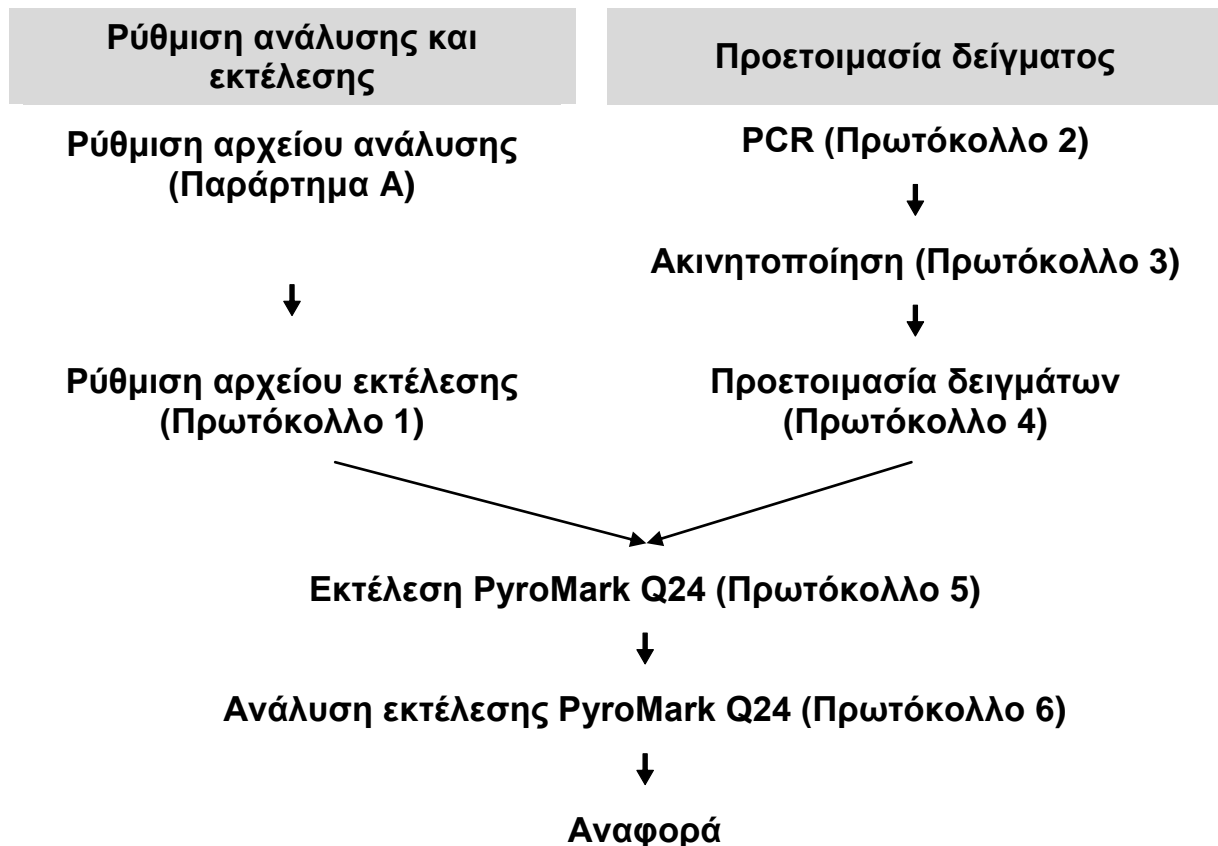
Το προϊόν αποτελείται από μείγμα εκκινητή PCR και εκκινητή αλληλούχησης για κάθε ανάλυση. Οι εκκινητές παρέχονται υπό μορφή διαλύματος. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 32 μl από κάθε εκκινητή ή μείγμα εκκινητών.

Αρχή της διαδικασίας

Στην παρακάτω ροή εργασιών απεικονίζεται η διαδικασία της ανάλυσης. Μετά την PCR με τη χρήση εκκινητών ειδικών για το εξόνιο 9 του *KIT* και για το εξόνιο 18 του *PDGFRA*, τα αμπλικόνια ακινητοποιούνται πάνω σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose® High Performance. Προετοιμάζεται το μονόκλωνο DNA και οι αντίστοιχοι εκκινητές αλληλούχησης υβριδοποιούνται με το DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα PyroMark Q24 με τη βοήθεια αρχείων ρύθμισης ανάλυσης και ενός αρχείου εκτέλεσης.

Συνιστάται η χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report για την ανάλυση της εκτέλεσης. Μπορείτε να προμηθευτείτε το GIST RapidScreen Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com. Ωστόσο, η ανάλυση της εκτέλεσης είναι εφικτή και με τη χρήση του εργαλείου ανάλυσης που περιλαμβάνεται στο σύστημα PyroMark Q24. Μπορείτε να ρυθμίσετε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) για την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων μετά τον κύκλο ανάλυσης (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 32 και «Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* GIST RapidScreen Pyro», σελίδα 53).

Ροή εργασιών της διαδικασίας *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



Δείγματα ελέγχου

Το δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA περιλαμβάνεται στο κιτ ως δείγμα θετικού ελέγχου για τις αντιδράσεις PCR και αλληλούχησης. Αυτό το DANN ελέγχου έχει γονότυπο φυσικού τύπου (wild-type) στις θέσεις που αλληλουχούνται με τη χρήση του κιτ αυτού και είναι απαραίτητο για την ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την αναγνώριση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου (βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων», σελίδα 32). Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού.

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

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

ΚΙΤ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (κουτί 1/2)

Κιτ <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro (24)	(24)
Αρ. καταλόγου	971510
Αριθμός αντιδράσεων	24
Seq Primer KIT exon 9 (Εκκινητής αλληλούχησης εξονίου 9 του KIT)	32 μl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (Εκκινητής αλληλούχησης εξονίου 18 του PDGFRA)	32 μl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (Μείγμα εκκινητών PCR για το εξόνιο 9 του KIT)	32 μl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (Μείγμα εκκινητών PCR για το εξόνιο 18 του PDGFRA)	32 μl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (Κύριο μείγμα PyroMark PCR, 2x)	850 μl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x (Συμπύκνωμα CoralLoad [®] , 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/μl (Δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA, 10 ng/μl)	100 μl

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια *therascreen Pyro* (κουτί 2/2)

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια <i>therascreen Pyro</i>	
PyroMark Binding Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Διάλυμα αποδιάταξης PyroMark)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (Μείγμα ενζύμων)	1 φιαλίδιο
Substrate Mixture (Μείγμα υποστρώματος)	1 φιαλίδιο
dATP α S	1.180 μ l
dCTP	1.180 μ l
dGTP	1.180 μ l
dTTP	1.180 μ l
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (Αγγλικά)	1

* Περιέχει υδροξείδιο του νατρίου.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

Αντιδραστήρια

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. «Απομόνωση DNA», σελίδα 14)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, αρ. κατ. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q® 18,2 ΜΩ x cm ή ισοδύναμο)

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

- Αιθανόλη (70%)*

Αναλώσιμα

- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα για ρύθμιση PCR)
- Πλάκες PCR 24 βυθισμάτων (βλ. «Συνιστώμενες πλάκες 24 βυθισμάτων», σελίδα 12)
- Αυτοκόλλητη μεμβράνη

Εξοπλισμός

- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)[†]
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος[†]
- Θερμοκυκλοποιητής[†] και κατάλληλα σωληνάρια PCR
- PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001513 ή 9001514)^{†‡}
- Λογισμικό PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9019063 ή 9019062)[‡]
- Πλάκα PyroMark Q24 (αρ. κατ. 979201)[‡]
- Φυσίγγιο PyroMark Q24 (αρ. κατ. 979202)[‡]
- Σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001515 ή 9001517)^{†‡}
- Αναδευτήρας πλάκας[†] για ακινητοποίηση σε σφαιρίδια (βλ. «Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας», σελίδα 12)
- Θερμαντικό μπλοκ[†] με δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασίας 80°C

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

[†] Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

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

Συνιστώμενες πλάκες 24 βυθισμάτων

Οι πλάκες 24 βυθισμάτων που αναφέρει ο Πίνακας 1 συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Πίνακας 1. Πλάκες 24 βυθισμάτων που συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αριθμός καταλόγου
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

Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας

Οι αναδευτήρες πλάκας κυκλικής κίνησης που αναφέρει ο Πίνακας 2 συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Πίνακας 2. Αναδευτήρες πλάκας που συνιστώνται για χρήση με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αριθμός καταλόγου
	Thermomixer comfort (βασική συσκευή)	5355 000.011
Eppendorf	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Πλάκα προσαρμογής για 96 x 0,2 ml σωληνάρια PCR για τοποθέτηση σε μπλοκ για πλάκες μικροπιλοδότησης	5363 007.009
	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
H+P Labortechnik GmbH	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Πληροφορίες ασφαλείας

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

Οι παρακάτω δηλώσεις επικινδυνότητας και προφυλάξεων αφορούν τα συστατικά του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro:

PyroMark Denaturation Solution



Προσοχή! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Σκουπίστε τη χυμένη ποσότητα για να προλάβετε υλικές ζημιές. Να διατηρείται μόνο στον αρχικό περιέκτη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.

Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει πάντοτε υπόψη του τα εξής:

- Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήστη είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων, με τρόπο που δεν προβλέπεται από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς κάτι τέτοιο θα οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης.
- Τα συστατικά του προϊόντος αυτού επαρκούν για τη διεξαγωγή 24 αντιδράσεων, σε έως 5 ανεξάρτητες εκτελέσεις.
- Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα, για συστήματα PCR).
- Αποθηκεύστε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δείγματα, θετικούς ορούς ελέγχου και αμπλικόνια) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέστε τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Αποψύχετε πλήρως όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη μιας ανάλυσης.
- Αφού έχουν αποψυχθεί, αναμείξτε τα συστατικά (αναρροφώντας και διοχετεύοντας επανειλημμένα με πιπέτα ή στροβιλίζοντας παλμικά) και φυγοκεντρήστε για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Τα αποτελέσματα των αποτυχημένων αντιδράσεων δεν αποτελούν σωστή βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης.

