

Εγχειρίδιο *therascreen*[®] EGFR Pyro[®] Kit



Έκδοση 1



Για in vitro διαγνωστική χρήση



971480



1061827EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R3

MAT

1061827EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

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

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

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	5
Αρχή της διαδικασίας	6
Υλικά που παρέχονται	8
Περιεχόμενα του κιτ	8
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	11
Πληροφορίες για την ασφάλεια	11
Γενικές προφυλάξεις	12
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	13
Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων	14
Διαδικασία	15
Απομόνωση DNA	15
Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24	16
Πρωτόκολλο 2: PCR με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το <i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	19
Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance	22
Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24	24
Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24	29
Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24	32
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	36
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου	36
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	41
Έλεγχος ποιότητας	45
Περιορισμοί	45
Χαρακτηριστικά επιδόσεων	46
Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης	46
Γραμμικότητα	49
Ακρίβεια	50
Διαγνωστική αξιολόγηση	51

Βιβλιογραφία	55
Σύμβολα	56
Στοιχεία επικοινωνίας	56
Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων <i>therascreen</i> EGFR Pyro	57
Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων	62
Πληροφορίες παραγγελιών	64

Προβλεπόμενη χρήση

Το *therascreen* EGFR Pyro Kit είναι μια *in vitro* εξέταση ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων, η οποία βασίζεται στο Pyrosequencing® για την ποσοτική ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του ανθρώπινου γονιδίου EGFR σε γενωμικό DNA προερχόμενο από δείγματα ανθρώπινου ιστού.

Το *therascreen* EGFR Pyro Kit παρέχει στους κλινικούς ιατρούς πληροφορίες για διευκόλυνση της επιλογής καρκινοπαθών ασθενών που έχουν περισσότερες πιθανότητες να επωφεληθούν από τις anti-EGFR θεραπείες. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

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

- Το όργανο PyroMark Q24 και το όργανο PyroMark Q24 MDx.
- Τον PyroMark Q24 Vacuum Workstation και τον PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- Το PyroMark Q24 Software (έκδοση 2.0) και το PyroMark Q24 MDx Software (έκδοση 2.0).

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

Σύνοψη και επεξήγηση

Το *therascreen* EGFR Pyro Kit παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής μέτρησης των μεταλλάξεων στα κωδικόνια 719, 768, 790 και 858–861, καθώς και ελλείψεων και σύνθετων μεταλλάξεων στο εξόνιο 19 του ανθρώπινου γονιδίου EGFR.

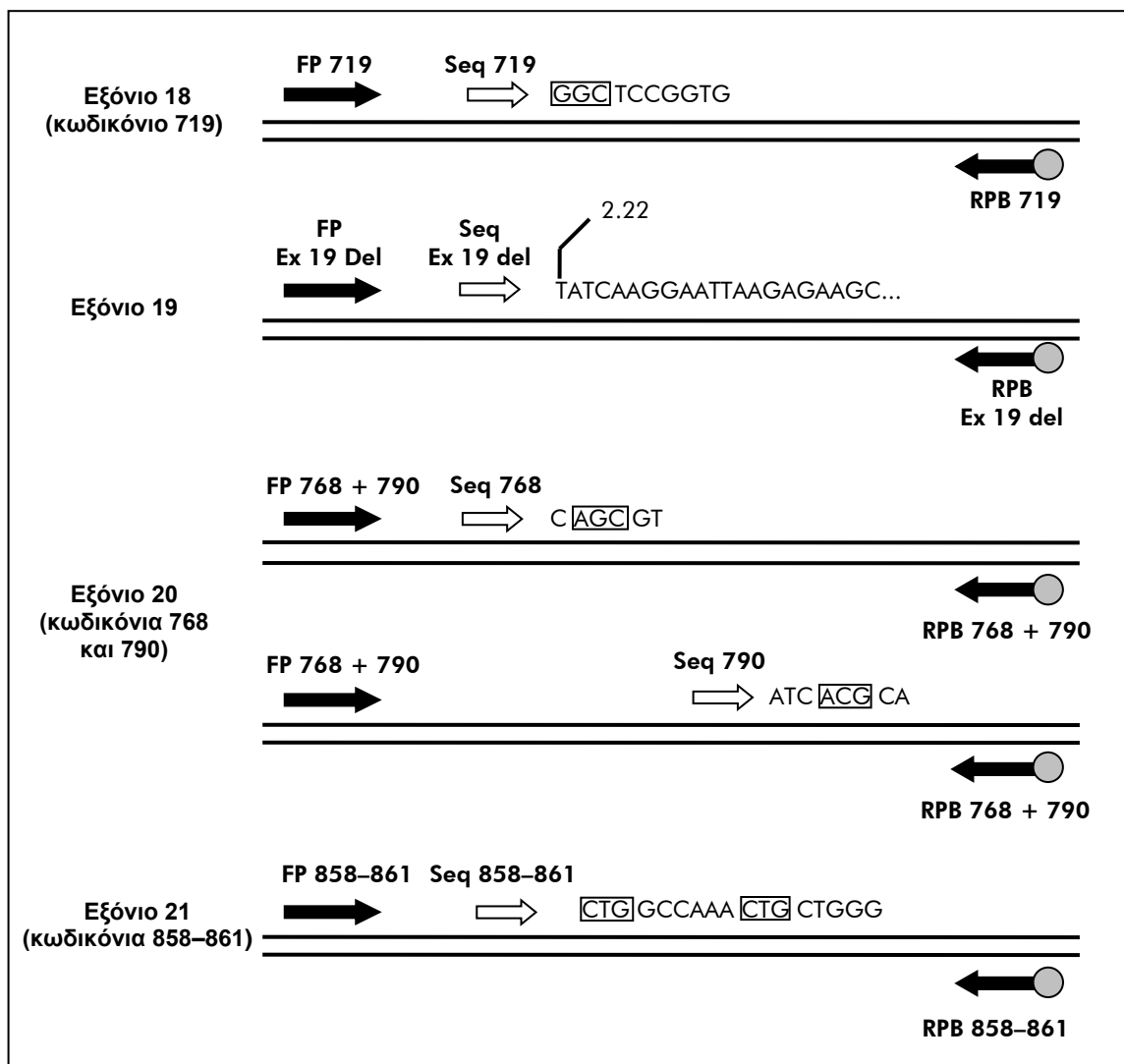
Το kit αποτελείται από τέσσερις αναλύσεις PCR (Εικόνα 1) για την ανίχνευση:

- Μεταλλάξεων του κωδικόνιου 719 (εξόνιο 18)
- Μεταλλάξεων των κωδικόνιων 768 και 790 (εξόνιο 20)
- Μεταλλάξεων των κωδικόνιων 858 έως 861 (εξόνιο 21)
- Ελλείψεις και σύνθετες μεταλλάξεις στο εξόνιο 19

Οι τέσσερις περιοχές ενισχύονται ξεχωριστά με αντίδραση PCR και υποβάλλονται σε αλληλούχηση κατά μήκος ολόκληρης της καθορισμένης περιοχής. Το αμπλικόνιο που καλύπτει τα κωδικόνια 768 και 790 χωρίζεται σε 2 αντιδράσεις αλληλούχησης. Οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις καθορισμένες θέσεις χρησιμοποιούνται ως κορυφές κανονικοποίησης και αναφοράς για την ποσοτικοποίηση και την ποιοτική αξιολόγηση της ανάλυσης.

Σε όλες τις αναλύσεις, η αλληλούχηση γίνεται προς την πρόσθια κατεύθυνση.

Το προϊόν αποτελείται από μείγμα εκκινητή PCR και εκκινητές αλληλούχησης για κάθε ανάλυση. Οι εκκινητές παρέχονται υπό μορφή διαλύματος. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 24 μl από κάθε εκκινητή ή μείγμα εκκινητών.



Εικόνα 1. Απεικόνιση της ανάλυσης EGFR. Η αλληλουχία που υποδεικνύεται είναι η αναλυθείσα αλληλουχία για ένα δείγμα φυσικού τύπου (wild-type). **FP**: Πρόσθιοι εκκινητές PCR, **RPB**: Αντίστροφοι εκκινητές PCR (το B συμβολίζει τη βιοτινυλίωση), **Seq**: Εκκινητές αλληλούχησης.

Αρχή της διαδικασίας

Στην παρακάτω ροή εργασιών απεικονίζεται η διαδικασία της ανάλυσης. Μετά την PCR με τη χρήση εκκινητών για τη στόχευση των εξονίων 18, 19, 20 και 21, τα αμπλικόνια μονιμοποιούνται σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose® High Performance. Παρασκευάζεται μονόκλωνο DNA και οι αντίστοιχοι εκκινητές αλληλούχησης υβριδοποιούνται στο DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα PyroMark Q24 με τη βοήθεια ενός αρχείου ρύθμισης εκτέλεσης και ενός αρχείου εκτέλεσης.

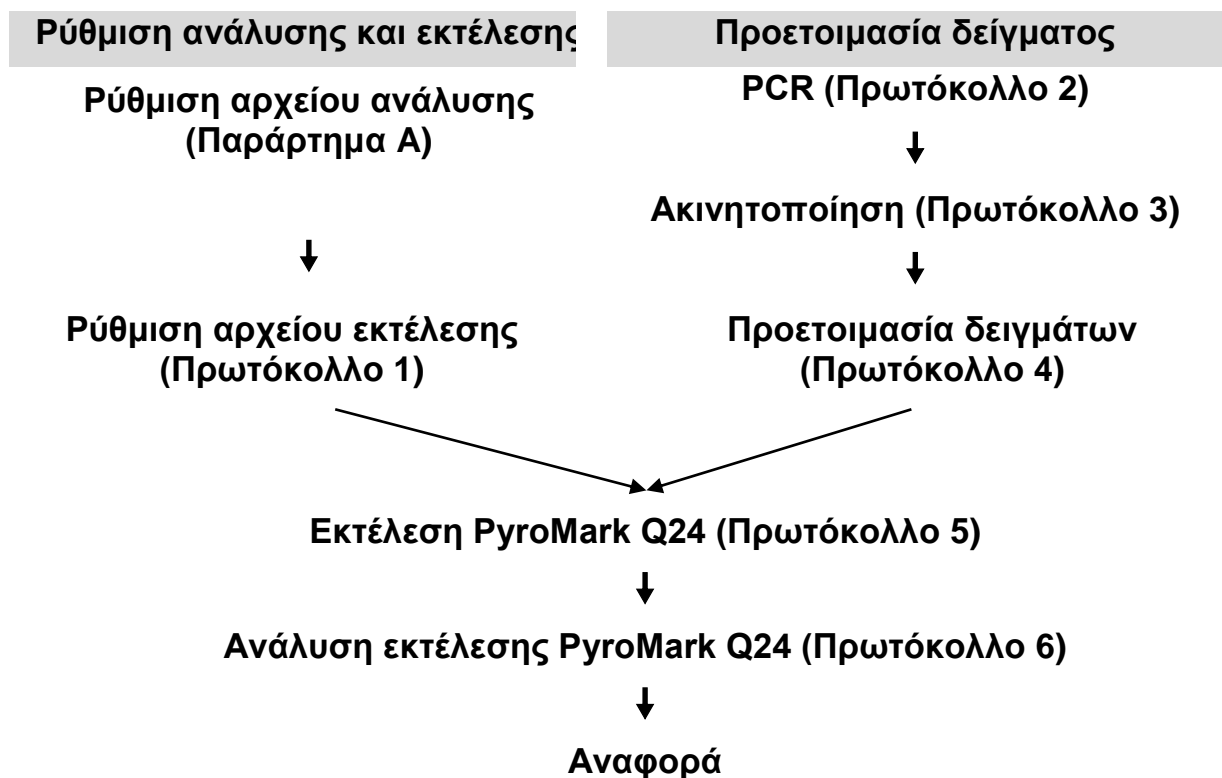
Συνιστάται η χρήση του EGFR Plug-in Report για την ανάλυση του κύκλου. Μπορείτε να προμηθευτείτε το EGFR Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com.

