

November 2019

Petunjuk Penggunaan (Buku Pegangan) *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit



Versi 1



Diagnostik in vitro kualitatif

Untuk digunakan dengan Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, JERMAN



1119793ID

Isi

Teknologi Sampel dan Uji Kadar dari QIAGEN	5
Penggunaan yang Ditujukan	6
Ringkasan dan Penjelasan	7
Prinsip Prosedur.....	8
Bahan yang Disediakan	12
Isi kit.....	12
Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia	13
Peringatan dan Pencegahan	15
Informasi keselamatan	15
Tindakan pencegahan umum	15
Penyimpanan dan Penanganan Reagen	17
Pengumpulan Spesimen, Persiapan Analisis, dan Penyimpanan	18
Prosedur	20
Ekstraksi DNA.....	20
Protokol: Penilaian sampel DNA	22
Protokol: Deteksi mutasi KRAS.....	35
Interpretasi Hasil.....	47
Panduan Pemecahan Masalah	49
Tanda yang dibuat oleh <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	50
Kontrol Kualitas	53
Batasan	53
Karakteristik Kinerja.....	54

Kinerja analitikal	54
Batas	54
Batasan kosong.....	55
Perbandingan terhadap metode referensi analitikal: CRC.....	55
Perbandingan terhadap metode referensi analitikal: NSCLC.....	58
Batas deteksi (Limit of Detection - LOD).....	60
Linearitas dan input DNA	62
Zat yang mengganggu	66
Kontaminasi silang	67
Eksklusivitas/reaktivitas silang.....	68
Pengulangan dan reproduksibilitas.....	70
Variabilitas penanganan sampel.....	73
Kesetaraan metode pemerolehan sampel (NSCLC saja)	74
Referensi.....	75
Simbol.....	78
Informasi Kontak.....	79
Lampiran 1: Protokol Panduan <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit.....	80
Interpretasi Hasil (Manual).....	97
Pengaturan analisis perangkat lunak.....	97
Analisis data penilaian sampel	98
Analisis sampel	101
Lampiran 2: Pemasangan <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	106
Informasi Pemesanan	110
Riwayat Revisi Dokumen.....	112

Teknologi Sampel dan Uji Kadar dari QIAGEN

QIAGEN adalah penyedia terdepan di bidang teknologi sampel dan uji kadar inovatif, yang memungkinkan isolasi dan deteksi kandungan dari setiap sampel biologis. Produk dan layanan canggih serta berkualitas tinggi kami memastikan keberhasilan dari sampel hingga hasil.

QIAGEN menetapkan standar dalam:

- Pemurnian DNA, RNA, dan protein
- Uji kadar protein dan asam nukleat
- RNAi dan riset mikroRNA
- Otomasi teknologi uji kadar dan sampel

Misi kami adalah untuk membawa Anda mencapai keberhasilan dan terobosan luar biasa. Untuk informasi lebih lanjut, kunjungi www.qiagen.com.

Penggunaan yang Ditujukan

therascreen[®] KRAS RGQ PCR Kit adalah uji kadar PCR kualitatif waktu nyata untuk deteksi 7 mutasi somatik dalam kodon 12 dan 13 onkogen KRAS manusia menggunakan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Kit ini dimaksudkan untuk digunakan dengan DNA yang diekstrak dari sampel formalin-tetap parafin-tertanam tertanam (formalin-fixed paraffin embedded, FFPE) pada kanker kolorektum (colorectal cancer, CRC) atau sampel kanker paru bukan-sel kecil (non-small cell lung cancer, NSCLC) yang diperoleh dari reseksi, biopsi jarum inti (core needle biopsy, CNB), atau aspirasi jarum halus (fine needle aspiration, FNA).

Mutasi somatik dalam gen KRAS merupakan biomarker prediktif potensial atas resistensi terhadap terapi yang diarahkan-faktor pertumbuhan epidermal (EGFR) manusia seperti panitumumab dan cetuximab untuk perawatan CRC. Mutasi somatik dalam gen KRAS juga dapat diindikasikan sebagai biomarker prediktif potensial untuk membuat keputusan perawatan untuk terapi NSCLC tertentu.

Status mutasi pasien akan dipertimbangkan oleh dokter bersama dengan faktor penyakit lain dalam membuat keputusan terapi. Keputusan perawatan untuk pasien kanker tidak boleh didasarkan hanya dari status mutasi KRAS.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit tidak ditujukan untuk mendiagnosis CRC, NSCLC, atau penyakit lain apa pun.

Ringkasan dan Penjelasan

Mutasi dalam onkogen KRAS sering ditemukan dalam kanker manusia (1–4). Dengan teknologi Sistem Mutasi Refraktori Alel Scorpions® dan ARMS® (5, 6), *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit memungkinkan deteksi 7 mutasi dalam kodon 12 dan 13 pada onkogen KRAS terhadap latar belakang DNA genomik tipe liar (Tabel 1). Berdasarkan data dalam basis data COSMIC (2015 v72), 7 mutasi yang dideteksi oleh *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit menyumbang >95% dari semua mutasi KRAS yang dilaporkan dari pasien CRC dan >88% dari semua mutasi yang dilaporkan dari pasien NSCLC (7).

Tabel 1. Daftar mutasi dan identitas COSMIC

Mutasi	Perubahan dasar	ID COSMIC*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

* ID COSMIC diambil dari *Katalog Mutasi Somatik dalam Kanker* (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Pengujian ini sangat sensitif dan spesifik, sehingga memungkinkan deteksi dalam persentase rendah DNA mutan terhadap latar belakang DNA tipe liar. Apabila terdapat salinan DNA dalam jumlah memadai, deteksi 0,8% mutan dalam latar belakang DNA genomik tipe liar dapat terjadi (lihat “Karakteristik Kinerja”, halaman 54, untuk informasi batasan deteksi untuk tiap mutasi).

therascreen KRAS RGQ PCR Kit digunakan dalam prosedur reaksi rantai polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Manfaat kit ini adalah kit ini sangat spesifik terhadap target serta cepat dan efisien tanpa subjektivitas dalam menentukan hasil.

Prinsip Prosedur

therascreen KRAS RGQ PCR kit menggunakan 2 teknologi — ARMS dan Scorpions — untuk deteksi mutasi dalam real-time PCR.

Campuran reaksi mutasi

Setiap campuran reaksi menggunakan primer ARMS yang spesifik-mutasi untuk memperkuat secara selektif DNA yang termutasi, kemudian primer Scorpions untuk mendeteksi produk amplifikasi.

ARMS

Amplifikasi spesifik-alel dicapai oleh ARMS yang mengeksploitasi kemampuan polimerase DNA *Taq* untuk membedakan antara dasar cocok dan tidak cocok di 3' ujung primer PCR. Jika primer sepenuhnya cocok, amplifikasi akan memproses dengan efisiensi penuh. Jika dasar 3' tidak cocok, hanya amplifikasi latar belakang tingkat rendah yang dapat terjadi. Sehingga, sekuens termutasi secara selektif diperkuat bahkan dalam sampel di mana sebagian besar DNA tidak membawa mutasi.

Scorpions

Deteksi amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Scorpions. Scorpions adalah molekul dwi-fungsi yang mengandung primer PCR yang secara kovalen terkait dengan kuar. Kuar menggabungkan fluorofor karboksifluoresin (FAM™) dan pemadam. Yang terakhir memadamkan fluoresens dari fluorofor. Saat kuar terikat pada amplicon ARMS selama PCR, fluorofor dan pemadam menjadi terpisah, menyebabkan peningkatan yang dapat dideteksi dalam fluoresens.

Format kit

therascreen KRAS RGQ PCR Kit berisi 8 uji kadar:

- 1 uji kadar kontrol (Campuran Reaksi Kontrol [CTRL])
- 7 uji kadar mutasi (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Campuran reaksi adalah dupleks, yang berisi reagen berlabel FAM untuk mendeteksi target dan kontrol internal berlabel HEX™. Campuran reaksi dan reagen kontrol positif mengandung dapar EDTA Tris, dan kontrol positif berisi Poly A RNA pembawa.

Uji Kadar

therascreen KRAS RGQ PCR Kit terdiri dari prosedur dengan 2 tahap. Di tahap pertama, uji kadar kontrol dilakukan untuk menilai total kemampuan DNA KRAS yang dapat diperkuat dalam sampel. Di tahap kedua, uji kadar kontrol dan mutasi dilakukan untuk menentukan ada atau tidak adanya DNA mutan.

Reaksi kontrol

CTRL menggunakan primer Scorpions dan primer tanpa label untuk memperkuat sekuens pendek ekson 4 dari gen KRAS. Reaksi kontrol digunakan untuk menentukan apakah tingkat DNA yang dapat diperkuat yang sesuai ada dalam sampel dan merupakan faktor yang digunakan dalam perhitungan analisis yang digunakan untuk menentukan status mutasi.

Uji kadar kontrol

Uji kadar kontrol yang berlabel FAM, digunakan untuk menilai total DNA KRAS yang dapat diperkuat dalam sampel. Uji kadar kontrol memperkuat wilayah ekson 4 dari gen KRAS. Primer dan kuar Scorpions dirancang untuk memperkuat setiap polimorfisme KRAS yang dikenali secara independen.

Uji kadar mutasi

Setiap uji kadar mutasi mengandung kuar Scorpion berlabel FAM dan primer ARMS, untuk membedakan antara DNA tipe liar dan DNA mutan tertentu.

Kontrol

Catatan: Semua proses eksperimen harus mengandung kontrol positif dan negatif.

Kontrol internal

Tiap campuran reaksi mengandung kontrol internal selain reaksi target. Kegagalan menunjukkan bahwa mungkin terdapat inhibitor yang dapat menyebabkan hasil tidak akurat atau kesalahan pengaturan operator yang terjadi untuk tabung tersebut. Jika kegagalan kontrol internal disebabkan karena inhibisi PCR, pengenceran sampel dapat mengurangi pengaruh inhibitor. Akan tetapi, perlu dicatat bahwa ini juga berarti mengencerkan DNA target. Satu tabung air untuk pengenceran sampel (Dil.) disertakan bersama kit. Pengenceran sampel harus dilakukan menggunakan air untuk pengenceran sampel (Dil.).

Kontrol positif

Setiap proses harus mengandung kontrol positif dalam tabung 1–5. *therascreen* KRAS RGQ Kit berisi Kontrol Positif (PC) KRAS untuk digunakan sebagai templat dalam reaksi kontrol positif. Hasil positif dinilai untuk memastikan bahwa kit berkinerja dalam kriteria penerimaan yang ditetapkan.

Kontrol negatif

Setiap proses harus mengandung kontrol negatif dalam tabung (“Kontrol Tanpa Templat”) dalam tabung 9–13. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit mengandung Air untuk NTC (NTC) untuk digunakan sebagai “templat” untuk Kontrol Tanpa Templat. Kontrol Tanpa Templat digunakan untuk menilai adanya potensi kontaminasi selama penyiapan proses dan untuk menilai kinerja reaksi kontrol internal.

Penilaian sampel

Campuran Reaksi Kontrol (CTRL) yang disertakan dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit digunakan untuk menilai total DNA KRAS yang dapat diperkuat dalam sampel. Uji kadar kontrol memperkuat wilayah ekson 4 dari gen KRAS. Disarankan untuk menyiapkan sampel hanya dengan uji kadar kontrol menggunakan Kontrol Positif (PC) KRAS sebagai kontrol positif dan Air untuk NTC sebagai Kontrol Tanpa Templat.

Platform dan perangkat lunak

therascreen KRAS RGQ PCR Kit secara spesifik dirancang untuk digunakan dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Perangkat Lunak Rotor-Gene Q dan *therascreen* KRAS Assay Package tersedia untuk diunduh di web atau secara terpisah di CD.

Instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM harus dipelihara sesuai dengan persyaratan dalam panduan pengguna instrumen. Baca panduan pengguna untuk informasi terkait instrumen.

Lihat Lampiran 2: Pemasangan *therascreen* KRAS Assay Package untuk petunjuk pemasangan.

Bahan yang Disediakan

Isi kit

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
No. Katalog				874011
Jumlah penyiapan		Identifikasi tabung		24
Warna	Identitas			Volume
Merah	Control Reaction Mix (Campuran Reaksi Kontrol)	1	CTRL	2 x 600 µl
Ungu	12ALA Reaction Mix (Campuran Reaksi 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Jingga	12ASP Reaction Mix (Campuran Reaksi 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Merah Muda	12ARG Reaction Mix (Campuran Reaksi 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Hijau	12CYS Reaction Mix (Campuran Reaksi 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Kuning	12SER Reaction Mix (Campuran Reaksi 12SER)	6	12SER	600 µl
Abu-abu	12VAL Reaction Mix (Campuran Reaksi 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Biru	13ASP Reaction Mix (Campuran Reaksi 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Krem	KRAS Positive Control (Kontrol Positif KRAS)	9	PC	250 µl
Mint	Taq DNA Polymerase (Polimerase DNA Taq)		<i>Taq</i>	80 µl
Putih	Water for NTC (Air untuk NTC)		NTC	1,9 ml
Putih	Water for Sample Dilution (Air untuk Pengenceran Sampel)		Dil.	1,9 ml
<i>Buku Pegangan theascreen KRAS RGQ PCR Kit (Inggris)</i>				1

Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (Safety Data Sheets, SDS) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

Reagen

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (no. kat. 56404; lihat Ekstraksi DNA)
- Xilena
- Etanol (96–100%)*

Bahan Habis Pakai

- Sterilkan ujung pipet dengan filter (untuk menghindari kontaminasi silang, kami merekomendasikan ujung pipet dengan penghalang aerosol)
- Sterilkan tabung mikrosentrifugasi untuk menyiapkan campuran master
- 0,1 ml Strip Tubes and Caps, untuk digunakan dengan rotor 72-sumuran (no. kat. 981103 atau 981106)

Peralatan

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan saluran fluoresens untuk Cycling Green dan Cycling Yellow (masing-masing deteksi FAM dan HEX)
- Perangkat lunak Rotor-Gene Q versi 2.3 dengan KRAS Assay Package (versi 3.1.1) yang dipasang untuk deteksi mutasi otomatis (lihat Lampiran 2: Pemasangan theascreen KRAS Assay Package).

* Jangan gunakan alkohol denaturasi, yang mengandung bahan lain seperti metanol atau metiletiletanon.

Catatan: Perangkat lunak Rotor-Gene Q dapat digunakan tanpa KRAS Assay Package untuk deteksi mutasi manual. Lihat Lampiran 1: Protokol Panduan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Thermomixer*, inkubator orbital berpemanas, blok pemanas atau penangas air yang mampu melakukan inkubasi pada suhu 56°C dan 90°C
- Sentrifugasi atas meja† dengan rotor untuk tabung 1,5 ml
- Vortexer atas meja†
- Pipet khusus (dapat disesuaikan) untuk penyiapan sampel†
- Pipet khusus (dapat disesuaikan) untuk penyiapan campuran master PCR*
- Pipet khusus (dapat disesuaikan) untuk penyaluran DNA templat*

* Pastikan bahwa instrumen telah diperiksa dan dikalibrasi sesuai dengan rekomendasi produsen.

† Jangan gunakan alkohol denaturasi, yang mengandung bahan lain seperti metanol atau metiletiketon.

Peringatan dan Pencegahan

Untuk penggunaan diagnostik in vitro

Informasi keselamatan

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi lebih lanjut, silakan lihat lembar data keselamatan (Safety Data Sheets, SDS) yang sesuai. Panduan tersedia online dalam format PDF yang mudah dan praktis di www.qiagen.com/safety. Di sana Anda dapat menemukan, melihat, dan mencetak SDS untuk setiap kit dan komponen kit QIAGEN.

Tindakan pencegahan umum

Pengguna harus selalu memperhatikan hal-hal berikut:

- Simpan dan ekstrak bahan positif (kontrol positif dan spesimen) secara terpisah dari semua reagen lain lalu tambahkan ke campuran reaksi dalam fasilitas di ruang yang terpisah.
- Beri perhatian ekstrem untuk mencegah kontaminasi PCR dengan bahan kontrol sintetis. Kami menyarankan untuk menggunakan pipet khusus yang terpisah untuk menyiapkan campuran reaksi dan menambahkan templat DNA. Penyiapan dan penyaluran campuran reaksi harus dilakukan dalam area terpisah pada penambahan templat. Tabung Rotor-Gene Q tidak boleh dibuka setelah proses PCR telah selesai. Hal ini untuk mencegah kontaminasi laboratorium dengan produk pasca-PCR.
- Reagen untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit telah diencerkan secara optimal. Kami tidak menyarankan pengenceran reagen lebih lanjut karena hal ini dapat menyebabkan hilangnya kinerja. Kami tidak menyarankan penggunaan volume reaksi kurang dari 25 μ l, karena hal ini akan meningkatkan risiko hasil negatif palsu.

-
- Semua reagen dalam *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit diformulasikan khusus untuk kinerja yang optimal. Semua reagen yang disediakan dalam kit ditujukan untuk digunakan hanya dengan reagen lain dalam *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit yang sama. Substitusi terhadap reagen dalam kit tidak boleh dilakukan jika akan menjaga kinerja yang optimal.
 - Hanya gunakan polimerase DNA *Taq* (*Taq*) yang disediakan dalam kit. Jangan melakukan substitusi dengan polimerase DNA *Taq* dari kit lain pada tipe yang sama atau yang lain, atau dengan polimerase DNA *Taq* dari pemasok lain.

Penyimpanan dan Penanganan Reagen

therascreen KRAS RGQ PCR Kit dikirimkan dengan es kering. Jika terdapat komponen *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit yang tidak beku saat kedatangan, kemasan luar telah terbuka selama transit, atau pengiriman tidak berisi nota pengemasan, buku pegangan, atau reagen lain, silakan hubungi salah satu Departemen Layanan Teknis QIAGEN atau distributor setempat (lihat sampul belakang atau kunjungi www.qiagen.com).

therascreen KRAS RGQ PCR Kit harus disimpan segera setelah diterima pada suhu -30 hingga -15°C dalam lemari pembeku dengan suhu konstan dan terlindung dari cahaya. Seperti dengan semua molekul berlabel fluoresens, Scorpions harus terlindung dari cahaya untuk menghindari pemutihan foto dan kehilangan kinerja.

Jika disimpan dalam kondisi penyimpanan yang direkomendasikan dalam kemasan asli, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tetap stabil hingga tanggal kedaluwarsa yang tertera. Hindari pencairan dan pembekuan berulang. Jangan melebihi maksimal 6 siklus beku-cair.

Pengumpulan Spesimen, Persiapan Analisis, dan Penyimpanan

Catatan: Semua sampel harus diperlakukan sebagai bahan yang berpotensi menular.

Bahan sampel harus berupa DNA genomik manusia yang diekstrak dari jaringan FFPE. Spesimen harus dipindahkan sesuai dengan metodologi patologi standar untuk menjamin kualitas spesimen.

Sampel tumor bersifat heterogen dan data dari sampel tumor mungkin tidak sesuai dengan bagian lain dari tumor yang sama. Sampel tumor juga dapat mengandung jaringan non-tumor. DNA dari jaringan non-tumor tidak akan diharapkan mengandung mutasi yang terdeteksi oleh *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Penyiapan sampel jaringan

Catatan: Gunakan pisau bedah kering. Jangan lakukan tahap ini dalam kap asap atau aliran laminar.

- Kikis jaringan tumor dari bagian ke dalam tabung mikrosentrifugasi berlabel menggunakan pisau bedah baru untuk sampel masing-masing.

Penyiapan sampel jaringan untuk ekstraksi DNA (CRC)

- Dengan metode dan bahan standar, masukkan spesimen jaringan dalam 10% formalin berdapar netral (Neutral Buffered Formalin, NBF), dan lekatkan spesimen jaringan dalam parafin. Dengan mikrotom, potong 5 μm bagian serial dari blok parafin dan pasang pada kaca mikroskop.

- Seorang individu terlatih (misal ahli patologi) harus menilai bagian yang mengandung Hematoksilin & Eosin (H&E) untuk kandungan tumor dan penentuan luas. Tandai kaca mikroskop bernoda untuk membedakan tumor dari jaringan normal. Gunakan bagian seri untuk ekstraksi DNA.
- Gunakan bagian dengan >20% kandungan tumor menurut luas untuk memproses tanpa makrobedah (lihat di bawah).
- Untuk bagian yang mengandung <20% kandungan tumor menurut luas, lakukan makrobedah pada satu atau beberapa bagian. Buang jaringan non-tumor.
- Untuk bagian dengan luas <4 mm², proses 2 atau beberapa bagian untuk meningkatkan luas total tumor hingga minimal 4 mm² (berlaku untuk sampel dengan dan tanpa makrobedah). Buang jaringan non-tumor.
- Kikis lebih parafin dari jaringan dengan pisau bedah yang baru dan steril.

Penyiapan sampel jaringan untuk ekstraksi DNA (NSCLC)

- Dengan metode dan bahan standar, masukkan spesimen jaringan dalam NBF 10%, dan letakkan spesimen jaringan dalam parafin. Dengan mikrotom, potong 5 µm bagian serial dari blok parafin dan pasang pada kaca mikroskop.
- Seorang individu terlatih (misal ahli patologi) harus menilai bagian yang mengandung H&E untuk adanya tumor. Gunakan bagian seri untuk ekstraksi DNA.
- Kikis lebih parafin dari jaringan dengan pisau bedah yang baru dan steril.

Penyimpanan

Simpan blok FFPE dan kaca mikroskop pada suhu ruang. Kaca mikroskop dapat disimpan pada suhu sekitar hingga 4 minggu sebelum ekstraksi DNA.

DNA genomik dapat disimpan pada suhu 2–8°C selama 1 minggu pasca ekstraksi, dan pada suhu –25 hingga –15°C sampai 8 minggu sebelum digunakan.

Prosedur

Ekstraksi DNA

Karakteristik kinerja untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dihasilkan menggunakan DNA yang diekstrak dengan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (no. kat. 56404). Jika menggunakan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, lakukan ekstraksi DNA sesuai dengan petunjuk dalam buku pegangan yang menyatakan hal-hal berikut.

Ekstraksi DNA (sampel CRC)

- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit hanya boleh digunakan secara manual.
- Jangan gunakan tahap RNase yang dijelaskan dalam Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Jangan gunakan QIAGEN deparaffinization solution. Hanya gunakan metode xilena/etanol untuk deparafinisasi, seperti yang dijelaskan dalam Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue.
- Pencernaan Proteinase K (tahap 11 dalam Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) harus dilakukan selama 1 jam.
- Sampel harus dielusi menggunakan 200 µl dapar elusi (Buffer ATE) dari QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Ekstraksi DNA (sampel NSCLC)

- Gunakan bagian 2 x 5 µm per ekstraksi.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit hanya boleh digunakan secara manual.
- Jangan gunakan tahap RNase dalam Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Jangan gunakan QIAGEN deparaffinization solution yang disediakan dalam QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Hanya gunakan metode xilena/etanol untuk deparafinisasi yang dijelaskan dalam Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Pencernaan Proteinase K (tahap 11 dalam Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) harus dilakukan selama 1 jam.
- Tambahkan 60 µl dapar elusi (ATE) dari QIAamp DNA FFPE Tissue Kit dan inkubasi selama 2,5 menit pada suhu ruang.
- Sentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 1 menit.
- Tambahkan lagi 60 µl dapar elusi (ATE) dari QIAamp DNA FFPE Tissue Kit dan inkubasi selama 2,5 menit pada suhu ruang.
- Sentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 1 menit.

Protokol: Penilaian sampel DNA

Protokol ini digunakan untuk menilai total DNA yang dapat diperkuat dalam sampel menggunakan KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) untuk penilaian sampel otomatis.