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro παρέχεται σε δύο κουτιά. Το kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (κουτί 1/2) αποστέλλεται μέσα σε ξηρό πάγο. Το κύριο μείγμα PyroMark PCR, το συμπύκνωμα CoralLoad, το δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA και όλοι οι εκκινητές πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες από -15 έως -30°C μετά την παραλαβή.

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

Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 10 ημέρες στους 2–8°C. Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν στα φιαλίδιά τους στους -15 έως -30°C. Τα κατεψυγμένα αντιδραστήρια δεν πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερους από 6 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

Σημείωση: Τα νουκλεοτίδια δεν πρέπει να καταψύχονται.

Το kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit, εφόσον αποθηκεύεται υπό αυτές τις συνθήκες.

Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων

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

Το υλικό δείγματος είναι ανθρώπινο DNA που εξάγεται από αίμα ή δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (δείγματα FFPE).

Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα από άτομα που υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή με ηπαρίνη. Τα δείγματα αίματος που έχουν συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιέχουν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. Η ηπαρίνη επηρεάζει την PCR.

Διαδικασία

Απομόνωση DNA

Η απόδοση του συστήματος καθορίστηκε με τη βοήθεια του kit EZ1[®] DNA Tissue και του kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue για την εξαγωγή ανθρώπινου DNA από δείγματα όγκου μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Για το σύστημα του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, η απόδοση

καθορίστηκε με τη βοήθεια δειγμάτων αίματος από υγιείς δότες, στα οποία έχουν προστεθεί εν μέρει εξωγενώς κύτταρα όγκου.

Τα κιτ της QIAGEN που αναφέρονται στον Πίνακα 3 έχουν επικυρωθεί για τον καθαρισμό DNA από τους υποδεικνυόμενους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων, για χρήση σε συνδυασμό με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Εκτελέστε τον καθαρισμό DNA ακολουθώντας τις οδηγίες που παρατίθενται στα εγχειρίδια των κιτ.

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

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος	Αριθμός καταλόγου (QIAGEN)
Ιστός εγκλεισμένος σε παραφίνη	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Αίμα	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* Ακολουθήστε το πρωτόκολλο για χρήση με ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη. Το EZ1 DNA Tissue Kit πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το EZ1 Advanced (αρ. κατ. 9001410 ή 9001411) και την κάρτα EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018298), με το EZ1 Advanced XL (αρ. κατ. 9001492) και την κάρτα EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018700), ή με το BioRobot[®] EZ1 (αρ. κατ. 9000705, δεν κυκλοφορεί πλέον) και την κάρτα EZ1 DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9015862).

[†] Με σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την οδηγία 98/79/EK της ΕΕ.

Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24


Σημαντική πληροφορία πριν από την έναρξη


- Αν κριθεί απαραίτητο, το όριο τυφλού (LOB) μπορεί να επιβεβαιωθεί με τη χρήση ενός δείγματος φυσικού τύπου για τη δημιουργία μιας πλήρους πλάκας αποτελεσμάτων. Για λεπτομέρειες, ανατρέξτε στην Οδηγία EP17-A του CLSI, «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» (Πρωτόκολλο για τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού, εγκεκριμένη οδηγία).

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Εάν δεν έχει εγκατασταθεί το GIST RapidScreen Plug-in Report, δημιουργήστε μια ρύθμιση ανάλυσης (Assay Setup) (βλ. «Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* GIST RapidScreen Pyro», σελίδα 53). Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει μία και μοναδική φορά, πριν από την πρώτη εκτέλεση των αναλύσεων *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Εάν έχει εγκατασταθεί το GIST RapidScreen Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες ρυθμίσεις ανάλυσης στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του λογισμικού PyroMark Q24, στη διαδρομή «Example Files/PyroMark Setups/GIST» (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/GIST). Μπορείτε να προμηθευτείτε το GIST RapidScreen Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com.

Διαδικασία

1. **Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων.**
Δημιουργείται ένα νέο αρχείο εκτέλεσης.
2. **Εισαγάγετε τις παραμέτρους της εκτέλεσης (βλ. «Παράμετροι εκτέλεσης», σελίδα 17).**
3. **Προετοιμάστε την πλάκα προσθέτοντας αναλύσεις για το εξόνιο 9 του KIT και για το εξόνιο 18 του PDGFRA σε βυθίσματα που αντιστοιχούν στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν.**
Σημείωση: Πρέπει να περιλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου (χωρίς μήτρα DNA) για μία τουλάχιστον ανάλυση σε κάθε προετοιμασία PCR.
Σημείωση: Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Δείγματα ελέγχου», σελίδα 8).
4. **Όταν η ανάλυση έχει ρυθμιστεί και είναι έτοιμη να εκτελεστεί στο σύστημα PyroMark Q24, εκτυπώστε μια λίστα με τους απαιτούμενες όγκους μείγματος ενζύμων, μείγματος υποστρώματος και**

νουκλεοτιδίων, καθώς και την καρτέλα με τη διάταξη της πλάκας. Επιλέξτε «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) στο μενού «Tools» (Εργαλεία) και, όταν εμφανιστεί η αναφορά, κάντε κλικ στο .

5. Κλείστε το αρχείο εκτέλεσης και αντιγράψτε το σε ένα USB stick (παρέχεται μαζί με το σύστημα) με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows® Explorer.

Οι εκτυπωμένες Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο για την προετοιμασία του δείγματος (βλ. «Πρωτόκολλο 3: Ακινητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance», σελίδα 22).

Για την ανάλυση της πλάκας στο σύστημα PyroMark Q24, βλ. «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 29.

Παράμετροι εκτέλεσης

Run name (Όνομα εκτέλεσης):	Το όνομα της εκτέλεσης παρέχεται κατά την αποθήκευση του αρχείου. Εάν αλλάξετε το όνομα του αρχείου, θα αλλάξει και το όνομα της εκτέλεσης.
Instrument method (Μέθοδος οργάνου):	Επιλέξτε τη μέθοδο οργάνου ανάλογα με το φυσίγγιο που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση. Ανατρέξτε στις οδηγίες που συνοδεύουν τα προϊόντα.
Plate ID (Αναγνωριστικό πλάκας):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε το αναγνωριστικό της πλάκας PyroMark Q24.
Bar code (Γραμμωτός κώδικας):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε τον γραμμωτό κώδικα για την πλάκα ή, αν υπάρχει συνδεδεμένη συσκευή ανάγνωσης γραμμωτού κώδικα στον υπολογιστή σας, τοποθετήστε τον δρομέα του ποντικιού στο πλαίσιο κειμένου «Barcode» (Γραμμωτός κώδικας) (κάνοντας κλικ στο πλαίσιο) και σαρώστε τον γραμμωτό κώδικα.
Kit and Reagent ID (Αναγνωριστικό κιτ και αντιδραστηρίου):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε τον αριθμό παρτίδας του κουτιού 1 και του κουτιού 2 του κιτ <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro που θα χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός παρτίδας αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος. Σημείωση: Σας συνιστούμε να συμπληρώνετε και τους δύο αριθμούς παρτίδας ώστε να είναι δυνατή η ιχνηλάτηση τυχόν απροσδόκητων προβλημάτων με το κιτ <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro.
Run note (Σημείωση εκτέλεσης):	Προαιρετικά: Εισαγάγετε μία σημείωση σχετικά με τα συστατικά ή τον σκοπό της εκτέλεσης.

Προσθήκη αρχείων ανάλυσης

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

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

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

Εισαγωγή αναγνωριστικών δειγμάτων και σημειώσεων

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

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

Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Το πρωτόκολλο αυτό συνίσταται στην ενίσχυση μέσω PCR μιας περιοχής που περιλαμβάνει το εξόνιο 9 του *KIT* και στη χωριστή ενίσχυση μέσω PCR μιας περιοχής που περιλαμβάνει το εξόνιο 18 του *PDGFRA*, με χρήση του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

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

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

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

Διαδικασία

1. Αποφύξτε όλα τα απαιτούμενα συστατικά (βλ. Πίνακα 4).

Αναμείξτε τα καλά πριν από τη χρήση.

2. Προετοιμάστε ένα μείγμα αντίδρασης για κάθε σετ εκκινητή PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 4.

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

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

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

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση
Κύριο μείγμα PyroMark PCR, 2x	12,5 μl
Συμπύκνωμα CoralLoad, 10x	2,5 μl
Εκκινητής PCR για το εξόνιο 9 του KIT ή Εκκινητής PCR για το εξόνιο 18 του PDGFRA	1 μl
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	4 μl
Συνολικός όγκος	20 μl

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

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

4. Προσθέστε 5 μl μήτρας DNA (2–10 ng γονιδιωματικού DNA) στα μεμονωμένα σωληνάρια PCR (Πίνακας 5) και αναμείξτε προσεκτικά.

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

Σημείωση: Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Δείγματα ελέγχου», σελίδα 8).

Πίνακας 5. Προετοιμασία της PCR

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

5. Προγραμματίστε τον θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο κυκλοποίησης

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

6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια PCR στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης.
7. Μετά την ενίσχυση, προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 3: Ακινητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance», σελίδα 22.
Τα δείγματα PCR μπορούν να φυλαχθούν στους 2–8°C μέχρι και για 3 ημέρες.

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

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

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Αφήστε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και διαλύματα να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία.
- Ενεργοποιήστε το σύστημα PyroMark Q24 τουλάχιστον 30 λεπτά προτού ξεκινήσει η εκτέλεση αναλύσεων. Ο διακόπτης λειτουργίας βρίσκεται στην πίσω πλευρά του οργάνου.
- Τοποθετήστε έναν συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμαντικό μπλοκ που έχει προθερμανθεί στους 80°C. Αφήστε έναν δεύτερο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).
- Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark παρέχεται υπό μορφή συμπυκνώματος 10x. Πριν από την πρώτη χρήση, αραιώστε το σε διάλυμα εργασίας 1x προσθέτοντας 225 ml νερού υψηλής καθαρότητας σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης PyroMark 10x (τελικός όγκος 250 ml).