Ωστόσο, η ανάλυση του κύκλου είναι εφικτή και με τη χρήση του εργαλείου ανάλυσης που περιλαμβάνεται στο σύστημα PyroMark Q24. Στη συνέχεια,

μπορείτε να ρυθμίσετε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) για την ανίχνευση διαφορετικών ελλείψεων στο εξόνιο 19 και σπάνιων μεταλλάξεων σε άλλα εξόνια μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 32).

Σημείωση: Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με την αναθεώρηση R1 του εγχειριδίου του *therascreen EGFR Pyro Kit* (βλ. «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24», σελίδα 24).

Ροή εργασιών της διαδικασίας *therascreen EGFR Pyro*



Δείγματα ελέγχου

Το δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA περιλαμβάνεται στο kit ως δείγμα θετικού ελέγχου για τις αντιδράσεις PCR και αλληλούχησης. Αυτό το δείγμα ελέγχου DNA έχει γονότυπο φυσικού τύπου (wild-type) στις θέσεις που αλληλουχούνται με τη χρήση του kit αυτού και είναι απαραίτητο για την ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την αναγνώριση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου (βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων», σελίδα 36). Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού.

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


Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

therascreen EGFR Pyro Kit (κουτί 1/2)

<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	(24)
Αρ. καταλόγου	971480
Αριθμός αντιδράσεων	24
Seq Primer EGFR 719 (Εκκινητής αλληλούχησης EGFR 719)	24 µl
Seq Primer EGFR Ex 19 Del (Εκκινητής αλληλούχησης EGFR Ex 19 Del)	24 µl
Seq Primer EGFR 768 (Εκκινητής αλληλούχησης EGFR 768)	24 µl
Seq Primer EGFR 790 (Εκκινητής αλληλούχησης EGFR 790)	24 µl
Seq Primer EGFR 858–861 (Εκκινητής αλληλούχησης EGFR 858–861)	24 µl
PCR Primer EGFR 719 (Εκκινητής PCR EGFR 719)	24 µl
PCR Primer EGFR Ex19 Del (Εκκινητής PCR EGFR Ex19 Del)	24 µl
PCR Primer EGFR 768+790 (Εκκινητής EGFR 768+790)	24 µl
PCR Primer EGFR 858-861 (Εκκινητής EGFR 858-861)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	2 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1,2 ml
H ₂ O	5 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA (Δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA), 10 ng/µl	100 µl

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

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια <i>therascreen</i>		
PyroMark Binding Buffer		2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer		2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Μείγμα ενζύμων)		2 φιαλίδια
Substrate Mixture (Μείγμα υποστρώματος)		2 φιαλίδια
dATP α S		2 x 1.180 μ l
dCTP		2 x 1.180 μ l
dGTP		2 x 1.180 μ l
dTTP		2 x 1.180 μ l
Handbook (Εγχειρίδιο)		1

* Περιέχει υδροξείδιο του νατρίου.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 15)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα για προετοιμασία PCR)
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος*
- Θερμοκυκλοποιητής* και κατάλληλα σωληνάρια PCR
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, αρ. κατ. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001513 ή 9001514)*†
- PyroMark Q24 Software (αρ. κατ. 9019063 ή 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (αρ. κατ. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (αρ. κατ. 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (αρ. κατ. 9001515 ή 9001517)*†
- Θερμαντικό μπλοκ* με δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασίας 80°C
- Πλάκα PCR 24 βυθισμάτων ή ταινίες PCR
- Πώματα ταινίας
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q® 18,2 ΜΩ x cm ή ισοδύναμο).
Σημείωση: Στο κιτ παρέχεται επαρκής ποσότητα νερού για την PCR, την ακινητοποίηση του DNA και τη διάλυση του μείγματος ενζύμων και του μείγματος υποστρώματος. Απαιτείται πρόσθετη ποσότητα νερού υψηλής καθαρότητας για την αραίωση του Substrate Mixture PyroMark Wash Buffer, 10x.
- Αιθανόλη (70%)‡

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

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

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

Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας

Οι αναδευτήρες πλάκας που παρατίθενται στον Πίνακα 1 συνιστώνται για χρήση με το *therascreen* EGFR Pyro Kit.

Πίνακας 1. Αναδευτήρες πλάκας που συνιστώνται για χρήση με το *therascreen* EGFR Pyro Kit

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αριθμός καταλόγου
Eppendorf	Thermomixer comfort (βασική συσκευή)	5355 000,011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Πληροφορίες για την ασφάλεια

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

Οι παρακάτω δηλώσεις επικινδυνότητας και προφυλάξεων αφορούν τα συστατικά του *therascreen* EGFR Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution



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

Μείγμα ενζύμων PyroMark



Περιέχει: Διθειοθρεϊτόλη, οξικό οξύ. Κίνδυνος! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετέ τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο.

Μείγμα υποστρώματος PyroMark



Περιέχει: οξικό οξύ. Προειδοποίηση! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετέ τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο.

Γενικές προφυλάξεις

Σημείωση: Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει πάντα υπόψη τα εξής.

- Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήστη είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων, με τρόπο που δεν προβλέπεται από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς κάτι τέτοιο θα οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης.
- Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς (βλ. «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24», σελίδα 24) σε σύγκριση με την αναθεώρηση R1 του *εγχειριδίου του therascreen EGFR Pyro Kit*.

- Τα συστατικά του προϊόντος αυτού επαρκούν για τη διεξαγωγή 24 αντιδράσεων, σε έως 5 ανεξάρτητες εκτελέσεις.
- Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα, για προετοιμασία PCR).
- Αποθηκεύετε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δοκίμια, δείγματα θετικού ελέγχου και αμπλικόνια) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Αποψύχετε πλήρως όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη μιας ανάλυσης.
- Αφού αποψυχθούν, αναμείξτε τα συστατικά (αναρροφώντας και διοχετεύοντας επανειλημμένα με πιπέτα ή στροβιλίζοντας παλμικά) και φυγοκεντρήστε για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Τα αποτελέσματα των αποτυχημένων αντιδράσεων δεν αποτελούν σωστή βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το *therascreen* EGFR Pyro Kit παρέχεται σε δύο κουτιά. Το *therascreen* EGFR Pyro Kit (κουτί 1/2) μεταφέρεται σε ξηρό πάγο. Το PyroMark PCR Master Mix, το CoralLoad Concentrate, το δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA και όλοι οι εκκινήτες πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες από –30°C έως –15°C μετά την παραλαβή.

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

Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 10 ημέρες στους 2–8°C. Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν στα φιαλίδιά τους στους –30°C έως –15°C. Τα κατεψυγμένα αντιδραστήρια δεν πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερες από 3 εκτελέσεις κατάψυξης-απόψυξης.

Σημείωση: Τα νουκλεοτίδια δεν πρέπει να καταψύχονται.

Το *therascreen* EGFR Pyro Kit παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit, όταν αποθηκεύεται υπό αυτές τις συνθήκες.

Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων

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

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

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

Διαδικασία

Απομόνωση DNA

Η απόδοση του συστήματος καθορίστηκε με τη βοήθεια του EZ1[®] DNA Tissue Kit και του QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit για την εξαγωγή ανθρώπινου DNA από δείγματα όγκου μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Για το σύστημα του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, η απόδοση καθορίστηκε με τη βοήθεια δειγμάτων αίματος από υγιείς δότες, στα οποία έχουν προστεθεί εν μέρει εξωγενώς κύτταρα όγκου.

Τα kit QIAGEN[®] που αναφέρονται στον Πίνακα 2 συνιστώνται για τον καθαρισμό DNA από τους υποδεικνυόμενους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων, για χρήση σε συνδυασμό με το *therascreen* EGFR Pyro Kit. Εκτελέστε τον καθαρισμό DNA ακολουθώντας τις οδηγίες που παρατίθενται στα εγχειρίδια των kit.

Πίνακας 2. Συνιστώμενα kit καθαρισμού DNA για χρήση σε συνδυασμό με το *therascreen* EGFR Pyro Kit

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

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

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

Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24


Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη


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

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Εάν δεν έχει εγκατασταθεί το EGFR Plug-in Report, δημιουργήστε μια Assay Setup (Ρύθμιση ανάλυσης) (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 57). Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει μία και μοναδική φορά, πριν από την πρώτη εκτέλεση των αναλύσεων *therascreen* EGFR Pyro. Εάν έχει εγκατασταθεί το EGFR Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες Assay Setups (Ρυθμίσεις ανάλυσης) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του PyroMark Q24 software, στη διαδρομή «Example Files/PyroMark Setups/EGFR» (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/EGFR). Μπορείτε να προμηθευτείτε το EGFR Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com.

Διαδικασία

1. **Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων.**
Δημιουργείται ένα νέο αρχείο εκτέλεσης.
2. **Εισαγάγετε τις παραμέτρους της εκτέλεσης (βλ. «Παράμετροι εκτέλεσης», σελίδα 17).**
3. **Προετοιμάστε την πλάκα προσθέτοντας αναλύσεις για τις 5 διαφορετικές αντιδράσεις αλληλούχησης σε βυθίσματα που αντιστοιχούν στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν.**
Σημείωση: Πρέπει να περιλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου (χωρίς μήτρα DNA) για μία τουλάχιστον ανάλυση σε κάθε προετοιμασία PCR.
Σημείωση: Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Δείγματα ελέγχου», σελίδα 11).
4. **Όταν η ανάλυση έχει ρυθμιστεί και είναι έτοιμη για εκτέλεση στο σύστημα PyroMark Q24, εκτυπώστε μια λίστα με τους απαιτούμενους όγκους μείγματος ενζύμων, μείγματος υποστρώματος και νουκλεοτιδίων, καθώς και την καρτέλα με τη διάταξη της πλάκας.**

Επιλέξτε «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) από το μενού «Tools» (Εργαλεία) και, όταν εμφανιστεί η αναφορά, κάντε κλικ στο .

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

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

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

Παράμετροι εκτέλεσης

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

Προσθήκη αρχείων ανάλυσης

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

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

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

Εισαγωγή αναγνωριστικών δειγμάτων και σημειώσεων

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

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

Πρωτόκολλο 2: PCR με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το *therascreen* EGFR Pyro Kit

Το πρωτόκολλο αυτό αφορά 4 ξεχωριστές ενισχύσεις PCR περιοχών που περιλαμβάνουν το κωδικόνιο 719 (εξόνιο 18), τα κωδικόνια 768 και 790 (εξόνιο 20), τα κωδικόνια 858–861 (εξόνιο 21) ή ελλείψεις και σύνθετες μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *therascreen* EGFR Pyro.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

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

Ενέργειες πριν από την έναρξη

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

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαιτούμενα συστατικά (βλ. Πίνακα 3).

Αναμείξτε τα καλά πριν από τη χρήση.