Catatan: Untuk penilaian sampel manual, lihat Lampiran 1: Protokol Panduan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Poin penting sebelum memulai

- Maksimal 24 sampel yang dapat dinilai menggunakan CTRL yang tersedia.
- Gunakan CTRL untuk menilai DNA sebelum pengujian.

Catatan: Penting untuk menggunakan CTRL seperti yang dijelaskan di bawah untuk penilaian ini dan bukan spektrofotometri atau metode alternatif lain. DNA yang menurun drastis tidak dapat diperkuat meski primer menghasilkan fragmen DNA pendek.

- Untuk penggunaan reagen yang efisien dalam *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, tetapkan batch sampel DNA sejauh mungkin untuk menciptakan proses lengkap. Pengujian sampel secara individu atau dalam jumlah kecil menghabiskan lebih banyak reagen dan mengurangi jumlah keseluruhan sampel yang dapat diuji dengan satu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Pastikan bahwa perangkat lunak *therascreen* KRAS Assay Package yang tepat yang berkaitan dengan versi perangkat lunak Rotor-Gene Q terpasang sebelum pertama kali menggunakan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (lihat Lampiran 2: Pemasangan *therascreen* KRAS Assay Package).

Prosedur

1. Cairkan campuran reaksi kontrol (tabung CTRL), air bebas-nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat (NTC), dan Kontrol Positif (PC) KRAS pada suhu ruang (15–30°C) selama minimal 1 jam.

Catatan: Bawa polimerase DNA Taq (Taq) pada suhu ruang (15–30°C) di waktu yang sama seperti reagen lain (lihat Penyimpanan dan Penanganan Reagen). Sentrifugasi tabung sekejap untuk mengumpulkan enzim di bagian dasar tabung.

Waktu pencairan reagen, pengaturan PCR, dan penyimpanan sebelum memulai proses ditunjukkan dalam Tabel 2.

Catatan: Lakukan pengaturan PCR pada suhu ruang.

Tabel 2. Waktu pencairan, waktu pengaturan PCR, dan suhu penyimpanan

Minimum	Waktu pencairan		Suhu penyimpanan* setelah pengaturan PCR	Maksimal waktu pengaturan PCR dan penyimpanan
		Maksimum		
1 jam		4,5 jam	Suhu ruang (15–30°C)	7 jam
1 jam		4,5 jam	2–8°C	18 jam

* Penyimpanan merujuk pada waktu antara selesainya pengaturan PCR dan dimulainya proses PCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

2. Campurkan reagen yang dicairkan dengan membalik masing-masing tabung 10 kali untuk menghindari konsentrasi garam yang terlokalisasi, lalu sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi pada bagian dasar tabung.

Catatan: Jangan melakukan proses vorteks polimerase DNA Taq (Taq) atau campuran apa pun yang mengandung Taq, karena hal ini dapat menonaktifkan enzim.

3. Siapkan campuran master secukupnya (Campuran Reaksi Kontrol [CTRL] dan DNA Polimerase Taq [Taq]) sesuai dengan volume dalam Tabel 3 untuk hal-hal berikut:
 - Semua sampel DNA
 - 1 reaksi Kontrol Positif (PC) KRAS
 - 1 reaksi air bebas-nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat (NTC)
 - 1 sampel tambahan untuk membiarkan lebih yang memadai untuk pengaturan PCRCampuran master mengandung semua komponen yang diperlukan untuk PCR, kecuali sampel.

Tabel 3. Penyiapan campuran master uji kadar Kontrol

Komponen	Volume
Campuran Reaksi Kontrol (CTRL)	$19,76 \mu\text{l} \times (n+1)^*$
Polimerase DNA <i>Taq</i> (<i>Taq</i>)	$0,24 \mu\text{l} \times (n+1)^*$
Total volume	20 μl /reaksi

* n = Jumlah reaksi (sampel ditambah kontrol).

Siapkan campuran master secukupnya untuk satu sampel tambahan (n+1) untuk membiarkan adanya lebihan yang memadai untuk pengaturan PCR.

Nilai n tidak boleh melebihi 24 (ditambah kontrol) karena 24 adalah jumlah maksimal sampel yang dapat disertakan dalam satu proses.

Catatan: Saat menyiapkan campuran master, Campuran Reaksi Kontrol (CTRL) ditambahkan ke tabung yang relevan terlebih dahulu kemudian polimerase DNA *Taq* (*Taq*) ditambahkan terakhir.

Catatan: Masukkan polimerase DNA *Taq* menggunakan pipet dengan meletakkan ujung pipet secara hati-hati di bawah permukaan cairan agar ujungnya tidak terlapisi lebihan enzim.

4. Letakkan sejumlah tabung 4-strip PCR (tiap strip memiliki 4 tabung) secukupnya dalam blok pemuatan sesuai dengan tata letak dalam Tabel 4. Jangan menutup tabung.

Catatan: Letakkan penutup dalam wadah plastik hingga dibutuhkan.

Tabel 4. Tata letak proses dalam blok pemuatan untuk penilaian sampel DNA

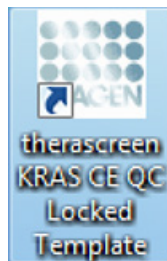
Uji Kadar									
Kontrol	1 (PC)	9	17	25	-	-	-	-	-
Kontrol	2 (NTC)	10	18	26	-	-	-	-	-
Kontrol	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Kontrol	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Kontrol	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Kontrol	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Kontrol	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Kontrol	8	16	24	-	-	-	-	-	-

* Angka menunjukkan posisi dalam blok pemuatan dan menunjukkan posisi akhir rotor.

- Atur pipet hingga volume di bawah total volume campuran master reaksi dan campurkan hingga rata dengan melakukan aspirasi penuh naik dan turun 10 kali.
- Segera tambahkan 20 µl campuran master ke setiap tabung strip PCR.
Catatan: Lihat Tabel 4 untuk tata letak tabung. Untuk penilaian sampel DNA, campuran master uji kadar Kontrol harus ditambahkan ke satu tabung PC, satu tabung NTC, dan satu tabung untuk masing-masing sampel DNA.
- Segera tambahkan 5 µl air bebas-nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat (NTC) ke tabung NTC (posisi tabung 2) lalu tutup tabungnya.
- Tambahkan 5 µl dari setiap sampel DNA ke tabung sampel (posisi tabung 3–26) lalu tutup tabungnya.
- Tambahkan 5 µl dari Kontrol Positif (PC) KRAS ke tabung PC (posisi tabung 1) lalu tutup tabungnya.

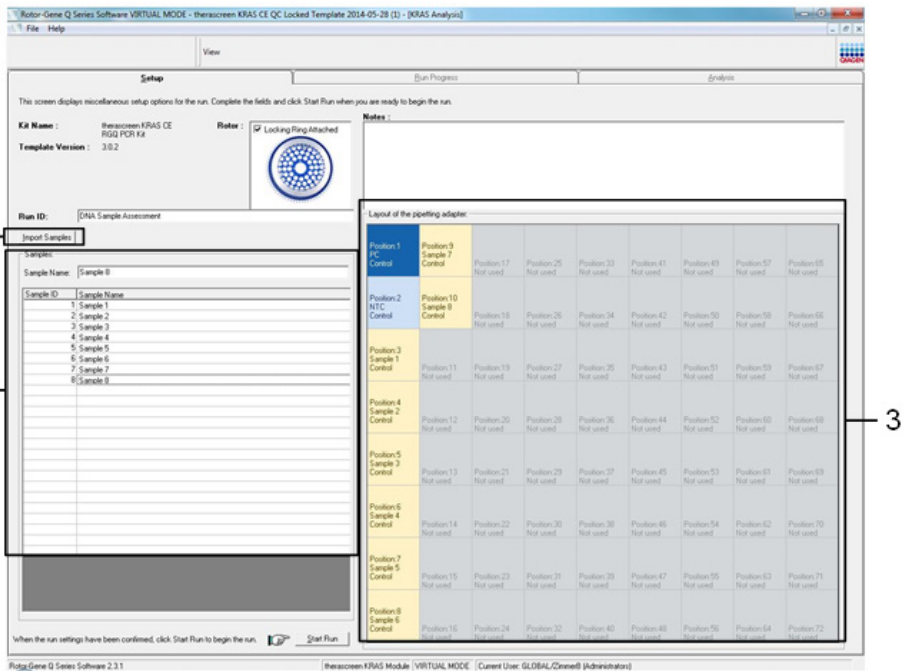
Tiap tabung harus berisi total volume reaksi sebanyak 25 µl (20 µl campuran master yang disiapkan dalam Tabel 3, ditambah 5 µl NTC/sampel/PC).

10. Dengan spidol permanen, tandai penutup tabung pertama dalam posisi numerik terendah dalam tiap tabung 4-strip PCR (misal, posisi 1, 5, dan 9, dst.) untuk menunjukkan orientasi dalam memuat tabung ke dalam rotor 72-sumuran instrumen Rotor Gene Q MDx 5plex HRM.
11. Balikkan tabung yang tertutup 4 kali untuk mencampurkan sampel dan campuran reaksi.
12. Letakkan semua tabung 4 strip PCR ke posisi yang sesuai pada rotor 72-sumuran sesuai dengan tata letak proses (Tabel 4) menggunakan tanda untuk orientasi.
Catatan: Jika rotor tidak terisi penuh, semua posisi yang tidak digunakan pada rotor harus diisi dengan tabung kosong tertutup. Hal ini memastikan agar efisiensi termal instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tetap terjaga.
13. Letakkan rotor 72-sumuran ke dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pastikan ring penguncian (yang disediakan dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) diletakkan di atas rotor untuk mengamankan tabung selama proses berlangsung.
14. Klik dua kali ikon theascreen KRAS QC Locked Template (Templat Terkunci QC theascreen KRAS) di desktop laptop yang terhubung pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Gambar 1) untuk memulai perangkat lunak Rotor Gene Q.



Gambar 1. Ikon “theascreen KRAS QC Locked Template” (Templat Terkunci QC theascreen KRAS).

Tab “Setup” (Pengaturan) muncul sebagai default (Gambar 2).



Gambar 2. Tab "Setup" (Pengaturan) dan kotak "Locking Ring Attached" (Ring Penguncian Terpasang).

1 = Tab "Setup" (Pengaturan), 2 = Kotak "Locking Ring Attached" (Ring Penguncian Terpasang).

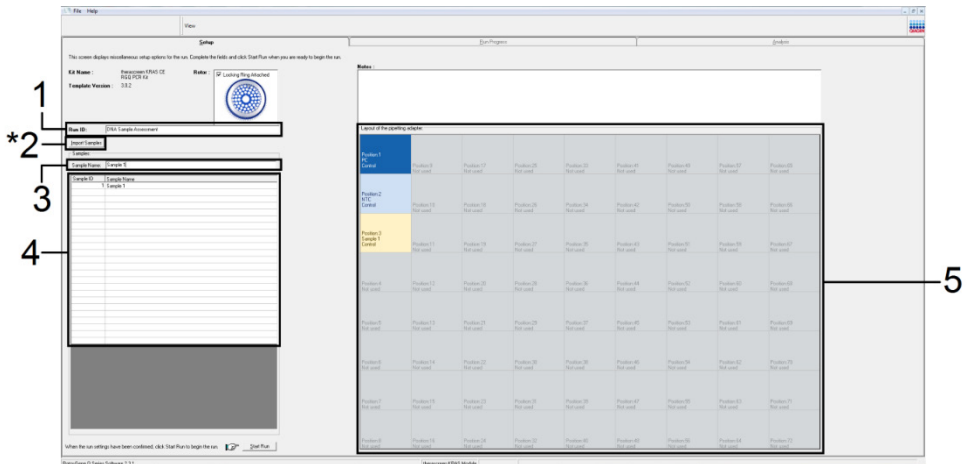
15. Pastikan bahwa ring penguncian terpasang dengan benar lalu centang kotak "Locking Ring Attached" (Ring Penguncian Terpasang). Tutup penutup instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Masukkan ID proses dalam bidang Run ID (ID Proses) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda. Masukkan nama sampel dalam bidang Sample Name (Nama Sampel) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali).

Ini akan menambahkan nama sampel ke daftar sampel di bawah dan menetapkan "Sample ID" (ID Sampel) untuk sampel (1, 2, 3, dst.). Selain itu, panel "Layout of the pipetting adapter" (Tata letak adaptor pipet) di sebelah kanan akan diperbarui untuk menyertakan nama sampel (Gambar 3).

Selain itu, nama sampel yang disimpan dalam format *.smp (file sampel Rotor-Gene Q) atau *.csv (comma separated values (nilai yang dipisahkan koma)) dapat diimpor menggunakan tombol Import Samples (Impor Sampel). Nama sampel akan terisi otomatis menggunakan metode ini.

Catatan: Dalam panel Layout (Tata letak) adaptor pipet, periksa bahwa tambahan nama sampel telah disoroti dengan adanya perubahan warna dan bahwa nama sampel berada dalam posisi sampel (Gambar 3).

Catatan: Nama sampel yang mengandung lebih dari 8 karakter mungkin tidak ditampilkan penuh dalam panel Layout (Tata letak) adaptor pipet.

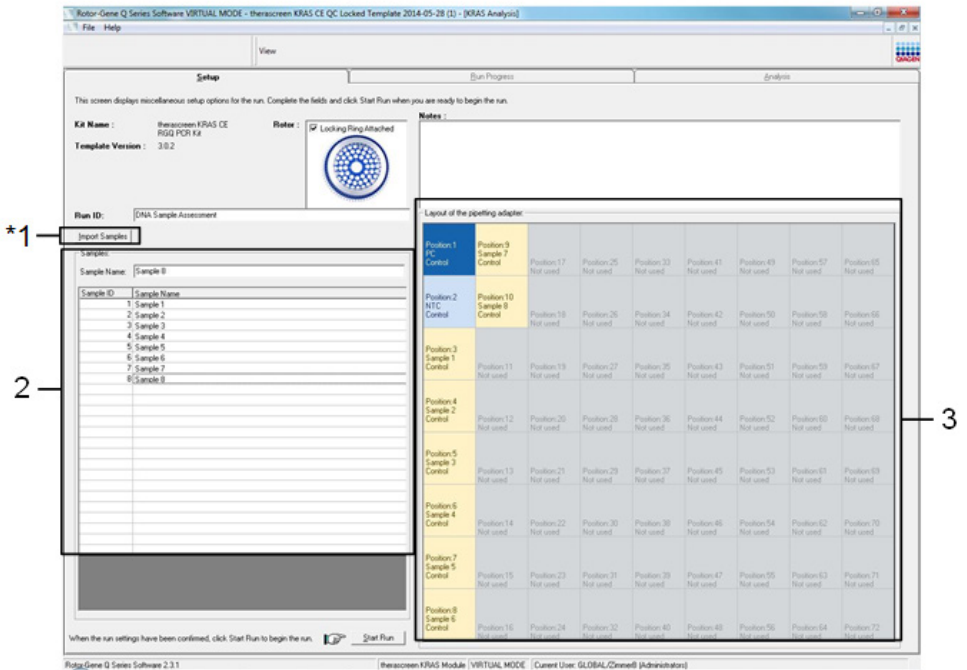


Gambar 3. Memasukkan "Run ID" (ID Proses) dan "Sample Name" (Nama Sampel).

1 = bidang dialog "Run ID" (ID Proses), 2 = tombol "Import Sample" (Impor Sampel), 3 = bidang dialog "Sample Name" (Nama Sampel), 4 = Daftar Sampel, 5 = Panel "Layout of the pipetting adapter" (Tata letak adaptor pipet).

17. Ulangi tahap 16 untuk memasukkan nama semua sampel tambahan (Gambar 4).

Catatan: Untuk mengedit nama sampel, klik "Sample Name" (Nama Sampel) dalam daftar sampel lalu sampel yang terpilih akan muncul dalam bidang dialog "Sample Name" (Nama Sampel) di atas. Edit nama sampel sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali) untuk memperbarui nama.

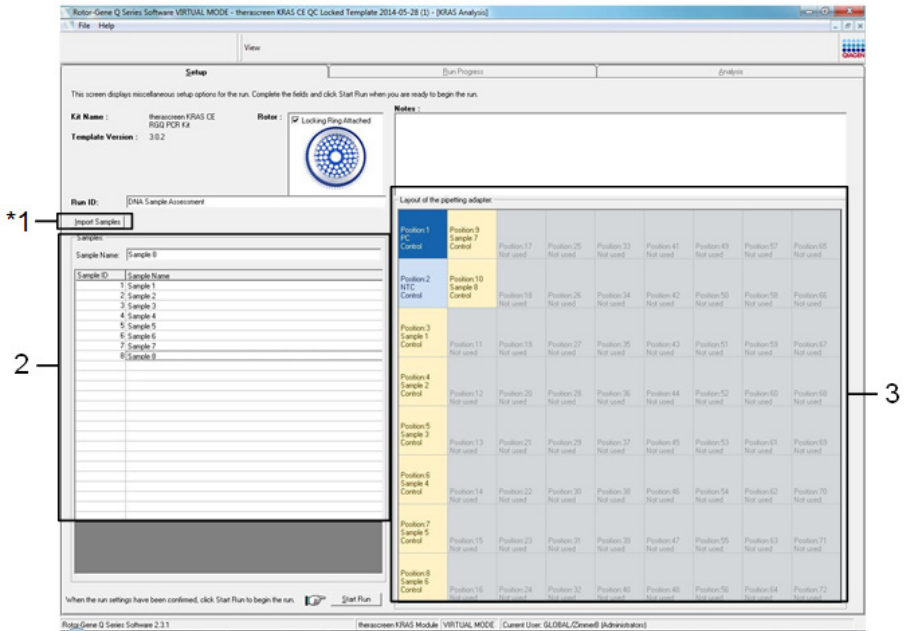


Gambar 4. Memasukkan nama sampel tambahan dalam bidang dialog "Sample Name" (Nama Sampel). *

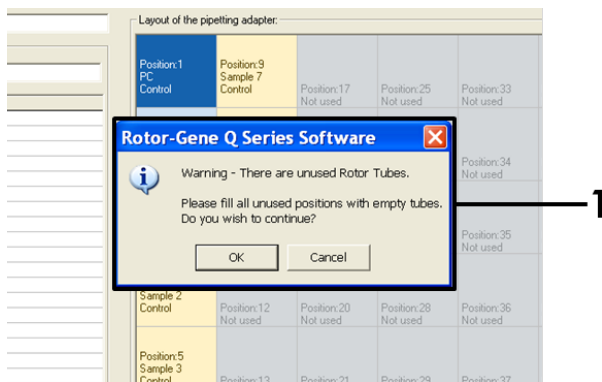
1 = tombol "Import Sample" (Impor Sampel), 2 = bidang dialog "Sample Name" (Nama Sampel) dan Daftar Sampel, 3 = Panel "Layout of the pipetting adapter" (Tata letak adaptor pipet) dengan nama sampel tambahan.

18. Jika semua nama sampel sudah dimasukkan, periksa apakah sudah benar. Tambahkan informasi lain dalam bidang Notes (Catatan) bila perlu, lalu klik Start Run (Mulai Proses) (Gambar 5).

Catatan: Jika ada posisi rotor yang tidak digunakan, "Warning" (Peringatan) akan muncul (Gambar 5 dan Gambar 6) untuk mengingatkan pengguna bahwa semua posisi yang tidak digunakan pada rotor harus diisi dengan tabung kosong tertutup. Periksa bahwa semua posisi rotor yang tidak digunakan terisi dengan tabung kosong tertutup lalu klik OK (Oke) untuk memproses.

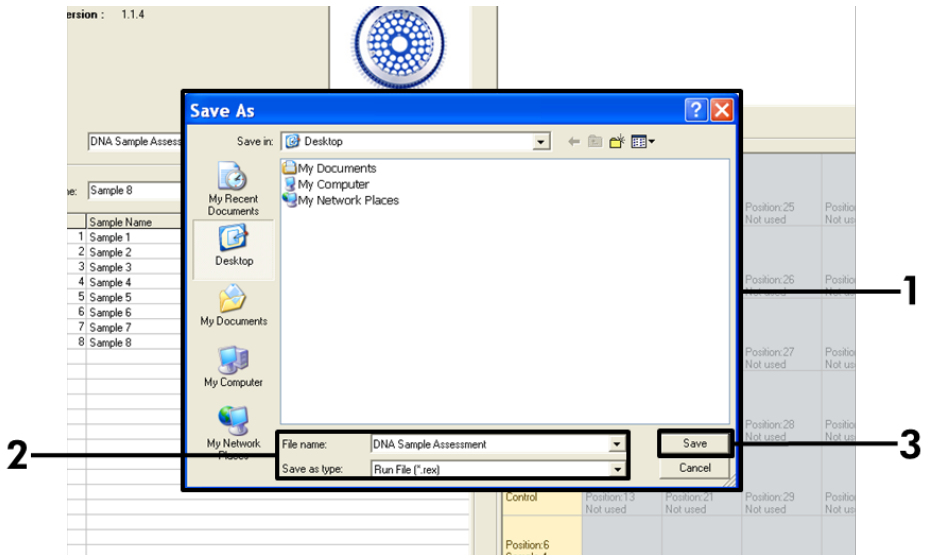


Gambar 5. Bidang dialog “Notes” (Catatan), “Start Run” (Mulai Proses), dan “Warning” (Peringatan) posisi rotor yang tidak digunakan.



Gambar 6. 1 = “Warning” (Peringatan) posisi rotor yang tidak digunakan.

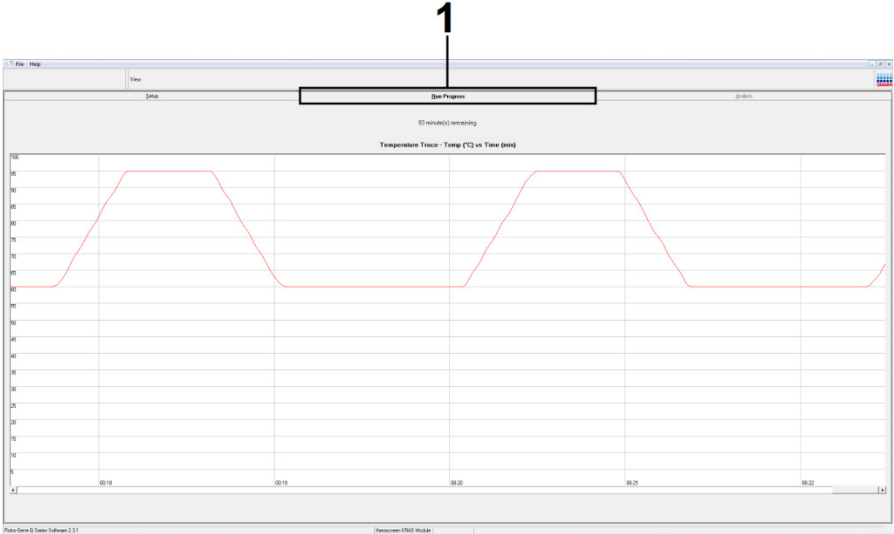
19. Muncul jendela "Save As" (Simpan Sebagai). Pilih nama file yang sesuai lalu simpan proses PCR sebagai file proses *.rex pada lokasi yang dipilih. Klik Save (Simpan) (Gambar 7).



Gambar 7. Menyimpan file proses. 1 = jendela "Save As" (Simpan Sebagai),
2 = Nama file dan simpan sebagai tipe file *.rex, 3 = "Save" (Simpan).

Proses PCR dimulai.

Catatan: Saat proses berjalan, tab "Run Progress" (Proses Operasi) akan otomatis terbuka untuk menampilkan jejak suhu dan sisa waktu proses (Gambar 8).



Gambar 8. Tab Run Progress (Proses Operasi).

