

# Manual do *therascreen*<sup>®</sup> KRAS Pyro<sup>®</sup> Kit



Versão 1



Para uso em diagnóstico in vitro



**REF** 971460

**HB** 1061825PTBR

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R3 **MAT** 1061825PTBR



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN é a principal fornecedora de tecnologias inovadoras de amostra e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção de conteúdos de qualquer amostra biológica. Nossos avançados serviços e produtos de alta qualidade garantem o sucesso, desde a amostra até o resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de DNA, RNA e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Pesquisa em microRNA e RNAi
- Automação de tecnologias de amostra e ensaio

A nossa missão é possibilitar que você alcance sucesso notável e progressos. Para obter mais informações, acesse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Conteúdo

Uso previsto	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	7
Materiais fornecidos	9
Conteúdo do kit	9
Materiais necessários, mas não fornecidos	11
Avisos e precauções	13
Informações de segurança	13
Precauções gerais	14
Armazenamento e manuseio de reagentes	15
Armazenamento e manuseio de amostras	16
Procedimento	16
Isolamento de DNA	16
Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24	18
Protocolo 2: PCR usando os reagentes de PCR fornecidos com o <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	20
Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance	23
Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24	25
Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24	30
Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24	32
Interpretação dos resultados	36
Interpretação dos resultados de análise e detecção de mutações de nível baixo	36
Guia de resolução de falhas	41
Controle de qualidade	44
Limitações	44
Características de desempenho	45
Limite de branco e limite de detecção	45
Linearidade	47

Precisão intermediária	48
Avaliação de diagnóstico	48
Referências	50
Símbolos	50
Informações de contato	51
Anexo A: Configuração de ensaios <i>therascreen</i> KRAS Pyro	52
Anexo B: Esvaziando o contêiner de resíduos e os canais	55
Informações para pedidos	57

## Uso previsto

O *therascreen* KRAS Pyro Kit é um teste de detecção baseado em sequência de ácidos nucleicos *in vitro*, com base na tecnologia Pyrosequencing®, para a detecção quantitativa de mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene KRAS humano em DNA gnômico derivado de amostras de tecido humano.

O *therascreen* KRAS Pyro Kit foi projetado para ser utilizado como auxiliar na identificação de pacientes com câncer colorretal que tenham maior probabilidade de se beneficiar com terapias anti-EGFR, como panitumumab e cetuximab. Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Apenas para uso no sistema PyroMark® Q24. Os sistemas PyroMark Q24 incluem o seguinte:

- Os instrumentos PyroMark Q24 e PyroMark Q24 MDx.
- A PyroMark Q24 Vacuum Workstation e a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- O PyroMark Q24 Software (versão 2.0) e o PyroMark Q24 MDx Software (versão 2.0).

O produto foi projetado para ser utilizado por usuários profissionais, tais como técnicos e médicos, com formação em procedimentos de diagnóstico *in vitro*, em técnicas de biologia molecular e no sistema PyroMark Q24.

## Resumo e explicação

Na Europa, existe um grande enfoque na análise da mutação do gene KRAS devido à autorização condicional de introdução no mercado concedida pela Comissão Europeia ao panitumumab e ao cetuximab para o tratamento de câncer do cólon metastático em pacientes com o gene KRAS sem mutação (tipo selvagem). Isso significa que o panitumumab e o cetuximab apenas podem ser administrados a pacientes que tenham sido examinados quanto ao status da mutação do KRAS.

O *therascreen* KRAS Pyro Kit com marcação CE-IVD é usado para medições quantitativas de mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene KRAS humano. O produto consiste em dois ensaios: um para a detecção de mutações nos códons 12 e 13 e outro para a detecção de mutações no códon 61 (Figura 1). As duas regiões são amplificadas separadamente por PCR e sequenciadas pela região definida. As sequências ao redor das posições definidas atuam como picos de

normalização e referência para a quantificação e avaliação da qualidade da análise.

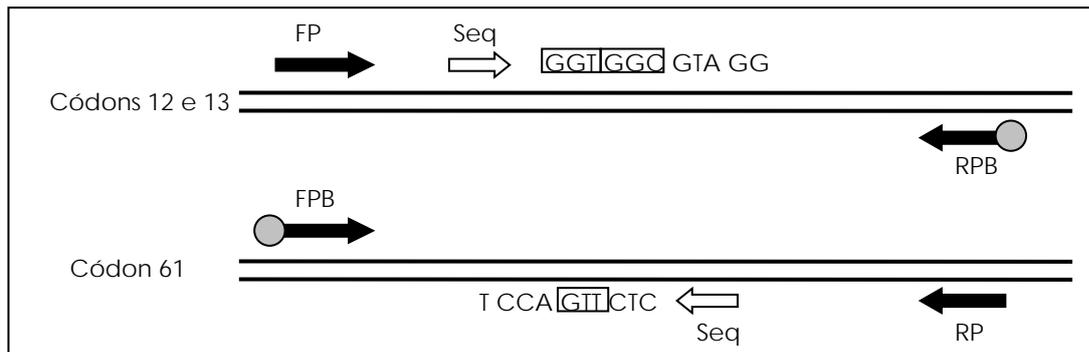


Figura 1. Ilustração do ensaio KRAS. A sequência indicada é a sequência analisada para uma amostra de tipo selvagem. FP e FPB: primers de PCR direto (B indica biotinilação); RP e RPB: primers de PCR inverso (B indica biotinilação); Seq: primers de sequenciamento.

Nota: O sequenciamento dos códons 12 e 13 é orientado para a frente e o do códon 61 é orientado no sentido inverso.

O produto consiste em uma mistura de primer de PCR e primer de sequenciamento para cada ensaio. Os primers são fornecidos em solução. Cada frasco contém 24 µl de cada primer ou mistura de primer.

## Princípio do procedimento

O fluxo de trabalho ilustra o procedimento do ensaio. Após a realização da PCR usando primers que têm como alvo os códons 12/13 e o códon 61, os amplicons são imobilizados em gotas de Streptavidin Sepharose® High Performance. O DNA de fita simples é preparado e os primers de sequenciamento correspondentes se hibridam com o DNA. Em seguida, as amostras são analisadas no sistema PyroMark Q24 usando um arquivo de configuração de execução e um arquivo de execução.

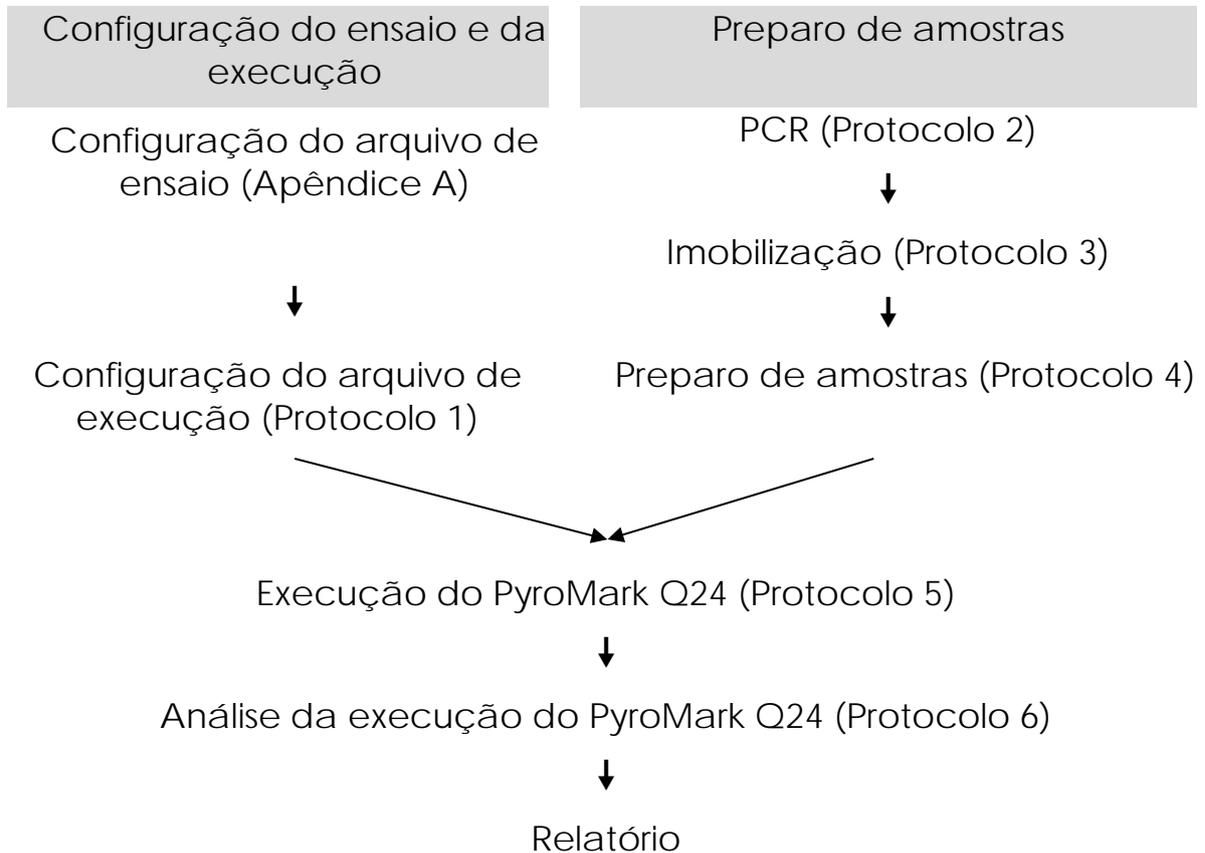
Recomenda-se o uso do KRAS Plug-in Report para analisar a execução. O KRAS Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Contudo, a execução também pode ser analisada usando a ferramenta de análise integrada do sistema PyroMark Q24. A "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) pode então ser ajustada para detectar mutações raras após a execução (consulte "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", na página 32).