2. Προετοιμάστε ένα μείγμα αντίδρασης για κάθε σετ εκκινητή PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 3.

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

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

Πίνακας 3. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης για κάθε μείγμα εκκινητή PCR

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer EGFR 719 ή PCR Primer EGFR Ex19 Del ή PCR Primer EGFR 768 και 790 ή PCR Primer EGFR 858–861	1,0
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	4,0
Συνολικός όγκος	20,0

3. Αναμείξτε σχολαστικά το μείγμα αντίδρασης και προσθέστε 20 μl σε κάθε σωληνάριο PCR.

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

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

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

Σημείωση: Να συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA για κάθε ανάλυση σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού (βλ. «Δείγματα ελέγχου», σελίδα 7).

Πίνακας 4. Προετοιμασία της PCR

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

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

Πίνακας 5. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο κυκλοποίησης

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

6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια PCR στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης.
7. Μετά την ενίσχυση, προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance», σελίδα 22.

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

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

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Αφήστε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και διαλύματα να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία.

Διαδικασία

1. Ανακινήστε ελαφρώς τη φιάλη που περιέχει Streptavidin Sepharose High Performance μέχρι να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.
2. Παρασκευάστε το κύριο μείγμα για την ακίνητοποίηση του DNA σύμφωνα με τον Πίνακα 6. Παρασκευάστε 10% μεγαλύτερη ποσότητα μείγματος από αυτήν που απαιτείται για τον συνολικό αριθμό των αντιδράσεων που πρόκειται να εκτελεστούν.

Πίνακας 6. Κύριο μείγμα για ακίνητοποίηση του DNA

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Νερό (H ₂ O, παρέχεται)	28
Συνολικός όγκος	70

3. Προσθέστε 70 μl του κύριου μείγματος στα βυθίσματα μιας πλάκας PCR 24 βυθισμάτων ή των ταινιών PCR, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16).
4. Προσθέστε 10 μl βιοτινυλιωμένου προϊόντος PCR από το Πρωτόκολλο 2 σε κάθε βύθισμα που περιέχει κύριο μείγμα, όπως έχει προκαθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16).
Σημείωση: Ο συνολικός όγκος ανά βύθισμα πρέπει να ανέρχεται σε 80 μl μετά την προσθήκη του κύριου μείγματος και του προϊόντος PCR.
5. Σφραγίστε την πλάκα PCR (ή τις ταινίες) με τα πώματα ταινίας.
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει κίνδυνος διαρροής μεταξύ των βυθισμάτων.

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

Σημείωση: Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, προετοιμάστε τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 για την προετοιμασία δειγμάτων, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

- 7. Προχωρήστε αμέσως στο «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24 », σελίδα 24.**

Σημείωση: Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Η συλλογή των σφαιριδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την ανάδευση.

Εάν έχει περάσει περισσότερο από 1 λεπτό από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταινιών), αναδεύστε ξανά για 1 λεπτό πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων.

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

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

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάρια με τους εκκινητές αλληλούχησης, φυγοκεντρήστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσθέστε τους 5 διαφορετικούς εκκινητές αλληλούχησης με τον ίδιο τρόπο όπως καθορίστηκε για την πλάκα κατά τη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16), ανάλογα με την περιοχή της ανάλυσης (κωδικόνιο 719 [εξόνιο 18], κωδικόνια 768 και 790 [εξόνιο 20], κωδικόνια 858–861 [εξόνιο 21] ή εξόνιο 19).
- Η ροή εργασιών έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με την αναθεώρηση R1 του *εγχειριδίου του theascreen EGFR Pyro Kit* (βήμα 18). Μην ελαττώνετε τον χρόνο ψύξης των δειγμάτων μετά τη θέρμανση στους 80°C.
- Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Τοποθετήστε έναν συγκρατητήρα PyroMark Q24 Plate σε θερμαντικό μπλοκ που έχει προθερμανθεί στους 80°C, για να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 17. Αφήστε έναν δεύτερο συγκρατητήρα PyroMark Q24 Plate σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 18.
- Το PyroMark Wash Buffer παρέχεται υπό μορφή συμπυκνώματος 10x. Πριν από την πρώτη χρήση, αραιώστε το σε διάλυμα εργασίας 1x προσθέτοντας 225 ml νερού υψηλής καθαρότητας σε 25 ml PyroMark Wash Buffer 10x (τελικός όγκος 250 ml).

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

Διαδικασία

1. Αραιώστε επαρκή ποσότητα κάθε εκκινητή αλληλούχησης (Seq Primer EGFR 719, Seq Primer EGFR 768, Seq Primer EGFR 790, Seq Primer EGFR 858–861, και Seq Primer EGFR Exon 19 Del) στο PyroMark Annealing Buffer όπως αναφέρεται στον Πίνακα 7.

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

Πίνακας 7. Παράδειγμα αραιώσης των εκκινητών αλληλούχησης

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)	Όγκος για 9 + 1 αντιδράσεις (μl)
Seq Primer EGFR 719 ή Seq Primer EGFR Ex 19 Del ή Seq Primer EGFR 768 ή Seq Primer EGFR 790 ή Seq Primer EGFR 858–861	0,8	8
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Συνολικός όγκος	25	250

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

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

3. Τοποθετήστε την πλάκα (ή τις ταινίες) PCR από το Πρωτόκολλο 3 και το PyroMark Q24 Plate στον πάγκο εργασίας (Εικόνα 2).

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα έχει τον ίδιο προσανατολισμό όπως και κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.



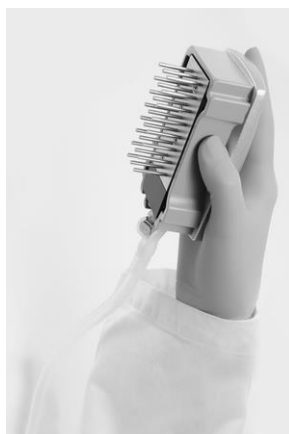
Εικόνα 2. Τοποθέτηση της πλάκας (ή των ταινιών) PCR και της πλάκας PyroMark Q24 στον σταθμό εργασίας υπό κενό.

4. Εφαρμόστε κενό στο εργαλείο ενεργοποιώντας τη λειτουργία κενού.
5. Βυθίστε προσεκτικά τους δειγματολήπτες με φίλτρο του εργαλείου κενού στην πλάκα (ή τις ταινίες) PCR, για τη συλλογή των σφαιριδίων που περιέχουν την ακινητοποιημένη μήτρα. Κρατήστε τους δειγματολήπτες στη θέση αυτή επί 15 δευτερόλεπτα. Προσέξτε πολύ όταν ανασηκώνετε το εργαλείο κενού.

Σημείωση: Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Η συλλογή των σφαιριδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την ανάδευση.

Εάν έχει περάσει περισσότερο από 1 λεπτό από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταινιών), αναδεύστε ξανά για 1 λεπτό πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων.

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



Εικόνα 3. Απεικόνιση του εργαλείου κενού, ανασηκωμένου πέρα από την κατακόρυφο (90°).

10. Για όσο διάστημα το εργαλείο κενού βρίσκεται πάνω από την πλάκα PyroMark Q24, απενεργοποιήστε τον διακόπτη κενού του εργαλείου (Off).
11. Ελευθερώστε τα σφαιρίδια μέσα στο PyroMark Q24 Plate, χαμηλώνοντας τους δειγματολήπτες με φίλτρο μέσα στον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχησης και μετακινώντας το εργαλείο με απαλές πλευρικές κινήσεις.
Σημείωση: Φροντίστε να μη χαράξετε την επιφάνεια του PyroMark Q24 Plate με τους δειγματολήπτες με φίλτρο.
12. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στο λεκανίδιο που περιέχει νερό υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 2) και ανακινήστε το για 10 δευτερόλεπτα.
13. Καθαρίστε τους δειγματολήπτες με φίλτρο βυθίζοντάς τους σε νερό υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 2) και εφαρμόζοντας κενό. Εκπλύνετε τους δειγματολήπτες με 70 ml νερού υψηλής καθαρότητας.
14. Ανασηκώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, πέρα από την κατακόρυφο (90°), για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο (Εικόνα 3).
15. Απενεργοποιήστε το διακόπτη κενού του εργαλείου (Off) και τοποθετήστε το εργαλείο κενού στη μόνιμη θέση (P).
16. Απενεργοποιήστε την αντλία κενού.
Σημείωση: Στο τέλος της εργάσιμης ημέρας, τα υγρά απόβλητα και τα υπολείμματα διαλυμάτων θα πρέπει να απορριφθούν και το PyroMark Q24 Vacuum Workstation να ελεγχθεί για τυχόν σκόνη και διαρροές (βλ. Παράρτημα Β, σελίδα 62).
17. Θερμάνετε το PyroMark Q24 Plate με τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας τον προθερμασμένο συγκρατητήρα PyroMark Q24 Plate.

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

Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24

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

Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη

- Η Αναφορά πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, που βρίσκεται στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24», σελίδα 16), παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους όγκους των νουκλεοτιδίων, των ενζύμων και του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος που απαιτούνται για μια συγκεκριμένη εκτέλεση ανάλυσης.

Ενέργειες πριν από την έναρξη

- Ενεργοποιήστε το σύστημα PyroMark Q24. Ο κεντρικός διακόπτης βρίσκεται στην πίσω πλευρά του οργάνου.

Διαδικασία

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

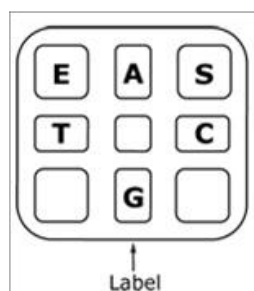
Σημείωση: Μη στροβιλίζετε!

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

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

* Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, θα πρέπει πάντοτε να φοράτε κατάλληλη ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (safety data sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

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



Εικόνα 4. Απεικόνιση του φυσιγγίου PyroMark Q24 από την επάνω πλευρά.

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

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

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

Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την ανάλυση μετάλλαξης μιας ολοκληρωμένης εκτέλεσης EGFR με τη βοήθεια του PyroMark Q24 Software.

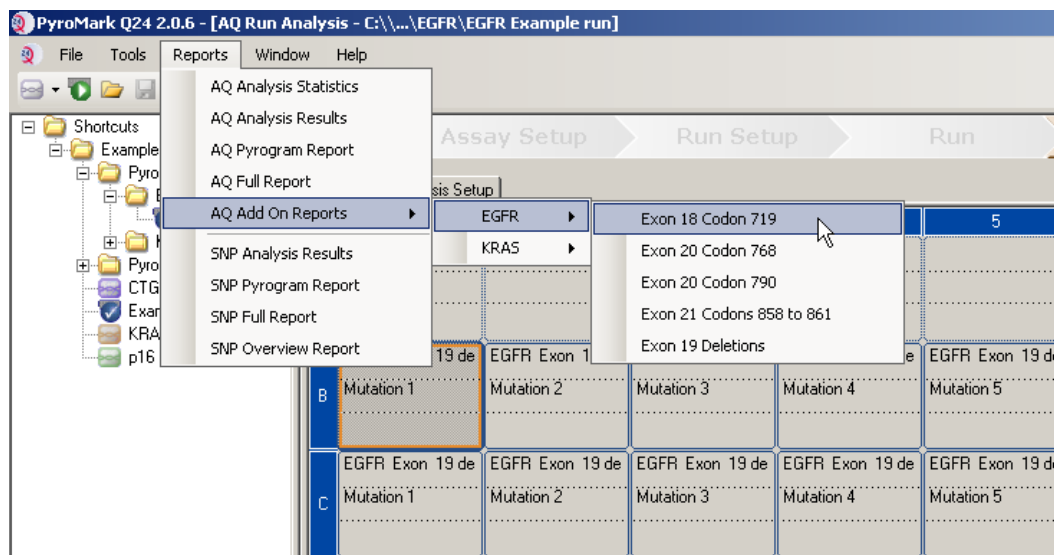
Διαδικασία

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

Σημείωση: Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση του EGFR Plug-in Report για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μπορείτε να προμηθευτείτε το EGFR Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com. Η αναφορά αυτή διασφαλίζει ότι έχουν χρησιμοποιηθεί οι αντίστοιχες τιμές LOD και διαφορετικές ρυθμίσεις «Sequences to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση) για την αυτόματη ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων και ελλείψεων, συμπεριλαμβανομένων είκοσι διαφορετικών ελλείψεων και σύνθετων μεταλλάξεων στο εξόνιο 19.