Setelah proses selesai, tab "Analysis" (Analisis) akan otomatis terbuka.

Catatan: Jika tab "Analysis" (Analisis) gagal terbuka, klik tab "Analysis" (Analisis) (Gambar 9).

Catatan: Penjelasan metode perhitungan disajikan dalam bab "Interpretasi Hasil".

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771070B	29.39	-	Valid
4	03771071B	27.38	-	Valid
5	03771072B	30.07	-	Valid
6	03771073B	26.53	-	Valid
7	03771074B	29.55	-	Valid
8	03771075B	28.45	-	Valid
9	03771076B	29.95	-	Valid
10	03771077B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771079B	28.93	-	Valid
13	03771081B	29.60	-	Valid
14	03771082B	31.44	-	Valid
15	03771083B	31.02	-	Valid
16	03771084B	29.09	-	Valid
17	03771085B	29.91	-	Valid
18	03771087B	30.33	-	Valid
19	03771088B	30.22	-	Valid
20	03771089B	27.17	-	Valid
21	03771090B	29.67	-	Valid
22	03771091B	29.32	-	Valid
23	03771092B	29.22	-	Valid
24	03771093B	29.57	-	Valid
25	03771094B	29.80	-	Valid
26	03771095B	30.41	-	Valid

Gambar 9. Tab “Analysis” (Analisis) dan pelaporan hasil. 1 = tab “Analysis” (Analisis), 2 = “Sample QC Result Table” (Tabel Hasil QC Sampel).

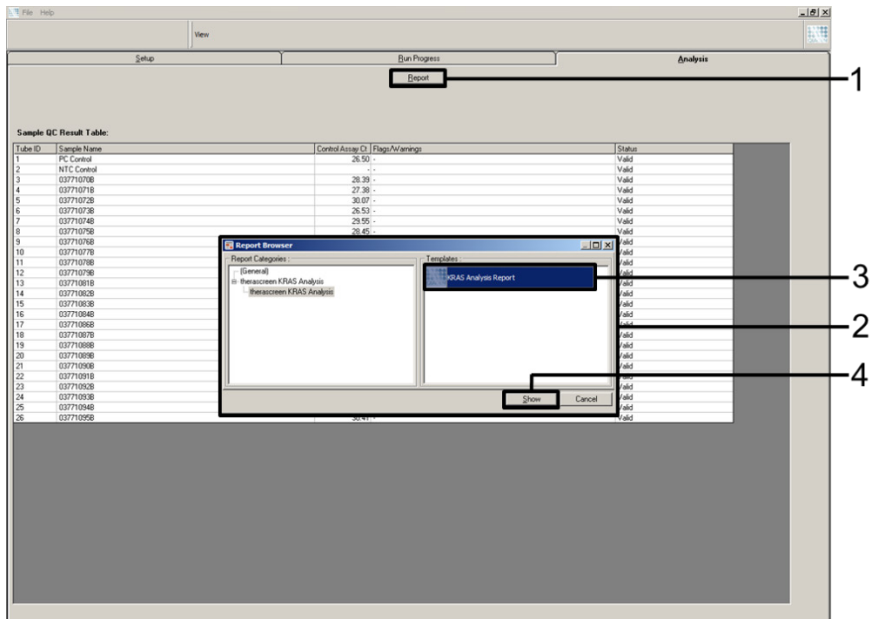
Catatan: Hasil kontrol akan dilaporkan sebagai berikut dalam “Sample QC Result Table” (Tabel Hasil QC Sampel) (2 dalam Gambar 9).

- Kontrol proses (PC dan NTC, tabung posisi 1 dan 2, masing-masing): “Valid” akan ditampilkan jika hasil berada dalam rentang yang dapat diterima. Jika tidak, hasil “Invalid” (Tidak Valid) akan muncul.
- C_T reaksi kontrol sampel $>32,00$: “Invalid” (Tidak Valid) ditampilkan. Jumlah DNA tidak memadai untuk analisis mutasi. Uji ulang sampel. Jika jumlah DNA masih belum memadai, ekstrak beberapa jaringan tumor jika tersedia (lihat “Panduan Pemecahan Masalah”).
- C_T reaksi kontrol sampel $<21,92$: “Invalid” (Tidak Valid) ditampilkan. Konsentrasi DNA terlalu tinggi untuk analisis mutasi. Encerkan dengan Air Bebas-Nuklease untuk Pengenceran (Dil.) lalu uji ulang. Encerkan menjadi C_T sebesar 21,92–32,00. Pengenceran 1:1 meningkatkan nilai C_T sebesar kurang lebih 1,0.
- C_T reaksi kontrol sampel sebesar 21,92–32,00 ($21,92 \leq C_T \text{ kontrol} \leq 32,00$): “Valid” akan ditampilkan jika konsentrasi DNA sesuai untuk analisis mutasi.

Catatan: Jika diperlukan pengenceran atau ekstraksi ulang, ulangi reaksi kontrol untuk memastikan bahwa konsentrasi DNA sesuai untuk digunakan.

20. Untuk membuat file laporan, klik Report (Laporan). Jendela "Report Browser" (Browser Laporan) akan muncul. Pilih KRAS Analysis Report (Laporan Analisis KRAS) pada Templates (Templat), lalu klik Show (Tampilkan) (Gambar 10).

Catatan: Laporan dapat disimpan di lokasi alternatif dalam format Arsip Web dengan mengklik tombol Save As (Simpan Sebagai) di sudut kiri atas laporan masing-masing.



Gambar 10. Memilih "KRAS Analysis Report" (Laporan Analisis KRAS).

1 = "Report" (Laporan), 2 = jendela "Report Browser" (Browser Laporan), 3 = pilihan "KRAS Analysis Report" (Laporan Analisis KRAS), 4 = "Show" (Tampilkan).

Protokol: Deteksi mutasi KRAS

Protokol ini adalah untuk deteksi mutasi KRAS.

Poin penting sebelum memulai

- Sampel dapat diuji menggunakan uji kadar mutasi KRAS setelah lolos penilaian sampel.
- Untuk penggunaan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit yang efisien, sampel harus dikelompokkan ke dalam batch yang terdiri dari 7 masing-masing (untuk mengisi rotor 72-sumuran). Ukuran batch yang lebih kecil berarti sampel yang lebih sedikit dapat diuji dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Pastikan bahwa perangkat lunak *therascreen* KRAS Assay Package yang tepat yang berkaitan dengan versi perangkat lunak Rotor-Gene Q terpasang sebelum pertama kali menggunakan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (lihat Lampiran 2: Pemasangan *therascreen* KRAS Assay Package).

Prosedur

1. Beri label 8 tabung mikrosentrifugasi (tidak disediakan) sesuai dengan campuran reaksi terkait yang ditunjukkan dalam tabel di bawah. Siapkan campuran master secukupnya (campuran reaksi mutasi atau kontrol [tabung CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, atau 13ASP] dan polimerase DNA *Taq* [*Taq*]) untuk sampel DNA, satu reaksi Kontrol Positif (tabung PC) KRAS, dan satu air bebas-nuklease untuk reaksi kontrol tanpa templat (tabung NTC) sesuai dengan volume dalam tabel. Sertakan reagen untuk 1 sampel tambahan untuk membiarkan kelebihan yang memadai untuk pengaturan PCR. Campuran master mengandung semua komponen yang diperlukan untuk PCR kecuali sampel.

Tabung campuran reaksi dan uji kadar	Volume campuran reaksi	Volume polimerase DNA Taq
Kontrol (tabung CTRL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ALA (tabung 12ALA)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ASP (tabung 12ASP)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ARG (tabung 12ARG)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12CYS (tabung 12CYS)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12SER (tabung 12SER)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12VAL (tabung 12VAL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
13ASP (tabung 13ASP)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

* n = jumlah reaksi (sampel ditambah kontrol).

Siapkan campuran master secukupnya untuk 1 sampel tambahan (n + 1) untuk membiarkan adanya lebihan yang memadai untuk pengaturan PCR. Nilai n tidak boleh melebihi 7 (ditambah kontrol) karena 7 adalah jumlah maksimal sampel yang dapat disertakan dalam satu proses.

2. Campurkan reagen yang telah dicairkan dengan membalikkan tabung masing-masing 10 kali untuk menghindari konsentrasi garam yang terlokalisasi. Sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi di bagian dasar tabung.
 3. Atur pipet hingga volume di bawah total volume campuran reaksi dan campurkan campuran master hingga rata dengan melakukan aspirasi penuh naik dan turun 10 kali.
 4. Segera tambahkan 20 μl campuran master ke setiap tabung strip PCR yang sesuai.
- Catatan: Lihat Tabel 5 untuk tata letak tabung selagi menyiapkan campuran reaksi. Untuk deteksi mutasi KRAS, campuran master harus ditambahkan ke 8 tabung PC, 8 tabung NTC, dan 8 tabung untuk sampel DNA masing-masing.

Tabel 5. Tata letak proses dalam blok pemuatan untuk deteksi mutasi KRAS

Uji Kadar	Kontrol		Nomor sampel						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

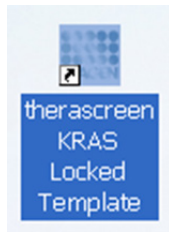
* Angka menunjukkan posisi dalam blok pemuatan dan menunjukkan posisi akhir rotor.

5. Segera tambahkan 5 µl air bebas-nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat (NTC) ke tabung NTC (posisi tabung 9–16) lalu tutup tabungnya.
6. Tambahkan 5 µl dari setiap sampel DNA ke tabung sampel (posisi tabung 17–72) lalu tutup tabungnya.
7. Tambahkan 5 µl dari Kontrol Positif (PC) KRAS ke tabung PC (posisi tabung 1–8) lalu tutup tabungnya.
8. Dengan spidol permanen, tandai penutup tabung pertama dalam posisi numerik terendah dalam tiap tabung 4-strip PCR (misal, posisi 1, 5, dan 9, dst.) untuk menunjukkan orientasi dalam memuat tabung ke dalam rotor 72-sumuran instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Balikkan tabung yang tertutup 4 kali untuk mencampurkan sampel dan campuran reaksi.
10. Letakkan semua tabung 4-strip PCR ke posisi yang sesuai pada rotor 72-sumuran sesuai dengan tata letak proses(Tabel 5) menggunakan tanda untuk orientasi.

Catatan: Maksimal 7 sampel dapat disertakan dalam setiap proses PCR. Jika rotor tidak terisi penuh, semua posisi yang tidak digunakan pada rotor harus diisi dengan tabung

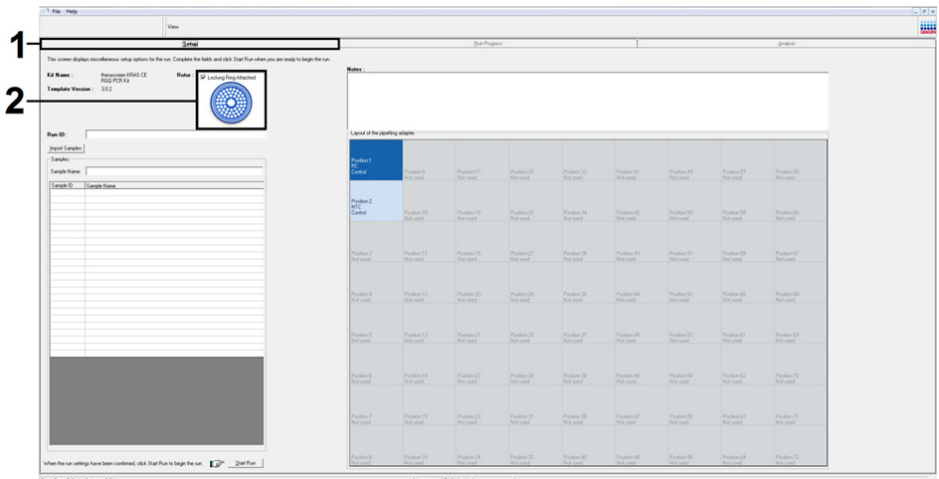
kosong tertutup. Hal ini memastikan agar efisiensi termal instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tetap terjaga.

11. Letakkan rotor 72-sumuran ke dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pastikan ring penguncian, (yang disediakan dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) diletakkan di atas rotor untuk mengamankan tabung selama proses berlangsung.
12. Klik dua kali ikon thetascreen KRAS Locked Template (Templat Terkunci thetascreen KRAS) di desktop laptop yang terhubung pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Gambar 11) untuk memulai perangkat lunak Rotor Gene Q MDx 5plex HRM.



Gambar 11. Ikon “therascreen KRAS Locked Template” (Templat Terkunci thetascreen KRAS).

Tab “Setup” (Pengaturan) muncul sebagai default (Gambar 12).



Gambar 12. 1= Tab “Setup” (Pengaturan) dan 2 = kotak “Locking Ring Attached” (Ring Penguncian Terpasang).

13. Pastikan bahwa ring penguncian terpasang dengan benar lalu centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Tutup penutup instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
14. Masukkan ID proses dalam bidang Run ID (ID Proses) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda.
15. Masukkan nama sampel dalam bidang Sample Name (Nama Sampel) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali).

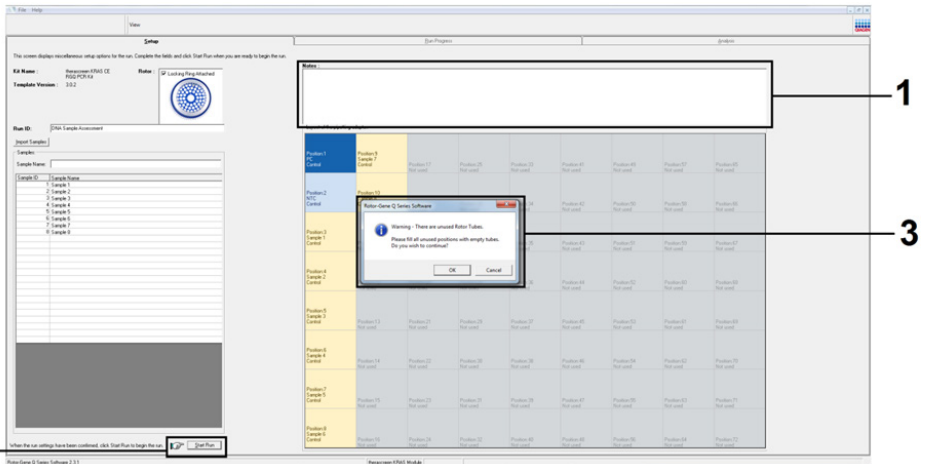
Ini akan menambahkan nama sampel ke daftar sampel di bawah dan menetapkan "Sample ID" (ID Sampel) untuk sampel (1, 2, 3, dst.). Selain itu, panel "Layout of the pipetting adapter" (Tata letak adaptor pipet) di sebelah kanan akan diperbarui untuk menyertakan nama sampel (Gambar 13).

Catatan: Dalam panel Layout (Tata letak) adaptor pipet, periksa bahwa tambahan nama sampel telah disoroti dengan adanya perubahan warna dan bahwa 8 uji kadar dalam kolom di bawah lingkaran sampel disoroti (Gambar 13).

Catatan: Maksimum 7 sampel dapat ditambahkan. ID sampel (dalam lingkaran sampel) akan otomatis ditetapkan mulai 1 hingga 7.

Catatan: Nama sampel yang mengandung lebih dari 8 karakter mungkin tidak ditampilkan penuh dalam panel "Layout of the pipetting adapter" (Tata letak adaptor pipet).

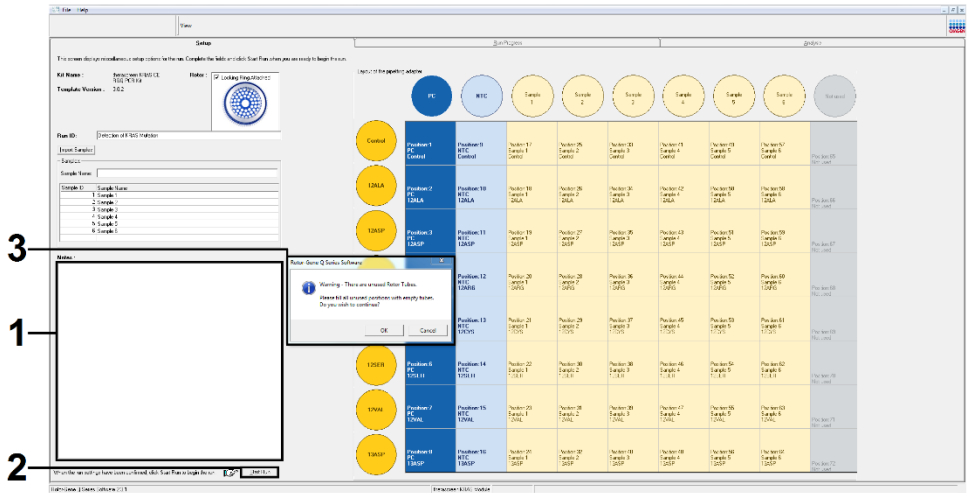
Selain itu, nama sampel yang disimpan dalam format *.smp (file sampel Rotor-Gene Q) atau *.csv (comma separated values (nilai yang dipisahkan koma)) dapat diimpor menggunakan tombol Import Samples (Impor Sampel). Nama sampel akan terisi otomatis menggunakan metode ini.



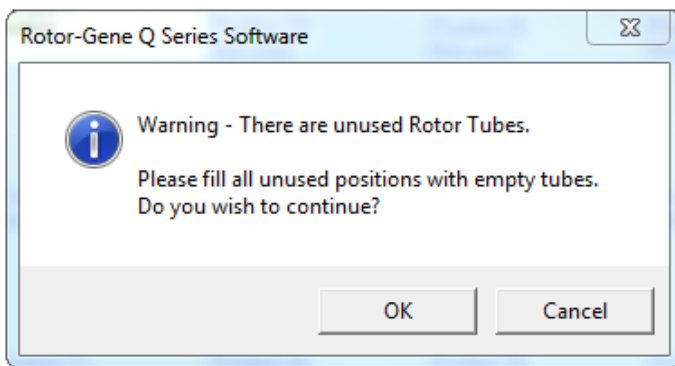
Gambar 14. Memasukkan nama sampel tambahan dalam bidang dialog “Sample Name” (Nama Sampel). 1 = bidang dialog “Sample Name” (Nama Sampel), 2 = Daftar Sampel, 3 = panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet) dengan nama sampel tambahan.

17. Jika semua nama sampel sudah dimasukkan, periksa apakah sudah benar. Tambahkan informasi lain dalam bidang Notes (Catatan) bila perlu, lalu klik Start Run (Mulai Proses) (Gambar 15).

Catatan: Jika ada posisi rotor yang tidak digunakan, “Warning” (Peringatan) akan muncul (Gambar 15 dan Gambar 16) untuk mengingatkan pengguna bahwa semua posisi yang tidak digunakan pada rotor harus diisi dengan tabung kosong tertutup. Periksa bahwa semua posisi rotor yang tidak digunakan terisi dengan tabung kosong tertutup lalu klik OK (Oke) untuk memproses.

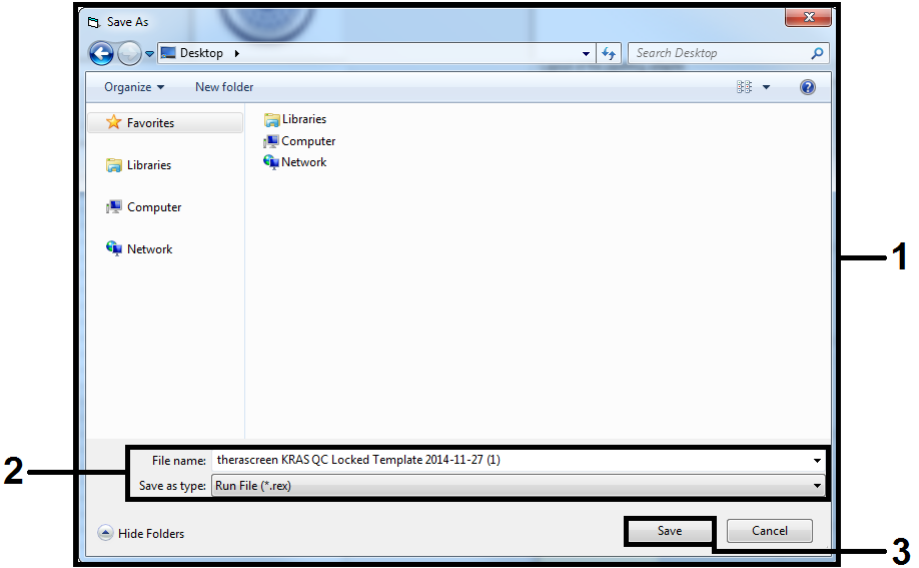


Gambar 15. 1 = bidang dialog “Notes” (Catatan), 2 = “Start Run” (Mulai Proses), dan 3 = “Warning” (Peringatan) posisi rotor yang tidak digunakan.



Gambar 16. “Warning” (Peringatan) posisi rotor yang tidak digunakan.

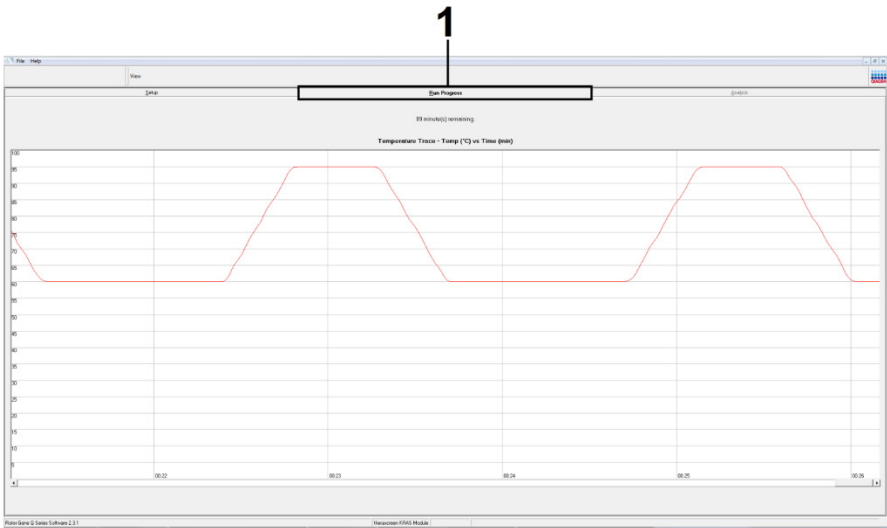
18. Di jendela Save As (Simpan Sebagai), pilih nama file yang sesuai lalu simpan proses PCR sebagai file proses *.rex pada lokasi yang dipilih (Gambar 17).



Gambar 17. Menyimpan file proses.

Proses PCR dimulai.

Catatan: Saat proses berjalan, tab "Run Progress" (Proses Operasi) akan otomatis terbuka untuk menampilkan jejak suhu dan sisa waktu proses (Gambar 18).