Nota: O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado com o *Manual do PyroMark KRAS Kit* e com a revisão R1 do *Manual do theascreen KRAS Pyro Kit* (consulte "Protocolo 2: PCR usando os reagentes de PCR fornecidos com o *therascreen KRAS Pyro*

Kit", na página 20, e "Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24", na página 25).

#### Fluxo de trabalho do procedimento *therascreen* KRAS Pyro



#### Controles

O DNA de controle não metilado está incluído no kit como um controle positivo para PCR e reações de sequenciamento. Essa amostra de controle possui um genótipo de tipo selvagem nas regiões sequenciadas usando esse kit e é necessária para obter uma interpretação dos resultados adequada e para a identificação de mutações de nível baixo (consulte "Interpretação dos resultados", na página 36). Inclua uma amostra com DNA de controle não metilado para cada ensaio em todas as execuções de Pyrosequencing.

Além disso, um controle negativo (sem DNA modelo) deve ser incluído em cada configuração de PCR para, pelo menos, um ensaio.

## Materiais fornecidos

### Conteúdo do kit

*therascreen* KRAS Pyro Kit (caixa 1/2)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
Ref.	971460
Número de reações	24
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl	100 µl

Tampões e reagentes *therascreen* (caixa 2/2)

Tampões e reagentes <i>therascreen</i>		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 frasco
Substrate Mixture		1 frasco
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Manual		1

\* Contém hidróxido de sódio.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de DNA (consulte "Isolamento de DNA", na página 16)
- Pipetas (ajustáveis)\*
- Ponteiras de pipetas estéreis (com filtros para configuração de PCR)
- Microcentrifuga de bancada\*
- Termociclador\* e tubos de PCR apropriados
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, ref. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (ref. 9001513 ou 9001514)\*†
- PyroMark Q24 Software (ref. 9019063 ou 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (ref. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (ref. 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (ref. 9001515 ou 9001517)\*†
- Agitador de placas\* para imobilização em gotas
- Bloco de aquecimento\* capaz de atingir 80 °C
- Tiras ou placa de PCR de 24 poços
- Tampas de tiras
- Água de alta pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou equivalente).

Nota: Uma quantidade suficiente de água é fornecida com o kit para PCR, imobilização de DNA e para dissolver a mistura enzimática e a mistura de substrato. Para diluir o PyroMark Wash Buffer, 10x, é necessária uma quantidade adicional de água de alta pureza.

\* Certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

† Com marcação CE-IVD de acordo com a Diretiva 98/79/CE da UE. Todos os outros produtos listados não possuem marcação CE-IVD com base na Diretiva 98/79/CE da UE.

‡ Não utilize álcool desnaturado, pois ele contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona.

■ Etanol (70%)<sup>†</sup>

## Agitadores de placas recomendados

Os agitadores de placas apresentados na Tabela 1 são recomendados para uso com o *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Tabela 1. Agitadores de placas recomendados para uso com o *therascreen* KRAS Pyro Kit

Fabricante	Produto	Referência
Eppendorf	Thermomixer comfort (dispositivo básico)	5355 000.011
	Termobloco para MTP	5363 000.012
	Placa adaptadora para tubos de PCR, 96 x 0,2 ml, para inserção em blocos para placas de microtitulação	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico in vitro

## Informações de segurança

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDSs) aplicáveis. Essas fichas estão disponíveis online em formato PDF conveniente e compacto em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde você pode encontrar, visualizar e imprimir SDS para cada kit e componente de kit QIAGEN.

As seguintes declarações de risco e precaução se aplicam aos componentes do *therascreen* KRAS Pyro Kit.

### PyroMark Denaturation Solution



Aviso! Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Pode ser corrosivo para metais. Absorva derramamentos para evitar danos materiais. Conserve apenas no recipiente original. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### PyroMark Enzyme Mixture



Contém: (R\*,R\*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol; ácido acético. Perigo! Provoca irritação da pele. Causa lesões graves nos olhos. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato com um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### PyroMark Substrate Mixture



Contém: ácido acético. Aviso! Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Se a irritação nos olhos persistir: Consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

## Precauções gerais

Nota: O usuário deve sempre prestar atenção no seguinte.

- Para resultados ótimos, é necessário que as instruções do manual do usuário sejam rigorosamente observadas. Não é recomendável diluir os reagentes de forma diferente à descrita neste manual, já que pode ocorrer uma diminuição do desempenho.

- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado (consulte "Protocolo 2: PCR usando os reagentes de PCR fornecidos com o *therascreen KRAS Pyro Kit*", na página 20, e "Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24", na página 25) quando comparado com o *Manual do PyroMark KRAS Kit* e com a revisão R1 do *Manual do therascreen KRAS Pyro Kit*.
- Os componentes desse produto são suficientes para realizar 24 reações em até 5 execuções independentes.
- Use ponteiras de pipetas estéreis com filtros (para configuração de PCR).
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controles positivos e amplicons) separadamente de todos os outros reagentes e adicione-os à mistura da reação em uma instalação separada.
- Descongele todos os componentes por completo à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar o ensaio.
- Após o descongelamento, misture os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando em vórtex) e centrifugue brevemente.
- Os resultados com falhas não são usados como base para avaliação do status mutacional.

## Armazenamento e manuseio de reagentes

O *therascreen KRAS Pyro Kit* é enviado em duas caixas. O *therascreen KRAS Pyro Kit* (caixa 1/2) é enviado em gelo seco. A PyroMark PCR Master Mix, o CoralLoad Concentrate, o Unmethylated Control DNA e todos os primers devem ser armazenados entre -30 e -15 °C assim que forem recebidos.

Os tampões e reagentes *therascreen* (caixa 2/2) contendo tampões, mistura enzimática, mistura de substrato, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP e dTTP *therascreen* (os reagentes da análise Pyrosequencing) são enviados em embalagens resfriadas. Esses componentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C assim que forem recebidos. Para minimizar a perda de atividade, é aconselhável manter tanto a mistura enzimática quanto a mistura de substrato nos frascos fornecidos.

As misturas de substrato e enzimática reconstituídas são estáveis por, pelo menos, dez dias quando armazenadas entre 2 e 8 °C. Elas podem ser congeladas e armazenadas nos respectivos frascos entre -30 e -

15 °C. Os reagentes congelados não devem ser sujeitos a mais de três ciclos de congelamento/descongelamento.

Nota: Nucleotídeos não devem ser congelados.

O *therascreen* KRAS Pyro Kit permanece estável até a data de validade, quando armazenado nas condições especificadas.

## Armazenamento e manuseio de amostras

Todas as amostras devem ser tratadas como materiais potencialmente infecciosos.

O material das amostras é DNA genômico humano, extraído de amostras de sangue ou fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE).

Amostras de humanos submetidos a tratamento com heparina não devem ser utilizadas. Amostras de sangue que tenham sido coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante não devem ser utilizadas. A heparina afeta a PCR.

## Procedimento

### Isolamento de DNA

O desempenho do sistema foi estabelecido usando o EZ1® DNA Tissue Kit e o QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit para a extração de DNA humano a partir de amostras de tumores fixadas em formalina e conservadas em parafina. O desempenho do sistema QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit foi estabelecido usando amostras de sangue de doadores saudáveis parcialmente fortificadas com células tumorais.

Os kits QIAGEN® mostrados na Tabela 2 são recomendados para a purificação de DNA a partir dos tipos de amostra humana indicados para uso com o *therascreen* KRAS Pyro Kit. Realize a purificação de DNA de acordo com as instruções dos manuais do kit.

Tabela 2. Kits de purificação de DNA recomendados para uso com o *therascreen* KRAS Pyro Kit

Material de amostra	Kit de isolamento de ácido nucleico	Referência (QIAGEN)
Tecido conservado em parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

\* Siga o protocolo para utilização com tecido conservado em parafina. O EZ1 DNA Tissue Kit deve ser usado em conjunto com o EZ1 Advanced (ref. 9001410 ou 9001411) e com o EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (ref. 9018298), com o EZ1 Advanced XL (ref. 9001492) e o EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (ref. 9018700) ou com o BioRobot® EZ1 (ref. 9000705; não está mais disponível) e o EZ1 DNA Paraffin Section Card (ref. 9015862).

† Com marcação CE-IVD de acordo com a Diretiva 98/79/CE da UE.

# Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24

## Ponto importante antes de começar

- Se necessário, o LOB pode ser confirmado usando uma amostra de tipo selvagem para gerar uma placa de resultados completa. Para obter detalhes, consulte a Diretriz EP17-A do CLSI "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protocolo para a determinação de limites de detecção e limites de quantificação; diretriz aprovada).