5. Χρήση του EGFR Plug-in Report:

Επιλέξτε «AQ Add On Reports/EGFR» (Πρόσθετες αναφορές AQ/EGFR) και «Exon 18 Codon 719» (Εξόνιο 18, Κωδικόνιο 719) ή «Exon 19 Deletions» (Ελλείψεις εξονίου 19) ή «Exon 20 Codon 768» (Εξόνιο 20, Κωδικόνιο 768) ή «Exon 20 Codon 790» (Εξόνιο 20, Κωδικόνιο 790) ή «Exon 21 Codons 858 to 961» (Εξόνιο 21, Κωδικόνια 858 έως 961) από το «Reports» (Αναφορές) στο μενού (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Οθόνη AQ Run Analysis (Ανάλυση εκτέλεσης AQ)

Τα βυθίσματα θα αναλυθούν αυτόματα για όλες τις μεταλλάξεις για τις οποίες το όριο LOD παρέχεται στον Πίνακα 8. Τα αποτελέσματα θα προβληθούν σε συνοπτικό πίνακα (Εικόνα 6), ακολουθούμενα από τα λεπτομερή αποτελέσματα, στα οποία περιλαμβάνονται τα Pyrogram και η ποιότητα ανάλυσης.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	del E746-A750	
A2	B105072	Wildtype			
A3	B116390	Mutation	26.6	delL747-P753insS	
A4	B116389	Wildtype			
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	delK745-E749	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	del E746-A750	
A7	WT control	Wildtype			
A8	NTC	Failed Analysis			⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

Εικόνα 6. Πίνακας σύνοψης αποτελεσμάτων.

6. Χρήση της ανάλυσης AQ:

Για να αναλύσετε την εκτέλεση EGFR και να λάβετε μια επισκόπηση των αποτελεσμάτων, κάντε κλικ σε ένα από τα κουμπιά ανάλυσης.



Ανάλυση όλων των βυθισμάτων.



Ανάλυση του επιλεγμένου βυθίσματος.

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

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

Σημείωση: Η τυπική ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) που καθορίστηκε στο Analysis Setup (Ρύθμιση ανάλυσης) αφορά τις συχνότερες μεταλλάξεις στα κωδικόνια 719, 768, 790, 858 και 861 και τις συχνότερες ελλείψεις στο εξόνιο 19 (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 57). Αν ένα δείγμα περιλαμβάνει μια λιγότερο συχνή μετάλλαξη, η ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να μεταβληθεί για ανάλυση και της κατάστασης της μετάλλαξης στη θέση αυτή, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα Α.

Ενημερωμένες συχνότητες μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονίδιο EGFR παρέχονται στο διαδίκτυο από το Ινστιτούτο Sanger, στη διεύθυνση www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Σημείωση: Για αξιόπιστα αποτελέσματα, συνιστώνται ύψη μονής κορυφής άνω των 20 RLU για την ανάλυση του κωδικονίου 768 και άνω των 30 RLU για τις υπόλοιπες 4 αναλύσεις. Ρυθμίστε την τιμή 20 ή 30 RLU, αντίστοιχα, ως «required peak height for passed quality» (απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα) στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* και Παράρτημα Α).

Σημείωση: Για να είναι δυνατή η σωστή ποσοτικοποίηση για το κωδικόνιο 719 και το κωδικόνιο 790, ρυθμίστε τα ύψη των ράβδων του ιστογράμματος στο assay setup (ρύθμιση ανάλυσης) (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 57).

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

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

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

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

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

Σημείωση: Αφού αντικαταστήσετε τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση), βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής και το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος έχουν ρυθμιστεί σωστά (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 57).

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

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου

Συνιστάται ιδιαίτερα να συμπεριλαμβάνεται δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA σε κάθε εκτέλεση αλληλούχησης, για σκοπούς σύγκρισης και ως δείγμα ελέγχου των επιπέδων υποβάθρου. Η μετρούμενη συχνότητα του δείγματος ελέγχου θα πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από το όριο τυφλού (limit of blank, LOB).

Όλα τα δείγματα πρέπει να εξετάζονται σε σχέση με το όριο ανίχνευσης (LOD, βλ. Πίνακα 8) και να ερμηνεύονται ως εξής.

- Συχνότητα μετάλλαξης < LOD: Φυσικός τύπος
- Συχνότητα μετάλλαξης \geq LOD και \leq LOD + 3 εκατοστιαίες μονάδες: Πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου

Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείτε το Plug-in Report (βλ. βήμα 5 στο «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24», σελίδα 32) και προκύψει αυτό, θα εμφανιστεί μια προειδοποίηση.

Τα δείγματα με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου θα πρέπει να θεωρούνται θετικά για τη μετάλλαξη αυτή μόνον εάν αυτό επιβεβαιωθεί με επανάληψη της αλληλούχησης εις διπλούν, μαζί με δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA. Το αποτέλεσμα και των δύο επαναλήψεων θα πρέπει να είναι \geq LOD και να διαφέρει από το αποτέλεσμα του δείγματος ελέγχου. Διαφορετικά, το δείγμα θα πρέπει να θεωρηθεί ως φυσικού τύπου.

- Συχνότητα μετάλλαξης > LOD + 3 εκατοστιαίες μονάδες: Μετάλλαξη

Αν χρησιμοποιείτε το EGFR Plug-in Report, η σύγκριση αυτή πραγματοποιείται αυτόματα.

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

Σημείωση: Εάν μετρηθεί συχνότητα μεγαλύτερη από το LOB στο δείγμα ελέγχου, τότε το επίπεδο του υποβάθρου στην αντίστοιχη εκτέλεση αλληλούχησης είναι υψηλότερο από το συνηθισμένο και άρα ενδέχεται να επηρεαστεί η ποσοτική εκτίμηση των αλληλόμορφων, ιδίως για μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου. Σε αυτή την περίπτωση, οι μετρηθείσες συχνότητες μεταξύ του LOD (Πίνακας 8) και του LOD + 3 εκατοστιαίες μονάδες δεν αποτελούν σωστή βάση για την αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης. Καλό είναι να επαναλαμβάνεται η αλληλούχηση των δειγμάτων με πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου.

Σημείωση: Πρέπει να σημειωθεί ότι η απόφαση για τη θεραπευτική αγωγή καρκινοπαθών ασθενών δεν πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στην κατάσταση της μετάλλαξης EGFR.

Πίνακας 8. Όρια LOB και LOD που καθορίστηκαν για συγκεκριμένες μεταλλάξεις

Μετάλλαξη	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V47)
Ελλείψεις εξονίου 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

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

[†] Τα όρια LOD για αυτές τις ελλείψεις στο εξόνιο 19 προσδιορίστηκαν με την πρόσθεση του εξαπλάσιου της τυπικής απόκλισης των αποτελεσμάτων τυφλών μετρήσεων στην τιμή LOB.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 8. Συνέχεια

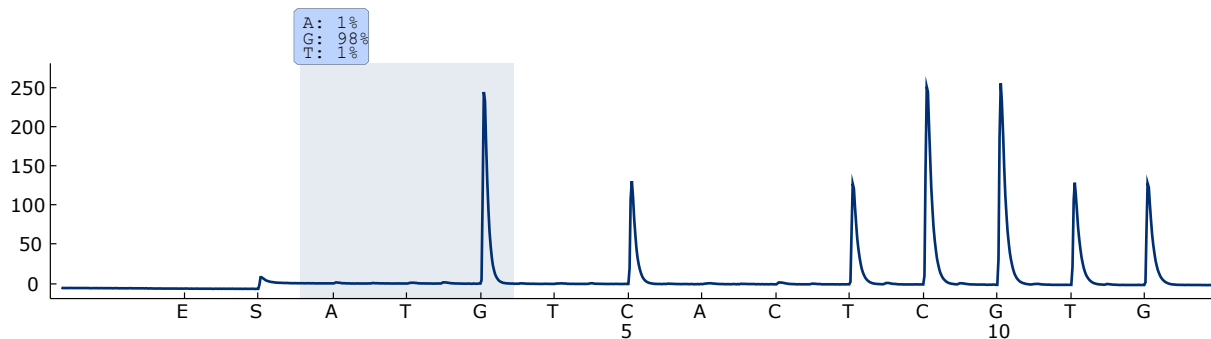
Μετάλλαξη	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V47)
Εξόνιο 18 κωδικόνιο 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Εξόνιο 20 κωδικόνιο 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Εξόνιο 20 κωδικόνιο 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Εξόνιο 21 κωδικόνιο 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Εξόνιο 21 κωδικόνιο 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

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

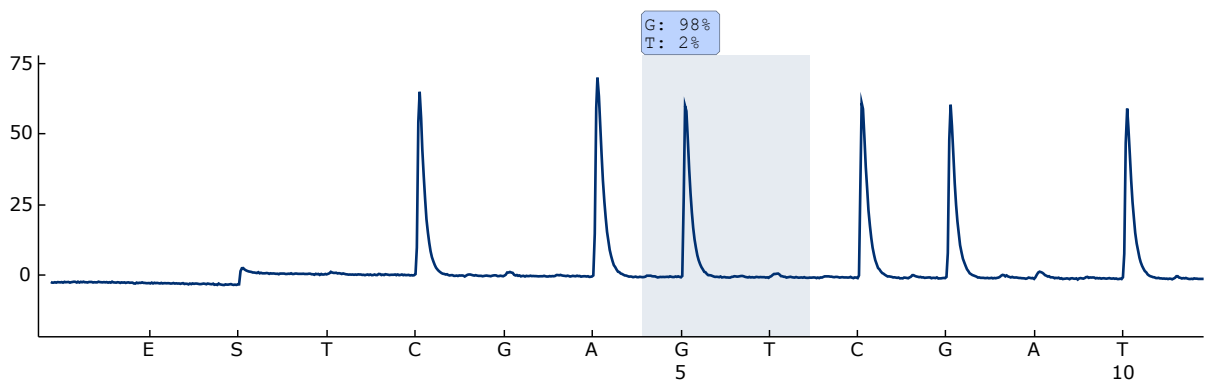
[‡] Το χαμηλότερο επίπεδο μετάλλαξης σε ένα δείγμα που οδηγεί σε μέτρηση συχνότητας \geq LOD.