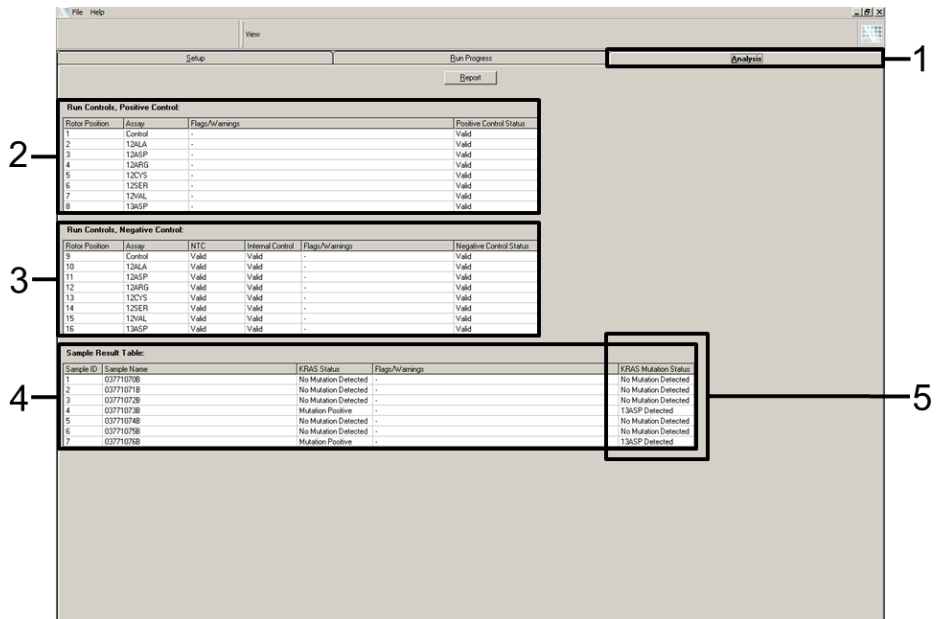


Gambar 18. Tab “Run Progress” (Proses Operasi).

Setelah proses selesai, tab “Analysis” (Analisis) akan otomatis terbuka.

Catatan: Jika tab “Analysis” (Analisis) gagal terbuka, klik tab “Analysis” (Analisis) (Gambar 19).

Catatan: Penjelasan metode perhitungan disajikan dalam bab “Interpretasi Hasil”.



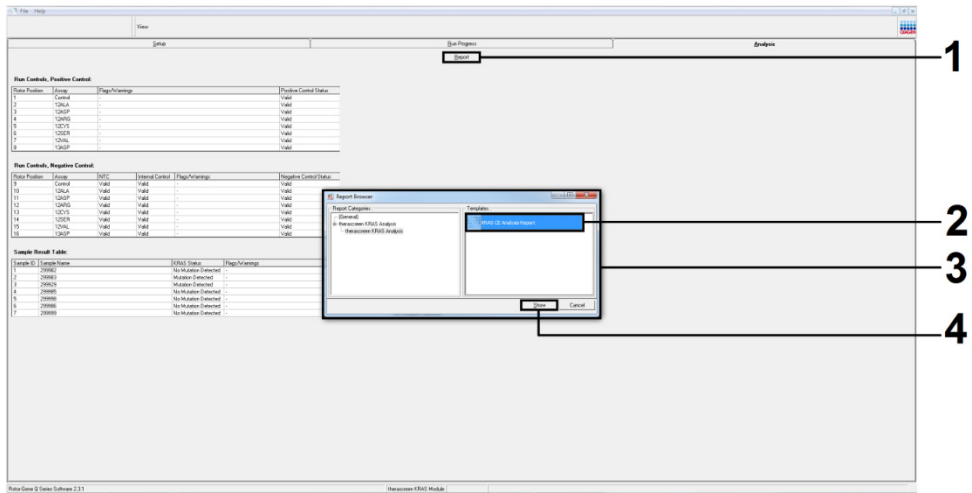
Gambar 19. Tab “Analysis” (Analisis) dan pelaporan hasil. 1 = tab “Analysis” (Analisis), 2 = panel “Run Controls, Positive Control” (Kontrol Proses, Kontrol Positif), 3 = panel “Run Controls, Negative Control” (Kontrol Proses, Kontrol Negatif), 4 = “Sample Result Table” (Tabel Hasil Sampel), 5 = kolom “KRAS Mutation Status” (Status Mutasi KRAS).

Hasil uji kadar akan dilaporkan sebagai berikut (Gambar 19).

- Panel “Run Controls, Positive Control” (Kontrol Proses, Kontrol Positif): Jika hasil berada dalam rentang yang dapat diterima, “Positive Control Status” (Status Kontrol Positif) akan menampilkan “Valid”, dan jika tidak maka hasil “Invalid” (Tidak Valid) akan muncul.
- Panel “Run Controls, Negative Control” (Kontrol Proses, Kontrol Negatif): Jika hasil “NTC” dan “Internal Control” (Kontrol Internal) berada dalam rentang yang dapat diterima, “Negative Control Status” (Status Kontrol Negatif) akan menampilkan “Valid”, dan jika tidak maka hasil “Invalid” (Tidak Valid) akan muncul.
- Panel “Sample Result Table” (Tabel Hasil Sampel): Mutasi spesifik akan dilaporkan untuk sampel Positif Mutasi dalam kolom “KRAS Mutation Status” (Status Mutasi KRAS).

19. Untuk membuat file laporan, klik Report (Laporan). Jendela “Report Browser” (Browser Laporan) akan muncul. Pilih KRAS Analysis Report (Laporan Analisis KRAS) pada Templates (Templat), lalu klik Show (Tampilkan) (Gambar 20).

Catatan: Laporan dapat disimpan di lokasi alternatif dalam format Arsip Web dengan mengeklik Save As (Simpan Sebagai) di sudut kiri atas laporan masing-masing.



Gambar 20. Memilih “KRAS Analysis Report” (Laporan Analisis KRAS). 1 = “Report” (Laporan), 2 = jendela “Report Browser” (Browser Laporan), 3 = pilihan “KRAS Analysis Report” (Laporan Analisis KRAS), 4 = “Show” (Tampilkan).

Interpretasi Hasil

Panggilan mutasi dan analisis dilakukan secara otomatis oleh *therascreen* KRAS Assay Package setelah proses selesai. Informasi berikut menjelaskan cara *therascreen* KRAS Assay Package membuat panggilan mutasi dan analisis.

Catatan: Untuk analisis manual, lihat Lampiran 1: Protokol Panduan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Siklus PCR di mana fluoresens dari reaksi tertentu melintang terhadap nilai ambang batas ditetapkan sebagai nilai C_T . Nilai C_T menunjukkan jumlah DNA input tertentu. Nilai C_T yang rendah menunjukkan tingkat DNA input yang lebih tinggi, sedangkan nilai C_T yang tinggi menunjukkan tingkat DNA input yang rendah. Reaksi dengan nilai C_T tergolong sebagai amplifikasi positif.

Perangkat lunak Rotor-Gene Q menginterpolasi sinyal fluoresens antara 2 nilai yang tercatat. Dengan demikian, nilai C_T dapat berupa bilangan nyata (tidak terbatas bilangan bulat) dalam rentang 0 hingga 40.

Untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, nilai ambang batas diatur pada 0,05 unit fluoresens relatif. Nilai ini dikonfigurasi dalam *therascreen* KRAS Assay Package untuk saluran fluoresens Hijau dan Kuning. Nilai ambang batas ditentukan selama pengembangan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Perhitungan dilakukan untuk menentukan nilai ΔC_T menggunakan persamaan:

$$\Delta C_T = [\text{nilai } C_T \text{ uji kadar mutasi}] - [\text{nilai } C_T \text{ uji kadar kontrol}]$$

Kontrol proses (kontrol positif, NTC, dan kontrol internal) dinilai untuk memastikan bahwa nilai C_T yang dapat diterima telah terpenuhi, dan reaksi berjalan dengan benar.

Nilai ΔC_T sampel dihitung sebagai selisih antara C_T uji kadar mutasi dan C_T uji kadar kontrol dari sampel yang sama. Sampel digolongkan sebagai positif mutasi jika sampel memberi ΔC_T kurang dari atau sama dengan nilai ΔC_T batas untuk uji kadar tersebut. Di atas nilai ini, sampel dapat mengandung kurang dari persentase mutasi yang dapat dideteksi oleh *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (di luar batasan uji kadar), atau sampel negatif mutasi, yang akan dilaporkan sebagai “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi).

Tidak adanya amplifikasi dalam reaksi mutasi akan dinilai sebagai “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi). Nilai ΔC_T yang dihitung dari amplifikasi latar belakang diharapkan lebih besar dari nilai ΔC_T batas, dan sampel akan digolongkan sebagai “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi).

Hasil uji kadar akan ditampilkan sebagai “Mutation Positive” (Positif Mutasi), “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi), “Invalid” (Tidak Valid), atau, jika kontrol proses gagal, “Run Control Failed” (Kontrol Proses Gagal). Untuk sampel positif-mutasi, mutasi spesifik akan dilaporkan.

Kemungkinan hasil lain yang dapat ditampilkan dibahas dalam “Protokol: Penilaian sampel DNA” buku pegangan ini.

Jarang sekali terjadi tumor yang mengandung lebih dari satu mutasi. Dalam kasus tersebut, mutasi yang menghasilkan nilai ΔC_T terendah akan teridentifikasi.

Panduan Pemecahan Masalah

Panduan pemecahan masalah ini dapat berfungsi untuk memecahkan masalah yang mungkin muncul. Untuk informasi selengkapnya, lihat juga halaman Pertanyaan Umum di Pusat Dukungan Teknis kami: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ilmuwan di Layanan Teknis QIAGEN selalu senang menjawab setiap pertanyaan yang Anda ajukan terkait informasi dan/atau protokol dalam buku pegangan ini atau teknologi uji kadar dan sampel (untuk informasi kontak, hubungi www.qiagen.com).

Komentar dan saran

Hasil tidak valid

- | | |
|---|--|
| a) Kondisi penyimpanan untuk satu atau beberapa komponen tidak mematuhi petunjuk yang diberikan di Penyimpanan dan Penanganan Reagen. | Periksa kondisi penyimpanan dan tanggal kedaluwarsa (lihat label) reagen dan gunakan kit yang baru, bila perlu. |
| b) <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit sudah kedaluwarsa. | Periksa kondisi penyimpanan dan tanggal kedaluwarsa (lihat label kit) dari reagen dan, bila perlu, gunakan Kit baru. |

Sampel NTC menunjukkan hasil positif dalam saluran FAM.

- | | |
|---|--|
| Kontaminasi terjadi selama persiapan PCR. | Ulangi PCR dengan reagen baru dalam replika.
Bila memungkinkan, langsung tutup tabung PCR setelah menambahkan sampel untuk diuji.
Pastikan ruang kerja dan instrumen didekontaminasi secara berkala. |
|---|--|

Tanda yang dibuat oleh *therascreen* KRAS Assay Package

Tabel 6 mencantumkan kemungkinan tanda yang mungkin dibuat oleh *therascreen* KRAS Assay Package, artinya, dan tindakan yang perlu dilakukan.

Tabel 6. Tanda *therascreen* KRAS Assay Package

Tanda	Arti	Tindakan yang perlu dilakukan
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Proses PCR tidak valid — CT FAM di luar rentang untuk kontrol positif dalam reaksi kontrol.	Ulangi seluruh proses PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Proses PCR tidak valid — CT FAM di luar rentang untuk satu atau beberapa reaksi kontrol mutasi.	Ulangi seluruh proses PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Proses PCR tidak valid — Data fluoresens dalam kontrol positif (Campuran Reaksi Kontrol) tidak dapat diinterpretasikan.	Ulangi seluruh proses PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Proses PCR tidak valid — Data fluoresens dalam kontrol positif (campuran reaksi mutasi) tidak dapat diinterpretasikan.	Ulangi seluruh proses PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Proses PCR tidak valid — Kontrol internal di atas rentang untuk kontrol negatif.	Ulangi seluruh proses PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Proses PCR tidak valid — Kontrol internal di bawah rentang untuk kontrol negatif.	Ulangi seluruh proses PCR.
NTC_INVALID_CT	Proses PCR tidak valid — FAM tidak valid (lebih kecil dari batas) untuk kontrol negatif.	Ulangi seluruh proses PCR.
NTC_INVALID_DATA	Proses PCR tidak valid — Data fluoresens dalam kontrol negatif tidak dapat diinterpretasikan.	Ulangi seluruh proses PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Sampel tidak valid — Data fluoresens dalam kontrol sampel tidak dapat diinterpretasikan.	Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampe terkait.

SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Sample Tidak Valid — C _T FAM terlalu rendah dalam kontrol sampel.	Encerkan sampel untuk meningkatkan nilai C _T kontrol. Pengenceran ini harus dihitung dengan asumsi bahwa mengencerkan 1:1 dengan air yang tersedia dalam kit akan meningkatkan C _T sebesar 1.0; setelah sampel diencerkan, atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Sample tidak valid — C _T FAM terlalu tinggi dalam reaksi kontrol sampel.	Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari bagian FFPE baru. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi baru. Jika tidak valid, ulangi ekstraksi kedua ini. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T terlalu tinggi (atau tidak ada C _T) untuk kontrol internal (HEX), negatif-mutasi saluran FAM.	<p>Jika sampel diberi status valid — tidak ada tindakan.</p> <p>Sampel CRC: Jika sampel diberi status tidak valid, atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari bagian FFPE baru. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi baru. Jika tidak valid, ulangi ekstraksi kedua ini. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p> <p>Sampel NSCLC: Jika sampel diberi status tidak valid, encerkan sisa sampel 1 dalam 8 dengan air dari tabung bertanda DIL dengan memastikan volume akhir lebih dari 40 µl (misalnya, 10 µl DNA dan 70 µl air dari tabung bertanda DIL), atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari bagian FFPE baru. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi baru. Jika tidak valid, encerkan sisa sampel 1 dalam 8 dengan air dari tabung bertanda DIL dengan memastikan volume akhir lebih dari 40 µl, lalu uji pengenceran ini. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>

SAMPLE_INT_CTRL _EARLY_CT	Tabung mutasi tidak valid — C _T HEX terlalu rendah untuk sampel (kontrol internal)	<p>Jika sampel diberi status valid — tidak ada tindakan.</p> <p>Jika sampel diberi status tidak valid, atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel.</p> <p>Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari bagian FFPE baru. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi baru. Jika tidak valid, ulangi ekstraksi kedua ini. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>
SAMPLE_INVALID_DATA	Tabung mutasi tidak valid — Data fluoresens dalam kontrol internal tidak dapat diinterpretasikan.	<p>Jika sampel diberi status valid — tidak ada tindakan.</p> <p>Jika sampel diberi status tidak valid, atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel.</p> <p>Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari bagian FFPE baru. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi baru. Jika tidak valid, ulangi ekstraksi kedua ini. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>
MUTATION_EARLY_CT	Tabung mutasi tidak valid — C _T FAM terlalu rendah untuk sampel.	<p>Jika sampel diberi status valid — tidak ada tindakan.</p> <p>Jika sampel diberi status tidak valid, atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel.</p> <p>Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari bagian FFPE baru. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi baru. Jika tidak valid, ulangi ekstraksi kedua ini. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	Satu atau beberapa mutasi untuk satu sampel bersifat valid dan positif; di saat yang sama, satu atau beberapa mutasi untuk sampel yang sama tidak valid (peringatan, bukan kesalahan).	Tidak ada.

Kontrol Kualitas

Sesuai dengan Sistem Manajemen Kualitas bersertifikat ISO dari QIAGEN, setiap *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit telah diuji spesifikasinya yang telah ditentukan untuk memastikan kualitas produk yang konsisten.

Batasan

Pengujian ini dirancang untuk mendeteksi 7 mutasi dalam kodon 12 dan 13 dari gen KRAS. Sampel dengan hasil yang dilaporkan sebagai “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi) dapat menyembunyikan mutasi KRAS yang tidak terdeteksi oleh uji kadar (misalnya, 13CYS).

Deteksi mutasi bergantung pada integritas sampel dan jumlah DNA yang dapat diperkuat yang ada dalam spesimen. Prosedur ini harus diulang apabila penilaian awal DNA dalam sampel menunjukkan bahwa jumlahnya tidak mencukupi atau terlalu tinggi untuk analisis mutasi.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit digunakan dalam prosedur reaksi rantai polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Seperti semua prosedur PCR, sampel dapat terkontaminasi oleh sumber luar DNA dalam lingkungan pengujian dan DNA dalam kontrol positif. Beri perhatian untuk menghindari kontaminasi sampel dan reagen campuran reaksi.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit hanya ditujukan untuk membedakan antara tipe liar dan mutan. Pengujian telah dirancang sedemikian rupa agar setiap reaksi mutan paling sensitif untuk mutasi spesifik yang sedang diukur. Akan tetapi, dalam sampel di mana ada mutasi yang terdeteksi, reaktivitas silang dapat terjadi dengan reaksi mutasi lain. Jika ada lebih dari satu reaksi mutan yang positif, hasilnya adalah reaksi dengan hasil ΔC_T paling rendah.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit hanya divalidasi untuk jaringan NSCLC dan CRC FFPE.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit hanya divalidasi untuk digunakan dengan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Hanya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM yang telah divalidasi untuk digunakan dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Karakteristik Kinerja

Kinerja analitikal

Karakteristik kinerja tertentu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ditentukan oleh studi yang melibatkan sampel jaringan FFPE yang dikumpulkan dari pasien CRC dan pasien NSCLC. Metode pemerolehan untuk sampel NSCLC meliputi biopsi jarum inti (core needle biopsy, CNB), aspirasi jarum halus (fine needle aspirate, FNA), dan reseksi. Untuk setiap tipe sampel, 8 lini sel manusia FFPE, di mana 7 mutasi KRAS yang dikenali tersembunyi terdeteksi oleh uji kadar dan satu KRAS tipe liar (yaitu, tidak ada mutasi pada kodon 12 dan 13) digunakan. Status mutasi sampel dikonfirmasi oleh pembentukan sekuens Sanger dwi-arah.

Batas

Dengan metode yang mengikuti panduan dalam CLSI EP17-A (2004) (8), 225 sampel FFPE diuji untuk menetapkan batas untuk uji kadar. Rentang C_T kontrol reaksi ditetapkan sebagai 21,92 sampai 32,00. Nilai batas, yang didasarkan pada C_T reaksi kontrol yang dikurangi dari C_T reaksi mutan (ΔC_T) ditunjukkan dalam Tabel 7.

Tabel 7 Nilai batas yang ditetapkan untuk tiap uji kadar mutasi.

	Uji kadar mutasi						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Batas ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Batasan kosong

Untuk menilai kinerja *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit pada tidak adanya templat positif mutan, dan untuk memastikan bahwa sampel kosong tidak menghasilkan sinyal analitikal yang dapat mengindikasikan konsentrasi mutasi yang rendah, sampel tanpa templat akan dievaluasi. Hasilnya menunjukkan tidak ada nilai C_T mutan atau kontrol yang dapat dideteksi dalam salah satu tabung reaksi kontrol atau mutasi (nilai C_T kontrol internal semuanya valid).

Perbandingan terhadap metode referensi analitikal: CRC

Dilakukan dua studi untuk menunjukkan kesesuaian dalam status mutasi sampel CRC yang diuji dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit relatif terhadap pembentukan sekuens dwi-arah. Sebanyak 137 sampel FFPE menunjukkan hasil valid untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dan pembentukan sekuens dwi-arah.

Keseluruhan hasil, tidak termasuk 6 sampel sekuens Sanger dwi-arah, ditunjukkan dalam Tabel 8. Tabel 9 menunjukkan analisis kesesuaian antara *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dan pembentukan sekuens dwi-arah.

Tabel 8. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. pembentukan sekuens Sanger dwi-arah

		Panggilan mutasi dengan pembentukan sekuens dwi-arah								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total
Panggilan <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negatif	80	–	–	1	–	–	–	1	82
	Positive 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
	Positive 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
	Positive 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
	Positive 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
	Positive 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	Positive 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
	Positive 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
	Total	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tabel 9. Analisis kesesuaian

Pengukuran kesesuaian	Frekuensi (%)	95% Interval Kepercayaan (CI)
Keseluruhan persentase kesesuaian	152/157 (96,82)	93,69–98,44
Persentase kesesuaian positif	72/74 (96,30)	92,63–98,63
Persentase kesesuaian negatif	80/83 (96,39)	91,65–98,19

Set unik kedua dari sampel dievaluasi untuk menambah data dari studi pertama. Satu set 271 sampel FFPE CRC diperoleh; 250 status mutasi yang tidak dikenali dan 21 sampel status mutasi yang dikenali (untuk memperkaya mutasi langka) dibandingkan dengan pembentukan sekuens dwi-arah Sanger, seperti yang dijelaskan di atas.

Analisis kesesuaian dilakukan pada 247 sampel dengan hasil dwi-arah dan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit yang valid. Terdapat 9 sampel yang tidak sesuai. Secara keseluruhan, kesesuaiannya adalah 96,82%. Data tersebut mendukung kinerja akurat *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (Tabel 10 dan Tabel 11).

Tabel 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. pembentukan sekuens Sanger dwi-arah (studi kedua)

		Panggilan mutasi dengan pembentukan sekuens dwi-arah								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total
Panggilan <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negatif	132	-	-	-	-	1	-	-	133
	Positive 12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10
	Positive 12ARG	5	-	5	-	-	-	-	-	10
	Positive 12ASP	-	-	-	31	-	-	-	-	31
	Positive 12CYS	1	-	-	-	11	-	-	-	12
	Positive 12SER	-	-	-	-	-	13	-	-	13
	Positive 12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27
	Positive 13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11
	Total	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabel 11. Analisis kesesuaian (studi kedua)

Pengukuran kesesuaian	Frekuensi (%)	95% Interval Kepercayaan (Confidence Interval, CI)
Keseluruhan persentase kesesuaian	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Persentase kesesuaian positif	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Persentase kesesuaian negatif	132/140 (94,29)	89,93–97,13

Perbandingan terhadap metode referensi analitikal: NSCLC

Untuk menunjukkan kesesuaian dalam status mutasi sampel NSCLC yang diuji dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ketika dibandingkan dengan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah, sampel NSCLC FFPE klinis diperoleh melalui reseksi, CNB, atau FNA. DNA diekstrak dari tiap sampel sebelum pengujian dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Hasil dari pengujian ini dibandingkan dengan hasil yang diperoleh melalui pembentukan sekuens Sanger dwi-arah.

Sebanyak 360 sampel menunjukkan hasil valid untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah, dengan 340 sampel yang menunjukkan hasil sesuai.

Kesesuaian antara *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah ditunjukkan dalam Tabel 12. Dua sampel menunjukkan panggilan mutasi ganda dengan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah. Karena satu mutasi sama seperti hasil *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, sampel ini digolongkan sebagai sesuai untuk analisis kesesuaian keseluruhan, kesesuaian positif, dan kesesuaian negatif (Tabel 13).

Tabel 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. pembentukan sekuens Sanger dwi-arah

		Panggilan mutasi dengan pembentukan sekuens dwi-arah								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total
Panggilan <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negatif	132	-	-	-	-	1	-	-	133
	Positive 12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10
	Positive 12ALA_12CYS	5	-	5	-	-	-	-	-	10
	Positive 12ARG	-	-	-	31	-	-	-	-	31
	Positive 12ASP									
	Positive 12CYS	1	-	-	-	11	-	-	-	12
	Positive 12SER	-	-	-	-	-	13	-	-	13
	Positive 12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27
	Positive 13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11
	Total	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabel 13. Analisis kesesuaian

Pengukuran kesesuaian	Frekuensi (%)	95% Interval Kepercayaan (Confidence Interval, CI)
Keseluruhan persentase kesesuaian	340/360 (94,44)	92,03–96,29
Persentase kesesuaian positif	79/80 (98,75)	94,21–99,94
Persentase kesesuaian negatif	261/280 (93,21)	90,20–95,51

Batas deteksi (Limit of Detection - LOD)

Rentang kerja untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit didasarkan pada jumlah DNA yang dapat diperkuat dalam spesimen seperti yang ditentukan oleh nilai C_T reaksi kontrol. Rentang input yang tertera ditentukan untuk uji kadar oleh rentang yang telah ditentukan sebelumnya dari C_T kontrol sebesar 21,92 hingga 32,00. LOD adalah persentase minimal DNA mutan yang dapat terdeteksi dalam latar belakang tipe liar jika total DNA yang dapat diperkuat berada dalam rentang input yang tertera dan masih di bawah nilai ΔC_T batas ambang.