## O que fazer antes de começar

- Se o KRAS Plug-in Report não tiver sido instalado, crie uma Assay Setup (Configuração do ensaio) (consulte o Anexo A, na página 52). Isso deve ser realizado apenas uma vez, antes de executar os ensaios *therascreen* KRAS Pyro pela primeira vez. Caso o KRAS Plug-in Report tenha sido instalado, estão disponíveis Assay Setups (Configurações de ensaio) predefinidas no atalho do navegador do PyroMark Q24 Software, no caminho "Example Files (Arquivos de exemplo)/PyroMark Setups (Configurações PyroMark)/KRAS". O KRAS Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Procedimento

1. Clique em  na barra de ferramentas.  
Um novo arquivo de execução é criado.
2. Insira os parâmetros de execução (consulte "Parâmetros de execução", na página 19).
3. Configure a placa adicionando ensaios para os códons 12/13 e para o códon 61 aos poços correspondentes às amostras para análise.  
Nota: Uma amostra de controle negativo (sem DNA modelo) deve ser incluída em cada configuração de PCR para, pelo menos, um ensaio.  
Nota: Inclua uma amostra com DNA de controle não metilado para cada ensaio em todas as execuções Pyrosequencing (consulte "Controles", na página 8).
4. Quando a execução estiver configurada e pronta para ser executada no sistema PyroMark Q24, imprima uma lista de volumes necessários de mistura enzimática, mistura de substrato e

nucleotídeos e a configuração da placa. Selecione "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas) e, quando o relatório aparecer, clique em .

5. Feche o arquivo de execução e copie-o para um pen drive (fornecido com o sistema) usando o Windows® Explorer.

Nota: As Pre Run Information (Informações de pré-execução) impressas podem ser usadas como um modelo para a configuração de amostras (consulte "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance", na página 23).

Para executar a placa no sistema PyroMark Q24, consulte "Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24", na página 30.

Parâmetros de execução

Run name (Nome da execução):	O nome da execução é dado quando o arquivo é salvo. Renomear o arquivo também altera o nome da execução.
Instrument method (Método de instrumento):	Selecione o método de instrumento de acordo com o cartucho que será usado para a execução. Consulte as instruções fornecidas com os produtos.
Plate ID (ID da placa):	Opcional: Insira o ID da PyroMark Q24 Plate.
Bar code (Código de barras):	Opcional: Insira um número de código de barras para a placa ou, se você tiver um leitor de código de barras conectado ao computador, posicione o cursor do mouse na caixa de texto "Barcode" (Código de barras) (clitando na caixa) e digitalize o código de barras.
Kit ID (ID do kit):	Opcional: Insira o número de lote do <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit a ser usado. O número de lote pode ser encontrado no rótulo do produto.  Nota: Recomendamos inserir o ID do kit e o ID do reagente para que qualquer problema inesperado com os reagentes possa ser rastreado.
Run note (Nota de execução):	Opcional: Insira uma nota sobre os conteúdos ou o propósito da execução.

## Adicionar arquivos de ensaio

Para adicionar um ensaio a um poço, você pode:

- Clicar com o botão direito do mouse no poço e selecionar "Load Assay" (Carregar ensaio) no menu de contexto.
- Selecionar o ensaio no atalho do navegador e clicar e arrastar o ensaio para o poço.

Um poço é codificado por cor de acordo com o ensaio carregado no poço.

## Inserir IDs de amostra e notas

Para inserir um ID de amostra ou uma nota, selecione a célula e insira o texto.

Para editar um ID de amostra ou uma nota, selecione a célula (o conteúdo atual será selecionado) ou clique duas vezes na célula.

## Protocolo 2: PCR usando os reagentes de PCR fornecidos com o *therascreen* KRAS Pyro Kit

Esse protocolo serve para as amplificações de PCR de uma região que contém os códons 12 e 13 e para uma amplificação de PCR separada de uma região que contém o códon 61 usando o *therascreen* KRAS Pyro Kit.

### Pontos importantes antes de começar

- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado com o *Manual do PyroMark KRAS Kit* (etapa 5).
- A polimerase de DNA HotStarTaq® na PyroMark Master Mix exige uma etapa de ativação de 15 minutos a 95 °C.
- Configure todas as misturas da reação em uma área separada daquela usada para a purificação de DNA, adicionando o DNA modelo à PCR, à análise de produto de PCR ou ao preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing.
- Use ponteiros descartáveis contendo filtros hidrofóbicos para minimizar contaminação cruzada.

### O que fazer antes de começar

- Antes de abrir os tubos com primers de PCR, centrifugue brevemente para coletar o conteúdo no fundo dos tubos.

- Ajuste a concentração do controle e da amostra de DNA para 0,4 a 2 ng/μl, se necessário.

### Procedimento

1. Descongele todos os reagentes necessários (consulte a Tabela 3). Misture bem antes de usar.
2. Prepare uma mistura de reação para cada primer de PCR definido de acordo com a Tabela 3.

Normalmente, a mistura da reação contém todos os componentes necessários para a PCR exceto a amostra.

Prepare um volume de mistura de reação superior ao necessário para o número total de ensaios de PCR a serem realizados.

Tabela 3. Preparo da mistura de reação para cada mistura de primer de PCR

Componente	Volume/reação (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 12/13 ou PCR Primer KRAS 61	1,0
Água (H <sub>2</sub> O, fornecida)	4,0
Volume total	20,0

3. Misture completamente a mistura de reação e dispense 20 μl em cada tubo de PCR.  
Não é necessário manter os tubos de PCR no gelo, pois a polimerase de DNA HotStarTaq é inativa à temperatura ambiente.
4. Adicione 5 μl de DNA modelo (2 a 10 ng de DNA genômico) aos tubos de PCR individuais (consulte a Tabela 4) e misture bem.  
Nota: Uma amostra de controle negativo (sem DNA modelo) deve ser incluída em cada configuração de PCR para, pelo menos, um ensaio.

Nota: Inclua uma amostra com DNA de controle não metilado para cada ensaio em todas as execuções Pyrosequencing (consulte "Controles", na página 8).

Tabela 4. Preparo de PCR

Componente	Volume/reacção (µl)
Mistura de reacção	20
Amostra de DNA	5
Volume total	25

5. Programe o termociclador de acordo com as instruções do fabricante usando as condições descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Protocolo de ciclagem otimizado

			Comentários
Etapa de ativação inicial:	15 minutos	95 °C	A polimerase de DNA HotStarTaq é ativada por essa etapa de aquecimento.
Ciclagem de 3 etapas:			
Desnaturação	20 segundos	95 °C	
Hibridação	30 segundos	53 °C	
Extensão	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
Extensão final:	5 minutos	72 °C	

6. Posicione os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.
7. Após a amplificação, proceda com o "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance", na página 23.

## Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance

Esse protocolo é usado para a imobilização de DNA modelo em Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes da análise no sistema PyroMark Q24.

O que fazer antes de começar

- Permita que todos os reagentes e soluções necessários atinjam a temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de começar.

Procedimento

1. Agite gentilmente o frasco que contém Streptavidin Sepharose High Performance até obter uma solução homogênea.
2. Prepare uma mistura principal para imobilização de DNA de acordo com a Tabela 6. Prepare um volume 10% superior ao necessário para o número total de reações a serem realizadas.

Tabela 6. Mistura principal para imobilização de DNA

Componente	Volume/amostra (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Água (H <sub>2</sub> O, fornecida)	28
Volume total	70

3. Adicione 70 µl de mistura principal às tiras ou aos poços de uma placa de PCR de 24 poços, conforme predefinido na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 18).
4. Adicione 10 µl do produto de PCR biotinilado do Protocolo 2 a cada poço contendo a mistura principal, conforme predefinido na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 18).  
Nota: O volume total por poço deve ser de 80 µl após a adição da mistura principal e do produto de PCR.
5. Vede a placa de PCR (ou as tiras) usando tampas de tiras.

Nota: Certifique-se de que não exista a possibilidade de vazamento entre os poços.

6. Agite a placa de PCR à temperatura ambiente (15 a 25 °C) por 5 a 10 minutos a 1400 rpm.

Nota: Durante esta etapa, prepare a PyroMark Q24 Vacuum Workstation para o preparo de amostras conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark Q24*.

7. Proceda imediatamente com o "Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24 ", na página 25.

Nota: As gotas de Sepharose se sedimentam rapidamente. As gotas devem ser capturadas imediatamente após a agitação.

Se mais de um minuto tiver passado desde que a placa (ou as tiras) foi agitada, agite-a novamente por um minuto antes de capturar as gotas.

## Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24

Esse protocolo é usado para o preparo de DNA de fita simples e para a hibridação do primer de sequenciamento no modelo antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24.

### Pontos importantes antes de começar

- Antes de abrir os tubos com primers de sequenciamento, centrifugue brevemente para coletar o conteúdo no fundo dos tubos.
- Adicione dois primers de sequenciamento diferentes no mesmo padrão, conforme predefinido para a placa na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 18), dependendo da região de análise (códon 12 e 13 ou códon 61).
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado com a revisão R1 do *Manual do theascreen KRAS Pyro Kit* (etapa 18). Não encurte o tempo de resfriamento das amostras depois de aquecer a 80 °C.
- Execute regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark Q24* e troque as sondas de filtro quando indicado.

### O que fazer antes de começar

- Posicione um PyroMark Q24 Plate Holder em um bloco de aquecimento pré-aquecido a 80 °C para usar na etapa 17. Deixe um segundo PyroMark Q24 Plate Holder à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para usar na etapa 18.
- O PyroMark Wash Buffer é fornecido como um concentrado de 10x. Antes de usá-lo pela primeira vez, dilua em uma solução de trabalho de 1x, adicionando 225 ml de água de alta pureza a 25 ml de PyroMark Wash Buffer, 10x (volume final de 250 ml).