Ενδεικτικά αποτελέσματα

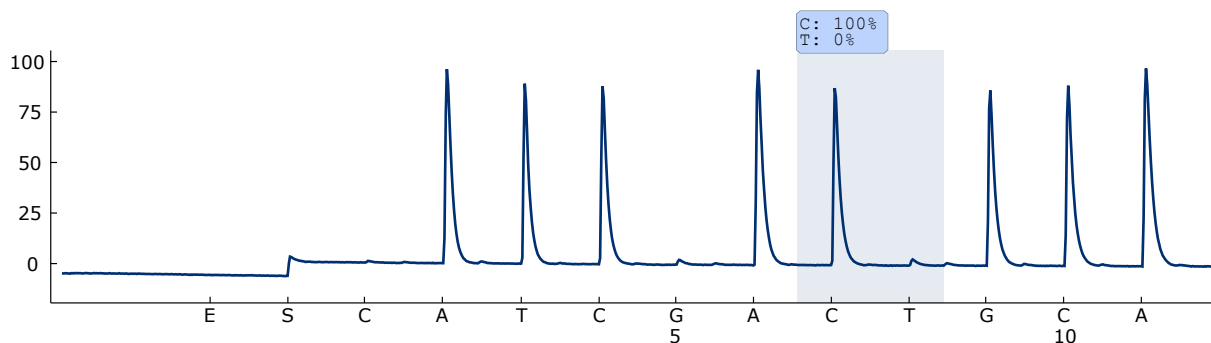
Ενδεικτικά αποτελέσματα Pyrogram παρουσιάζονται στις Εικόνες 7–14.



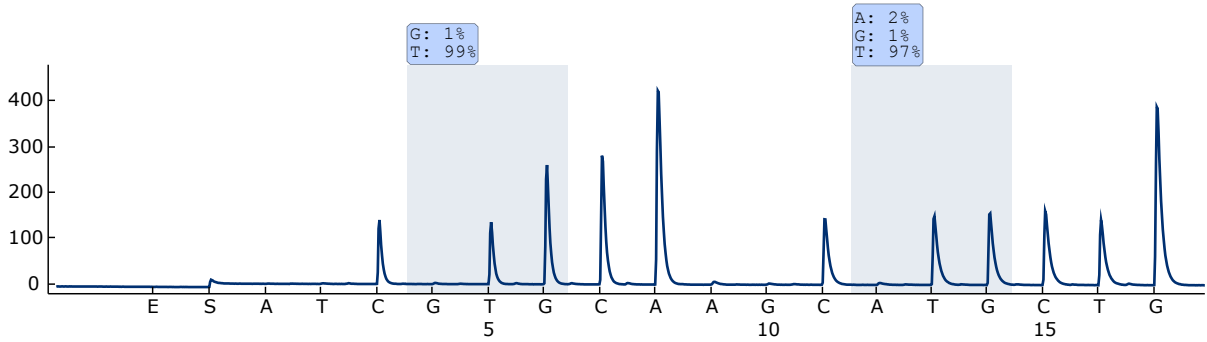
Εικόνα 7. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στο κωδικόνιο 719 με τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) DGCTCCGGTGC.



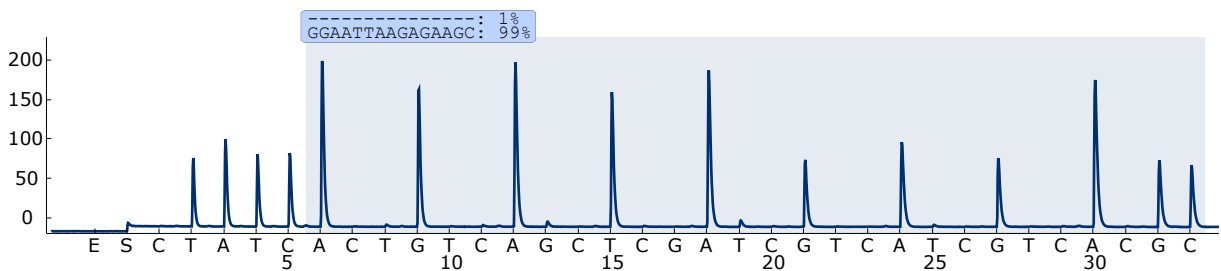
Εικόνα 8. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στο κωδικόνιο 768 με τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) CAKCGTG.



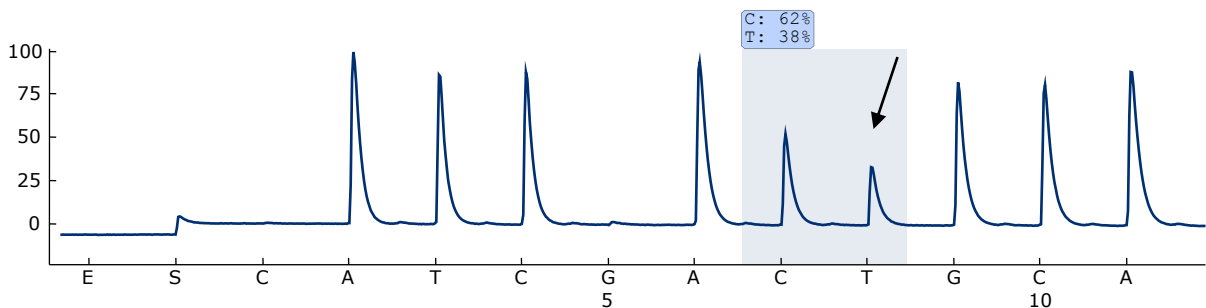
Εικόνα 9. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στο κωδικόνιο 790 με τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) ATCAYGCAG.



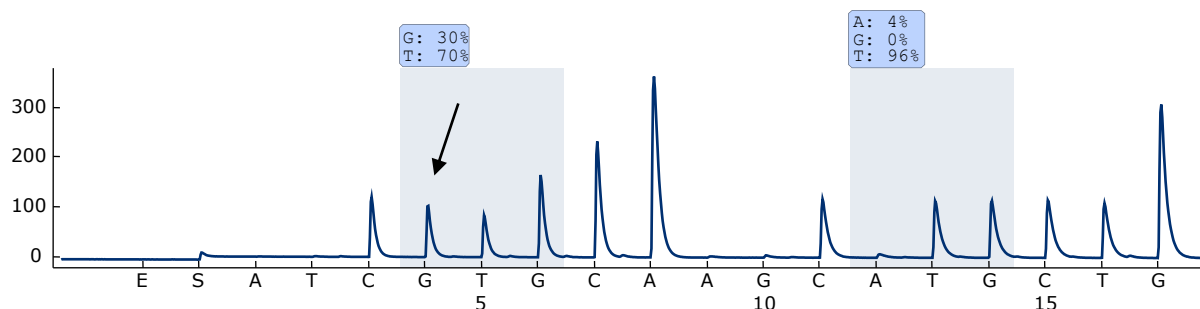
Εικόνα 10. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στα κωδικόνια 858–861 με τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) CKGGCCAAACDGCTGGGT.



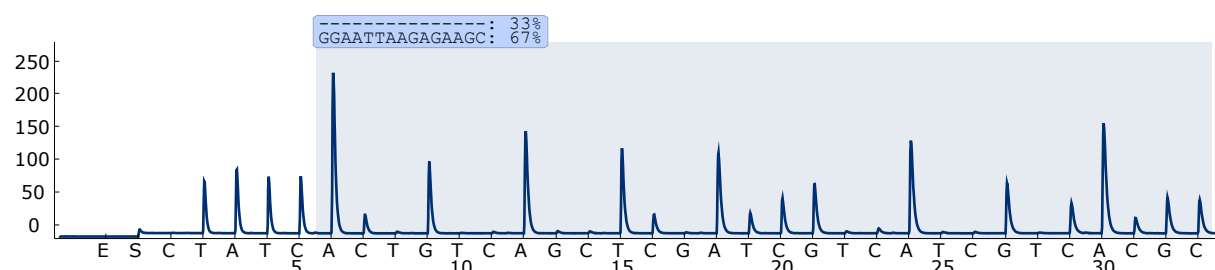
Εικόνα 11. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο φυσικού τύπου στο εξόνιο 19.



Εικόνα 12. Ίχνος Pyrogram που προέκυψε από την ανάλυση δειγμάτων με μετάλλαξη ACG → ATG στη βάση 2 του κωδικόνιου 790 (επισημαίνεται με βέλος).



Εικόνα 13. Ίχνος Pyrogram που προέκυψε από την ανάλυση δειγμάτων με μετάλλαξη CTG → CGG στη βάση 2 του κωδικόνιου 858 (επισημαίνεται με βέλος).



Εικόνα 14. Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με έλλειψη 2235del19 στο εξόνιο 19.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

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

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

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Σήματα στο δείγμα ελέγχου χωρίς μήτρα (δείγμα αρνητικού ελέγχου)

α) Παρεμβολές μεταξύ των βυθισμάτων

Το σήμα ενός βυθίσματος ανιχνεύεται σε παρακείμενο βύθισμα. Αποφύγετε την τοποθέτηση δειγμάτων με σήμα υψηλής έντασης δίπλα στα βυθίσματα δειγμάτων ελέγχου χωρίς μήτρα.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- β) Μόλυνση της αντίδρασης PCR Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο. Αποθηκεύετε και εξάγετε τα υλικά, όπως δοκίμια, δείγματα ελέγχου και αμπλικόνια, ξεχωριστά από τα αντιδραστήρια PCR.

Αλληλουχία χαμηλής ποιότητας ή μη αναμενόμενη αλληλουχία

- α) Χαμηλής ποιότητας γενωμικό DNA Η χαμηλή ποιότητα του γενωμικού DNA μπορεί να προκαλέσει αποτυχία της PCR. Αναλύστε τα δείγματα PCR με μια ηλεκτροφορητική τεχνική (π.χ. το QIAxcel® System ή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης).

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

- α) Χαμηλό ύψος κορυφής Τυχόν σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού είναι πιθανό να οδηγήσουν σε χαμηλές τιμές κορυφής. Να εκτελείτε τακτικά τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*, και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται.
- Εάν εμφανιστεί προειδοποίηση «Check» (Έλεγχος), συγκρίνετε προσεκτικά το Pyrogram με το ιστογράμμο, το οποίο μπορείτε να εμφανίσετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος, το αποτέλεσμα είναι έγκυρο. Διαφορετικά, συνιστάται η επαναληπτική αλληλούχηση του δείγματος.
- β) Η μετάλλαξη δεν ορίζεται στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) Προσαρμόστε τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 57) και επαναλάβετε την ανάλυση της εκτέλεσης.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- γ) Μη αναμενόμενη σπάνια μετάλλαξη
- Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία) μπορεί να οφείλονται σε μη αναμενόμενο μοτίβο κορυφών. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία μιας μη αναμενόμενης μετάλλαξης, η οποία δεν αναλύεται με την παρεχόμενη ρύθμιση «Sequences to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση). Τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αναλυθούν χρησιμοποιώντας την εναλλακτική ρύθμιση «Sequences to Analyze» (Αλληλουχίες προς ανάλυση) λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία μη αναμενόμενων μεταλλάξεων.
- δ) Προειδοποίηση μεγάλης απόκλισης ύψους κορυφής για διανομή X
- Το Pyrogram θα πρέπει να αντιπαραβάλλεται προσεκτικά με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορείτε να προβάλετε κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του Pyrogram. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές δεν συμφωνούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν εξηγούνται από σπάνιες μεταλλάξεις, συνιστάται η επαναληπτική αλληλούχηση του δείγματος.
- ε) Εμφανίζεται το μήνυμα προειδοποίησης «Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8» (Αβεβαιότητα/Αποτυχία λόγω μεγάλης απόκλισης ύψους κορυφής στην προσθήκη: 8) στην ανάλυση του κωδικονίου 790.
- Ο θόρυβος υποβάθρου στην προσθήκη T8 είναι κάτω από το αναμενόμενο επίπεδο. Προσαρμόστε το ύψος της ράβδου του ιστογράμματος στην προεπιλεγμένη τιμή (1,00, μόνο κατά τη χρήση του εργαλείου ανάλυσης που περιλαμβάνεται στο PyroMark Q24 Software).