CRC

Sebuah studi dilakukan untuk menentukan LOD masing-masing dari 7 reaksi spesifik-mutasi yang disertakan dalam *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, batasan deteksi DNA mutan dalam latar belakang DNA tipe liar ditetapkan sebagai faktor pengenceran terendah di mana 95% replika pengujian untuk tiap sampel positif mutasi ditentukan positif.

Model regresi logistik diterapkan pada tiap uji kadar secara individual untuk set data DNA dengan input tinggi dan input rendah. Dalam model ini, variabel responsnya adalah output biner dari mutasi terdeteksi (deteksi = 1) dan mutasi tidak terdeteksi (deteksi = 0), variabel penjelas berkelanjutannya adalah \log_2 % pengenceran mutasi. LOD dihitung sebagai persen pengenceran mutasi yang memberikan probabilitas terprediksi pada deteksi sebesar 0,95 (Tabel 14).

Tabel 14. Nilai LOD untuk tiap uji kadar mutasi menggunakan lini sel FFPE

Uji Kadar	LOD C ₉₅ (persentase DNA mutan dalam DNA tipe liar)
12ALA	0,77
12ARG	2,56
12ASP	6,43
12CYS	1,47
12SER	5,65
12VAL	1,60
13ASP	6,42

NSCLC

LOD untuk uji kadar *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ditetapkan dan diverifikasi menggunakan jaringan CRC. Hasil LOD ini telah diverifikasi ulang untuk jaringan NSCLC.

Studi tersebut dilakukan dalam 2 sesi. Di Sesi 1, 60 replika 7 lini sel NSCLC FFPE mutan yang mewakili tiap mutasi diencerkan pada LOD uji kadar masing-masing dan diuji. Seluruh 60 replika lini sel FFPE yang valid untuk tiap sampel yang dinilai menunjukkan 100% deteksi untuk reaksi mutasi masing-masingnya pada LOD yang dinilai.

Di Sesi 2, 96 replika sampel NSCLC FFPE klinis, yang mewakili tiap mutasi di 3 metode pemerolehan (reseksi, CNB, dan FNA), diuji setelah pengenceran pada LOD uji kadar masing-masing.

96 replika yang valid untuk 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL, dan 13ASP menunjukkan 100% panggilan yang benar. Uji kadar untuk 12CYS dan 12SER menunjukkan 95,8% deteksi pada LOD.

Hal ini menunjukkan bahwa nilai LOD yang ditentukan sebelumnya terverifikasi untuk semua uji kadar mutasi saat menilai jaringan NSCLC dan sampel cocok-pasien/lini sel FFPE/NSCLC FFPE.

Linearitas dan input DNA

Pengaruh tingkat input DNA terhadap nilai ΔC_T

Jika sampel dengan total tingkat DNA yang berbeda mengandung proporsi DNA mutan yang sama, diharapkan bahwa nilai ΔC_T yang terukur akan tetap konsisten. DNA yang diekstrak dari 8 lini sel FFPE digunakan untuk menyiapkan kumpulan DNA dengan C_T reaksi kontrol yang dapat diperoleh yang paling rendah.

Rentang pengenceran untuk tiap reaksi mutasi dan nilai rata-rata ΔC_T yang diperoleh dari hasil ditunjukkan dalam Tabel 15 dan Tabel 16. Keseluruhan nilai ΔC_T bersifat konsisten di seluruh rentang kerja *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untuk semua uji kadar, yang menunjukkan bahwa tingkat DNA tidak akan berdampak pada keakuratan panggilan mutasi sampel.

Tabel 15. Pengaruh input DNA terhadap nilai ΔC_T pada rentang C_T reaksi kontrol input — lini sel FFPE CRC

Uji Kadar	ΔC_T				
	Pengenceran 1 ~20–21 C_T	Pengenceran 2 ~23–24 C_T	Pengenceran 3 ~26–27 C_T	Pengenceran 4 ~29–30 C_T	Pengenceran 5 ~32–33 C_T
12ALA	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
12ASP*	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
12ARG	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
12VAL	0,29	0,25	0,15	0,26	-0,1
12SER	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
12CYS	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
13ASP	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

* Total jumlah replika untuk 12ASP sebanyak 27.

Tabel 16. Pengaruh input DNA terhadap nilai ΔC_T pada rentang C_T reaksi kontrol input – sampel FFPE NSCLC

Uji Kadar	ΔC_T				
	Pengenceran 1 ~20–21 C_T	Pengenceran 2 ~23–24 C_T	Pengenceran 3 ~26–27 C_T	Pengenceran 4 ~29–30 C_T	Pengenceran 5 ~32–33 C_T
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

* Tidak ada C_T reaksi mutasi yang dihasilkan karena rendahnya konsentrasi DNA, sehingga tidak ada ΔC_T yang dihitung.

Efisiensi amplifikasi/linearitas sebagai fungsi input DNA

Efisiensi amplifikasi dan linearitas PCR untuk tiap reaksi mutasi, relatif terhadap Reaksi Kontrol, di seluruh rentang kerja *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ditunjukkan. Efisiensi amplifikasi dihitung untuk setiap reaksi mutasi dan reaksi kontrol sebagai $[2(-1/\text{kemiringan})] - 1$.

Efisiensi amplifikasi kontrol yang dibandingkan dengan reaksi mutan menunjukkan bahwa ΔC_T , sehingga panggilan mutasi, konsisten di seluruh rentang kerja uji kadar. Ringkasan data ditampilkan dalam Tabel 17 dan Tabel 18.

Efisiensi amplifikasi/linearitas sebagai fungsi persen mutasi

Tujuan studi ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh sampel positif-mutan yang diencerkan secara berurutan terhadap efisiensi amplifikasi, di seluruh rentang kerja *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, yang dimulai dengan tingkat input C_T pada sekitar 22–23 C_T .

Ekstrak DNA dari lini sel FFPE CRC dan sampel NSCLC awalnya dinilai dengan pembacaan OD sebelum melakukan PCR dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Kemudian stok DNA disiapkan untuk C_T Reaksi Kontrol yang berkaitan dengan sekitar $23C_T$. Stok tersebut diencerkan secara berurutan dua kali setiap saat menggunakan DNA tipe liar, guna menjaga agar total DNA tipe liar tetap konstan selagi mengubah persentase DNA mutan dalam templat.

Kumpulan DNA yang cukup untuk 6 replika per mutasi disiapkan. Data C_T dan ΔC_T untuk setiap mutasi di setiap titik pengenceran dihitung. Model regresi linear dipasang dengan C_T reaksi mutasi versus pengenceran input pengenceran DNA \log_2 . Studi menunjukkan bahwa pengenceran mutasi dalam latar belakang konsentrasi DNA tipe liar yang konstan menghasilkan efisiensi amplifikasi yang tidak beragam secara signifikan di luar nilai yang ditentukan dalam studi linearitas di atas.

Tabel 17. Efisiensi amplifikasi dalam reaksi mutasi dan kontrol: Lini sel CRC

Sampel	Perpotongan	Standar kesalahan perpotongan	Kemiringan yang dihitung	Standar kesalahan (kemiringan)	Batas kepercayaan 95% 2-sisi bawah (kemiringan)	Batas kepercayaan 95% 2-sisi atas (kemiringan)	Efisiensi amplifikasi	Selisih dalam efisiensi amplifikasi	
12ALA	C _T Kontrol	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	C _T 12ALA	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	C _T Kontrol	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	C _T 12ARG	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	C _T Kontrol	20,385	0,13 0,065	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	C _T 12ASP	21,347		-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	C _T Kontrol	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	C _T 12CYS	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	C _T Kontrol	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	C _T 12SER	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	C _T Kontrol	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	C _T 12VAL	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	C _T Kontrol	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	C _T 12ASP	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Tabel 18. Efisiensi amplifikasi dalam reaksi mutasi dan kontrol: Sampel NSCLC

Sampel		Perpotongan	Standar kesalahan perpotongan	Kemiringan yang dihitung	Standar kesalahan (kemiringan)	Batas kepercayaan 95% 2-sisi bawah (kemiringan)	Batas kepercayaan 95% 2-sisi atas (kemiringan)	Efisiensi amplifikasi	Selisih dalam efisiensi amplifikasi
12ALA	C _T Kontrol	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94	0,069
	C _T 12ALA	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01	
12ARG	C _T Kontrol	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093
	C _T 12ARG	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04	
12ASP	C _T Kontrol	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001
	C _T 12ASP	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96	
12CYS	C _T Kontrol	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019
	C _T 12CYS	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00	
12SER	C _T Kontrol	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127
	C _T 12SER	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09	
12VAL	C _T Kontrol	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011
	C _T 12VAL	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91	
13ASP	C _T Kontrol	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
	C _T 12ASP	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

Zat yang mengganggu

Tujuan studi ini adalah untuk mengevaluasi dampak zat yang berpotensi mengganggu terhadap kinerja *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Studi ini dilakukan dengan menganalisis dampak zat masing-masing pada nilai ΔC_T dan status mutasi sampel pengujian dengan cara menghentikan melakukan eksperimen di berbagai konsentrasi. Zat yang berpotensi mengganggu dari proses DNA yang diuji adalah Buffer AL, Buffer ATL, etanol, lilin parafin, Proteinase K, Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2, dan xilena. Dapar elusi akhir dari kit, Buffer ATE, juga diuji sebagai kontrol kosong.

Pada konsentrasi yang diharapkan ditemui dalam penggunaan normal, tidak satu pun zat yang berpotensi mengganggu yang dievaluasi berdampak pada kemampuan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dalam membedakan antara sampel positif-mutasi dan negatif-mutasi.

Selain studi zat yang mengganggu, potensi pengaruh nekrosis dalam sampel klinis dinilai untuk menentukan apakah tingkat jaringan nekrosis yang tinggi dalam sampel tumor berdampak pada kemampuan untuk menghasilkan data yang valid. Dari total 421 sampel yang dinilai sebagai bagian dari studi Perbandingan terhadap Metode Referensi Analitikal, 29 sampel memiliki nekrosis pada tingkat >50% seperti yang ditentukan oleh tinjauan patologi. Dari 29 sampel ini, 28 menunjukkan hasil valid yang sesuai dengan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah. Satu hasil tidak valid karena DNA yang tidak memadai.

Kontaminasi silang

Tujuan studi ini adalah untuk menentukan sejauh mana kontaminasi silang antara sampel DNA menggunakan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, yang berpotensi menyebabkan hasil positif-palsu. Sumber yang berpotensi kontaminasi silang mencakup berikut ini:

- Ekstraksi sampel (misal, kikisan kaca mikroskop)
- Penggunaan pipet pada sampel
- Penutupan tabung sampel
- Kontaminasi reagen kit selama penggunaan
- Pemuatan tabung uji kadar pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Untuk studi ini, digunakan standar FFPE: standar tipe liar dan standar 12ALA (karena reaksi 12ALA adalah reaksi dengan LOD terendah dalam kit).

Studi ini terdiri dari 10 proses PCR yang dirancang untuk menyelidiki potensi kontaminasi dalam dan antara proses instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Dalam proses pengujian ini, tabung yang berisi DNA tipe liar digunakan untuk menguji kontaminasi dari DNA mutan.

Hasil dari studi ini menunjukkan tidak ada kontaminasi yang dapat dideteksi dalam ekstrak DNA tipe-liar yang dimaksudkan untuk mendeteksi kontaminasi silang.

Eksklusivitas/reaktivitas silang

therascreen KRAS RGQ PCR Kit terdiri dari 8 reaksi terpisah, yang mencakup reaksi kontrol tunggal yang mendeteksi wilayah non-polimorfis dari gen KRAS dan 7 reaksi spesifik-mutasi. Tidak ada reaksi yang secara spesifik mengukur sekuens KRAS tipe liar pada kodon 12 atau 13. Hasil “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi) KRAS (yakni tipe liar) ditentukan dari tidak adanya salah satu dari 7 mutasi yang menyebabkan hasil mutasi positif.

Sehingga, penting untuk menunjukkan jumlah amplifikasi nonspesifik, atau reaktivitas-silang yang terjadi dalam tiap reaksi dengan lebih jumlah DNA tipe liar KRAS guna memastikan tidak terjadi hasil positif palsu. Serupa dengan hal tersebut, amplifikasi nonspesifik dinilai untuk mutasi KRAS yang tidak dimaksudkan agar dapat dideteksi oleh uji kadar. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah reaktivitas-silang antara reaksi mutan tidak menyebabkan panggilan mutasi yang keliru dalam adanya lebih jumlah DNA mutan. Karena input DNA untuk uji kadar ini didasarkan pada rentang C_T kontrol (21,92–32,00), konsentrasi input DNA tertinggi didasarkan pada adanya nilai C_T kontrol sekitar 22.

Amplifikasi nonspesifik/reaktivitas silang: DNA KRAS tipe liar

Jumlah amplifikasi nonspesifik untuk DNA tipe liar oleh campuran reaksi yang dirancang untuk memperkuat mutasi spesifik telah ditangani. Sebanyak 60 replika DNA lini sel FFPE tipe liar dan 60 sampel NSCLC dievaluasi pada konsentrasi tertinggi tingkat input DNA yang dapat diperkuat menggunakan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Nilai C_T kontrol adalah sekitar 22–23. Hasilnya menunjukkan bahwa nilai ΔC_T melebihi batas yang ditetapkan dan minimal 95% replika tipe liar dipanggil dengan benar.

Amplifikasi nonspesifik/reaktivitas silang/eksklusivitas: DNA KRAS positif-mutasi

Sampel mutan dengan konsentrasi DNA input yang tinggi diuji terhadap semua campuran reaksi. Sampel DNA disiapkan dari setiap lini sel FFPE NSCLC dan CRC agar C_T Reaksi Kontrol sesuai dengan sekitar 23. Dari pengenceran ini, 6 replika tiap sampel mutasi dievaluasi. Persentase mutasi dalam sampel diatur oleh persentase mutan dalam DNA lini sel.

Nilai ΔC_T rata-rata yang disajikan dalam Tabel 19 dan Tabel 20 menunjukkan bahwa terdapat reaktivitas-silang antara reaksi mutan. Di semua kasus, hasilnya menunjukkan bahwa mutasi tepat dipanggil dengan reaksi mutasi yang cocok (yaitu, nilai ΔC_T terkecil adalah panggilan mutasi tepat). Semua kasus pengujian lain tidak terdeteksi atau berada di luar ambang batas ΔC_T .

Tabel 19. Reaktivitas-silang (ΔC_T) antara reaksi mutasi menggunakan DNA lini sel FFPE CRC pada rentang input tinggi

DNA Mutan	Batas	ΔC_T Uji kadar						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42*	12,66	T/A	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42*	T/A	T/A	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12*	11,42	T/A	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98*	T/A	7,96†	12,88
12SER	8	T/A	13,39	13,31	T/A	3,02*	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83†	T/A	T/A	T/A	13,38	0,28*	13,74
13ASP	7,5	T/A	13,29	13,89	T/A	T/A	14,36	4,5*

T/A: Tidak ada reaksi silang.

* Nilai ΔC_T dari reaksi yang cocok.

† ΔC_T dari reaksi reaktif-silang di bawah batas.

Tabel 20. Reaktivitas-silang (ΔC_T) antara reaksi mutasi menggunakan DNA lini sel FFPE NSCLC pada rentang input tinggi

DNA Mutan	Batas	ΔC_T Uji kadar						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,31*	12,8	T/A	5,01†	2,26†	5,57†	12,65
12ASP	6,6	12,61	1,66*	T/A	T/A	T/A	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	0,81*	11,24	T/A	12,66	12,62
12CYS	8	T/A	12,22	7,84†	0,56*	T/A	13,06	11,84
12SER	8	T/A	12,87	13,21	T/A	1,93*	13,25	12,93
12VAL	7,5	5,93†	14,29	T/A	T/A	13,14	0,45*	12,39
13ASP	7,5	T/A	T/A	T/A	T/A	T/A	T/A	2,02*

T/A: Tidak ada reaksi silang.

* Nilai ΔC_T dari reaksi yang cocok.

† ΔC_T dari reaksi reaktif-silang di bawah batas.

Pengulangan dan reproduksibilitas

Tujuan studi ini adalah untuk menunjukkan presisi *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dalam-laboratorium (pengulangan) dan antar-laboratorium (reproduksibilitas). Ketepatan hasil panggilan mutasi dan presisi nilai ΔC_T (selisih dalam nilai C_T antara Reaksi Mutasi dan Reaksi Kontrol) dilaporkan.

CRC

Sampel CRC klinis digunakan untuk evaluasi ini. Satu tipe liar dan satu sampel untuk tiap mutasi diuji dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit menggunakan 2 operator di setiap 3 lokasi masing-masing, yang menguji semua sampel dan kontrol pada 3 lot *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, setiap hari selama 5 hari, dengan 2 proses per hari dan 2 replika dari tiap sampel di tiap proses. Nilai C_T dan ΔC_T yang diperoleh untuk tiap reaksi dalam tiap sampel juga dianalisis dengan analisis komponen beragam.

Reproduksibilitas *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ditunjukkan untuk mutan tingkat rendah (3x LOD) dan sampel tipe liar dengan minimal 39/40 panggilan mutasi tepat untuk semua uji kadar di beberapa lot, platform, dan operator, untuk dalam dan antara laboratorium. Estimasi proporsi 3x pengujian sampel LOD sebagai sampel tipe liar dan mutan dilaporkan secara keseluruhan dan dalam tiap lokasi. Untuk semua kombinasi sampel dan uji kadar, minimal 79 dari 80 replika memberikan panggilan mutasi tepat (Tabel 21).

Tabel 21. Keseluruhan panggilan tepat

Sampel	Panggilan tepat uji kadar mutasi						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mutan 3x LOD	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Tipe liar (rendah)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

NSCLC

Untuk masing-masing dari 7 mutasi NSCLC KRAS, 3 sampel yang mewakili masing-masing dari 3 tipe metode pemerolehan sampel (reseksi, CNB, dan FNA) digunakan. Sebanyak 6 sampel klinis tipe liar tambahan (2 sampel mewakili masing-masing dari 3 tipe metode pemerolehan sampel) digunakan untuk membuat kumpulan pengencer DNA tipe liar.

Beberapa ekstrak dikumpulkan untuk setiap sampel mutasi untuk membuat satu kumpulan sampel per mutasi. Setiap kumpulan sampel mutasi diencerkan untuk menghasilkan sampel pengujian pada tingkat mutasi 1x LOD dan 3x LOD.

Laboratorium yang digunakan dalam studi ini berada di 3 lokasi berbeda. Kondisi laboratorium berbeda-beda di tiap lokasi dengan penggunaan 2 instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 2 operator, 2 lot *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, dan 2 proses per hari (per operator) selama 16 hari tidak berturut-turut.

Untuk semua kombinasi sampel dan uji kadar, minimal 284 dari 288 replika memberikan panggilan mutasi yang tepat. Keseluruhan proporsi panggilan tepat, dengan semua uji kadar dikombinasikan, untuk grup 1x LOD adalah 100%. Keseluruhan proporsi panggilan tepat, dengan semua uji kadar dikombinasikan, untuk grup 3x LOD adalah 99,6%. Keseluruhan proporsi panggilan tepat untuk sampel tidak ada mutasi terdeteksi (tipe liar) adalah 100% (Tabel 22).

Tabel 22. Panggilan tepat untuk 1x LOD, 3x LOD, dan tipe liar

Tingkat mutasi	Uji Kadar	Panggilan tepat	Panggilan tepat, %	CI 90% dua sisi bawah
1x LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3x LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Tipe liar		285/285	100	98,95

Variabilitas penanganan sampel

Tujuan studi ini adalah untuk menilai pengaruh variabilitas penanganan sampel, khususnya ekstraksi DNA, pada *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Studi ini melengkapi studi pengulangan dan reproduksibilitas dengan menganalisis variabilitas penanganan sampel jika bagian FFPE klinis dan bagian lini sel FFPE yang sama diproses di 3 lokasi dilanjutkan dengan pengujian menggunakan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CRC

Tiga puluh bagian berukuran 5 µm yang berurutan dipotong dari masing-masing dari 10 sampel CRC FFPE (3 tipe liar dan 1 per mutasi). Bagian diacak pada di 1 dari 3 lokasi pengujian sehingga tiap lokasi menerima 10 bagian per sampel FFPE (total 100 bagian). Dari 300 ekstraksi DNA yang diuji, 298 sampel valid. Terdapat 99,33% kesesuaian yang berkaitan dengan panggilan mutasi KRAS di antara 3 lokasi.

Perbandingan menurut lokasi dari nilai rata-rata ΔC_T untuk sampel tipe liar dan mutan menunjukkan kesesuaian yang sangat dekat untuk hasil. Hasilnya menunjukkan kesesuaian prosedur ekstraksi DNA dan pemrosesan sampel sehubungan dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

NSCLC

Terdapat 13 sampel NSCLC klinis (3 x 12ASP, 3 x 12CYS, 4 x 12VAL dan 3 tipe-liar) dan 4 sampel lini sel FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER dan 13ASP) yang digunakan dalam studi ini. Sampel mewakili berbagai metode pemerolehan: reseksi bedah, FNA, dan CNB. Lini sel digunakan untuk merepresentasikan mutasi langka di mana jaringan NSCLC klinis tidak tersedia. Tiga batch berisi 20 bagian FFPE kemudian didistribusikan secara acak ke 3 lokasi. Di masing-masing dari 3 lokasi, ekstraksi DNA dilakukan dalam batch berisi 20 bagian FFPE (10 pasang) per mutasi dan tipe liar.

Jika semua penyiapan sampel di 3 lokasi pengujian individual diuji dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, masing-masing dari 7 mutasi dan sampel tipe liar diidentifikasi dengan panggilan mutasi tepat. Keseluruhan panggilan untuk masing-masing dari 7 mutasi dan sampel tipe liar 100% menunjukkan konsistensi antar-lokasi untuk ekstraksi DNA dan deteksi mutasi menggunakan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Kesetaraan metode pemerolehan sampel (NSCLC saja)

Tujuan studi ini adalah untuk menilai apakah panggilan mutasi untuk sampel NSCLC yang ditentukan oleh *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dipengaruhi oleh metode pemerolehan sampel. Ketiga metode pemerolehan sampel yang dinilai dalam studi ini adalah reseksi, FNA, dan CNB.

Untuk studi ini, sampel FNA dan CNB "cocok-pasien" diambil dari sampel tumor reseksi bedah agar tumor yang sama dikumpulkan dengan 3 metode pemerolehan. Sebanyak 169 sampel reseksi, 169 sampel CNB, dan 169 sampel FNA tersedia untuk studi ini.

Tiap sampel diekstrak dan diuji dengan uji kadar Kontrol KRAS. Tiap sampel yang memberikan hasil valid (169 reseksi, 169 CNB, dan 164 FNA) diuji dengan 8 uji kadar KRAS.

Selain itu, untuk masing-masing sampel NSCLC FFPE, DNA terekstrak yang digunakan untuk analisis *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit juga dinilai menggunakan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah untuk menentukan tingkat kesesuaian antara *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dan pembentukan sekuens Sanger dwi-arah. Dari seluruh tipe sampel, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit secara akurat menetapkan status mutasi versus pembentukan sekuens Sanger dwi-arah dengan keseluruhan persentase tingkat kesesuaian sebesar 96,96%.