Nota: A solução de trabalho PyroMark Wash Buffer 1x é estável entre 2 e 8 °C até a data de validade marcada.

### Procedimento

1. Dilua uma quantidade suficiente de cada primer de sequenciamento, Seq Primer KRAS 12/13 e Seq Primer KRAS 61, no PyroMark Annealing Buffer, conforme mostrado na Tabela 7.

Prepare um volume de primer de sequenciamento diluído superior ao necessário para o número total de amostras a serem sequenciadas (o número de amostras mais uma extra).

Tabela 7. Exemplo de diluição dos primers de sequenciamento

Componente	Volume/amostra (µl)	Volume para 9 + 1 reações (µl)
Seq Primer KRAS 12/13	0,8	8
ou Seq Primer KRAS 61		
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Volume total	25	250

2. Adicione 25 µl de primer de sequenciamento diluído a cada poço da PyroMark Q24 Plate de acordo com a configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 18).

Nota: Mantenha um dos PyroMark Q24 Plate Holders (fornecidos com a PyroMark Q24 Vacuum Workstation) à temperatura ambiente (15 a 25 °C) e use-o como suporte quando estiver preparando e movimentando a placa.

3. Posicione a placa (ou as tiras) de PCR do Protocolo 3 e a PyroMark Q24 Plate na mesa de trabalho (Figura 2).

Nota: Certifique-se de que a placa esteja na mesma orientação que quando as amostras foram carregadas.



Figura 2. Posicionamento da placa (ou das tiras) de PCR e da PyroMark Q24 Plate na estação de trabalho de vácuo.

4. Aplique vácuo na ferramenta ligando o interruptor de vácuo.
5. Baixe cuidadosamente as sondas de filtro da ferramenta de vácuo para a placa (ou as tiras) de PCR para capturar as gotas contendo o modelo imobilizado. Mantenha as sondas no lugar por 15 segundos. Tome cuidado ao pegar na ferramenta de vácuo.  
Nota: As gotas de Sepharose se sedimentam rapidamente. As gotas devem ser capturadas imediatamente após a agitação.  
Se mais de um minuto tiver passado desde que a placa (ou as tiras) foi agitada, agite-a novamente por um minuto antes de capturar as gotas.
6. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo 40 ml de etanol a 70% (Figura 2). Lave as sondas de filtro por 5 segundos.
7. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo 40 ml de Denaturation Solution (Figura 2). Lave as sondas de filtro por 5 segundos.
8. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo 50 ml de Wash Buffer (Figura 2). Lave as sondas de filtro por 10 segundos.
9. Erga a ferramenta de vácuo para cima e para trás excedendo um ângulo de 90° na vertical por 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Figura 3).

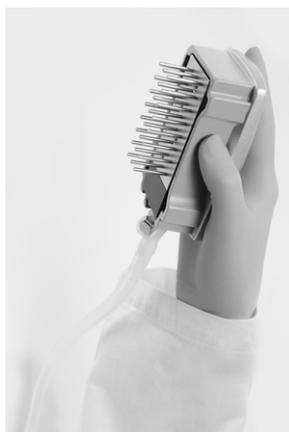


Figura 3. Ilustração da ferramenta de vácuo erguida excedendo um ângulo de 90° na vertical.

10. Enquanto a ferramenta de vácuo estiver posicionada acima da PyroMark Q24 Plate, desligue (Off) o interruptor de vácuo na ferramenta.
11. Libere as gotas na PyroMark Q24 Plate colocando as sondas de filtro no primer de sequenciamento diluído e movendo a ferramenta gentilmente de um lado para o outro.  
Nota: Tome cuidado para não danificar a superfície da PyroMark Q24 Plate arranhando-a com as sondas de filtro.
12. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo água de alta pureza (Figura 2) e agite-a por 10 segundos.
13. Lave as sondas de filtro colocando as sondas em água de alta pureza (Figura 2) e aplique vácuo. Lave as sondas com 70 ml de água de alta pureza.
14. Erga a ferramenta de vácuo para cima e para trás excedendo um ângulo de 90° na vertical por 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Figura 3).
15. Desligue (Off) o interruptor de vácuo na ferramenta e coloque a ferramenta na posição Parada (P).
16. Desligue a bomba de vácuo.  
Nota: No final de um dia de trabalho, os resíduos líquidos e as soluções remanescentes devem ser descartados e a PyroMark Q24 Vacuum Workstation deve ser inspecionada quanto a poeira e derramamentos (consulte o Anexo B, na página 55).
17. Aqueça a PyroMark Q24 Plate com as amostras a 80 °C por 2 minutos usando o PyroMark Q24 Plate Holder pré-aquecido.
18. Remova a PyroMark Q24 Plate do suporte de placa aquecido e a posicione em um segundo PyroMark Q24 Plate Holder mantido à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para permitir que as amostras resfriem até a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.

19. Prossiga com o "Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24", na página 30.

## Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24

Esse protocolo descreve o preparo e o carregamento de reagentes PyroMark Gold Q24 no PyroMark Q24 Cartridge. Ele também descreve como iniciar e finalizar uma execução no PyroMark Q24. Para obter uma descrição detalhada sobre como configurar uma execução, consulte o *Manual do usuário do PyroMark Q24*.

### Ponto importante antes de começar

- O relatório Pre Run Information (Informações de pré-execução) encontrado no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 18) fornece informações sobre o volume de nucleotídeos, tampão de substrato e tampão enzimático necessário para uma execução específica.

### O que fazer antes de começar

- Ligue o PyroMark Q24. O interruptor de alimentação está localizado na parte de trás do instrumento.

### Procedimento

1. Dissolva as misturas de substrato e enzimática liofilizadas em 620 µl de água cada (H<sub>2</sub>O, fornecida).
2. Misture girando o frasco gentilmente.  
Nota: Não use um agitador de vórtex!

Nota: Para garantir que a mistura seja completamente dissolvida, deixe-a à temperatura ambiente (15 a 25 °C) por 5 a 10 minutos. Certifique-se de que a solução não esteja turva antes de encher o PyroMark Q24 Cartridge. Se os reagentes não forem usados imediatamente, coloque os frascos de reagente no gelo\* ou em um refrigerador.

3. Permita que os reagentes e o PyroMark Q24 Cartridge atinjam a temperatura ambiente (20 a 25 °C).
4. Posicione o PyroMark Q24 Cartridge com o rótulo virado em sua direção.
5. Carregue o PyroMark Q24 Cartridge com os volumes apropriados de nucleotídeos e misturas de substrato e enzimática de acordo com a Figura 4.

Certifique-se de que nenhuma bolha de ar seja transferida da pipeta para o cartucho.

\* Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

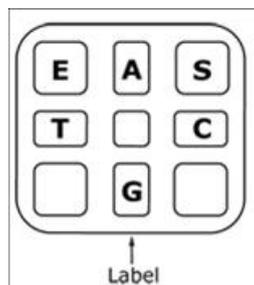


Figura 4. Ilustração do PyroMark Q24 Cartridge visto de cima. As anotações correspondem ao rótulo nos frascos de reagente. Adicione a mistura enzimática (E), a mistura de substrato (S) e os nucleotídeos (A, T, C, G) de acordo com as informações de volume fornecidas no relatório Pre Run Information (Informações de pré-execução) encontrado no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração de execução.

- Abra a porta do cartucho e insira o cartucho de reagentes cheio com o rótulo virado para fora. Empurre o cartucho por completo e empurre-o para baixo.
- Certifique-se de que a linha esteja visível na frente do cartucho e feche a porta.
- Abra a estrutura do suporte de placa e posicione a placa no bloco de aquecimento.
- Feche a estrutura do suporte de placa e a tampa do instrumento.
- Insira o pen drive (contendo o arquivo de execução) na porta USB na frente do instrumento.  
Nota: Não remova o pen drive até que a execução seja finalizada.
- Selecione "Run" (Executar) no menu principal (usando os botões da tela ▲ e ▼) e pressione "OK".
- Selecione o arquivo de execução usando os botões da tela ▲ e ▼.  
Nota: Para visualizar o conteúdo de uma pasta, selecione a pasta e pressione "Select" (Selecionar). Para voltar para a visualização anterior, pressione "Back" (Voltar).
- Quando o arquivo de execução for selecionado, pressione "Select" (Selecionar) para iniciar a execução.
- Quando a execução estiver finalizada e o instrumento confirmar que o arquivo de execução foi salvo no pen drive, pressione "Close" (Fechar).
- Remova o pen drive.
- Abra a tampa do instrumento.

17. Abra a porta do cartucho e remova o cartucho de reagentes levantando-o e retirando-o.
18. Feche a porta.
19. Abra a estrutura do suporte de placa e remova a placa do bloco de aquecimento.
20. Feche a estrutura do suporte de placa e a tampa do instrumento.
21. Descarte a placa e limpe o cartucho, de acordo com as instruções na folha do produto fornecida com o cartucho.
22. Analise a execução de acordo com o "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", na página 32.

## Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24

Esse protocolo descreve a análise de mutação de uma execução de KRAS finalizada usando o PyroMark Q24 Software.

### Procedimento

1. Insira o pen drive contendo o arquivo de execução processado na porta USB do computador.
2. Mova o arquivo de execução do pen drive para o local desejado no computador usando o Windows Explorer.
3. Abra o arquivo de execução no modo AQ do Software PyroMark Q24 selecionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Arquivo) ou clicando duas vezes no arquivo (👉) no atalho do navegador.
4. Existem dois métodos para analisar a execução. Se estiver usando o KRAS Plug-in Report, vá para a etapa 5. Se estiver usando a análise AQ integrada do PyroMark Q24, vá para a etapa 6.