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

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

Διαδικασία

1. **Ανακινήστε ελαφρώς τη φιάλη που περιέχει Streptavidin Sepharose High Performance μέχρι να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.**
2. **Παρασκευάστε το κύριο μείγμα για την ακίνητοποίηση του DNA σύμφωνα με τον Πίνακα 7.**

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

Πίνακας 7. Κύριο μείγμα για ακινητοποίηση του DNA

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

Σημείωση: Αυτό το πρωτόκολλο αφορά σε υλικό Streptavidin Sepharose High Performance με αριθμό παρτίδας 10057037 ή μεγαλύτερο. Όταν χρησιμοποιούνται σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance με αριθμό παρτίδας μικρότερο από 10057037, τότε ο όγκος των σφαιριδίων ανά δείγμα πρέπει να αυξηθεί στα 2 μl, με αντίστοιχη μείωση του όγκου του νερού.

- 3. Προσθέστε 70 μl του κύριου μείγματος στα βυθίσματα μιας πλάκας PCR 24 βυθισμάτων, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16).**

Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα ή παλμικό στροβιλισμό για να εξασφαλίσετε την ομοιογένεια του κύριου μείγματος. Μη φυγοκεντρήσετε το κύριο μείγμα.

- 4. Προσθέστε 10 μl βιοτινυλιωμένου προϊόντος PCR από το Πρωτόκολλο 2 σε κάθε βύθισμα που περιέχει κύριο μείγμα, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro», σελίδα 19).**

Ο συνολικός όγκος ανά βύθισμα πρέπει να ανέρχεται σε 80 μl μετά την προσθήκη του κύριου μείγματος και του προϊόντος PCR.

- 5. Σφραγίστε την πλάκα PCR με αυτοκόλλητη μεμβράνη.**
Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει κίνδυνος διαρροής μεταξύ των βυθισμάτων.
- 6. Αναδεύστε την πλάκα PCR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για 5–10 λεπτά στις 1.400 σ.α.λ.**

Κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, προχωρήστε αμέσως στο «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24», σελίδα 24.

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

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

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάρια με τους εκκινητές αλληλούχησης, φυγοκεντρήστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσθέστε τους 2 διαφορετικούς εκκινητές αλληλούχησης με τον ίδιο τρόπο όπως προκαθορίστηκε για την πλάκα κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16), ανάλογα με την περιοχή της ανάλυσης (εξόνιο 9 του *KIT* ή εξόνιο 18 του *PDGFRA*).
- Μην ελαττώνετε τον χρόνο ψύξης των δειγμάτων μετά τη θέρμανση στους 80°C.
- Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται.

Διαδικασία

- 1. Αραιώστε επαρκή ποσότητα κάθε εκκινητή αλληλούχησης (εκκινητή αλληλούχησης εξονίου 9 του *KIT* και εκκινητή αλληλούχησης εξονίου 18 του *PDGFRA*) σε ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης PyroMark, όπως αναφέρεται στον Πίνακα 8.**

Προετοιμάστε μεγαλύτερη ποσότητα αραιωμένου εκκινητή αλληλούχησης από ό,τι απαιτείται για τον συνολικό αριθμό δειγμάτων που πρόκειται να υποβληθούν σε αλληλούχηση (για τον αριθμό των δειγμάτων + ένα επιπλέον).

Μην αραιώσετε και φυλάξετε μεγαλύτερη ποσότητα εκκινητή αλληλούχησης.

Πίνακας 8. Παράδειγμα αραιώσης των εκκινητών αλληλούχησης

Συστατικό	Όγκος/δείγμα	Όγκος για 9 + 1 αντιδράσεις
PyroMark Annealing Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης PyroMark)	24,2 μl	242 μl
Seq Primer KIT exon 9 (Εκκινητής αλληλούχησης εξονίου 9 του KIT) ή Seq Primer PDGFRA exon 18 (Εκκινητής αλληλούχησης εξονίου 18 του PDGFRA)	0,8 μl	8 μl
Συνολικός όγκος	25 μl	250 μl

- 2. Προσθέστε 25 μl από τον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχησης σε κάθε βύθισμα της πλάκας PyroMark Q24, σύμφωνα με τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16).**

Διατηρήστε έναν από τους συγκρατητήρες της πλάκας PyroMark Q24 (παρέχεται μαζί με το σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) και χρησιμοποιήστε τον ως στήριγμα κατά την προετοιμασία και τη μετακίνηση της πλάκας.

- 3. Ενεργοποιήστε την αντλία κενού του σταθμού εργασίας υπό κενό PyroMark Q24.**

- 4. Τοποθετήστε την πλάκα PCR από το Πρωτόκολλο 3 και την πλάκα PyroMark Q24 στον σταθμό εργασίας υπό κενό (Εικόνα 3).**

Επιθεωρήστε την πλάκα PCR και βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια σεφαρόζης βρίσκονται σε διάλυση. Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα PCR έχει τον ίδιο προσανατολισμό όπως και κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.



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

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

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

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

7. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 40 ml αιθανόλης 70% (λεκανίδιο 1, Εικόνα 3). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 40 ml διαλύματος αποδιάταξης (λεκανίδιο 2, Εικόνα 3). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
9. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (λεκανίδιο 3, Εικόνα 3). Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με φίλτρο για 10 δευτερόλεπτα.
10. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 4).



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

11. Για όσο διάστημα το εργαλείο κενού βρίσκεται πάνω από την πλάκα PyroMark Q24, απενεργοποιήστε τον διακόπτη κενού του εργαλείου (Off).
12. Ελευθερώστε τα σφαιρίδια μέσα στην πλάκα PyroMark Q24, χαμηλώνοντας τους δειγματολήπτες με φίλτρο μέσα στον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχησης και μετακινώντας το εργαλείο κενού με απαλές πλευρικές κινήσεις.
Φροντίστε να μη χαράξετε την επιφάνεια της πλάκας PyroMark Q24 με τους δειγματολήπτες.
13. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει νερό υψηλής καθαρότητας (λεκανίδιο 4, Εικόνα 3) και ανακινήστε το για 10 δευτερόλεπτα.
14. Καθαρίστε τους δειγματολήπτες με φίλτρο βυθίζοντάς τους στο νερό υψηλής καθαρότητας (λεκανίδιο 5, Εικόνα 3) και εφαρμόζοντας κενό. Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με 70 ml νερού υψηλής καθαρότητας.
15. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 4).
16. Απενεργοποιήστε το διακόπτη κενού του εργαλείου (Off) και τοποθετήστε το εργαλείο κενού στη μόνιμη θέση (P).
17. Απενεργοποιήστε την αντλία κενού.
Στο τέλος της εργάσιμης ημέρας, τα υγρά απόβλητα και τα υπολείμματα διαλυμάτων θα πρέπει να απορριφθούν και ο σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 να ελεγχθεί για τυχόν σκόνη και διαρροές.
Βλ. «Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων», σελίδα 57.
18. Θερμάνετε την πλάκα PyroMark Q24 με τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας τον προθερμασμένο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24.

19. Αφαιρέστε την πλάκα PyroMark Q24 από τον θερμό συγκρατητήρα και τοποθετήστε τη σε έναν δεύτερο συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 ο οποίος είχε παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), όπου θα αφήσετε τα δείγματα να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου επί 10–15 λεπτά.
20. Προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 29.

Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24

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

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Η αναφορά Πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, που βρίσκεται στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16), παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους όγκους των νουκλεοτιδίων, των ενζύμων και του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος που απαιτούνται για μια συγκεκριμένη εκτέλεση ανάλυσης.
- Χρησιμοποιήστε ρύγχη μίας χρήσης χωρίς υδρόφοβα φίλτρα για τη φόρτωση του φυσιγγίου, ώστε να εξασφαλιστεί η ορθή λειτουργία του φυσιγγίου.

Διαδικασία

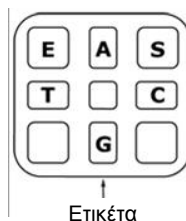
1. Διαλύστε το καθένα από τα μείγματα λυοφιλιωμένων ενζύμων και υποστρώματος σε 620 μl νερού (H₂O, παρέχεται).
2. Αναμείξτε περιστρέφοντας προσεκτικά το φιαλίδιο.

Μη στροβιλίζετε!

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

3. Αφήστε τα αντιδραστήρια και το φυσίγγιο PyroMark Q24 να περιέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20–25°C).
4. Τοποθετήστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με την ετικέτα στραμμένη προς το μέρος σας.
5. Γεμίστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με τον απαιτούμενο όγκο μειγμάτων νουκλεοτιδίων, ενζύμων και υποστρώματος σύμφωνα με την Εικόνα 5.

Βεβαιωθείτε ότι δεν μεταφέρονται φυσαλίδες αέρα από την πιπέτα στο φυσίγγιο.