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- στ) Εμφανίζεται το μήνυμα προειδοποίησης «Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10» (Αβεβαιότητα/Αποτυχία λόγω μεγάλης απόκλισης ύψους κορυφής στην προσθήκη: 10) στην ανάλυση του κωδικονίου 858-861. Μια μετάλλαξη CTG>CGG υψηλού επιπέδου στο κωδικόνιο 858 (L858R) μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο υπόβαθρο σε προσθήκες G-10 και A-12, και συχνότητα μεγαλύτερη από LOD για τη μετάλλαξη ATG>CAG στο κωδικόνιο 861 (L861Q). Σε αυτήν την περίπτωση, έγκυρη είναι μόνο η αναφερόμενη μετάλλαξη L585R και μπορείτε να παραβλέψετε την προειδοποίηση και την ποιοτική αξιολόγηση «Check» (Έλεγχος).
Σημείωση: Το EGFR Plug-in Report θα αναφέρει μόνο μία μετάλλαξη (δηλ. τη μετάλλαξη με την υψηλότερη συχνότητα).
- ζ) Εμφανίζεται το μήνυμα προειδοποίησης «Uncertain due to high peak height deviation at dispensation: 23» (Αβεβαιότητα λόγω μεγάλης απόκλισης ύψους κορυφής στην προσθήκη: 23) όταν αναφέρεται η έλλειψη 2235del15. Αυτή η προειδοποίηση μπορεί να προκύψει σε έλλειψη 2235del15 υψηλού επιπέδου. Σε αυτήν την περίπτωση, η αναφερόμενη μετάλλαξη είναι έγκυρη και μπορείτε να παραβλέψετε την προειδοποίηση και την ποιοτική αξιολόγηση «Check» (Έλεγχος).

Υψηλό υπόβαθρο

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

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Απουσία σημάτων στο δείγμα θετικού ελέγχου (δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA)

- | | |
|---|---|
| α) Ανεπαρκής ποσότητα μείγματος ενζύμων ή υποστρώματος για όλα τα βυθίσματα | Βεβαιωθείτε ότι η πλήρωση του φυσιγγίου PyroMark Q24 εκτελείται σύμφωνα με το «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν την εκτέλεση) στο μενού «Tools» (Εργαλεία). |
| β) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης ή αραίωσης των αντιδραστηρίων | Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια <i>therascreen</i> σύμφωνα με τις οδηγίες στο «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση στο PyroMark Q24», σελίδα 29. |
| γ) Αποτυχία προετοιμασίας της PCR ή των δειγμάτων | Τα σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR, τον προγραμματισμό του κυκλοποιητή PCR ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού ενδέχεται να οδηγήσουν σε απουσία σήματος. Να εκτελείτε τη δοκιμή λειτουργίας των δειγματοληπτών με φίλτρο όπως περιγράφεται στο <i>Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24</i> και να αντικαθιστάτε τους δειγματολήπτες όταν σας υποδεικνύεται. Επαναλάβετε την PCR και την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού. |

Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *therascreen EGFR Pyro Kit* έχει ελεγχθεί σε ό,τι αφορά τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση σταθερής ποιότητας των προϊόντων.

Περιορισμοί

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων.

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

Χαρακτηριστικά επιδόσεων

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το όριο τυφλού (LOB) και το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) έχουν καθορισθεί για διάφορες μεταλλάξεις με τη χρήση μειγμάτων πλασμιδίων (Πίνακας 9). Ο καθορισμός των ορίων LOB και LOD πραγματοποιήθηκε βάσει των συστάσεων της Οδηγίας EP17-A «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation, approved guideline» (Πρωτόκολλο για τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού, εγκεκριμένη οδηγία) του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI). Τα σφάλματα α και β (ψευδώς θετικό και ψευδώς αρνητικό, αντίστοιχα) καθορίστηκαν στο 5%. Τα όρια LOD για ορισμένες σπάνιες ελλείψεις στο εξόνιο 19 προσδιορίστηκαν με την πρόσθεση του εξαπλάσιου της τυπικής απόκλισης των αποτελεσμάτων τυφλών μετρήσεων στην τιμή LOB.

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

Η μετάλλαξη CTG → CGG στο εξόνιο 858

Για τη μετάλλαξη CTG → CGG στο κωδικόνιο 858, οι μετρήσεις δειγμάτων με χαμηλά επίπεδα μετάλλαξης παρουσίασαν μη κανονική κατά Gauss κατανομή. Κατά συνέπεια, η τιμή LOD προσδιορίστηκε με διαφορετική μέθοδο, σύμφωνα με τις συστάσεις της κατευθυντήριας οδηγίας EP17-A του CLSI. Το ελάχιστο σήμα που υποδεικνύει την παρουσία μετάλλαξης (LOD) στις θέσεις αυτές καθορίστηκε σε 2 εκατοστιαίες μονάδες πάνω από το αντίστοιχο επίπεδο γραμμής αναφοράς, όπως αυτό καθορίστηκε από το 95ο εκατοστημόριο των μετρήσεων τυφλού. Κατά την ανάλυση ενός δείγματος με επίπεδο μετάλλαξης 5,5%, το 95% των αποτελεσμάτων ($n = 72$) παρείχε ένα σήμα που μπορεί να εκληφθεί ως θετικό (\geq LOD, δηλ. $\geq 2,6$ ποσοστιαίες μονάδες).

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

Μετάλλαξη	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V47)
Ελλείψεις εξονίου 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

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

[†] Τα όρια LOD για αυτές τις ελλείψεις στο εξόνιο 19 προσδιορίστηκαν με την πρόσθεση του εξαπλάσιου της τυπικής απόκλισης των αποτελεσμάτων τυφλών μετρήσεων στην τιμή LOB.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 9. Συνέχεια

Μετάλλαξη	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V47)
Εξόνιο 18 κωδικόνιο 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Εξόνιο 20 κωδικόνιο 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Εξόνιο 20 κωδικόνιο 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Εξόνιο 21 κωδικόνιο 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Εξόνιο 21 κωδικόνιο 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

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

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

Σημείωση: Αυτές οι τιμές βασίστηκαν σε εκτελέσεις στις οποίες μείγματα πλασμιδίων που έφεραν τον φυσικό τύπο ή την αντίστοιχη μεταλλαγμένη αλληλουχία χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την ενίσχυση με PCR.

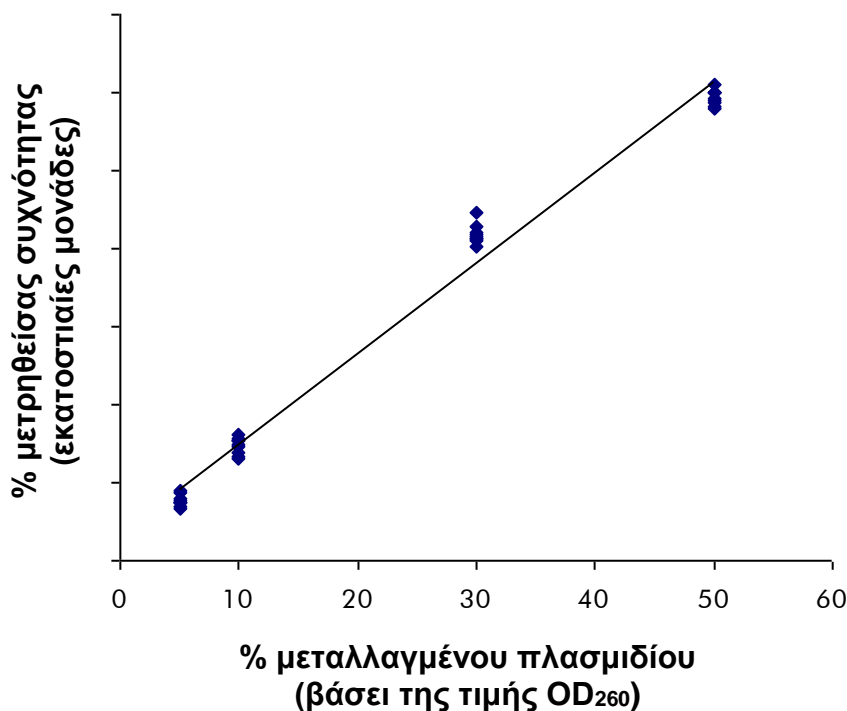
Σημείωση: Συνιστάται η εργαστηριακή επαλήθευση της απόδοσης της μεθόδου.

Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα προσδιορίστηκε με χρήση μειγμάτων πλασμιδίων που έφεραν την αλληλουχία φυσικού τύπου ή τη μεταλλαγμένη αλληλουχία για τις μεταλλάξεις GGC>AGC στο κωδικόνιο 719, ACG>ATG στο κωδικόνιο 790, CTG>CGG στο κωδικόνιο 858 και για τις ελλείψεις 2235del15 και 2236del15 στο εξόνιο 19. Τα πλασμίδια αναμείχθηκαν σε αναλογίες τέτοιες ώστε να προκύψουν τέσσερα επίπεδα μετάλλαξης (5, 10, 30 και 50%). Κάθε μείγμα αναλύθηκε με τρεις διαφορετικές παρτίδες του *therascreen* EGFR Pyro Kit, σε τρεις εκτελέσεις αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού, με τρεις επαναλήψεις στην καθεμία.

Τα αποτελέσματα (n=9 για κάθε επίπεδο μετάλλαξης) αναλύθηκαν σύμφωνα με την οδηγία EP6-A “Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline” (Αξιολόγηση της γραμμικότητας των διαδικασιών ποσοτικής μέτρησης: μια στατιστική προσέγγιση – εγκεκριμένη οδηγία) του CLSI, με χρήση του Analyse-it® Software v2.21. Τα αποτελέσματα για την έλλειψη 2235del15 στο εξόνιο 19 παρουσιάζονται στην Εικόνα 15.

Τα αποτελέσματα ήταν γραμμικά εντός του επιτρεπόμενου ορίου μη γραμμικότητας των 5 εκατοστιαίων μονάδων, για την ελεγχθείσα περιοχή τιμών επιπέδου μετάλλαξης (από 5% έως 50%). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τις μεταλλάξεις GGC>AGC στο κωδικόνιο 719, ACG>ATG στο κωδικόνιο 790, CTG>CGG στο κωδικόνιο 858 και για την έλλειψη 2236del15 στο εξόνιο 19.



Εικόνα 15. Γραμμικότητα της έλλειψης 2235del15 στο εξόνιο 19.