Nota: Recomendamos fortemente o uso do KRAS Plug-in Report para a interpretação de resultados. O KRAS Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Este relatório garante que os respectivos valores de LOD (Tabela 8) e as diferentes "Sequences to Analyze" (Sequências a serem analisadas) sejam usados para detectar automaticamente todas as mutações.

5. Usando o KRAS Plug-in Report:  
Para gerar um relatório, selecione "AQ Add On Reports/KRAS" (Relatórios de complemento AQ/KRAS) e "Codon 12 and 13" (Códons 12 e 13) ou "Codon 61" (Códon 61) em "Reports"

(Relatórios) no menu.

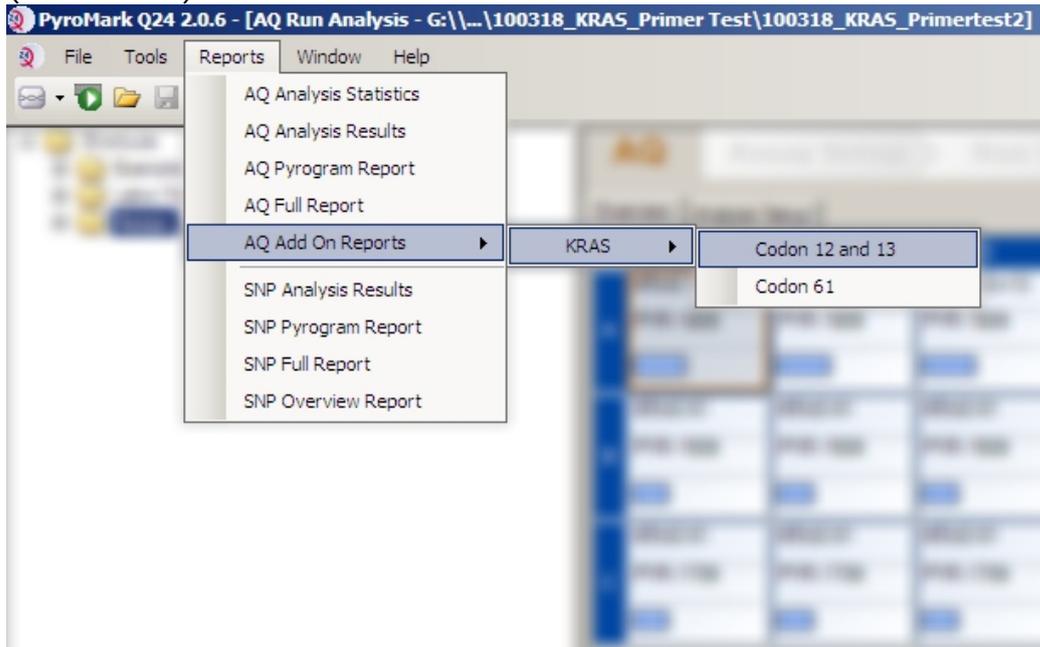


Figura 5. A tela AQ Run Analysis (Análise de execução AQ).

Os poços serão analisados automaticamente para averiguar todas as mutações para as quais o LOD é fornecido na Tabela 8. Os resultados serão apresentados em uma tabela de visão geral (Figura 6), seguidos por resultados detalhados, que incluem Pyrograms e a qualidade da análise.

## Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	⚠
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				

⚠ See detailed results for further explanation.

Figura 6. A tabela de resumo de resultados.

### 6. Usando a análise AQ:

Para analisar a execução e obter uma visão geral dos resultados, clique em um dos botões de análise.



Analise todos os poços.



Analise o poço selecionado.

Os resultados da análise (frequências de alelos) e a avaliação de qualidade são exibidos acima da posição variável na curva de Pyrogram®. Para obter mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o *Manual do usuário do PyroMark Q24*.

Para gerar um relatório, selecione "AQ Full Report" (Relatório completo AQ) ou "AQ Analysis Results" (Resultados de análise AQ) no menu "Reports" (Relatórios).

Nota: As mutações mais frequentes no KRAS são encontradas no nucleotídeo 35 (segunda base do códon 12). Portanto, o padrão "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para os ensaios dos códons 12 e 13 do KRAS conforme definido na "Analysis Setup" (Configuração de análise) aborda mutações nessa posição (consulte o Anexo A, na página 52). Se uma amostra apresentar uma mutação no nucleotídeo 34 (primeira base do códon 12), a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) pode ser alterada para analisar também o status da mutação nessa posição, conforme descrito no Anexo A. Do mesmo modo, a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) pode ser alterada para o ensaio do códon 61 do KRAS, conforme descrito no Anexo A.

As frequências de mutações atualizadas nos códons 12/13 e 61 do gene KRAS humano são fornecidas online pelo Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

Nota: Para obter resultados confiáveis, recomendamos alturas de pico individuais acima de 30 RLU. Defina 30 RLU como "required peak height for passed quality" (altura de pico necessária para qualidade aprovada) na configuração do ensaio (consulte o Anexo A e o *Manual do usuário do PyroMark Q24*).

Nota: O relatório "AQ Analysis Results" (Resultados de análise AQ) deve ser usado para documentação e interpretação da quantificação de alelos. Os números mostrados no Pyrogram são arredondados e não mostram a quantificação exata.

Nota: O Pyrogram deve ser sempre comparado com o histograma, que pode ser exibido clicando com o botão direito na janela Pyrogram. Os picos medidos devem corresponder à altura das barras do histograma.

Reanálise de amostras sem mutação detectada no nucleotídeo 35 (Códon 12) ou 183 (Códon 61) ou com resultado "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha) na avaliação de qualidade.

Recomendamos fortemente uma reanálise de todas as amostras sem mutação detectada com o padrão "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada), bem como de todas as amostras cujo resultado tenha sido "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha) na avaliação de qualidade. Os resultados "Check" (Verificado) e "Failed" (Falha) na avaliação de resultados podem indicar uma mutação em uma posição diferente daquela do nucleotídeo 35 ou 183, resultando em desvios de altura de pico nas distribuições de referência. Por exemplo, um pico em qualquer uma das três primeiras distribuições mostra que há uma mutação no nucleotídeo 34.

Para reanalisar e visar mutações no nucleotídeo 34, vá para "Analysis Setup" (Configuração de análise) e altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) de *GNTGRCGTAGGC* para *NGTGRCGTAGGC*. Clique em "Apply" (Aplicar) e, em seguida, clique em "To All" (A todos) quando a janela "Apply Analysis Setup" (Aplicar configuração de análise) aparecer.

Para reanalisar e visar mutações no nucleotídeo 182 (segunda posição do códon 61), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) do ensaio do códon 61 para a sequência seguinte.  
*CTCTHGACCTG*

Para reanalisar e visar mutações no nucleotídeo 181 (primeira posição do códon 61), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) do ensaio do códon 61 para a sequência seguinte.  
*CTCTTSACCTG*

Nota: Após alterar a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada), certifique-se de que o limiar de altura de pico individual esteja definido para 30 RLU.

Nota: Se os picos medidos não corresponderem à altura das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras ou inesperadas, o resultado não poderá ser usado como base para avaliação do status mutacional. É recomendável executar novamente a amostra.

## Interpretação dos resultados

### Interpretação dos resultados de análise e detecção de mutações de nível baixo

É altamente recomendável que uma amostra com DNA de controle não metilado seja incluída em cada execução para comparação e como um controle dos níveis de fundo. A frequência medida da amostra de controle deve ser inferior ou igual ao limite de branco (LOB).

Todas as amostras devem ser analisadas com relação ao limite de detecção (LOD, consulte a Tabela 8) e interpretadas da seguinte maneira.

- Frequência de mutação  $<$  LOD: Tipo selvagem
- Frequência de mutação  $\geq$  LOD e  $\leq$  LOD + 3% de unidades: potencial de mutação de nível baixo  
Nota: Se estiver usando o Plug-in Report (etapa 5 do "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", página 32) e isso ocorrer, um aviso será emitido.

As amostras com indicação de um potencial de mutação de nível baixo apenas devem ser consideradas positivas para a mutação se confirmadas por uma nova execução em duplicado, em conjunto com uma amostra contendo DNA de controle não metilado. O resultado de ambos os duplicados deve ser  $\geq$  LOD e diferente da amostra de controle. Caso contrário, a amostra deve ser avaliada como sendo de tipo selvagem.

- Frequência de mutação  $>$  LOD + 3% de unidades: Mutação

Se estiver usando o KRAS Plug-in Report, isso é realizado automaticamente.

Nota: Recomenda-se o uso do KRAS Plug-in Report para a interpretação dos resultados. Para uma análise mais detalhada das amostras com indicação de potencial de mutação de nível baixo, recomendamos que a amostra também seja analisada manualmente no software do aplicativo (por ex., para comparação com a frequência mutacional da amostra de controle).

Nota: Uma frequência medida acima do LOB na amostra de controle indica um nível de fundo superior ao usual na respectiva execução, o que pode impactar a quantificação dos alelos, especialmente para níveis de mutação baixos. Nesse caso, as frequências medidas no intervalo de LOD (Tabela 8) a LOD + 3% de unidades não podem ser

usadas como base para avaliação do status mutacional. É recomendável executar novamente as amostras com um potencial de mutação de nível baixo.