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

6. **Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και εισαγάγετε το γεμάτο φυσιγγίο αντιδραστηρίου με την ετικέτα προς τα έξω. Πιέστε το φυσιγγίο εντελώς προς τα μέσα και, στη συνέχεια, πιέστε το προς τα κάτω.**
7. **Βεβαιωθείτε ότι η γραμμή είναι ορατή μπροστά από το φυσιγγίο και κλείστε το διάφραγμα.**
8. **Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και τοποθετήστε την πλάκα στο θερμαντικό μπλοκ.**
9. **Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.**
10. **Εισαγάγετε το USB stick (που περιέχει το αρχείο εκτέλεσης) στη θύρα USB στο μπροστινό μέρος του οργάνου.**
Μην αφαιρέσετε το USB stick πριν ολοκληρωθεί η εκτέλεση.
11. **Επιλέξτε «Run» (Εκτέλεση) στο κύριο μενού (χρησιμοποιώντας τα κουμπιά ▲ και ▼ στην οθόνη) και πατήστε «OK».**
12. **Επιλέξτε το αρχείο εκτέλεσης χρησιμοποιώντας τα κουμπιά ▲ και ▼ στην οθόνη.**
Για να προβάλετε τα περιεχόμενα ενός φακέλου, επιλέξτε τον φάκελο και πατήστε «Select» (Επιλογή). Για να επιστρέψετε στην προηγούμενη προβολή, πατήστε «Back» (Πίσω).
13. **Όταν έχει επιλεγεί το αρχείο κύκλου, πατήστε «Select» (Επιλογή), για να ξεκινήσει η εκτέλεση.**
14. **Όταν ολοκληρωθεί η εκτέλεση και το όργανο επιβεβαιώσει ότι το αρχείο εκτέλεσης έχει αποθηκευτεί στο USB stick, πατήστε «Close» (Κλείσιμο).**
15. **Αφαιρέστε το USB stick.**
16. **Ανοίξτε το καπάκι του οργάνου.**
17. **Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και αφαιρέστε το φυσιγγίο αντιδραστηρίων ανασηκώνοντάς το και τραβώντας το προς τα έξω.**
18. **Κλείστε το διάφραγμα.**

- 19. Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και αφαιρέστε την πλάκα από το θερμαντικό μπλοκ.**
- 20. Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.**
- 21. Απορρίψτε την πλάκα και καθαρίστε το φυσίγγιο σύμφωνα με τις οδηγίες στο δελτίο προϊόντος που συνοδεύει το φυσίγγιο.**
- 22. Αναλύστε την εκτέλεση σύμφωνα με το «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 32.**

Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την ανάλυση μεταλλάξεων σε μια ολοκληρωμένη εκτέλεση GIST RapidScreen με τη βοήθεια του λογισμικού PyroMark Q24.

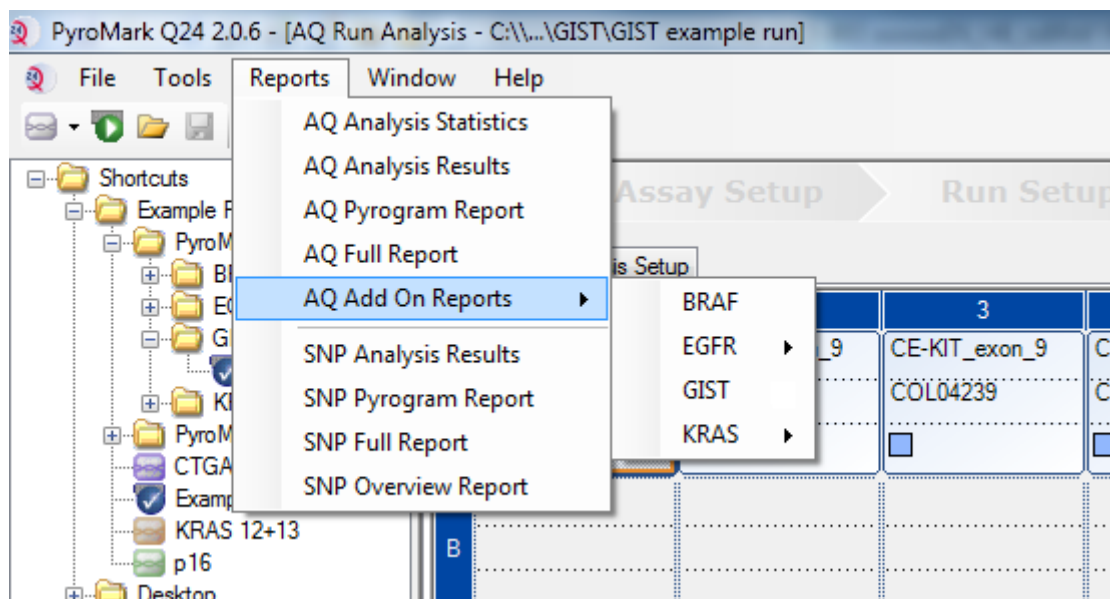
Διαδικασία

1. Εισαγάγετε στη θύρα USB του υπολογιστή το USB stick που περιέχει το αρχείο του διεξαχθέντος κύκλου.
2. Μεταφέρετε το αρχείο εκτέλεσης από το USB stick στην επιθυμητή θέση στον υπολογιστή με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows Explorer.
3. Ανοίξτε το αρχείο εκτέλεσης στον τρόπο λειτουργίας AQ του λογισμικού PyroMark Q24, είτε επιλέγοντας «Open» (Άνοιγμα) στο μενού «File» (Αρχείο) είτε με διπλό κλικ στο αρχείο (📁) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων.
4. Υπάρχουν 2 μέθοδοι ανάλυσης της εκτέλεσης. Εάν χρησιμοποιείτε το GIST RapidScreen Plug-in Report, προχωρήστε στο βήμα 5. Εάν χρησιμοποιείτε την ανάλυση AQ που περιλαμβάνεται στο λογισμικό PyroMark Q24, προχωρήστε στο βήμα 6.

Σημείωση: Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report για την τεκμηρίωση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μπορείτε να προμηθευτείτε το GIST RapidScreen Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com. Η αναφορά αυτή διασφαλίζει ότι έχουν χρησιμοποιηθεί οι αντίστοιχες τιμές LOD (Πίνακας 9) και διαφορετική αλληλουχία προς ανάλυση («Sequence to Analyze») για την αυτόματη ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων.

Σημείωση: Δεν είναι δυνατή η ανάλυση δύο σύνθετων μεταλλάξεων στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* (2526_2538>G και 2524_2526 GAC>TAT) με χρήση της ανάλυσης AQ του λογισμικού PyroMark Q24. Συνιστούμε τη χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report για την ανάλυση σύνθετων μεταλλάξεων στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*.

5. Χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report:
Για να δημιουργήσετε μια αναφορά, επιλέξτε «AQ Add On Reports/ GIST» (Αναφορές προσθέτου AQ/GIST) από το «Reports» (Αναφορές) στο μενού (βλ. Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Μενού GIST RapidScreen Plug-in Report.

Τα βυθίσματα θα αναλυθούν αυτόματα για όλες τις μεταλλάξεις για τις οποίες το όριο LOD παρέχεται στον Πίνακα 9. Τα αποτελέσματα θα προβληθούν σε συνοπτικό πίνακα (βλ. Εικόνα 7), ακολουθούμενα από τα λεπτομερή αποτελέσματα, στα οποία περιλαμβάνονται τα διαγράμματα αλληλούχησης με πυροφωσφορικό (Pyrogram) και η ποιότητα ανάλυσης.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Εικόνα 7. GIST RapidScreen Plug-in Report.

6. Χρήση της ανάλυσης AQ:

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



Ανάλυση όλων των βυθισμάτων.



Ανάλυση του επιλεγμένου βυθίσματος.

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

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

Σημείωση: Για αξιόπιστα αποτελέσματα, συνιστώνται ύψη μονής κορυφής άνω των 30 RLU. Ρυθμίστε την τιμή 30 RLU ως «required peak height for passed quality» (απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα) στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. «Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων theascreen GIST RapidScreen Pyro» και *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*).

Σημείωση: Η αναφορά αποτελεσμάτων ανάλυσης AQ (AQ Analysis Results) πρέπει να χρησιμοποιείται για την τεκμηρίωση και την ερμηνεία της ποσοτικοποίησης αλληλόμορφων. Οι αριθμοί που φαίνονται στο Pyrogram είναι στρογγυλοποιημένοι και δεν αντιπροσωπεύουν με ακρίβεια την ποσοτικοποίηση.

Σημείωση: Το Pyrogram θα πρέπει να αντιπαραβάλλεται πάντοτε με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Οι μετρηθείσες κορυφές πρέπει να συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος.

Επαναληπτική ανάλυση δειγμάτων χωρίς ανίχνευση μετάλλαξης με τυπική ρύθμιση «Sequence to analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) ή με ποιοτική αξιολόγηση «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία).

Η τυπική αλληλουχία «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση), όπως αυτή ορίζεται στη ρύθμιση ανάλυσης, εξετάζει τον διπλασιασμό των 6 bp στο εξόνιο 9 του *KIT* και την πιο συχνή σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 842 (GAC>GTC) του εξονίου 18 του *PDGFRA* (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 53). Αν ένα δείγμα περιλαμβάνει μια λιγότερο συχνή μετάλλαξη στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*, η ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να αναλυθεί και η μεταλλακτική κατάσταση της θέσης αυτής, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα A.

Δεν είναι δυνατή η ανάλυση δύο σύνθετων μεταλλάξεων στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* (2526_2538>G και 2524_2526 GAC>TAT) με χρήση της ανάλυσης AQ του λογισμικού PyroMark Q24. Συνιστούμε τη χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report για την ανάλυση σύνθετων μεταλλάξεων στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*.

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

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

Ενημερωμένες συχνότητες μεταλλάξεων στα ανθρώπινα γονίδια *KIT/PDGFR*A παρέχονται στο Διαδίκτυο από το Ινστιτούτο Sanger, στη διεύθυνση www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Σημείωση: Αφού αλλάξετε την παράμετρο «Sequence to Analyze», βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU.

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

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

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου

Συνιστάται ιδιαίτερα να συμπεριλαμβάνεται μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου σε κάθε εκτέλεση αλληλούχησης, για σκοπούς σύγκρισης και ως δείγμα ελέγχου των επιπέδων υποβάθρου. Η μετρούμενη συχνότητα του δείγματος ελέγχου θα πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από το όριο τυφλού (LOB). Οι τιμές LOB (όριο τυφλού) και LOD (όριο ανίχνευσης) που δίνονται στα εγχειρίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν προσδιορίζεται η παρουσία μιας μετάλλαξης. Αυτές οι τιμές υπολογίστηκαν με χρήση μιγμάτων πλασμιδίων που έφεραν την αλληλουχία φυσικού τύπου ή την αντίστοιχη μεταλλαγμένη αλληλουχία.