Ακρίβεια

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

Η επαναληψιμότητα (μεταβλητότητα εντός μεθόδου και μεταξύ παρτίδων) υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα προσδιορισμού γραμμικότητας (τρεις εκτελέσεις την ίδια ημέρα με χρήση διαφορετικών παρτίδων του *therascreen* EGFR Pyro Kit). Η ενδιάμεση ακρίβεια (μεταβλητότητα εντός εργαστηρίου) προσδιορίστηκε σε τρεις εκτελέσεις εντός ενός εργαστηρίου σε τρεις διαφορετικές ημέρες με διαφορετικούς χειριστές, διαφορετικά όργανα PyroMark Q24 και διαφορετικές παρτίδες του *therascreen* EGFR Pyro Kit. Η αναπαραγωγιμότητα (μεταβλητότητα μεταξύ εργαστηρίων) υπολογίστηκε με δύο εκτελέσεις σε ένα εσωτερικό εργαστήριο και δύο εκτελέσεις σε ένα εξωτερικό εργαστήριο και με χρήση διαφορετικών παρτίδων του *therascreen* EGFR Pyro Kit.

Οι εκτιμήσεις ακρίβειας εκφράζονται ως τιμές τυπικής απόκλισης των μετρούμενων συχνοτήτων μετάλλαξης, σε εκατοστιαίες μονάδες (Πίνακας 10). Η επαναληψιμότητα, η ενδιάμεση ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα για την έλλειψη 2235del15 στο εξόνιο 19 ήταν 0,8–1,2, 0,7–2,9 και 0,7–1,8 εκατοστιαίες μονάδες αντίστοιχα, στην ελεγχόμενη περιοχή τιμών επιπέδου μετάλλαξης (5–50%). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τις μεταλλάξεις GGC>AGC στο κωδικόνιο 719, ACG>ATG στο κωδικόνιο 790, CTG>CGG στο κωδικόνιο 858, και για την έλλειψη 2236del15 στο εξόνιο 19.

Πίνακας 10. Ακρίβεια για την έλλειψη 2235del15 στο εξόνιο 19*

% μεταλλαγμένου πλασμιδίου [†]	Επαναληψιμότητα		Ενδιάμεση ακρίβεια		Αναπαραγωγιμότητα	
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

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

[†] Με βάση τη μέτρηση OD₂₆₀.

Διαγνωστική αξιολόγηση

Το *therascreen* EGFR Pyro Kit αξιολογήθηκε έναντι της αλληλούχησης με τη μέθοδο Sanger και του *therascreen* EGFR RGQ Kit. DNA απομονώθηκε από 100 δείγματα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) και αναλύθηκε ως προς την παρουσία μεταλλάξεων στα κωδικόνια 719, 768, 790 και 858–861, και ελλείψεων και μεταλλάξεων στο εξόνιο 19.

Το DNA απομονώθηκε με χρήση του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Εκτελέστηκαν αναλύσεις με το *therascreen* EGFR Pyro Kit στο σύστημα PyroMark Q24, με το *therascreen* EGFR RGQ Kit στο Rotor Gene-Q 5plex HRM σειράς II και η αλληλούχηση κατά Sanger στο ABI® 3130 Genetic Analyzer.

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν, η κατάσταση μετάλλαξης προσδιορίστηκε για όλα τα κωδικόνια και το εξόνιο 19 σε 97 δείγματα και με τις τρεις μεθόδους. Για δύο δείγματα η κατάσταση μετάλλαξης του κωδικονίου 768 δεν καθορίστηκε με ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού και σε ένα δείγμα η διαδικασία απέτυχε για τα περισσότερα κωδικόνια και με τις τρεις μεθόδους, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ποιότητα του DNA ήταν πολύ χαμηλή ώστε να επιτευχθεί ενίσχυση.

Η μετάλλαξη αντίστασης T790M ανιχνεύθηκε σε ένα δείγμα και με τις τρεις μεθόδους, ενώ η μετάλλαξη L861Q ανιχνεύθηκε σε ένα δείγμα μόνο με ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού. Δεκατρείς, δώδεκα και δεκαέξι ελλείψεις και σύνθετες μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 ανιχνεύθηκαν με ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού, με το Rotor-Gene Q και με αλληλούχηση κατά Sanger, αντίστοιχα. Δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση με την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού και με το Rotor-Gene Q τριών από τις ελλείψεις στο εξόνιο 19 που ανιχνεύθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger. Η μετάλλαξη L858R ανιχνεύθηκε σε τρία δείγματα και με τις τρεις μεθόδους, σε δύο δείγματα με την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού και με μία εκ των δύο άλλων μεθόδων, σε ένα δείγμα μόνο με την ανάλυση αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού και σε ένα δείγμα μόνο με την ανάλυση με το Rotor-Gene Q. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 11–14.

Καμία μέθοδος από τις τρεις δεν ανίχνευσε μεταλλάξεις στα κωδικόνια 719 και 768 στα 100 δείγματα.

Εξαιρώντας τα δείγματα στα οποία μία ή περισσότερες μέθοδοι απέτυχαν, το *therascreen* EGFR Pyro Kit και η αλληλούχηση κατά Sanger παρουσίασαν συμφωνία 100%, 98%, 99% και 97% στα αποτελέσματα για τα κωδικόνια 790, 858, 861, και το εξόνιο 19, αντίστοιχα, ενώ το *therascreen* EGFR Pyro Kit και το *therascreen* EGFR RGQ Kit 100%, 97%, 99%, και 99% για τα κωδικόνια 790, 858, 861, και το εξόνιο 19, αντίστοιχα (Πίνακες 11–14).

Πίνακας 11. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων NSCLC για το κωδικόνιο 790

		Αλληλούχηση κατά Sanger			
		Μεταλ- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	1	0	1	2
	Φυσικός τύπος	0	98	0	98
	Άγνωστο	0	0	0	0
	Σύνολο	1	98	1	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ Kit			
		Μεταλ- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	1	0	1	2
	Φυσικός τύπος	0	98	0	98
	Άγνωστο	0	0	0	0
	Σύνολο	1	98	1	100

Πίνακας 12. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων NSCLC για το κωδικόνιο 858

		Αλληλούχηση κατά Sanger			
		Μετα- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	4	2	0	6
	Φυσικός τύπος	0	93	0	93
	Άγνωστο	0	0	1	1
	Σύνολο	4	95	1	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ Kit			
		Μετα- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	4	2	0	6
	Φυσικός τύπος	1	92	0	93
	Άγνωστο	0	1	0	1
	Σύνολο	5	95	0	100

Πίνακας 13. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων NSCLC για το κωδικόνιο 861

		Αλληλούχηση κατά Sanger			
		Μετα- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	0	1	0	1
	Φυσικός τύπος	0	98	0	98
	Άγνωστο	0	1	0	1
	Σύνολο	0	100	0	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ Kit			
		Μετα- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	0	1	0	1
	Φυσικός τύπος	0	98	0	98
	Άγνωστο	0	0	1	1
	Σύνολο	0	99	1	100

Πίνακας 14. Αποτελέσματα των αναλυθέντων δειγμάτων NSCLC για το εξόνιο 19

		Αλληλούχηση κατά Sanger			
		Μετα- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	13	0	0	13
	Φυσικός τύπος	3	84	0	87
	Άγνωστο	0	0	0	0
	Σύνολο	16	84	0	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ Kit			
		Μετα- λαγμένο	Φυσικός τύπος	Άγνωστο	Σύνολο
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	Μεταλλαγμένο	12	1	0	13
	Φυσικός τύπος	0	86	1	87
	Άγνωστο	0	0	0	0
	Σύνολο	12	87	1	100

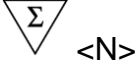













Σημείωση: Σε όλες τις εκτελέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης, το σήμα ήταν πάνω από 20 RLU για την ανάλυση του κωδικονίου 768 και πάνω από 30 RLU για τις υπόλοιπες τέσσερις αναλύσεις, όπως κατά κανόνα προκύπτει από 10 ng DNA που απομονώθηκε από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE). Τα δεδομένα αλληλούχησης μέσω πυροφωσφορικού αναλύθηκαν με χρήση του EGFR Plug-in Report.

Βιβλιογραφία

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

Για έναν πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Σύμβολα

	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού
	Συστατικά
	Περιεχόμενα
	Αριθμός
	Υδροξείδιο του νατρίου
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Στοιχεία επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support ή επικοινωνήστε τηλεφωνικά με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* EGFR Pyro


Εάν έχει εγκατασταθεί το EGFR Plug-in Report, τότε θα υπάρχουν προκαθορισμένες ρυθμίσεις ανάλυσης για τα κωδικόνια 719, 768, 790 και 858–861 και για τις ελλείψεις του εξονίου 19 στον φυλλομετρητή συντομεύσεων του PyroMark Q24 software, στη διαδρομή «Example Files/PyroMark Setups/EGFR» (Αρχεία παραδειγμάτων/Ρυθμίσεις PyroMark/EGFR). Τα παρακάτω βήματα δεν χρειάζεται να εκτελεστούν. Μπορείτε να προμηθευτείτε το EGFR Plug-in Report στέλνοντας ένα e-mail στη διεύθυνση pyro.plugin@qiagen.com.

Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση του EGFR Plug-in Report αντί της χειροκίνητης ανάλυσης. Δεν είναι δυνατή η προσθήκη σύνθετων μεταλλάξεων στη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) χειροκίνητα και θα πρέπει να υποβληθούν σε ανάλυση χρησιμοποιώντας το plug-in. Μετά την εγκατάσταση του plug-in ή κάθε φορά που γίνεται εγκατάσταση ή αναβάθμιση νέου λογισμικού στον υπολογιστή, η σωστή λειτουργία του plug-in πρέπει να ελέγχεται όπως περιγράφεται στο γρήγορο οδηγό του EGFR Plug-In.

Αν δεν έχει γίνει εγκατάσταση του EGFR Plug-in Report, το αρχείο ανάλυσης πρέπει να ρυθμιστεί χειροκίνητα πριν από την πρώτη εκτέλεση της ανάλυσης *therascreen* EGFR Pyro. Ρυθμίστε την ανάλυση για τα κωδικόνια 719, 768, 790 και 858–861 και για τις ελλείψεις του εξονίου 19 του EGFR χρησιμοποιώντας το PyroMark Q24 Software, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία

Κωδικόνιο 719 του EGFR

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

A2. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
DGCTCCGGTGC

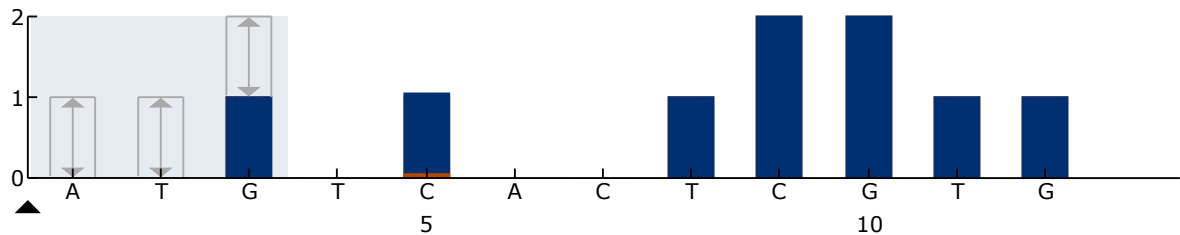
Σημείωση: Οι συχνότερες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 719 θα ανιχνευθούν στο νουκλεοτίδιο 2155 χρησιμοποιώντας αυτήν τη ρύθμιση «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).