Nota: O algoritmo KRAS Plug-in Report foi usado para gerar os dados de LOB e LOD. A análise manual utilizando o PyroMark Application Software conforme descrito no Protocolo 6 (página 32) pode resultar em valores ligeiramente diferentes.

Nota: A decisão quanto ao tratamento para pacientes com câncer não deve ser baseada somente no status da mutação do KRAS.

Tabela 8. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição do ácido nucleico	Substituição do aminoácido	LOB (% unidades)	LOD (% unidades)	ID COSMIC* (V42)
Códon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) <sup>†</sup>	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Códon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Códon 61 (CAA), conforme analisado em orientação inversa (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutações somáticas em câncer), disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

† Nível mais baixo de mutação em uma amostra resultante em uma frequência medida  $\geq$ LOD.

Resultados representativos usando a análise AQ integrada da PyroMark Q24

Os resultados representativos do Pyrogram são mostrados nas Figuras 7 a 11.

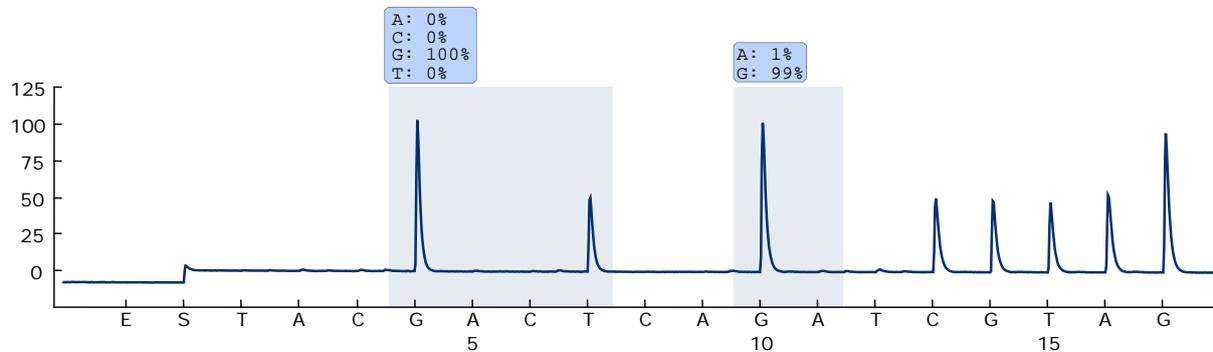


Figura 7. Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem nos códons 12 e 13.

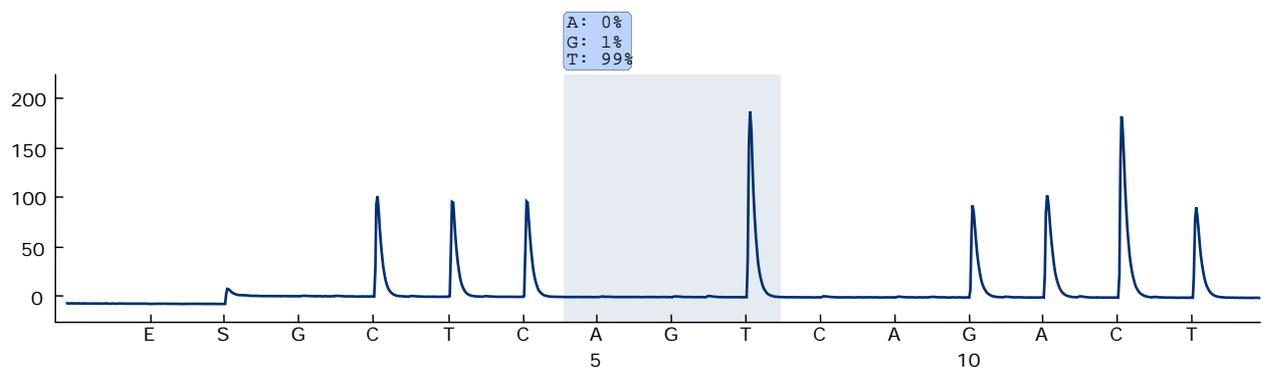


Figura 8. Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem no códon 61.

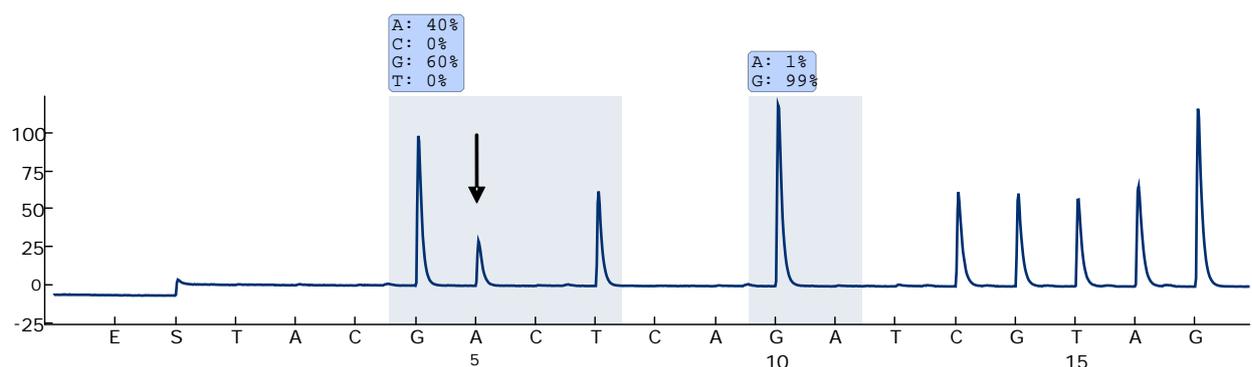


Figura 9. Curva de Pyrogram obtida após a análise de amostras com uma mutação GGT → GAT na base 2 do códon 12 (nucleotídeo 35, indicado com uma seta).

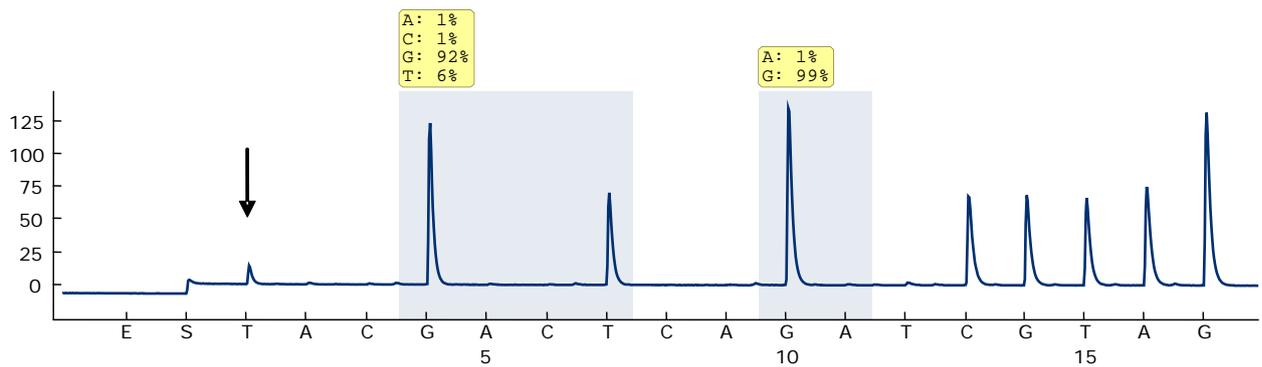


Figura 10. Curva de Pyrogram obtida após a análise de amostras com uma mutação GGT → TGT na base 1 do códon 12 (nucleotídeo 34, indicado com uma seta) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) GNTGRCGTAGGC tendo como alvo a base 2 do códon 12 (nucleotídeo 35). A cor amarela indica que esta sequência é inesperada e precisa ser verificada.

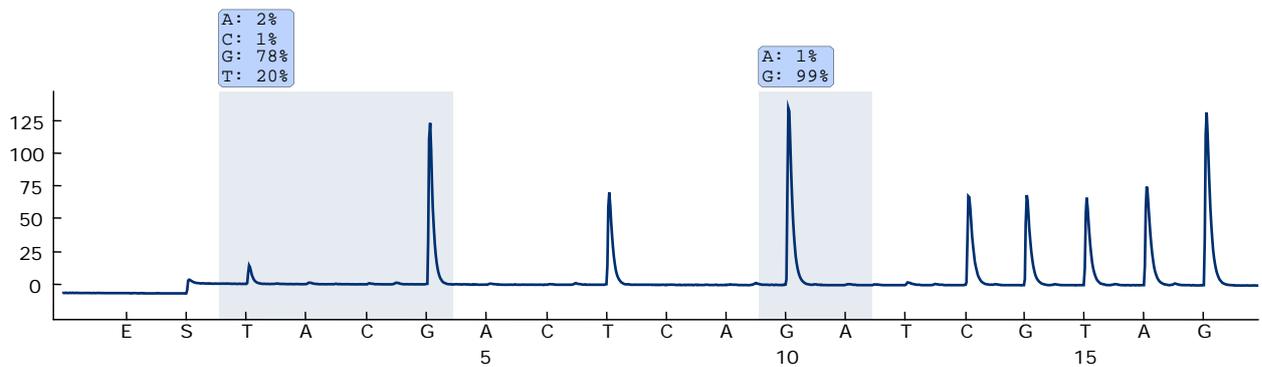


Figura 11. Curva de Pyrogram e resultados obtidos após a reanálise da amostra na Figura 10. A mutação GGT → TGT foi reanalisada com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) NGTGRCGTAGGC tendo como alvo a base 1 do códon 12 (nucleotídeo 34).