Μετά από ανάλυση με το λογισμικό PyroMark Q24 ή τις αναφορές Plug-in Reports, μπορούν να ληφθούν 3 πιθανά αποτελέσματα.

- Συχνότητα μετάλλαξης < LOD: Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
- Συχνότητα μετάλλαξης > LOD + 3 εκατοστιαίες μονάδες: Μετάλλαξη
- Συχνότητα μετάλλαξης \geq LOD και \leq LOD + 3 εκατοστιαίες μονάδες: Πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου
Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείτε το GIST RapidScreen Plug-in Report (βλ. βήμα 5 στο «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 32) και προκύψει αυτό, θα εμφανιστεί μια προειδοποίηση.

Η κλίμακα από το LOD έως το LOD + 3 εκατοστιαίες μονάδες επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου με υψηλή ευαισθησία υπό ιδανικές συνθήκες. Εάν μετρηθεί συχνότητα μεγαλύτερη από το LOB στο μη μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, τότε το επίπεδο του υποβάθρου στην αντίστοιχη εκτέλεση αλληλούχησης είναι υψηλότερο από το συνηθισμένο και άρα ενδέχεται να επηρεαστεί η ποσοτική εκτίμηση των αλληλόμορφων, ιδίως για μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που συνοδεύονται από την προειδοποίηση «Potential low level mutation» (Πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου) πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά.

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

Η παρουσία αυξημένου υποβάθρου για μια μετάλλαξη μπορεί να διαπιστωθεί με σύγκριση των τιμών LOB που αναφέρονται στο εγχειρίδιο με τις μετρήσεις που λαμβάνονται με το μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου. Τα δείγματα με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου θα πρέπει να

χαρακτηριστούν «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) χωρίς να εκτελεστεί επανάληψη εάν η συχνότητα που μετρήθηκε με το μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου είναι υψηλότερη από την τιμή LOB που δίνεται στο εγχειρίδιο για την αντίστοιχη μετάλλαξη. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση που αναφέρεται πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου υπάρχουν 3 διαφορετικά ενδεχόμενα.

1. Συχνότητα μέτρησης με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου > LOB για αυτή τη μετάλλαξη: Το δείγμα μπορεί να χαρακτηριστεί «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) χωρίς επανάληψη.
2. Δεν λαμβάνεται το ίδιο αποτέλεσμα κατά την επανάληψη: Χαρακτηρίστε το δείγμα «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη).
3. Η επανάληψη δίνει το ίδιο αποτέλεσμα και το δείγμα φυσικού τύπου έχει τιμή < LOB για την αντίστοιχη μετάλλαξη: Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη.

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

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

Σημείωση: Οι αποφάσεις σχετικά με τη θεραπευτική αγωγή των ασθενών με καρκίνο δεν θα πρέπει να στηρίζονται αποκλειστικά στην κατάσταση μετάλλαξης του εξονίου 9 του *KIT* και του εξονίου 18 του *PDGFRA*.

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

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LoB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (v58)
<i>KIT</i>, εξόνιο 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<i>PDGFRA</i>, εξόνιο 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 ή [‡]	D842_H845del ή [‡]	2,2	5,2	737 ή [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

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

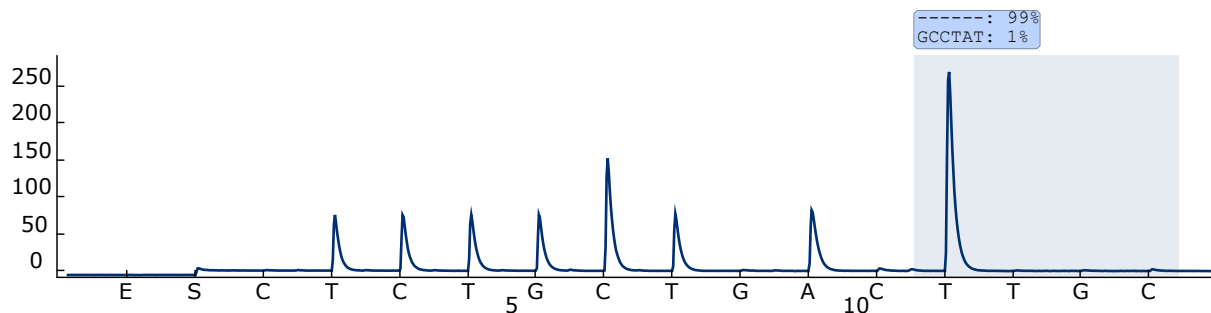
[†] Οι μεταλλάξεις 2524G>T και 2524_2526GAC>TAT, και οι μεταλλάξεις 2526_2537del12 και 2527_2538del12 οδηγούν στις ίδιες αμινοξικές αλλαγές αντιστοίχως.

[‡] Οι μεταλλάξεις 2524_2535del12 και 2526_2537del12 οδηγούν στην ίδια νουκλεοτιδική αλλαγή.

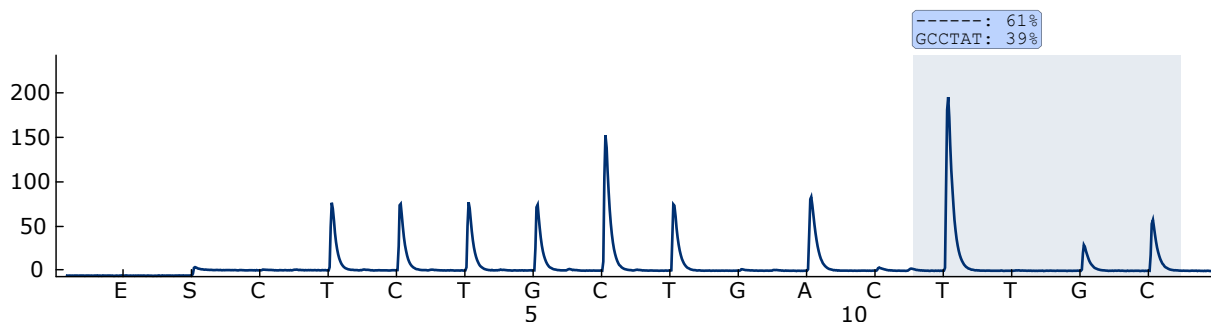
[§] Δεν είναι δυνατή η ανάλυση των μεταλλάξεων 2526_2538>G και 2524_2526GAC>TAT στη λειτουργία AQ του λογισμικού PyroMark Q24.

Ενδεικτικά αποτελέσματα

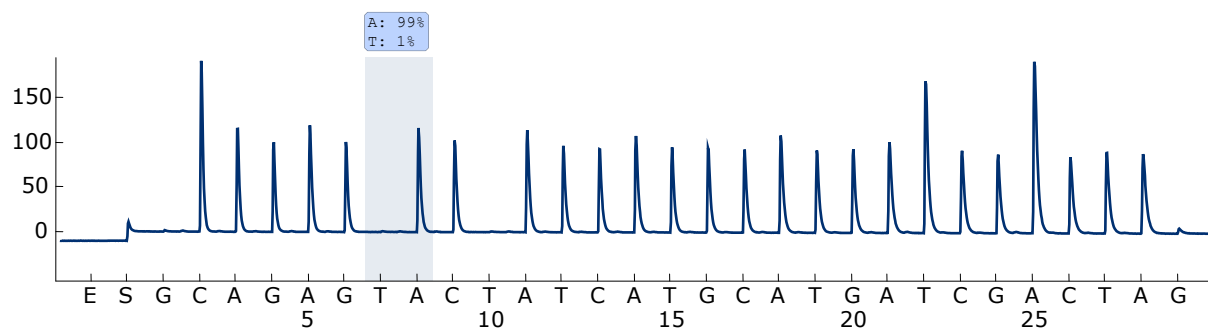
Ενδεικτικά αποτελέσματα Pyrogram παρουσιάζονται στις Εικόνες 8-11.



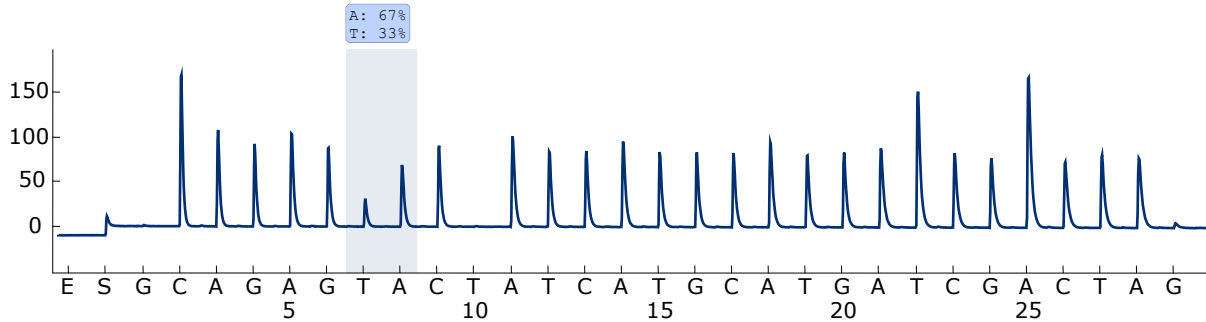
Εικόνα 8. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στο εξόνιο 9 του *KIT*, με ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* η οποία εξετάζει τον διπλασιασμό των 6 bp μετά το κωδικόνιο 503.



Εικόνα 9. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος με διπλασιασμό GCCTAT μετά το κωδικόνιο 503 στο εξόνιο 9 του *KIT*, με ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.



Εικόνα 10. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*, με ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* η οποία εξετάζει τη μετάλλαξη GAC>GTC στο κωδικόνιο 842 (νουκλεοτίδιο 2525).