Hasil dari studi ini menunjukkan bahwa *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit menyediakan hasil setara di seluruh 3 metode pengumpulan yang dipelajari sebagaimana yang ditunjukkan oleh persentase berpasangan keseluruhan tingkat kesesuaian:

- CNB vs. FNA 97,52 (batas kepercayaan 94,41–99,15)
- CNB vs. reseksi 96,39 (batas kepercayaan 92,99–98,41)
- FNA vs. reseksi 98,76 (batas kepercayaan 96,14–99,78)

Referensi

Kutipan referensi

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25, 511.
2. Bachireddy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Referensi yang berguna

Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.

Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.

Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.

De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.

Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.

Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.

Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.

Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.

Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.

Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.

-
- Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.
- Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.
- Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* **120**, 1145.
- Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).
- Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
- Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

Simbol

Simbol berikut ini mungkin terdapat di kemasan dan label:



<N>

Berisi reagen yang cukup untuk reaksi <N>



Gunakan sebelum



Perangkat medis diagnostik in vitro



Nomor katalog



Nomor lot



Nomor materi



Mengandung



Nomor

Rn

R adalah untuk revisi Buku Pegangan dan n adalah nomor revisi



Batas suhu



Produsen



Baca petunjuk penggunaan



Perhatian

Informasi Kontak

Untuk bantuan teknis dan informasi lebih lanjut, silakan lihat Pusat Dukungan Teknis kami di **www.qiagen.com/Support**, hubungi 00800-22-44-6000, atau hubungi salah satu Departemen Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal (lihat sampul belakang atau kunjungi www.qiagen.com).

Lampiran 1: Protokol Panduan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

Bab ini berisi petunjuk untuk menggunakan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dengan perangkat lunak RGQ 2.3 dalam mode terbuka (yakni, tanpa menggunakan KRAS Assay Package).

Informasi umum

- Untuk bahan yang diperlukan, lihat Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia.
- Untuk petunjuk lengkap tentang penyiapan sampel dan tata letak sampel, lihat bab Protokol: Penilaian sampel DNA dan Protokol: Deteksi mutasi KRAS.

Protokol: Membuat profil suhu

Sebelum memulai, buat profil suhu untuk analisis KRAS. Parameter siklus sama untuk Penilaian Sampel dan Penilaian Mutasi.

Prosedur

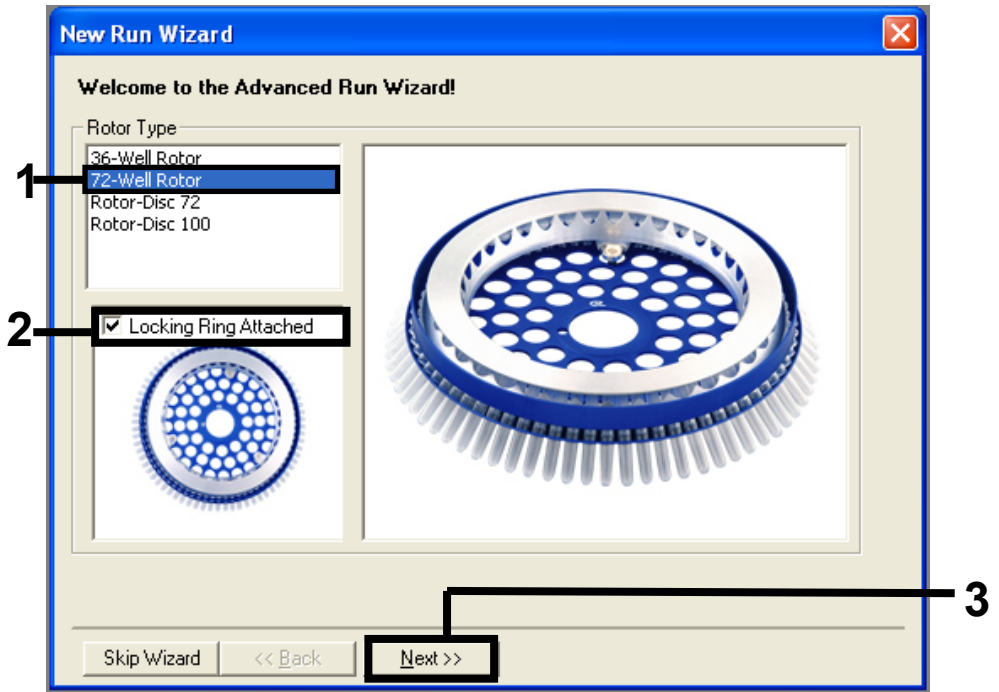
Parameter siklus ditunjukkan dalam Tabel 23.

Tabel 23. Parameter siklus

Siklus	Suhu	Waktu	Pemerolehan data
1	95°C	15 menit	Tidak ada
40	95°C	30 detik	Tidak ada
	60°C	60 detik	Hijau dan kuning

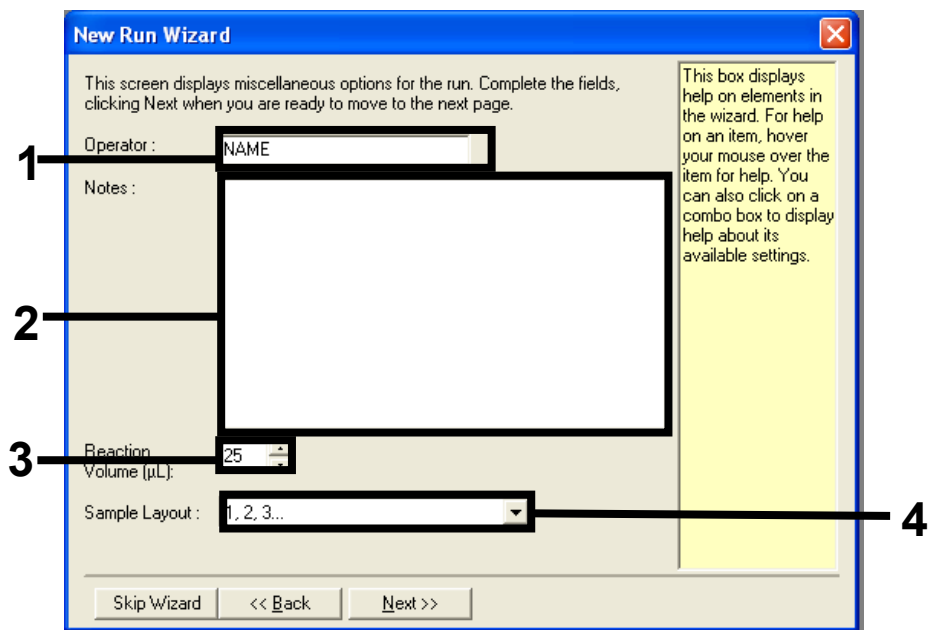
1. Klik dua kali ikon perangkat lunak Rotor-Gene Q Series Software 2.3 pada desktop laptop yang terhubung dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pilih tab "Advanced" (Tingkat Lanjut) dalam jendela New Run (Proses Baru) yang muncul.

2. Untuk membuat templat baru, pilih Empty Run (Proses Kosong), lalu klik New (Baru). Untuk memasukkan New Run Wizard (Wizard Proses Baru).
3. Pilih 72-Well Rotor sebagai tipe rotor. Pastikan bahwa ring penguncian terpasang lalu centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Klik Next (Berikutnya) (Gambar 21).



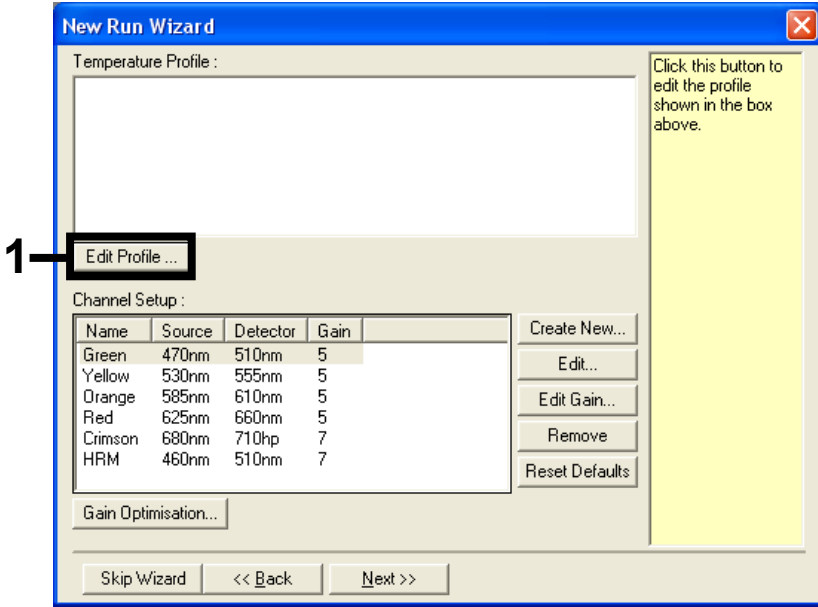
Gambar 21. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru). 1 = “Rotor type (Tipe rotor), 2 = “Locking Ring Attached box” (kotak Ring Penguncian Terpasang), 3 = “Next” (Berikutnya).

4. Masukkan nama operator. Tambahkan catatan apa pun lalu masukkan volume reaksi sebagai 25. Pastikan bahwa bidang Sample Layout (Tata Letak Sampel) berisi nilai 1, 2, 3.... Klik Next (Berikutnya) (Gambar 22).



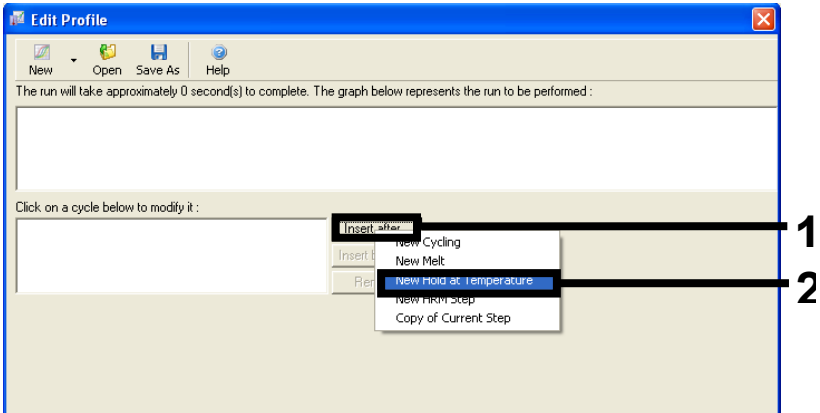
Gambar 22. Memasukkan nama operator dan volume reaksi. 1 = bidang dialog "Operator", 2 = bidang dialog "Notes" (Catatan), 3 = bidang "Reaction Volume" (Volume Reaksi), 4 = "Sample Layout" (Tata Letak Sampel), 5 = "Next" (Berikutnya).

5. Klik Edit Profile (Edit Profil) dalam jendela "New Run Wizard" (Wizard Proses Baru) (Gambar 23) dan programkan profil suhu sesuai dengan informasi dalam tahap berikut.



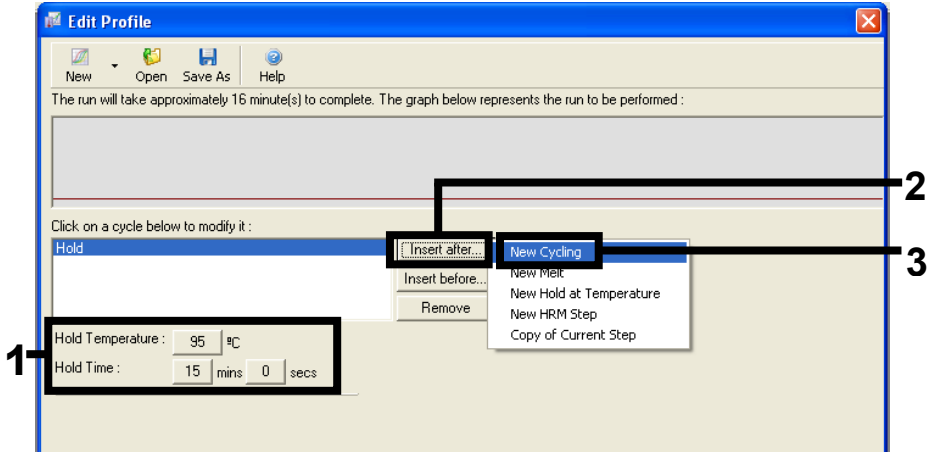
Gambar 23. Mengedit profil.

6. Klik Insert after (Sisipkan setelah) lalu pilih New Hold at Temperature (Jaga pada Suhu Baru) (Gambar 24).



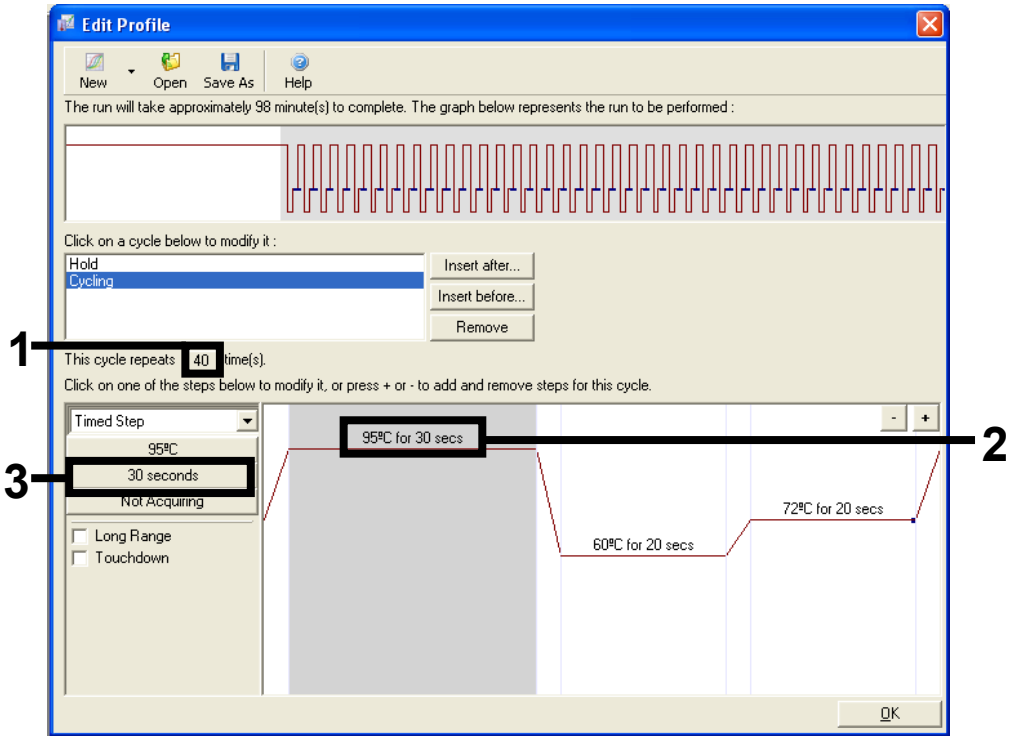
Gambar 24. Menyisipkan tahap inkubasi awal. 1 = "Insert after" (Sisipkan setelah), 2 = "New Hold at Temperature" (Jaga pada Suhu Baru).

7. Atur nilai dalam bidang Hold Temperature (Jaga Suhu) 95°C dan bidang Hold Time (Jaga Waktu) 15 mins 0 secs (15 menit 0 detik). Klik Insert after (Sisipkan setelah), lalu pilih New Cycling (Siklus Baru) (Gambar 25).



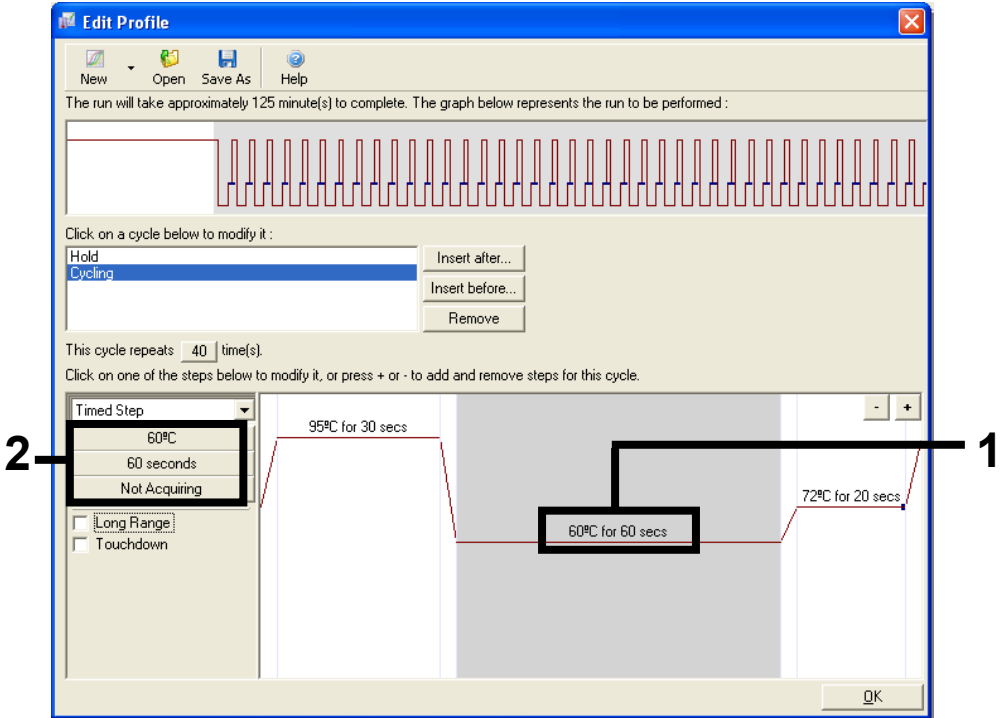
Gambar 25. Tahap inkubasi awal pada 95°C. 1 = "Hold Temperature and Hold Time" (Jaga Suhu dan Jaga Waktu), 2 = "Insert after" (Sisipkan setelah), 3 = "New Cycling" (Siklus Baru).

8. Atur jumlah pengulangan siklus menjadi 40. Pilih tahap pertama dan atur menjadi 95°C for 30 secs (95°C selama 30 detik) (Gambar 26).



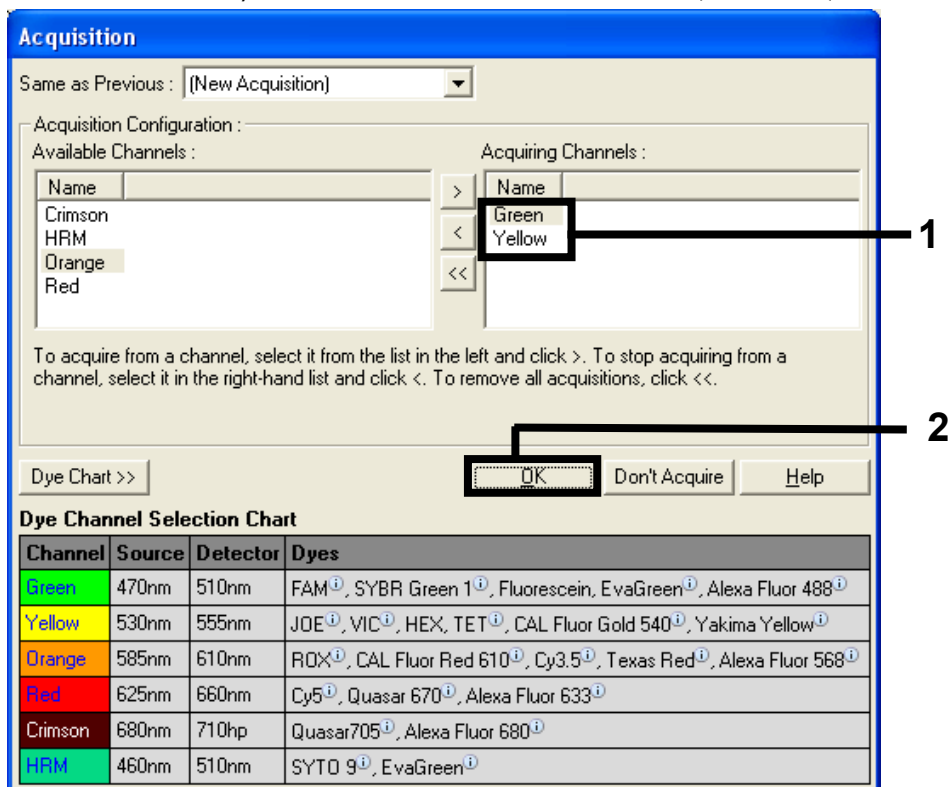
Gambar 26. Tahap siklus pada suhu 95°C. 1 = kotak "Cycle repeats" (Pengulangan siklus), 2 = "pengaturan suhu tahap satu, 3 = pengaturan waktu tahap satu.

9. Soroti tahap kedua dan atur menjadi 60°C for 60 secs (60°C selama 60 detik). Untuk mengaktifkan pemerolehan data dalam tahap ini, klik Not Acquiring (Tidak Memperoleh) (Gambar 27).



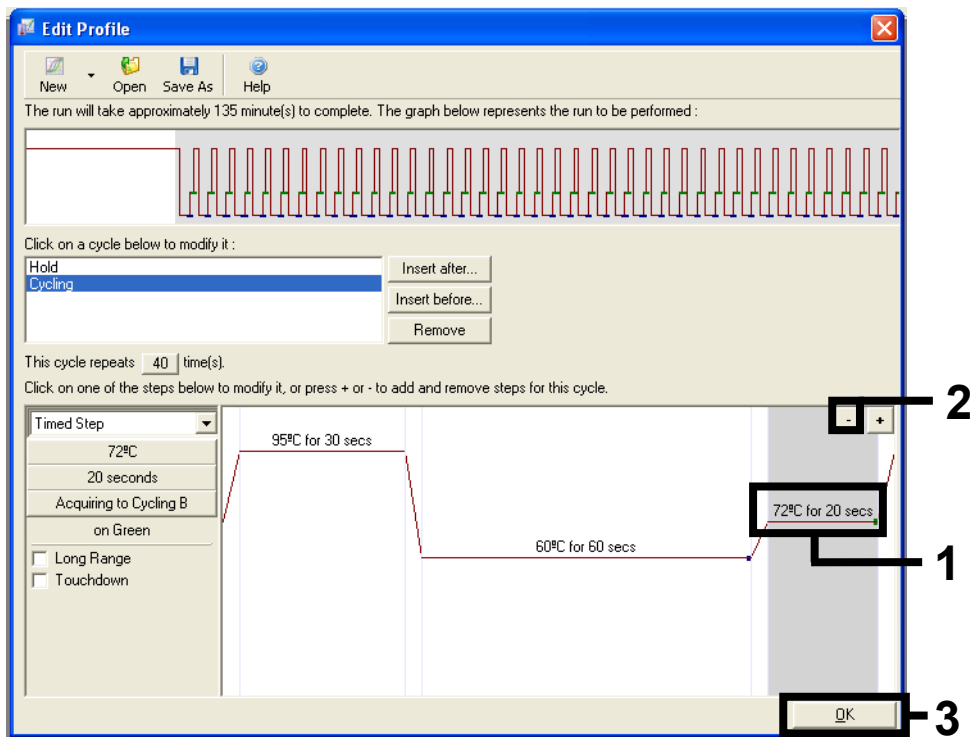
Gambar 27. Tahap siklus pada suhu 60°C. 1 = pengaturan waktu dan suhu tahap kedua, 2 = Not Acquiring (Tidak Memperoleh).

10. Dalam daftar Saluran yang Tersedia, pilih Green (Hijau) dan Yellow (Kuning) lalu klik > untuk memindahkannya ke daftar Saluran Pemerolehan. Klik OK (Gambar 28).