Το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να τροποποιηθεί μετά την εκτέλεση για ανάλυση μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 2156. Για να ελέγξετε αν υπάρχουν μεταλλάξεις στο νουκλεοτίδιο 2156, αντικαταστήστε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) με την παρακάτω αλληλουχία.

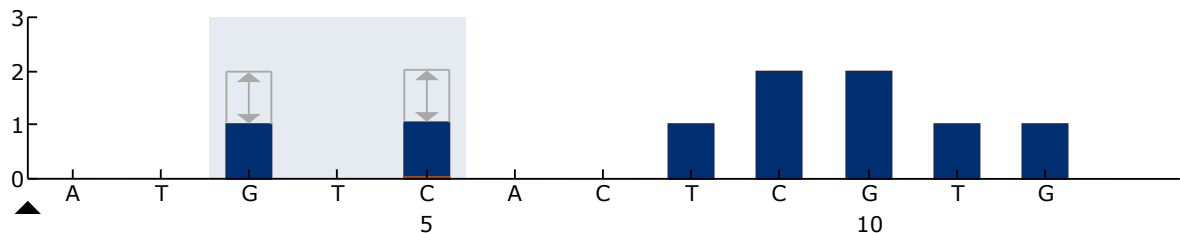
GSCTCCGGTGC

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η τιμή κατωφλίου για το ύψος μονής κορυφής έχει ρυθμιστεί σε 30 RLU. Επίσης, βεβαιωθείτε ότι τα ύψη των ράβδων του ιστογράμματος έχουν ρυθμιστεί σωστά (βλ. παρακάτω οδηγίες).

- A3. Εισαγάγετε με το χέρι το παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων).**
ATGTCACCTCGTG




Εικόνα 16. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 719 (νουκλεοτίδιο 2155) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *DGCTCCGGTGC*. Το κόκκινο ορθογώνιο στο κάτω μέρος της ράβδου στην προσθήκη C5 παρουσιάζει την προσαρμογή του ύψους της ράβδου του ιστογράμματος.

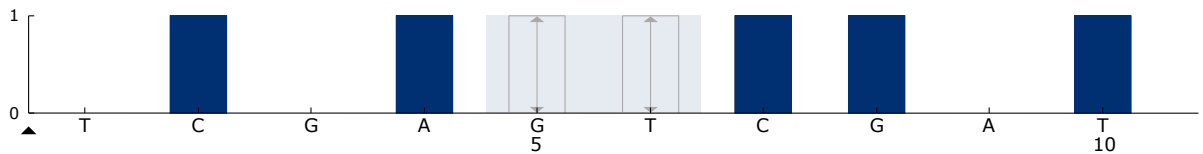


Εικόνα 17. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 719 (νουκλεοτίδιο 2156) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *GSCTCCGGTGC*. Το κόκκινο ορθογώνιο στο κάτω μέρος της ράβδου στην προσθήκη C5 παρουσιάζει την προσαρμογή του ύψους της ράβδου του ιστογράμματος.


- A4. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.**
- A5. Στο ιστογράμμα, μετακινήστε το δρομέα του ποντικιού στο πάνω άκρο της ράβδου, στην προσθήκη C5, και κάντε κλικ κρατώντας πατημένο το κουμπί «Ctrl». Θα εμφανιστεί ένα μικρό παράθυρο με το προεπιλεγμένο ύψος της ράβδου του ιστογράμματος (1,00). Αυξήστε το επίπεδο σε 1,04 για το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *DGCTCCGGTGC* και σε 2,04 για το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) *GSCTCCGGTGC*.**
- A6. Κάντε κλικ στο στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «EGFR codon 719» (Κωδικόνιο 719 του EGFR).**

Κωδικόνιο 768 του EGFR


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

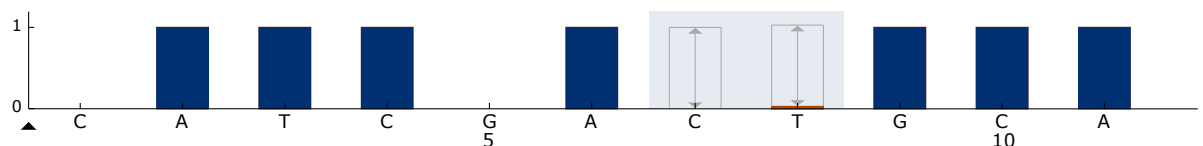


Εικόνα 18. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 768 (νουκλεοτίδιο 2303) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **CAKCGTG**.

- A4. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «EGFR codon 768» (Κωδικόνιο 768 του EGFR).


Κωδικόνιο 790 του EGFR

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




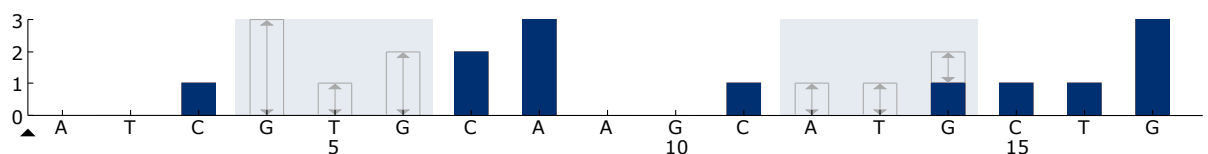
Εικόνα 19. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 790 (νουκλεοτίδιο 2369) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **ATCAYGCAG**. Το κόκκινο ορθογώνιο στο κάτω μέρος της ράβδου στην προσθήκη T8 παρουσιάζει την προσαρμογή του ύψους της ράβδου του ιστογράμματος.

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


- A5.** Στο ιστόγραμμα, μετακινήστε το δρομέα του ποντικιού στο πάνω άκρο της ράβδου, στην προσθήκη T8, και κάντε κλικ κρατώντας πατημένο το κουμπί «Ctrl». Θα εμφανιστεί ένα μικρό παράθυρο με το προεπιλεγμένο ύψος της ράβδου του ιστογράμματος (1,00). Αυξήστε το επίπεδο σε 1,03.
- A6.** Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «EGFR codon 790» (Κωδικόνιο 790 του EGFR).

Κωδικόνια 858–861 του EGFR


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



Εικόνα 20. Ιστόγραμμα για τα κωδικόνια 858–861 με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) **CKGGCCAAACDGCTGGGT**.

- A4.** Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.
- A5.** Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «EGFR codons 858–861» (Κωδικόνια 858–861 του EGFR).

EGFR Exon 19 del

- A1.** Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέα ανάλυση AQ).
- A2.** Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

Η συχνότερη έλλειψη στο εξόνιο 19 είναι 2235del15. Για να εκτελέσετε ανάλυση για άλλες ελλείψεις, το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) πρέπει να τροποποιηθεί σύμφωνα με κάθε έλλειψη που καθορίστηκε.

Χρησιμοποιήστε την αλληλουχία φυσικού τύπου:

**TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA
ATCCTCGAT**

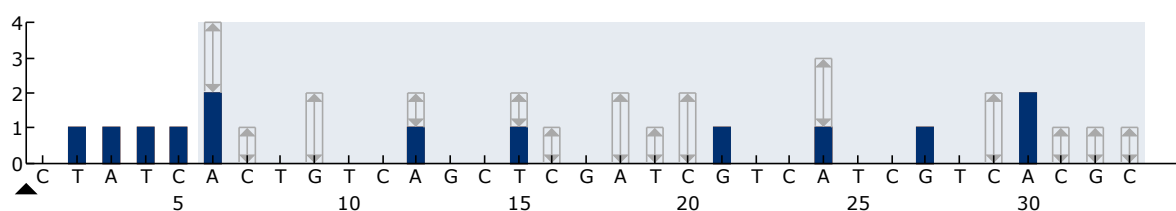
και προσθέστε τετράγωνες αγκύλες στο σημείο έναρξης και τέλους της έλλειψης.

Για τη δεύτερη συχνότερη έλλειψη στο εξόνιο 19 (2236del15), αντικαταστήστε το «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) με τα παρακάτω.

TATCAAG[GAATTAAGAGAAGCA]ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

A3. Εισαγάγετε με το χέρι το παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων).


CTATCACTGTCAGCTCGATCGTCATCGTCACGC



Εικόνα 21. Ιστόγραμμα για έλλειψη εξονίου 19.

- A4. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το «Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:» (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής – Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα:) σε 30.**
- A5. Κάντε κλικ στο στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως «EGFR Exon 19 del» (Έλλειψη εξονίου 19 του EGFR).**

Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανιδίων

<p>ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ</p> 	<p>Επικίνδυνες χημικές ουσίες</p> <p>Το διάλυμα αποδιάταξης που χρησιμοποιείται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, το οποίο προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια και το δέρμα.</p> <p>Να φοράτε πάντοτε γυαλιά ασφαλείας, γάντια και ποδιά εργαστηρίου.</p> <p>Η αρμόδια αρχή (π.χ. ο υπεύθυνος του εργαστηρίου) πρέπει να λαμβάνει τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χώρος εργασίας είναι ασφαλής και ότι οι χειριστές των οργάνων δεν εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα τοξικών ουσιών (χημικών ή βιολογικών), όπως καθορίζεται στα ισχύοντα δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS) ή τα έγγραφα των OSHA*, ACGIH† και COSHH‡.</p> <p>Ο αερισμός για αναθυμιάσεις και η απόρριψη των αποβλήτων πρέπει να γίνονται σύμφωνα με όλους τους εθνικούς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς και νόμους υγείας και ασφάλειας.</p>
---	---

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

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

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

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

Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη

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

Διαδικασία

- B1. Βεβαιωθείτε ότι στο εργαλείο κενού δεν εφαρμόζεται κενό.**
Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία κενού και η αντλία κενού είναι απενεργοποιημένες (Off).
- B2. Απορρίψτε διαλύματα που τυχόν απομένουν στα λεκανίδια.**
- B3. Ξεπλύνετε τα λεκανίδια με νερό υψηλής καθαρότητας, ή αντικαταστήστε τους, εάν είναι απαραίτητο.**

B4. Αδειάστε τον περιέκτη αποβλήτων.

Σημείωση: Το καπάκι μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς αποσύνδεση της σωλήνωσης.

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

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις σε συστήματα PyroMark Q24: Εκκινήτες αλληλούχησης, Εκκινήτες PCR, Δείγμα ελέγχου με μη μεθυλιωμένο DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Μείγμα ενζύμων, Μείγμα υποστρώματος, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP και H ₂ O	971480
PyroMark Q24 MDx	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001513
PyroMark Q24	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη αλληλούχηση μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως τη μονόκλωνη μήτρα	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Λογισμικό εφαρμογής	9019063
PyroMark Q24 Software	Λογισμικό ανάλυσης	9019062
Βοηθητικός εξοπλισμός		
PyroMark Q24 Plate (100)	Πλάκα αντίδρασης αλληλούχησης 24 βυθισμάτων	979301

* Αποκλειστικά για το Ηνωμένο Βασίλειο.

† Για τις υπόλοιπες χώρες.

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

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

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

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

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς του αγοραστή ή του χρήστη του *therascreen* EGFR Pyro Kit των εξής όρων:

1. Το *therascreen* EGFR Pyro Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο του theascreen EGFR Pyro Kit* και σε συνδυασμό μόνο με τα συστατικά που περιέχονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης στο πλαίσιο των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε άλλα συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο του theascreen EGFR Pyro Kit Handbook* και στα πρόσθετα πρωτόκολλα που είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση(-εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικά με το kit ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

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

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

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

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

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

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

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

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

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

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

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

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

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

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

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