## Guia de resolução de falhas

Este guia de resolução de falhas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de suporte técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre disponíveis para responder a quaisquer questões que você possa ter sobre as informações e os protocolos contidos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, veja o verso do manual ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Nota: Consulte o *Manual do usuário do PyroMark Q24* para obter soluções de problemas gerais do instrumento.

### Comentários e sugestões

---

#### Sinais no controle sem modelo (controle negativo)

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| a) Interferência entre poços | O sinal de um poço é detectado em um poço adjacente. Evite colocar amostras com intensidades de sinal altas ao lado de poços de controle sem modelo.   |
| b) Contaminação da PCR       | Use ponteiros de pipetas estéreis com filtros. Armazene e extraia materiais, como amostras, controles e amplicons, separadamente dos reagentes de PCR. |

#### Sequência fraca ou inesperada

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| a) DNA genômico de baixa qualidade | O DNA genômico de baixa qualidade pode causar a falha da PCR. Analise amostras de PCR usando uma técnica de eletroforese (por exemplo, o QIAxcel® System ou a eletroforese em gel de agarose). |
|------------------------------------|--|

Resultado "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha)

- a) Altura de pico baixa      Lidar com erros na configuração de PCR ou no preparo de amostras antes da Pyrosequencing pode resultar em picos baixos. Execute regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark Q24* e troque as sondas de filtro quando indicado.
- No caso de um aviso "Check" (Verificado), compare cuidadosamente o Pyrogram com o histograma, que pode ser exibido clicando com o botão direito na janela Pyrogram. Se os picos medidos corresponderem à altura das barras do histograma, o resultado é válido. Caso contrário, é recomendável executar novamente a amostra.
- b) Mutação não definida na "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada)      Ajuste a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) na configuração do ensaio (consulte o Anexo A, na página 52) e reanalise a execução.
- c) Mutação rara inesperada      Um resultado "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha) na avaliação de qualidade pode ser causado por um padrão inesperado de picos. Isso pode indicar uma mutação inesperada, que não é analisada pelo Plug-in Report. Essas amostras devem ser analisadas manualmente utilizando o PyroMark Q24 Software e considerando mutações inesperadas.
- d) Aviso de desvio de altura de pico alto para uma distribuição      O Pyrogram deve ser cuidadosamente comparado com o histograma, que pode ser exibido clicando com o botão direito na janela Pyrogram. Se os picos medidos não corresponderem à altura das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras, recomenda-se que a amostra seja executada novamente.

Fundo alto

- a) Armazenamento incorreto de nucleotídeos      Armazene os nucleotídeos entre 2 e 8 °C. O armazenamento entre -15 e -30 °C pode causar um aumento no fundo.
- b) Encurte o tempo de resfriamento das amostras antes da análise Pyrosequencing      Mantenha as amostras em um PyroMark Q24 Plate Holder à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Não encurte o tempo de resfriamento.
- c) Contaminação do cartucho      Limpe com cuidado o cartucho conforme descrito na folha do produto. Armazene o cartucho protegido da luz e de poeira.

Nenhum sinal no controle positivo (DNA de controle não metilado)

- a) Mistura de substrato ou enzimática insuficiente para todos os poços      Certifique-se de preencher o PyroMark Q24 Cartridge de acordo com as "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas).
- b) Reagentes incorretamente armazenados ou diluídos      Prepare os reagentes PyroMark Q24 Gold de acordo com as instruções fornecidas com os reagentes.
- c) Ativação insuficiente da polimerase de DNA HotStarTaq      A polimerase de DNA HotStarTaq na PyroMark PCR Master Mix exige uma etapa de ativação de 15 minutos a 95 °C.
- c) Falha no preparo de amostras ou de PCR      Lidar com erros na configuração de PCR, na programação do ciclo de PCR ou no preparo de amostras antes da Pyrosequencing pode resultar na ausência de sinais. Execute o teste de funcionamento das sondas de filtro conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark Q24* e troque as sondas de filtro quando indicado. Repita a análise Pyrosequencing e de PCR.

## Controle de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão de Qualidade da QIAGEN com certificação ISO, cada lote de *therascreen* KRAS Pyro Kit é testado com relação a especificações predeterminadas para garantir a qualidade consistente do produto.

## Limitações

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

É responsabilidade do usuário validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não sejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

## Características de desempenho

### Limite de branco e limite de detecção

O limite de branco (LOB) e o limite de detecção (LOD) foram determinados para várias mutações usando misturas de plasmídeos (Tabela 9). O LOB e o LOD foram determinados de acordo com as recomendações na diretriz EP17-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protocolo para a determinação de limites de detecção e limites de quantificação; diretriz aprovada). Os erros  $\alpha$  e  $\beta$  (falso-positivo e falso-negativo, respectivamente) foram definidos para 5%.

Os valores de LOB representam a frequência medida obtida com uma amostra de tipo selvagem. Os valores de LOD representam o sinal mais baixo (frequência medida) que pode ser considerado como positivo para a respectiva mutação.

#### A mutação GGT → GTT no códon 12

Para essa mutação, as medições em branco estavam consistentemente próximas de 0% de unidades (n=72), resultando em uma distribuição não Gaussiana. Portanto, o LOD foi determinado usando um método diferente, de acordo com as recomendações da Diretriz EP17-A do CLSI. O sinal mais baixo que indica a presença de mutação (LOD) nessa posição foi definido para 1 % de unidades, que está claramente acima do nível de linha de base consistente (LOB) de 0% de unidades. Ao analisar uma amostra com um nível de mutação de 7%, 95% dos resultados (n=89) deram sinal de que podem ser considerados positivos ( $\geq$ LOD, isto é,  $\geq$ 1% de unidades).

Tabela 9. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição do ácido nucleico	Substituição do aminoácido	LOB (% unidades)	LOD (% unidades)	ID COSMIC* (V42)
Códon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) <sup>†</sup>	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Códon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Códon 61 (CAA), conforme analisado em orientação inversa (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutações somáticas em câncer), disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

<sup>†</sup> Nível mais baixo de mutação em uma amostra resultante em uma frequência medida  $\geq$ LOD.

Nota: Esses valores basearam-se em execuções onde misturas de plasmídeos que exibiam a sequência mutante ou a sequência de tipo selvagem foram usadas como modelo para a amplificação de PCR.

Nota: O algoritmo KRAS Plug-in Report foi usado para gerar os dados de LOB e LOD. A análise manual utilizando o PyroMark Q24 Application Software conforme descrito no Protocolo 6 (página 32) pode resultar em valores ligeiramente diferentes.

Nota: É recomendável que o desempenho do método seja confirmado no laboratório.

## Linearidade

A linearidade foi medida de acordo com a Diretriz EP6-A do CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Avaliação da linearidade dos procedimentos de medição quantitativa: uma abordagem estatística; diretriz aprovada).

Os plasmídeos que exibiam a sequência mutante e a sequência de tipo selvagem foram misturados em diferentes proporções para fornecer os seguintes níveis de mutação: 0, 12,5, 25, 37,5 e 50%. Quatro replicados das misturas foram posicionados em um padrão aleatório em uma placa e analisados. Os resultados para a mutação GGT → TGT no códon 12 foram analisados usando o Analyse-it® Software v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) e são mostrados na Figura 12.

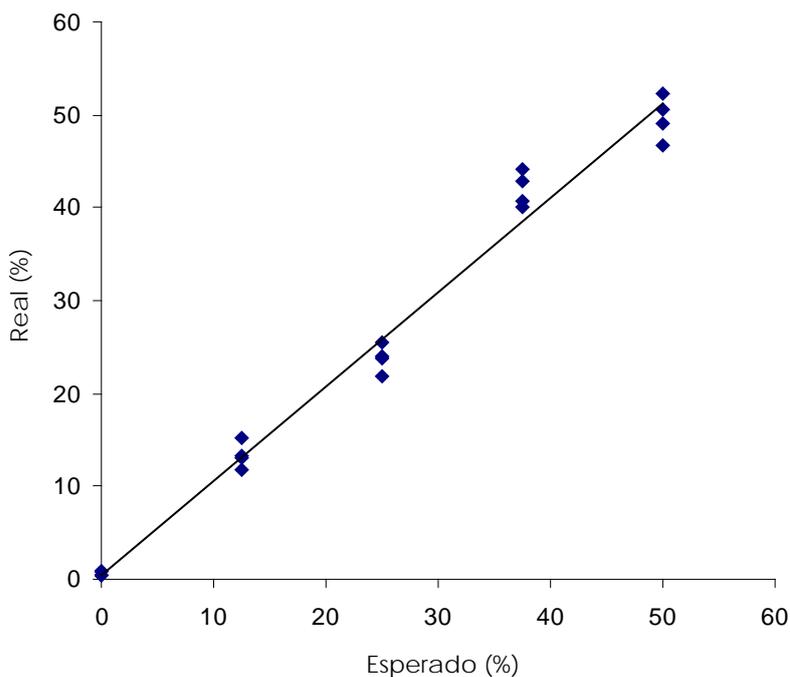


Figura 12. Linearidade da mutação GGT → TGT no códon 12.