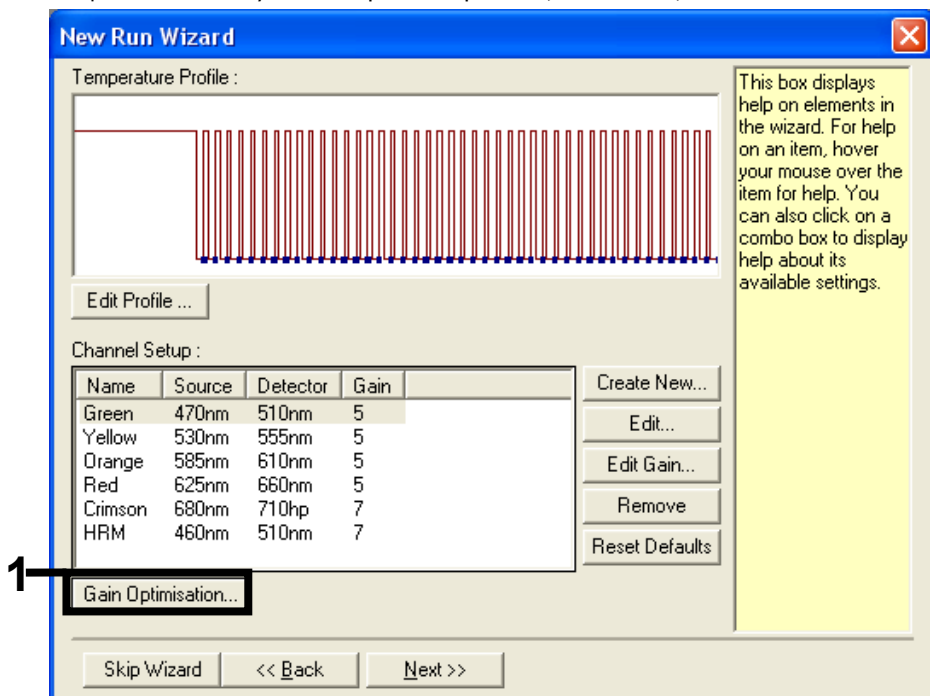
Gambar 28. Pemerolehan pada tahap siklus di suhu 60°C.

11. Soroti tahap ketiga lalu klik – untuk menghapus. Klik OK (Gambar 29).



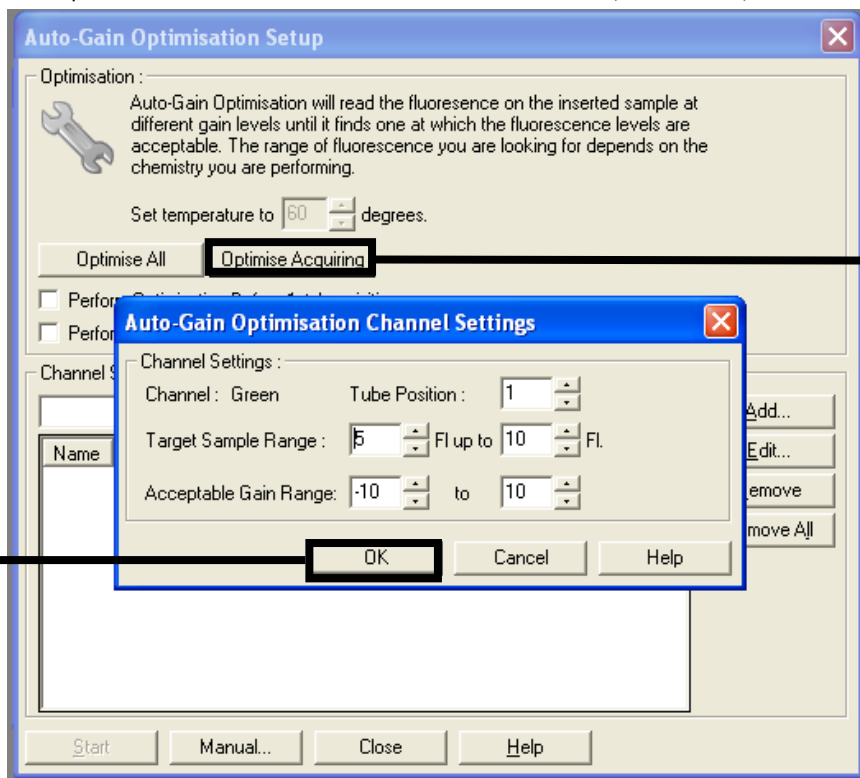
Gambar 29. Tahap penghapusan ekstensi.

12. Di jendela berikutnya, klik Dapatkan Optimasi (Gambar 30).



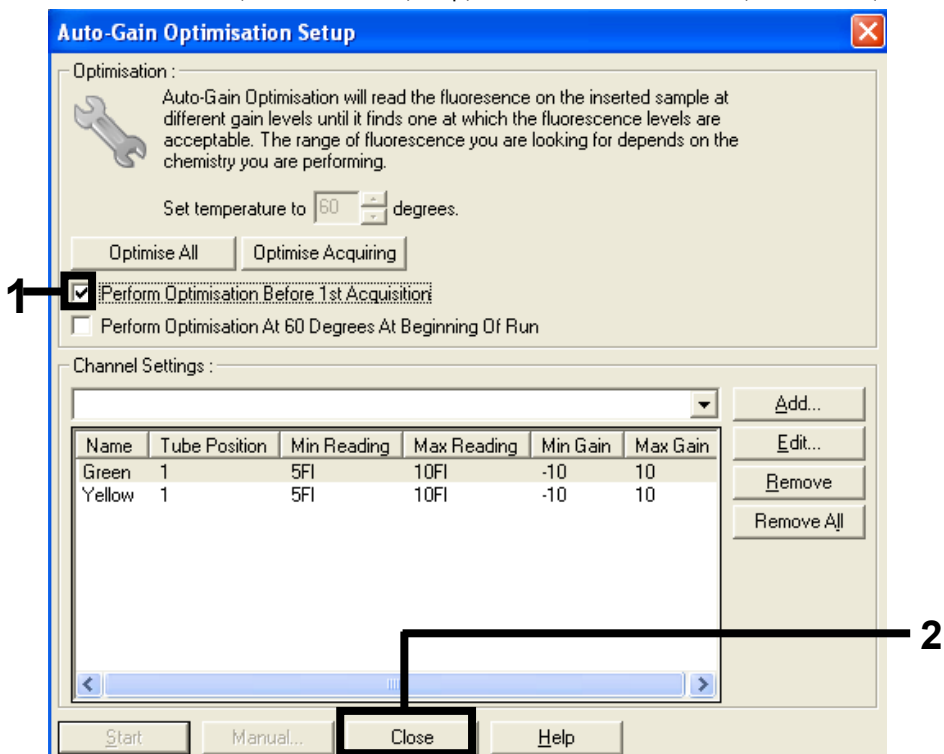
Gambar 30. "Gain Optimization" (Dapatkan Optimasi).

13. Klik Optimize Acquiring (Optimalkan Pemerolehan). Pengaturan saluran ditampilkan untuk tiap saluran. Klik OK untuk menerima nilai default ini. (Gambar 31).



Gambar 31. "Auto-gain Optimization" (Dapatkan Optimasi Otomatis) untuk saluran hijau.

14. Centang kotak Perform Optimization before 1st Acquisition (Lakukan Optimasi sebelum Pemerolehan Pertama) lalu klik Close (Tutup) untuk kembali ke wizard (Gambar 32).



Gambar 32. Pemilihan saluran hijau dan kuning.

15. Klik Next (Berikutnya). Lalu, klik Save (Simpan) untuk menyimpan templat di lokasi yang sesuai.

Protokol: Penilaian sampel (manual)

Protokol ini digunakan untuk menilai total DNA yang dapat diperkuat dalam sampel dan harus dilakukan sebelum analisis mutasi KRAS.

- Siapkan sampel seperti yang diuraikan di Protokol: Penilaian sampel DNA.
- Atur proses PCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM seperti yang diuraikan di Protokol: Pengaturan *therascreen* KRAS PCR RGQ.
- Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan petunjuk dalam bab Analisis data penilaian sampel.

Protokol: Deteksi mutasi KRAS (manual)

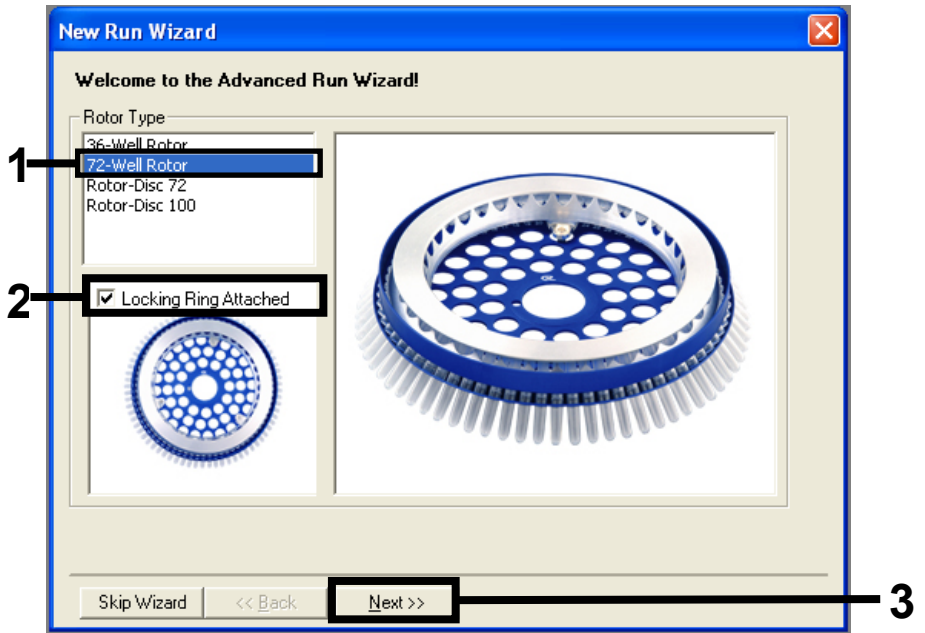
Setelah sampel lolos penilaian sampel, sampel dapat diuji untuk mendeteksi mutasi KRAS.

- Siapkan sampel seperti yang diuraikan di Protokol: Deteksi mutasi KRAS.
- Atur proses PCR pada Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM seperti yang diuraikan di Protokol: Pengaturan *therascreen* KRAS PCR RGQ.
- Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan petunjuk dalam bab Analisis deteksi mutasi KRAS.

Protokol: Pengaturan *therascreen* KRAS PCR RGQ

1. Buka Rotor-Gene Q series software 2.3 dan profil suhu yang sesuai yang telah dibuat.
2. Buat profil suhu sesuai dengan Protokol: Membuat profil suhu.

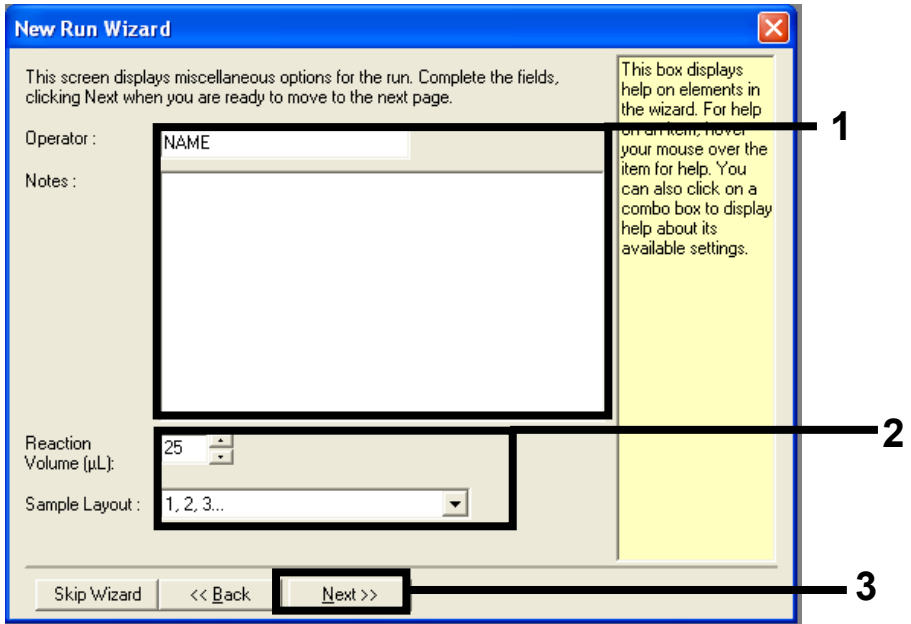
Pastikan bahwa rotor yang benar telah dipilih, lalu centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Klik Next (Berikutnya) (Gambar 33).



Gambar 33. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) dan layar selamat datang.

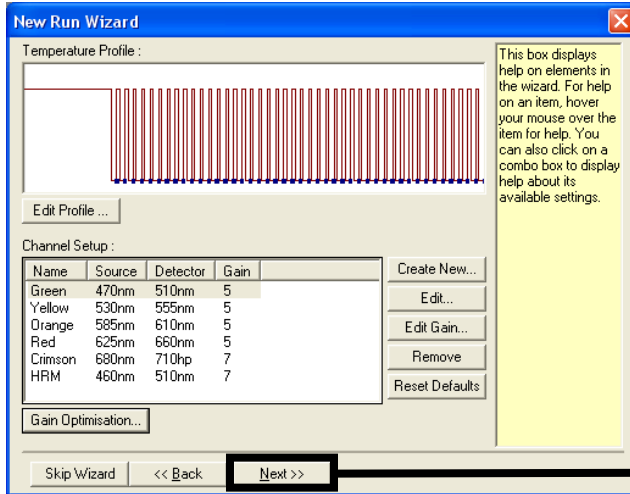
1 = Rotor type (Tipe rotor), 2 = “Locking Ring Attached box” (kotak Ring Penguncian Terpasang), 3 = “Next” (Berikutnya).

3. Masukkan nama operator. Tambahkan catatan lalu periksa bahwa bidang Reaction Volume (Volume Reaksi) diatur ke 25 dan kotak bidang Sample Layout (Tata Letak Sampel) berisi nilai 1, 2, 3.... Klik Next (Berikutnya) (Gambar 34).



Gambar 34. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru). 1 = bidang “Operator” dan “Notes” (Catatan), 2 = bidang “Reaction Volume” (Volume Reaksi) dan “Sample Layout” (Tata Letak Sampel), 3 = “Next” (Berikutnya).

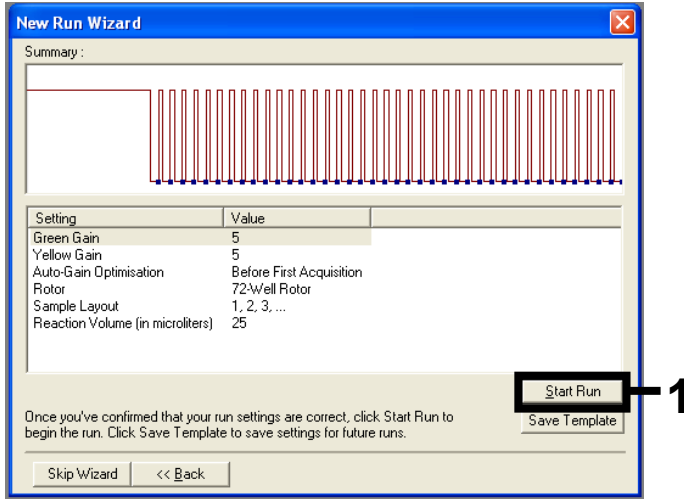
4. Biarkan semua nilai apa adanya di jendela berikutnya. Proses edit tidak diperlukan karena profil suhu telah dibuat sesuai dengan petunjuk dalam Protokol: Membuat profil suhu. Klik Next (Berikutnya) (Gambar 35).



Gambar 35. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) dan layar edit suhu.

1 = “Next” (Berikutnya).

5. Tinjau ringkasan lalu klik Start Run (Mulai Proses) untuk menyimpan file proses dan memulai proses (Gambar 36).



Gambar 36. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru). 1 = “Start Run” (Mulai Proses).

Catatan: Setelah proses dimulai, jendela baru akan muncul di mana Anda dapat memasukkan nama sampel sekarang atau mengklik Finish (Selesai), dan memasukkannya nanti dengan memilih tombol Sample (Sampel) selama proses atau setelah proses selesai.

Jika Anda mengklik Finish and Lock Samples (Selesai dan Kunci Sampel), Anda tidak lagi dapat mengedit nama sampel. Anda harus sangat berhati-hati saat memasukkan nama sampel guna memastikan pengujian dan analisis sampel yang tepat.

Catatan: Saat memberi nama sampel, sumuran yang kosong harus dibiarkan kosong dalam kolom “Name” (Nama).

6. Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan bagian analisis data penilaian Sampel atau analisis deteksi mutasi KRAS, yang sesuai.
7. Jika laporan kuantifikasi diperlukan, klik ikon toolbar Reports (Laporan) dalam file proses Rotor-Gene Q.

Interpretasi Hasil (Manual)

Setelah proses penilaian sampel atau proses analisis mutasi selesai, analisis data sesuai dengan prosedur berikut.

Pengaturan analisis perangkat lunak

1. Buka file yang sesuai menggunakan Rotor-Gene Q series software 2.3.
2. Jika Anda belum memberi nama sampel Anda sebelum melakukan proses, klik Edit Samples (Edit Sampel).
3. Masukkan nama sampel Anda dalam kolom Name (Nama).
4. Klik Analysis (Analisis). Di halaman analisis, klik Cycling A. Yellow (Siklus A. Kuning) untuk menampilkan saluran HEX.
5. Klik Named On (Beri Nama).
Catatan: Ini dilakukan untuk memastikan agar sumuran yang kosong tidak disertakan dalam analisis.
6. Pilih Dynamic Tube (Tabung Dinamis).
7. Pilih Linear Scale (Skala Linear).
8. Klik Outlier Removal (Penghapusan Pencilan) lalu masukkan 10% dalam bidang NTC Threshold (Ambang batas NTC).
9. Atur Ambang batas menjadi 0.05 (0,05) lalu periksa nilai CT HEX.
10. Di halaman analisis, klik Cycling A. Green (Siklus A. Hijau) untuk menampilkan saluran FAM.
11. Periksa apakah Dynamic Tube (Tabung Dinamis) sudah disoroti. Klik Linear Scale (Skala Linear).
12. Klik Outlier Removal (Penghapusan Pencilan) lalu masukkan 10% dalam bidang NTC Threshold (Ambang batas NTC).
13. Atur Ambang batas menjadi 0.05 (0,05) lalu periksa nilai CT FAM.

Analisis data penilaian sampel

Analisis kontrol proses

Lihat bagan alir “Analisis kontrol proses” pada Gambar 37.

- **Kontrol negatif:** Untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminasi campuran reaksi, Kontrol Tanpa Templat tidak boleh menghasilkan nilai C_T dalam saluran hijau di bawah 40. Untuk memastikan bahwa pelat telah diatur dengan benar, NTC harus menampilkan amplifikasi sebesar 31,91–35,16 dalam saluran kuning. Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai tersebut.
- **Kontrol positif:** Kontrol Positif (PC) KRAS harus memberikan nilai C_T sebesar 23,5–29,5 dalam saluran hijau pada masing-masing dari 8 uji kadar. Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai tersebut. Nilai di luar rentang ini menunjukkan adanya masalah pengaturan uji kadar sehingga proses gagal.

Catatan: Data sampel tidak boleh digunakan jika kedua kontrol proses tersebut gagal.

Dengan ketentuan bahwa kedua kontrol proses valid, setiap nilai C_T sampel harus berada dalam rentang 21,92–32,00 dalam saluran hijau. Jika sampel berada di luar rentang ini, diberikan panduan berikut.

Analisis sampel – uji kadar kontrol

- C_T uji kadar kontrol sampel $<21,92$: Sampel dengan C_T kontrol $<21,92$ harus diencerkan karena sampel ini mewakili batas bawah rentang uji kadar yang divalidasi. Untuk mendeteksi tiap mutasi di tingkat bawah, sampel dengan konsentrasi-berlebih harus diencerkan agar berada di atas rentang atas dengan dasar bahwa pengenceran sebanyak setengah akan meningkatkan C_T sebesar 1. Jika sampel dekat dengan 21,92, dianjurkan untuk melakukan pengenceran guna memastikan agar hasil diperoleh dari proses pengujian sampel (deteksi mutasi KRAS). Sampel harus diencerkan menggunakan air yang disediakan dalam kit (Air Bebas-Nuklease untuk Pengenceran [Dil.]).
- C_T uji kadar kontrol sampel >32 : Ekstraksi ulang sampel disarankan karena templat DNA awalan yang tidak memadai akan ada untuk mendeteksi semua mutasi pada nilai batas yang ditetapkan untuk uji kadar.

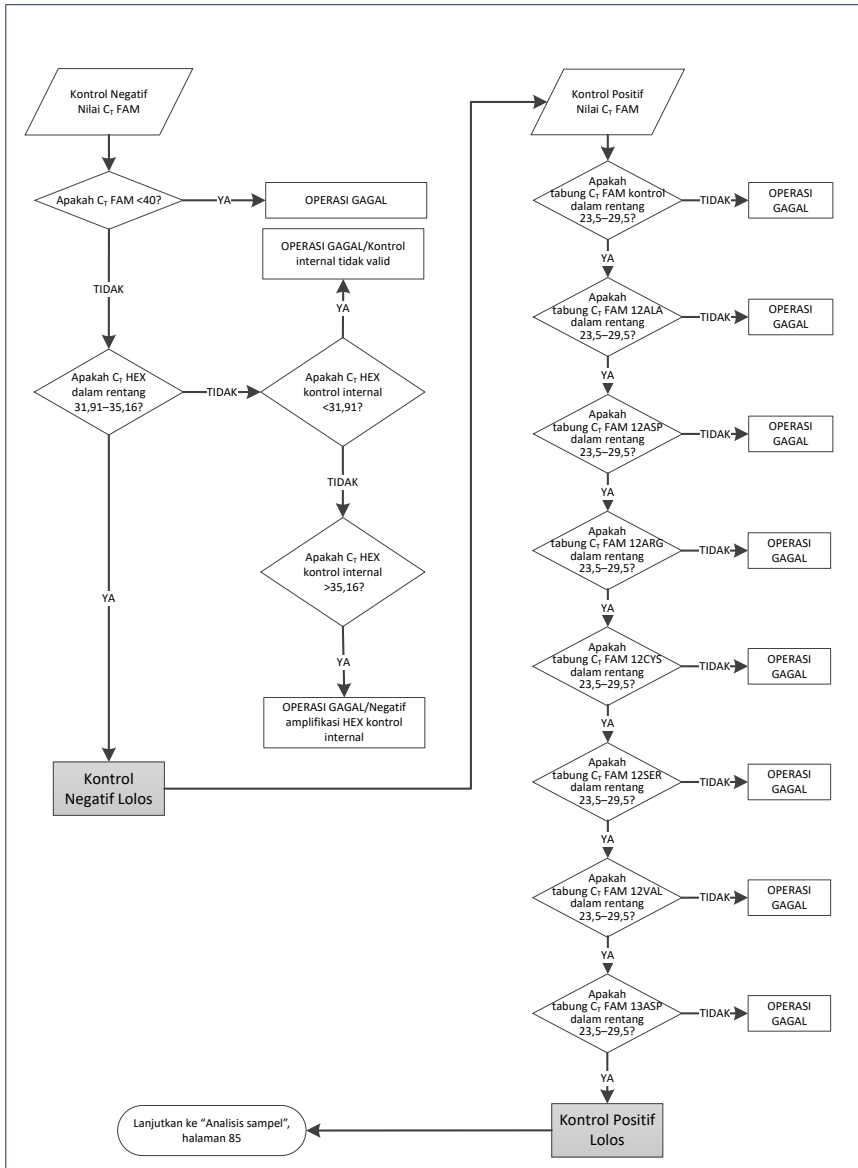
Analisis deteksi mutasi KRAS

Analisis kontrol proses

Lihat bagan alir “Analisis kontrol proses” (Gambar 37).