Εικόνα 11. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος με μετάλλαξη GAC>GTC στο κωδικόνιο 842 (νουκλεοτίδιο 2525) στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*, με ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT**.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

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

Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* για γενικές οδηγίες αντιμετώπισης προβλημάτων του οργάνου.

Σχόλια και συστάσεις

Σήματα στο δείγμα ελέγχου χωρίς μήτρα (δείγμα αρνητικού ελέγχου)

- | | |
|-------------------------------------|--|
| α) Παρεμβολές μεταξύ των βυθισμάτων | Το σήμα ενός βυθίσματος ανιχνεύεται σε παρακείμενο βύθισμα. Αποφύγετε την τοποθέτηση δειγμάτων με σήμα υψηλής έντασης δίπλα στα βυθίσματα δειγμάτων ελέγχου χωρίς μήτρα. |
| β) Μόλυνση της αντίδρασης PCR | Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας με φίλτρα. Αποθηκεύετε και εξάγετε τα υλικά, όπως δοκίμια, δείγματα ελέγχου και αμπλικόνια, ξεχωριστά από τα αντιδραστήρια PCR. |

Σχόλια και συστάσεις

Αλληλουχία χαμηλής ποιότητας ή μη αναμενόμενη αλληλουχία

Γονιδιωματικό DNA χαμηλής ποιότητας

Η χαμηλή ποιότητα του γονιδιωματικού DNA μπορεί να προκαλέσει αποτυχία της PCR. Αναλύστε τα δείγματα PCR με μια ηλεκτροφορητική τεχνική (π.χ. το QIAxcel[®] System ή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης).

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

α) Χαμηλό ύψος κορυφής

Τυχόν σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού είναι πιθανό να οδηγήσουν σε χαμηλές τιμές κορυφής.

Τα δείγματα πρέπει οπωσδήποτε να αναρροφώνται πλήρως με το εργαλείο κενού. Βεβαιωθείτε ότι το εργαλείο κενού εισάγεται αργά μέσα στα δείγματα και ότι η γεωμετρία της πλάκας ή των ταινιών PCR που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση επιτρέπει την πλήρη αναρρόφηση των δειγμάτων.

Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται.

Εάν εμφανιστεί προειδοποίηση «Check» (Έλεγχος), συγκρίνετε προσεκτικά το Pyrogram με το ιστογράμμα, το οποίο μπορείτε να εμφανίσετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος, το αποτέλεσμα είναι έγκυρο. Διαφορετικά, συνιστάται η επαναληπτική αλληλούχηση του δείγματος.

β) Η μετάλλαξη δεν ορίζεται στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση)

Προσαρμόστε την παράμετρο «Sequence to Analyze» στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. «Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* GIST RapidScreen Pyro», σελίδα 53) και επαναλάβετε την ανάλυση της εκτέλεσης.

Σχόλια και συστάσεις

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

Υψηλό υπόβαθρο

- α) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης των νουκλεοτιδίων
- Φυλάσσετε τα νουκλεοτίδια σε θερμοκρασία 2–8°C. Η αποθήκευση σε θερμοκρασία -15 έως -30°C μπορεί να προκαλέσει αύξηση του υποβάθρου.
- β) Σύντομος χρόνος ψύξης των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού
- Αφήστε τα δείγματα σε έναν συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου επί 10–15 λεπτά. Μη συντομεύετε τον χρόνο ψύξης.
- γ) Μόλυνση του φυσίγγιου
- Καθαρίστε προσεκτικά το φυσίγγιο όπως περιγράφεται στο δελτίο του προϊόντος. Φυλάξτε το φυσίγγιο σε θέση προστατευμένη από το φως και τη σκόνη.

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

- α) Ανεπαρκής ποσότητα μείγματος ενζύμων ή υποστρώματος για όλα τα βυθίσματα
- Βεβαιωθείτε ότι η πλήρωση του φυσίγγιου PyroMark Q24 εκτελείται σύμφωνα με το «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από τον κύκλο) στο μενού «Tools» (Εργαλεία).

Σχόλια και συστάσεις

- | | |
|---|--|
| β) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης ή αραίωσης των αντιδραστηρίων | Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με τις οδηγίες στο «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 29. |
| γ) Αποτυχία προετοιμασίας της PCR ή των δειγμάτων | Τα σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR, τον προγραμματισμό του θερμοκυκλοποιητή ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού ενδέχεται να οδηγήσουν σε απουσία σήματος. Εκτελέστε τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο όπως περιγράφεται στο <i>Εγχειρίδιο PyroMark Q24</i> και αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται. Επαναλάβετε την PCR και την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού. |

Ποιοτικός έλεγχος

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

Περιορισμοί

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

Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήστη είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων από την PCR. Πρέπει να δίνεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το όριο τυφλού (LOB) και το όριο ανίχνευσης (LOD) έχουν καθοριστεί για διάφορες μεταλλάξεις με τη χρήση μειγμάτων πλασμιδίων (Πίνακας 10). Ο καθορισμός των ορίων LOB και LOD πραγματοποιήθηκε βάσει των συστάσεων της Οδηγίας EP17-A «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation, approved guideline» (Πρωτόκολλο για τον

καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού, εγκεκριμένη οδηγία) του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI). Τα σφάλματα α και β (ψευδώς θετικό και ψευδώς αρνητικό αντίστοιχα) καθορίστηκαν στο 5%. Τα όρια LOD για ορισμένες σπάνιες ελλείψεις στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* προσδιορίστηκαν με την πρόσθεση του τριπλάσιου της τυπικής απόκλισης των αποτελεσμάτων τυφλών μετρήσεων στην τιμή LOB. Οι τιμές LOD ορίστηκαν έτσι ώστε να είναι μεγαλύτερες από την τιμή LOB κατά τουλάχιστον 3 εκατοστιαίες μονάδες.

Οι τιμές LOB αντιπροσωπεύουν τη μετρηθείσα συχνότητα που προέκυψε από ένα δείγμα φυσικού τύπου (wild-type). Οι τιμές LOD αντιπροσωπεύουν το ελάχιστο σήμα (μετρηθείσα συχνότητα) που μπορεί να θεωρηθεί θετικό για την αντίστοιχη μετάλλαξη.

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

Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (v58)
<i>KIT</i>, εξόνιο 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<i>PDGFRA</i>, εξόνιο 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 ή [‡]	D842_H845del ή [‡]	2,2	5,2	737 ή [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

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

[†] Οι μεταλλάξεις 2524G>T και 2524_2526GAC>TAT, και οι μεταλλάξεις 2526_2537del12 και 2527_2538del12 οδηγούν στις ίδιες αμινοξικές αλλαγές αντιστοίχως.

[‡] Οι μεταλλάξεις 2524_2535del12 και 2526_2537del12 οδηγούν στην ίδια νουκλεοτιδική αλλαγή.

§ Τα όρια LOD για αυτές τις ελλείψεις στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* προσδιορίστηκαν με την πρόσθεση του τριπλάσιου της τυπικής απόκλισης των αποτελεσμάτων τυφλών μετρήσεων στην τιμή LOB.

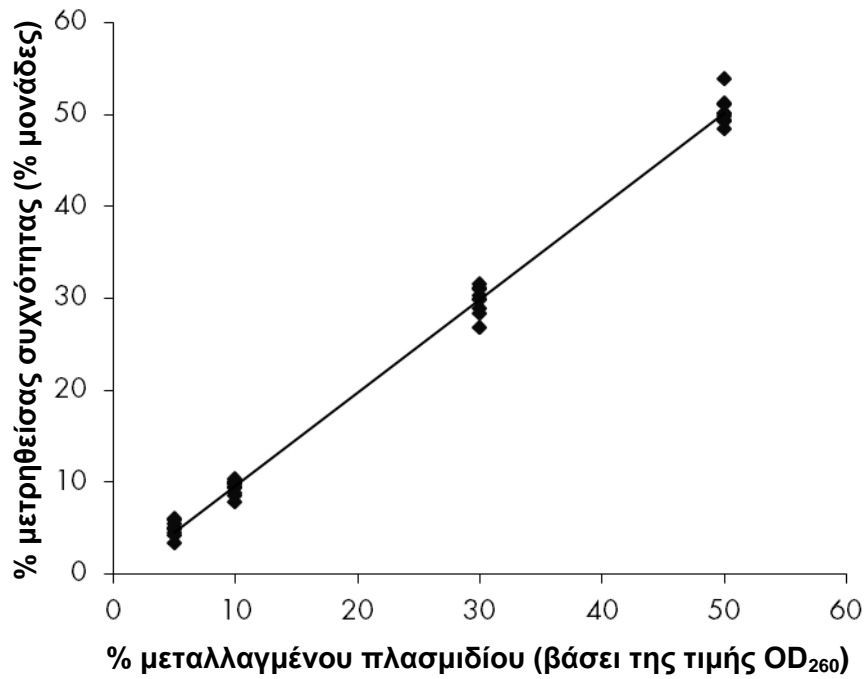
¶ Δεν είναι δυνατή η ανάλυση της μετάλλαξης 2526_2538>G στη λειτουργία AQ του λογισμικού PyroMark Q24.