- Kontrol negatif: Untuk memastikan tidak ada kontaminasi campuran reaksi, Kontrol Tanpa Templat tidak boleh menghasilkan nilai C_T dalam saluran hijau di bawah 40. Untuk memastikan bahwa pelat telah diatur dengan benar, NTC harus menampilkan amplifikasi sebesar 31,91–35,16 dalam saluran kuning. Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai tersebut.
- Kontrol positif: Kontrol Positif (PC) KRAS harus memberikan nilai C_T sebesar 23,5–29,5 dalam saluran hijau pada masing-masing dari 8 uji kadar. Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai tersebut. Nilai di luar rentang ini menunjukkan adanya masalah pengaturan uji kadar sehingga proses gagal.

Catatan: Data sampel tidak boleh digunakan jika 2 kontrol proses tersebut gagal.



Gambar 37. Bagan alir analisis kontrol proses.

Analisis sampel

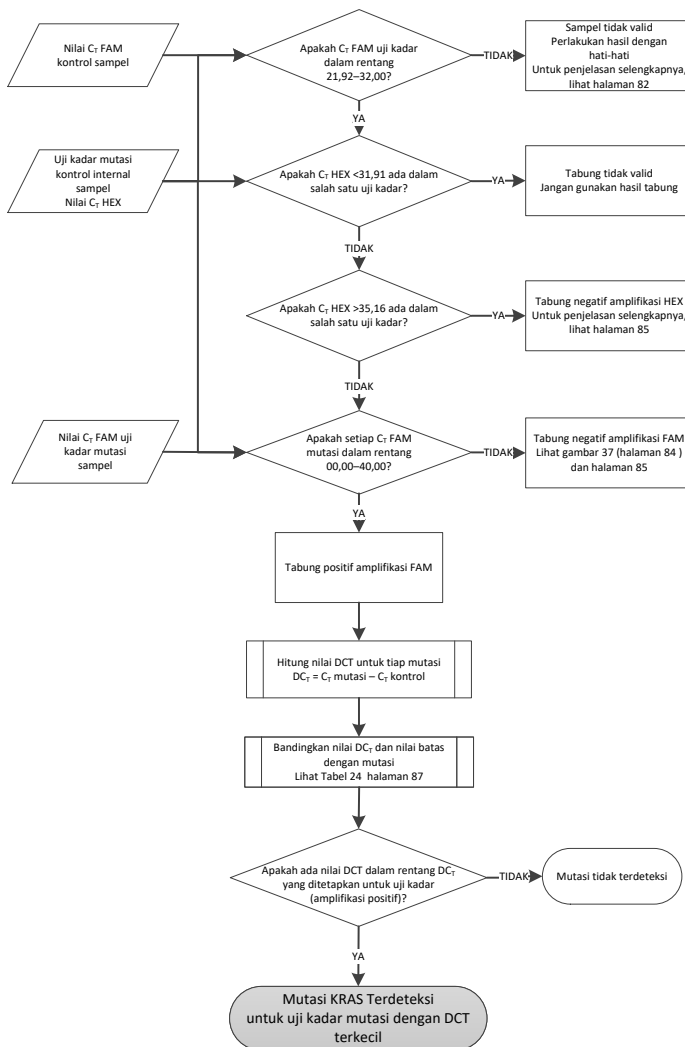
Lihat bagan alir “Analisis sampel” pada Gambar 38.

Nilai C_T FAM kontrol sampel

Dengan ketentuan bahwa kedua kontrol proses valid untuk uji kadar kontrol, setiap Kontrol nilai C_T kontrol sampel harus berada dalam rentang 21,92–32,00 dalam saluran hijau.

Jika sampel berada di luar rentang ini, diberikan panduan berikut.

- C_T uji kadar kontrol sampel $<21,92$: Sampel dengan C_T kontrol sebesar $<21,92$ akan melebihi muatan uji kadar mutasi dan harus diencerkan. Untuk mendeteksi tiap mutasi di tingkat bawah, sampel dengan konsentrasi berlebih harus diencerkan agar berada di atas rentang atas dengan dasar bahwa pengenceran sebanyak setengah akan meningkatkan C_T sebesar 1. Sampel harus diencerkan menggunakan air yang disediakan dalam kit (Air Bebas-Nuklease untuk Pengenceran [Dil.]).
- C_T uji kadar kontrol sampel >32 : Interpretasikan secara cermat karena mutasi dengan tingkat sangat rendah mungkin tidak terdeteksi.



Gambar 38. Bagan alir analisis sampel.

Nilai CT HEX uji kadar mutasi kontrol internal sampel

Lihat bagan alir “Analisis Sampel” pada Gambar 38.

Semua sumuran dari tiap sampel harus dianalisis. Periksa bahwa setiap sumuran menghasilkan sinyal HEX dari kontrol internal. Terdapat 3 kemungkinan hasil.

- Jika C_T kontrol internal jatuh dalam rentang yang ditentukan (31,91–35,16), artinya positif amplifikasi HEX.
- Jika C_T kontrol internal jatuh di atas rentang yang ditentukan ($>35,16$), artinya negatif amplifikasi HEX.
- Jika C_T kontrol internal jatuh di bawah rentang yang ditentukan ($<31,91$), artinya tidak valid.

Jika kegagalan kontrol internal disebabkan oleh inhibisi PCR, pengenceran sampel dapat mengurangi pengaruh inhibitor, tetapi perlu dicatat bahwa hal ini juga akan mengencerkan DNA target. Satu tabung Air untuk Pengenceran Sampel (Dil.) disertakan bersama kit.

Nilai CT FAM uji kadar mutasi sampel

Nilai FAM untuk 7 campuran reaksi harus diperiksa dengan nilai yang tercantum dalam Tabel 24.

Tabel 24. Nilai reaksi mutasi sampel yang dapat diterima (FAM)*

Uji Kadar	Rentang C_T yang dapat diterima	Rentang ΔC_T
12ALA	0,00–40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00–40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00–40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00–40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00–40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00–40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00–40,00	$\leq 7,50$

* Nilai yang dapat diterima berada dalam dan termasuk nilai yang ditampilkan.

- Jika C_T FAM jatuh dalam rentang yang ditentukan, artinya positif amplifikasi FAM.

- Jika C_T FAM jatuh di atas rentang yang ditentukan atau tidak ada amplifikasi, artinya negatif amplifikasi FAM.

Hitung nilai ΔC_T untuk setiap tabung mutasi yang positif amplifikasi FAM seperti berikut ini, dengan memastikan bahwa nilai C_T kontrol dan mutasi berasal dari sampel yang sama.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutasi} - C_T \text{ kontrol}$$

Bandingkan nilai ΔC_T untuk sampel dengan titik batas untuk uji kadar terkait (Tabel 24), dengan memastikan bahwa titik batas yang tepat diterapkan pada tiap uji kadar.

Titik batas adalah titik di atas di mana sinyal positif kemungkinan dapat disebabkan karena sinyal latar belakang primer ARMS pada DNA tipe liar. Jika nilai ΔC_T sampel lebih tinggi dari titik batas, maka digolongkan sebagai negatif atau di luar batas deteksi kit.

Untuk setiap sampel, tiap reaksi mutasi akan diberi status “mutasi terdeteksi”, “mutasi tidak terdeteksi”, atau “tidak valid” menggunakan kriteria berikut:

Mutasi terdeteksi:

- Positif amplifikasi FAM dan ΔC_T berada di atau di bawah nilai batas. Jika beberapa mutasi terdeteksi, mutasi yang dilaporkan adalah mutasi dengan nilai ΔC_T terkecil.

Mutasi tidak terdeteksi:

- Positif amplifikasi FAM dan ΔC_T berada di atas nilai batas.
- Negatif amplifikasi FAM dan positif amplifikasi HEX (kontrol internal).

Tidak Valid:

- HEX (kontrol internal) tidak valid.
- Negatif amplifikasi FAM dan negatif amplifikasi HEX.

Jika sampel negatif amplifikasi HEX dalam tabung tetapi positif amplifikasi FAM di tabung yang lain, maka hasil “mutasi terdeteksi:” di tabung yang lain masih dapat dianggap valid, tetapi mutasi tertentu yang teridentifikasi mungkin tidak dapat secara andal ditentukan.

- Jika sampel negatif amplifikasi HEX dan positif amplifikasi FAM dalam tabung yang sama, maka hasil “mutasi terdeteksi” harus dianggap valid.

- Jika tabung HEX (kontrol internal) tidak valid, hasil tabung tersebut tidak boleh digunakan.

Menetapkan status mutasi sampel

Setelah semua tabung reaksi mutasi dinilai, status mutasi sampel ditetapkan sebagai berikut:

- Mutasi terdeteksi: Satu atau beberapa dari 7 reaksi mutasi menunjukkan positif. Jika beberapa mutasi terdeteksi, mutasi yang dilaporkan adalah mutasi dengan nilai ΔC_T terkecil.
- Mutasi tidak terdeteksi: Sebanyak 7 reaksi mutasi menunjukkan negatif.
- Tidak valid: Tidak ada reaksi mutasi yang positif, dan satu atau beberapa reaksi mutasi tidak valid.

Catatan: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dimaksudkan untuk mendeteksi mutasi dalam gen KRAS pada sampel DNA. Jika sampel disebut mutasi KRAS terdeteksi, hanya satu mutasi spesifik yang harus dilaporkan. Jika beberapa mutasi terdeteksi, mutasi yang dilaporkan adalah mutasi dengan nilai ΔC_T terkecil.

Beberapa reaktivitas silang dapat terjadi di antara reaksi mutasi. Misalnya, jika mutasi 12ALA tingkat tinggi ditemukan, beberapa dari reaksi mutasi lain juga dapat menunjukkan hasil positif. Hal ini dikarenakan primer ARMS yang mendeteksi mutasi lain dari sekuens yang serupa ke yang lain. Jika uji kadar mutasi kedua memberikan hasil positif, hal ini merupakan kecenderungan reaktivitas silang. Mutan ganda telah ditemukan, meski jarang sekali terjadi. Jika satu atau beberapa reaksi mutasi tidak valid tetapi satu atau beberapa positif, sampel masih dapat disebut mutasi KRAS terdeteksi karena terdapat mutasi. Namun, mutasi spesifik yang dilaporkan mungkin tidak akurat dan kemungkinan adalah hasil reaktivitas-silang. Dengan demikian, sampel sebaiknya cukup disebut mutasi KRAS terdeteksi.

Lampiran 2: Pemasangan *therascreen* KRAS Assay Package

therascreen KRAS RGQ PCR Kit dirancang untuk digunakan dengan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72-sumuran. *therascreen* KRAS Assay Package tersedia secara terpisah pada CD (no. kat. 9022641).

therascreen KRAS Assay Package tersedia untuk diunduh di halaman web produk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit terkait di www.qiagen.com. Informasi unduhan dapat ditemukan dalam bagian "Product Resources" (Sumber Daya Produk) pada tab "Supplementary Protocols" (Protokol Tambahan). Paket Uji Kadar juga dapat dipesan di CD.

Paket tersebut meliputi "*therascreen* KRAS CE QC Locked Template" dan "*therascreen* KRAS CE Locked Template."

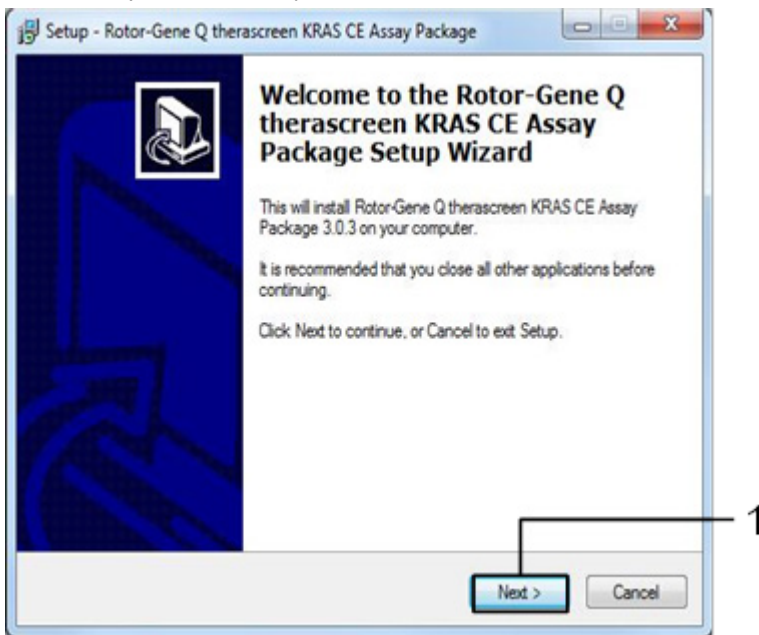
Catatan: *therascreen* KRAS Assay Package hanya akan berfungsi dengan perangkat lunak Rotor-Gene Q versi 2.3 terkait dengan *therascreen* KRAS Assay Package versi 3.1.1 (QIAGEN, no. kat. 9023675). Pastikan bahwa versi perangkat lunak Rotor-Gene Q yang tepat telah terpasang sebelum melanjutkan pemasangan *therascreen* KRAS Assay Package.

Prosedur (unduh)

1. Unduh *therascreen* KRAS RGQ Assay Package di halaman web produk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit terkait di www.qiagen.com.
2. Buka file zip yang telah diunduh dengan mengklik dua kali pada file dan mengekstrak file di dalam arsip.
3. Klik dua kali *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe* untuk memulai pemasangan.

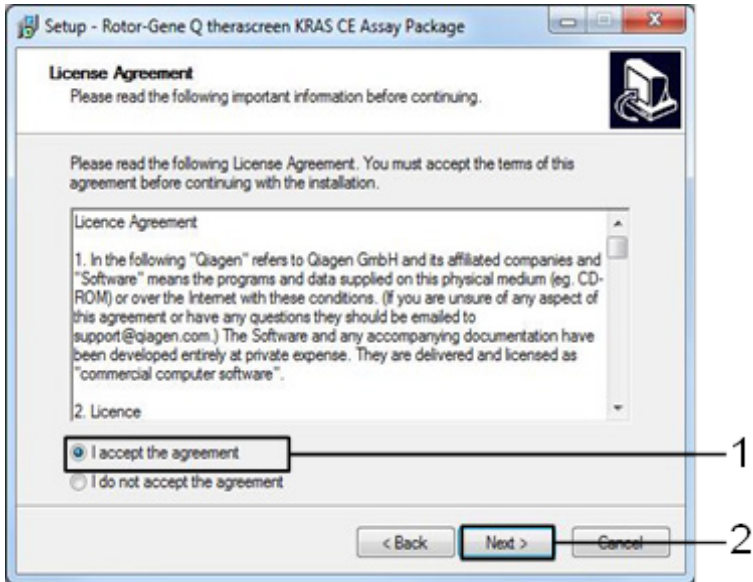
Prosedur (CD)

1. Pesan CD CE thetascreen KRAS RGQ Assay Package yang kompatibel dengan Perangkat Lunak Rotor-Gene Q (lihat di atas) yang tersedia terpisah dari QIAGEN. Versi 3.1.1. No. kat. 9023675.
2. Masukkan CD ke dalam CD drive di laptop yang terhubung pada instrumen Rotor Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Klik dua kali thetascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe atau thetascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe untuk memulai pemasangan Wizard pengaturan akan muncul.
4. Klik Next (Berikutnya) untuk melanjutkan (Gambar 39).



Gambar 39. Kotak dialog "Setup" (Pengaturan). 1 = "Next" (Berikutnya).

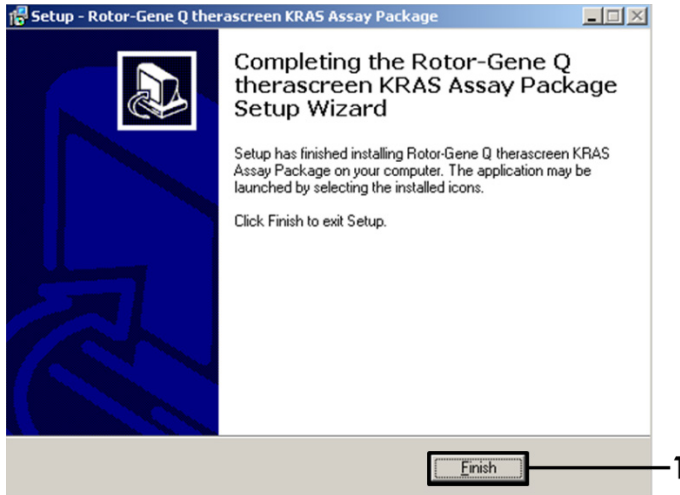
5. Baca Perjanjian Lisensi dalam kotak dialog “License Agreement” (Perjanjian Lisensi) dan centang kotak I accept the agreement (Saya menyetujui perjanjian ini). Klik Next (Berikutnya) untuk melanjutkan (Gambar 40).



Gambar 40. Kotak dialog “License Agreement” (Perjanjian Lisensi). 1 = pernyataan “I accept the agreement” (Saya menyetujui perjanjian ini), 2 = “Next” (Berikutnya).

Pengaturan templat akan otomatis dimulai.

6. Di jendela Pengaturan akhir, klik Finish (Selesai) untuk keluar dari wizard pengaturan. (Gambar 41).



Gambar 41. Menyelesaikan wizard.

7. Mulai ulang komputer. Pintasan ke “therascreen KRAS QC Locked Template” (Templat Terkunci QC therascreen KRAS) dan “therascreen KRAS Locked Template” (Templat Terkunci therascreen KRAS) akan dihasilkan secara otomatis dan akan muncul di desktop.

Informasi Pemesanan

Produk	Isi	No. Kat.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Untuk 24 reaksi: 1 Uji Kadar Kontrol, 7 Uji Kadar Mutasi, Kontrol Positif, Air, Polimerase DNA <i>Taq</i> .	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	Paket protokol perangkat lunak untuk digunakan dengan <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit dan instrumen QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dengan rotor 72-sumuran	9023675
Rotor-Gene Q dan aksesoris		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, 1-tahun garansi suku cadang dan tenaga kerja, tidak termasuk pemasangan dan pelatihan	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, 1-tahun garansi suku cadang dan tenaga kerja, pemasangan, dan pelatihan	9002033

Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blok aluminium untuk pengaturan reaksi manual dengan pipet bersaluran tunggal dalam tabung 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strip 4 tabung dan penutup untuk 1000 reaksi	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strip 4 tabung dan penutup untuk 10.000 reaksi	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — jaringan parafin-tertanam	untuk pemurnian DNA genomik dari jaringan parafin-tertanam	
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Untuk 50 penyiapan DNA: Kolum QIAamp MinElute®, Proteinase K, Dapar, dan Collection Tubes (2 ml)	56404

Untuk informasi pelisensian terbaru dan penafian produk-spesifik, lihat buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN. Buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN tersedia di www.qiagen.com atau dapat dipesan dari Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal Anda.

Riwayat Revisi Dokumen

Tanggal	Perubahan
R4, Januari 2019	Tambahkan Perwakilan Resmi (sampul depan) Bab Simbol Diperbarui Templat Diperbarui
R5, November 2019	Perubahan pada produsen legal (halaman sampul) Simbol EC + REP dihapus dari halaman depan dan bab Simbol Adaptasi nama instrumen dari Rotor-Gene Q MDx menjadi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM agar selaras dengan nama pada label instrumen Protokol Deteksi mutasi KRAS diperbarui dengan menyertakan tahap tambahan dalam menyiapkan campuran master Nilai yang dibetulkan dalam kolom Frekuensi dan Interval Kepercayaan 95% dalam Tabel 9. Persentase kesesuaian keseluruhan CRC diperbarui dari 96,4% menjadi 96,82% Nilai diperbaiki dalam kolom C_{95} LOD pada Tabel 14

Halaman ini sengaja dikosongkan

Halaman ini sengaja dikosongkan

Perjanjian Lisensi Terbatas untuk *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

Penggunaan produk ini menyatakan perjanjian pembeli atau pengguna produk dengan ketentuan berikut:

1. Produk hanya boleh digunakan sesuai dengan protokol yang disediakan bersama produk dan buku pegangan ini dan hanya digunakan dengan komponen yang terdapat di dalam kit saja. QIAGEN tidak memberikan lisensi apa pun berdasarkan kekayaan intelektualnya untuk menggunakan atau menggabungkan komponen yang tersedia dengan kit ini dengan komponen apa pun yang tidak termasuk dalam kit ini kecuali sebagaimana dijelaskan dalam protokol yang disediakan dengan produk, buku pegangan ini, dan protokol tambahan yang tersedia di www.qiagen.com. Beberapa protokol tambahan ini telah disediakan oleh pengguna QIAGEN bagi pengguna QIAGEN. Protokol-protokol tersebut belum diuji secara menyeluruh atau dioptimalkan oleh QIAGEN. QIAGEN tidak memberi garansi atau menjamin bahwa protokol tersebut tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
2. Selain lisensi yang dinyatakan secara tegas, QIAGEN tidak membuat jaminan bahwa kit ini dan/atau penggunaannya tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
3. Kit ini serta komponennya dilisensikan untuk penggunaan satu kali dan tidak boleh digunakan kembali, diperbarui, atau dijual kembali.
4. QIAGEN secara khusus menyangkal segala lisensi lain, yang dinyatakan secara tegas maupun tersirat selain yang dinyatakan secara tegas di atas.
5. Pembeli dan pengguna kit setuju untuk tidak mengambil atau mengizinkan orang lain mengambil langkah apa pun yang dapat menyebabkan atau mendukung tindakan apa pun yang dilarang di atas. QIAGEN dapat memberlakukan larangan Perjanjian Lisensi Terbatas ini di Pengadilan mana pun, dan akan memulihkan semua biaya investigasi dan Pengadilannya, termasuk biaya pengacara, dalam tindakan apa pun untuk menegakkan Perjanjian Lisensi Terbatas ini atau hak kekayaan intelektualnya yang terkait dengan kit dan/atau komponennya.

Untuk ketentuan lisensi yang diperbarui, lihat www.qiagen.com.

Merek Dagang: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], MinElute[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®], *therascreen*[®] (QIAGEN Group); ARMS[®] (AstraZeneca Ltd.); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Nama, merek dagang terdaftar, dll. yang digunakan di dalam dokumen ini, meski tidak secara khusus ditandai sebagaimana demikian, tidak akan dianggap sebagai tanpa perlindungan undang-undang.

Tidak untuk digunakan dengan sampel tinja.

Tidak untuk digunakan dengan sampel urine.

Tidak untuk digunakan dengan sampel asam nukleat ekstraseluler dari darah.

Tidak untuk digunakan dengan sampel sumsum tulang bebas-sel.

Tidak untuk digunakan dengan sampel air liur.

PEMBELIAN PRODUK INI MEMBERIKAN HAK KEPADA PEMBELI SESUAI DENGAN PATEN ROCHE TERTENTU UNTUK MENGGUNAKANNYA SEMATA-MATA UNTUK MENYEDIAKAN LAYANAN DIAGNOSTIK IN VITRO MANUSIA. TIDAK ADA PATEN UMUM ATAU LISENSI LAIN DALAM BENTUK APA PUN SELAIN DARI HAK PENGGUNAAN KHUSUS DARI PEMBELIAN YANG DIBERIKAN DI SINI.

1119793 HB-1861-005 11-2019 © 2019 QIAGEN, hak cipta dilindungi undang-undang.

Pemesanan www.qiagen.com/shop | Dukungan Teknis support.qiagen.com |
Situs Web www.qiagen.com