Γραμμικότητα

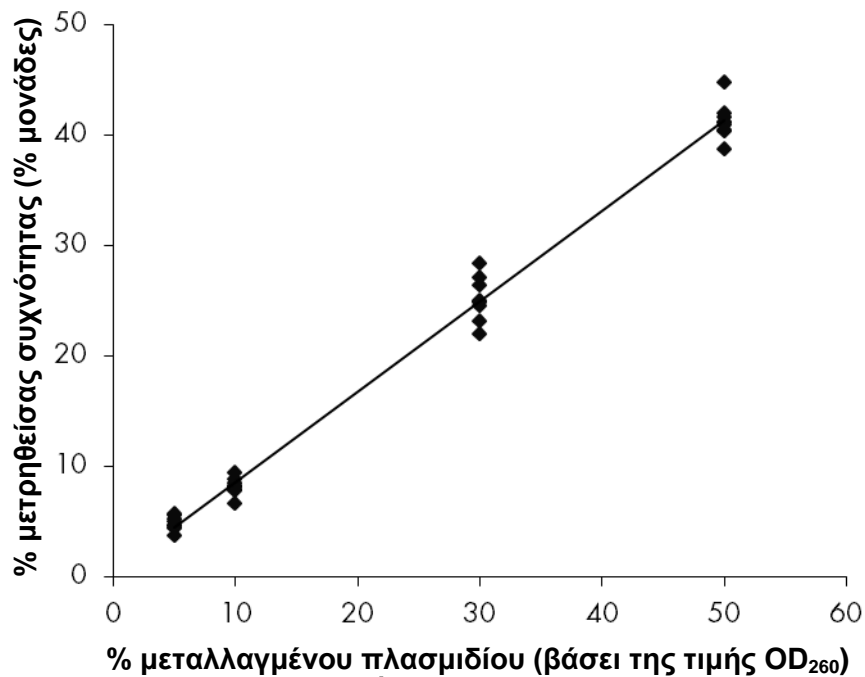
Η γραμμικότητα προσδιορίστηκε με χρήση μειγμάτων πλασμιδίων που έφεραν την κανονική ή τη μεταλλαγμένη αλληλουχία για τον διπλασιασμό 1509_1510insGCCTAT στο εξόνιο 9 του *KIT* και για τη μετάλλαξη 2525A>T στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*. Τα πλασμίδια αναμείχθηκαν σε αναλογίες τέτοιες ώστε να προκύψουν 4 επίπεδα μετάλλαξης (5, 10, 30 και 50%). Κάθε μείγμα αναλύθηκε με 3 διαφορετικές παρτίδες του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro, σε 3 εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού, με 3 επαναλήψεις στην καθεμία.

Τα αποτελέσματα (n = 9 για κάθε επίπεδο μετάλλαξης) αναλύθηκαν σύμφωνα με την κατευθυντήρια οδηγία EP6-A «Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline» (Αξιολόγηση της γραμμικότητας των διαδικασιών ποσοτικής μέτρησης: μια στατιστική προσέγγιση - εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία) του CLSI, με χρήση του λογισμικού Analyse-it[®] v2.21, και παρουσιάζονται στις Εικόνες 12 και 13.

Τα αποτελέσματα ήταν γραμμικά εντός του επιτρεπόμενου ορίου μη γραμμικότητας των 5 εκατοστιαίων μονάδων, για την ελεγχόμενη περιοχή τιμών επιπέδου μετάλλαξης (από 5% έως 50%).



Εικόνα 12. Γραμμικότητα του διπλασιασμού 1509_1510insGCCTAT στο εξόνιο 9 του *KIT*.



Εικόνα 13. Γραμμικότητα της μετάλλαξης 2525A>T στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*.

Ακρίβεια

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

Η επαναληψιμότητα (μεταβλητότητα εντός μεθόδου και μεταξύ παρτίδων) υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα προσδιορισμού γραμμικότητας (3 κύκλοι ανάλυσης την ίδια ημέρα με χρήση διαφορετικών παρτίδων του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro). Η ενδιάμεση ακρίβεια (μεταβλητότητα εντός εργαστηρίου) προσδιορίστηκε σε 3 κύκλους ανάλυσης εντός ενός εργαστηρίου σε 3 διαφορετικές ημέρες με διαφορετικούς χειριστές, διαφορετικά όργανα PyroMark Q24 και διαφορετικές παρτίδες του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Η αναπαραγωγιμότητα (μεταβλητότητα μεταξύ εργαστηρίων) υπολογίστηκε με 2 κύκλους ανάλυσης σε ένα εσωτερικό εργαστήριο και 2 κύκλους ανάλυσης σε ένα εξωτερικό εργαστήριο και με χρήση διαφορετικών παρτίδων του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Οι εκτιμήσεις ακρίβειας εκφράζονται ως τιμές τυπικής απόκλισης των μετρούμενων συχνοτήτων μετάλλαξης, σε εκατοστιαίες μονάδες (Πίνακας 11). Η επαναληψιμότητα, η ενδιάμεση ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα για τον διπλασιασμό 1509_1510insGCCTAT στο εξόνιο 9 του *KIT* ήταν 0,8–1,6, 0,5–1,5 και 0,7–1,9 εκατοστιαίες μονάδες αντίστοιχα, στην ελεγχόμενη περιοχή τιμών επιπέδου μετάλλαξης (5–50%). Η επαναληψιμότητα, η ενδιάμεση ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα για τη μετάλλαξη 2525A>T στο εξόνιο 18 του *PDGFRA* ήταν 0,6–1,9, 0,6–3,7 και 0,5–2,4 εκατοστιαίες μονάδες αντίστοιχα, στην ελεγχόμενη περιοχή τιμών επιπέδου μετάλλαξης (5–50%).

Πίνακας 11. Ακρίβεια για τον διπλασιασμό 1509_1510insGCCTAT στο εξόνιο 9 του *KIT**

% μεταλλαγμένου πλασμιδίου [†]	Επαναληψιμότητα		Ενδιάμεση ακρίβεια		Αναπαραγωγιμότητα	
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

* Όλες οι τιμές δίνονται σε εκατοστιαίες μονάδες. SD: τυπική απόκλιση (n=9).

[†] Με βάση τη μέτρηση OD₂₆₀.

Πίνακας 12. Ακρίβεια για τη μετάλλαξη 2525A>T στο εξόνιο 18 του PDGFRA[‡]

% μεταλλαγμένου πλασμιδίου [§]	Επαναληψιμότητα		Ενδιάμεση ακρίβεια		Αναπαραγωγιμότητα	
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

[‡] Όλες οι τιμές δίνονται σε εκατοστιαίες μονάδες. SD: τυπική απόκλιση (n=9).

[§] Με βάση τη μέτρηση OD₂₆₀.

Διαγνωστική αξιολόγηση

Το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro αξιολογήθηκε έναντι της αλληλούχησης με τη μέθοδο Sanger. DNA απομονώθηκε από 100 δείγματα όγκων GIST μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) και αναλύθηκε ως προς την παρουσία μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *KIT* και στο εξόνιο 18 του *PDGFRA*.

Το DNA απομονώθηκε με χρήση του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Οι αναλύσεις εκτελέστηκαν με χρήση του κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro στο σύστημα PyroMark Q24. Η αλληλούχηση κατά Sanger εκτελέστηκε στο σύστημα Applied Biosystems[®] 3130 Genetic Analyzer.

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν, η κατάσταση μετάλλαξης προσδιορίστηκε σε όλα, τόσο για το εξόνιο 9 του *KIT* (Εικόνα 13) όσο και για το εξόνιο 18 του *PDGFRA* (Εικόνα 14), και με τις δύο μεθόδους.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων όγκων GIST για το εξόνιο 9 του *KIT*

<i>KIT</i> , εξόνιο 9		Αλληλούχηση κατά Sanger		
		Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Σύνολο
<i>KIT theascreen GIST RapidScreen Pyro</i>	Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Σύνολο	92	8	100

Πίνακας 14. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων όγκων GIST για το εξόνιο 18 του *PDGFRA*

<i>PDGFRA</i> , εξόνιο 18		Αλληλούχηση κατά Sanger				Σύνολο
		WT	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
<i>KIT theascreen GIST RapidScreen Pyro</i>	Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Σύνολο	93	2	3	2	100

Σημείωση: Σε όλες τις εκτελέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης, το σήμα ήταν πάνω από 30 RLU, όπως κατά κανόνα προκύπτει από 10 ng DNA που απομονώθηκε από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE). Τα δεδομένα αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού αναλύθηκαν με χρήση του *GIST RapidScreen Plug-in Report*.

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί στο Διαδίκτυο μια μεγάλη, ενημερωμένη βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε, είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού είτε ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κ.λπ.

Για τον πλήρη κατάλογο βιβλιογραφικών παραπομπών, επισκεφθείτε την ηλεκτρονική βάση δεδομένων βιβλιογραφίας QIAGEN στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή απευθυνθείτε στο τμήμα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή στον τοπικό αντιπρόσωπό σας.

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Σύμβολα

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



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιεχόμενα



Αριθμός



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμοί θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης



Προσοχή

Πληροφορίες επικοινωνίας

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

Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Εάν έχει εγκατασταθεί το GIST RapidScreen Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες ρυθμίσεις ανάλυσης για το εξόνιο 9 του *KIT* και για το εξόνιο 18 του *PDGFRA* στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του λογισμικού PyroMark Q24, στη διαδρομή «Example Files/PyroMark Setups/GIST» (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/GIST). Τα παρακάτω βήματα δεν χρειάζεται να εκτελεστούν. Μπορείτε να προμηθευτείτε το GIST RapidScreen Plug-in Report από τη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com.

Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report αντί της μη αυτόματης ανάλυσης. Δεν είναι δυνατή η μη αυτόματη προσθήκη σύνθετων μεταλλάξεων του εξονίου 18 του *PDGFRA* στην παράμετρο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση), και συνεπώς αυτές πρέπει να αναλυθούν με χρήση του GIST RapidScreen Plug-in Report. Μετά την εγκατάσταση του προσθέτου (plug-in) ή κάθε φορά που γίνεται αναβάθμιση ή εγκατάσταση νέου λογισμικού στον υπολογιστή, η σωστή λειτουργία του Plug-in πρέπει να επαληθεύεται, όπως περιγράφεται στο γρήγορο οδηγό GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide.

Εάν δεν έχει εγκατασταθεί το GIST RapidScreen Plug-in Report, τα αρχεία ανάλυσης πρέπει να ρυθμιστούν μη αυτόματα πριν από την πρώτη εκτέλεση των αναλύσεων *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Ρυθμίστε την ανάλυση για το εξόνιο 9 του *KIT* και για το εξόνιο 18 του *PDGFRA* χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία

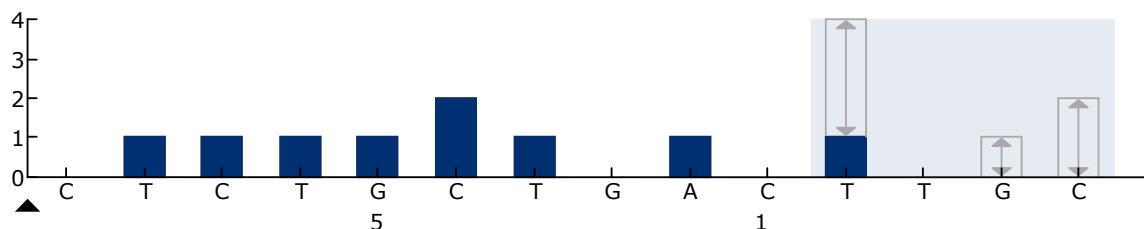
KIT, εξόνιο 9

A1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέα ανάλυση AQ).


A2. Εισαγάγετε χειροκίνητα το παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων):
CTCTGCTGACTTGC

A3. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση):
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTAA


Ο διπλασιασμός των 6 bp GCCTAT μετά το κωδικόνιο 503 στο εξόνιο 9 του *KIT* ανιχνεύεται με χρήση αυτής της αλληλουχία προς ανάλυση (Sequence to Analyze).



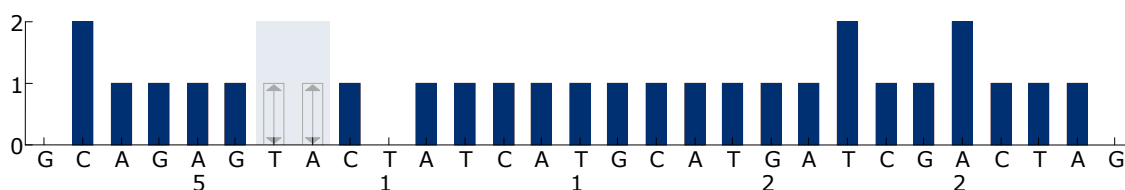
Εικόνα 14. Ιστόγραμμα για το εξόνιο 9 του *KIT* με ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*, η οποία εξετάζει τον διπλασιασμό των 6 bp μετά το κωδικόνιο 503.

- A4. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.
- A5. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «KIT exon 9» (KIT, εξόνιο 9).

PDGFRA, εξόνιο 18

- A1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέα ανάλυση AQ).
- A2. Εισαγάγετε χειροκίνητα το παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων):
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
CCAGAGWCATCATGCATGATTTCGAACTAT

Η πιο συχνή μετάλλαξη GAC>GTC στο κωδικόνιο 842 (νουκλεοτίδιο 2525) του εξονίου 18 του PDGFRA ανιχνεύεται με χρήση αυτής της αλληλουχίας προς ανάλυση (Sequence to Analyze).



Εικόνα 15. Ιστόγραμμα για το εξόνιο 18 του *PDGFRA* με ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *CCAGAGWCATCATGCATGATTTCGAACTAT*, η οποία εξετάζει τη μετάλλαξη GAC>GTC στο κωδικόνιο 842 (νουκλεοτίδιο 2525).


Μπορείτε να τροποποιήσετε τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μετά την εκτέλεση της ανάλυσης ώστε να ανιχνευτούν επίσης και μεταλλάξεις στο νουκλεοτίδιο 2524 (κωδικόνιο 842) αλλά και 9 ελλείψεις και σύνθετες μεταλλάξεις μέσα στην περιοχή μεταξύ των κωδικονίων 842 και 847.

Για να ελέγξετε εάν υπάρχουν οι παρακάτω μεταλλάξεις, αλλάξτε τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) όπως καθορίζεται στον Πίνακα 15.

Σημείωση: Μπορείτε να παραβλέψετε την προειδοποίηση «Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations» (Η ποσοτικοποίηση ενδέχεται να είναι αμφίβολη: η μεταβλητή θέση χρειάζεται περισσότερες από 5 προσθήκες) κατά τη ρύθμιση της ανάλυσης.

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU.

A4. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.

A5. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «PDGFRA exon 18» (PDGFRA, εξόνιο 18).

Πίνακας 15. Συχνές μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με το kit *therascreen GIST RapidScreen Pyro* με χρήση διαφορετικών ρυθμίσεων «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση)

Αλλαγή νουκλεϊκού οξέος	Αλλαγή αμινοξέος	«Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση)
<i>KIT</i>, εξόνιο 9		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTTAA*
<i>PDGFRA</i>, εξόνιο 18		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTTCGAACTAT
2524_2535del12 ή [‡] 2526_2537del12	D842_H845del ή [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	— [§]
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	— [§]


* Τυπική αλληλουχία προς ανάλυση.

[†] Οι μεταλλάξεις 2524G>T και 2524_2526GAC>TAT, και οι μεταλλάξεις 2526_2537del12 και 2527_2538del12 οδηγούν στις ίδιες αμινοξικές αντικαταστάσεις αντιστοίχως.

[‡] Οι μεταλλάξεις 2524_2535del12 και 2526_2537del12 οδηγούν στην ίδια νουκλεοτιδική αντικατάσταση και αναλύονται με την ίδια αλληλουχία προς ανάλυση (Sequence to Analyze).

[§] Δεν είναι δυνατή η ανάλυση των μεταλλάξεων 2526_2538>G και 2524_2526GAC>TAT στη λειτουργία AQ του λογισμικού PyroMark Q24.

Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων

<p>ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ</p> 	<p>Επικίνδυνα χημικά</p> <p>Το διάλυμα αποδιάταξης που χρησιμοποιείται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, το οποίο προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια και το δέρμα.</p> <p>Φοράτε πάντοτε προστατευτικά γυαλιά, γάντια και εργαστηριακή ποδιά.</p> <p>Η αρμόδια αρχή (π.χ. ο υπεύθυνος του εργαστηρίου) πρέπει να λαμβάνει τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χώρος εργασίας είναι ασφαλής και οι χειριστές των οργάνων δεν εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα τοξικών ουσιών (χημικών ή βιολογικών), όπως καθορίζεται στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας υλικών (SDS) ή τα έγγραφα των OSHA*, ACGIH,[†] ή COSHH[‡].</p> <p>Ο εξαερισμός για τις αναθυμιάσεις και η απόρριψη των αποβλήτων πρέπει συμμορφώνονται με τους εθνικούς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς και νόμους σχετικά με την υγεία και την ασφάλεια.</p>
---	---

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

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

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

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

Σημαντική πληροφορία πριν από την έναρξη

- Το πρωτόκολλο αυτό απαιτεί νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q 18,2 ΜΩ x cm, www.millipore.com, ή ισοδύναμο).

Διαδικασία

- B1. Βεβαιωθείτε ότι στο εργαλείο κενού δεν εφαρμόζεται κενό. Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία κενού και η αντλία κενού είναι απενεργοποιημένες (Off).**
- B2. Απορρίψτε τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων που υπάρχουν στα λεκανίδια.**

B3. Εκτελέστε έκπλυση των λεκανιδίων με νερό υψηλής καθαρότητας ή αντικαταστήστε τα, αν είναι απαραίτητο.

B4. Αδειάστε τον περιέκτη αποβλήτων.

Το καπάκι μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς αποσύνδεση της σωλήνωσης.

B5. Αν απαιτείται καθαρισμός του σταθμού εργασίας υπό κενό (για παράδειγμα λόγω σκόνης ή διαρροών), ακολουθήστε τις οδηγίες που παρατίθενται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις σε συστήματα PyroMark Q24: Εκκινητές αλληλούχησης, Εκκινητές PCR, Δείγμα ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA, Κύριο μείγμα PyroMark PCR, Συμπύκνωμα CoralLoad, Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης PyroMark, Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης PyroMark, Διάλυμα αποδιάταξης PyroMark, Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark, Μείγμα ενζύμων, Μείγμα υποστρώματος, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP και H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001513
PyroMark Q24	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001517* 9001515 [†]
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Λογισμικό εφαρμογής	9019063
PyroMark Q24 Software	Λογισμικό ανάλυσης	9019062

* Αποκλειστικά για το Ηνωμένο Βασίλειο.

[†] Για τις υπόλοιπες χώρες.

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Βοηθητικός εξοπλισμός		
PyroMark Q24 Plate (100)	Πλάκα αντίδρασης αλληλούχησης 24 βυθισμάτων	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Φυσίγγια για την προσθήκη νουκλεοτιδίων και αντιδραστηρίων	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Επαναχρησιμοποιούμενοι δειγματολήπτες με φίλτρο για τους σταθμούς εργασίας υπό κενό PyroMark Q96 και Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Για έλεγχο εγκατάστασης του συστήματος	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Για επιβεβαίωση απόδοσης του συστήματος	979304
Σχετικά προϊόντα		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Για 50 προπαρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp MinElute [®] , πρωτεΐνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Για 48 προπαρασκευές: Φυσίγγια με αντιδραστήρια (ιστού), ρύγχη με φίλτρο μίας χρήσης, συγκρατητήρες για ρύγχη μίας χρήσης, σωληνάρια δειγμάτων (2 ml), σωληνάρια έκλουσης (1,5 ml), ρυθμιστικό διάλυμα G2, πρωτεΐνάση K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Για 50 προπαρασκευές: Στήλες φυγοκέντρησης QIAamp Mini, ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, VacConnectors	61104

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

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group) – Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.) – Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation) – FrameStar® (4titude Ltd.) – Milli-Q® (Millipore Corporation) – Sepharose® (GE Healthcare) – Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries) – Windows® (Microsoft Corporation).

***Άδεια περιορισμένης χρήσης για το κιτ *therascreen* GIST RapidScreen Pyro**

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

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

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013-2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

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