A repetibilidade geral foi de 1,64% de unidades e os resultados foram lineares dentro de uma não linearidade permitida de 3% de unidades. Resultados similares foram obtidos para a mutação GGC → GAC no códon 13.

## Precisão intermediária

A determinação da linearidade da mutação GGT → TGT no códon 12 foi repetida por três operadores em três dias separados utilizando diferentes combinações de instrumentos e reagentes PyroMark Q24. Os resultados das três execuções são exibidos na Tabela 12.

Tabela 12. Precisão intermediária\*

% de plasmídeo mutado†	Execução 1		Execução 2		Execução 3		Resumo	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

\* Todos os valores são fornecidos como % de unidades. DP: desvio padrão.

† Baseado na medição de OD<sub>260</sub>.

Os valores da precisão intermediária (DP) foram, portanto, de 0,6 a 2,0% de unidades no intervalo medido de 0 a 50% do nível de mutação.

## Avaliação de diagnóstico

O *therascreen* KRAS Pyro Kit foi avaliado em comparação com o DxS KRAS Mutation Kit. O DNA foi extraído de 100 amostras prospectivas de tumor de câncer colorretal fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE) e analisado quanto a mutações nos códons 12 e 13.

O DNA para teste foi isolado utilizando o EZ1 DNA Tissue Kit e a análise foi realizada com o *therascreen* KRAS Pyro Kit no PyroMark Q24 e com o DxS KRAS Mutation Kit no ABI PRISM® 7900HT SDS.

Das 100 amostras analisadas, foi possível determinar o status mutacional de 91 delas com o DxS KRAS Mutation Kit. Com o *therascreen* KRAS Pyro Kit, foi possível determinar o status mutacional de 94 amostras.

Excluindo as amostras que falharam com um ou ambos os kits, o *therascreen* KRAS Pyro Kit e o DxS KRAS Mutation Kit apresentaram uma concordância de resultados de 100%.

A sensibilidade de diagnóstico do *therascreen* KRAS Pyro Kit foi de 100% e a especificidade de diagnóstico também foi de 100% (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados das amostras prospectivas de tumor de câncer colorretal analisadas para os códons 12 e 13

		DxS KRAS Mutation Kit			Total
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Mutante	33	0	1	34
	Tipo selvagem	0	57	3	60
	Desconhecido	0	1	5	6
	Total	33	58	9	100

#### Análise do códon 61

As mesmas 100 amostras foram analisadas quanto a mutações no códon 61 utilizando o *therascreen* KRAS Pyro Kit. Apenas uma amostra apresentou um resultado de falha na avaliação de qualidade do ensaio do códon 61. Esta amostra também falhou nos ensaios do *therascreen* KRAS Pyro Kit e DxS para os códons 12 e 13, indicando que o DNA era de qualidade muito baixa. A taxa de sucesso mais alta do ensaio do códon 61 indica que ele depende menos da qualidade do DNA do que os ensaios do *therascreen* KRAS Pyro Kit e DxS para os códons 12 e 13. Uma vez que o ensaio do DxS não testa as mutações no códon 61, não é possível fazer uma comparação direta dos ensaios.

Foram detectadas mutações no códon 61 em quatro das 99 amostras. Três continham mutações frequentes (CAC, CAT, CTA) no códon 61, enquanto a quarta continha mutações no códon 60 (GGT→GGA) e no códon 61 (CAA→AAA).

Nota: Em todas as execuções usadas para a determinação das características de desempenho, o sinal era superior a 60 RLU, conforme obtido rotineiramente a partir de 10 ng de DNA isolado de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPE).

## Referências

A QIAGEN mantém um vasto banco de dados online atualizado de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos que você precisa, pesquisando por uma única palavra-chave ou especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, visite o banco de dados de referência online da QIAGEN em [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou entre em contato com a Assistência técnica da QIAGEN ou o distribuidor local.

## Símbolos



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> testes



Data de validade



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Referência



Número de lote



Número do material



Componentes



Contém



Número



Número global de item comercial



Limites de temperatura



Fabricante



Consulte as instruções de uso

## Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de suporte técnico em [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) ou contate um dos Departamentos da Assistência técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (veja o verso do manual ou visite-nos em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Anexo A: Configuração de ensaios *therascreen* KRAS Pyro

Caso o KRAS Plug-in Report tenha sido instalado, estão disponíveis Assay Setups (Configurações de ensaio) predefinidas para os códons 12 e 13 e para o códon 61 no atalho do navegador do PyroMark Q24 Software, no caminho "Example Files (Ficheiros de exemplo)/PyroMark Setups (Configurações PyroMark)/KRAS". As seguintes etapas não necessitam ser realizadas. O KRAS Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Recomendamos fortemente o uso do KRAS Plug-in Report ao invés da análise manual. Após a instalação do plug-in ou sempre que um novo software for instalado ou atualizado no computador, a função correta do plug-in deve ser verificada conforme descrito no Plug-In Quick Guide (Guia rápido do plug-in).

Se o KRAS Plug-in Report não tiver sido instalado, o arquivo de ensaio deve ser configurado manualmente antes de executar o ensaio *therascreen* KRAS Pyro pela primeira vez. Configure o ensaio para os códons 12 e 13 e para o códon 61 do KRAS usando o PyroMark Q24 Software, conforme descrito abaixo.

### Procedimento

#### Códons 12 e 13 do KRAS

1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).
2. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada).

*GNTGRCGTAGGC*

Nota: As mutações mais frequentes no códon 12 serão detectadas no nucleotídeo 35 (segunda posição) usando essa "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada). Para verificar se as mutações estão presentes no nucleotídeo 34 (primeira posição), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para a seguinte sequência.

*NGTGRCGTAGGC*

Nota: Certifique-se de que o limiar de altura de pico individual esteja definido para 30 RLU.

3. Insira manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição).

*TACGACTCAGATCGTAG*

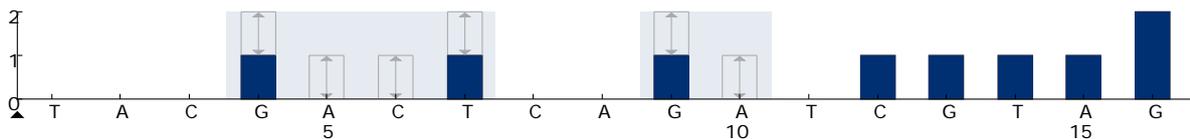


Figura 13. Histograma para os códons 12 (nucleotídeo 35) e 13 (nucleotídeo 38) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) *GNTGRCGTAGGC*.

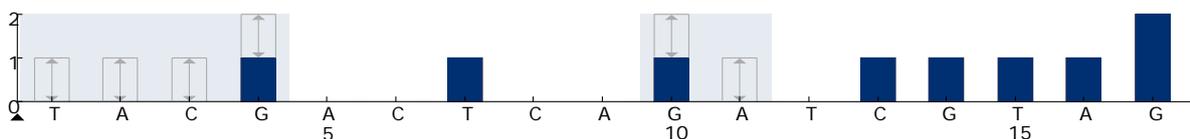


Figura 14. Histograma para os códons 12 (nucleotídeo 34) e 13 (nucleotídeo 38) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) *NGTGRCGTAGGC*.

4. Clique na guia "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Limiar de altura de pico – Altura de pico necessária para qualidade aprovada) para 30.
5. Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "KRAScodon 12+13".

#### Códon 61 do KRAS

6. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).
7. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada).

*CTCDTGACCTG*

Nota: As mutações mais frequentes no códon 61 serão detectadas no nucleotídeo 183 (terceira posição) com essa "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada). Para verificar se as mutações estão presentes no nucleotídeo 182 (segunda posição), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para a seguinte sequência.

*CTCTHGACCTG*

Para verificar se as mutações estão presentes no nucleotídeo 181 (primeira posição), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para a seguinte sequência.

*CTCTTSACCTG*

Nota: Certifique-se de que o limiar de altura de pico individual esteja definido para 30 RLU.

- Adicione manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição).

*GCTCAGTCAGACT*

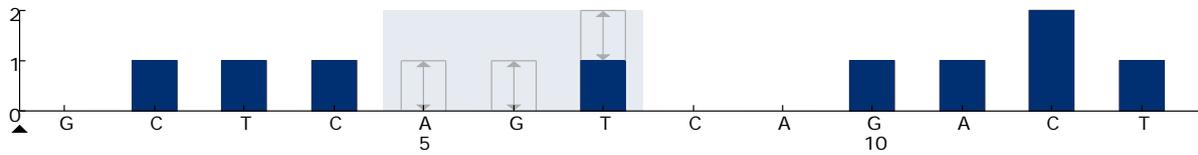


Figura 15. Histograma para o códon 61 (nucleotídeo 183) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) *CTCDTGACCTG*.

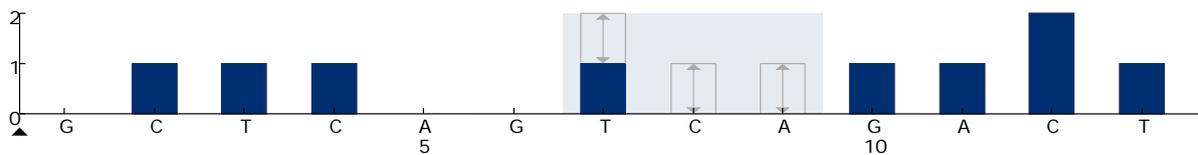


Figura 16. Histograma para o códon 61 (nucleotídeo 182) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) *CTCTHGACCTG*.

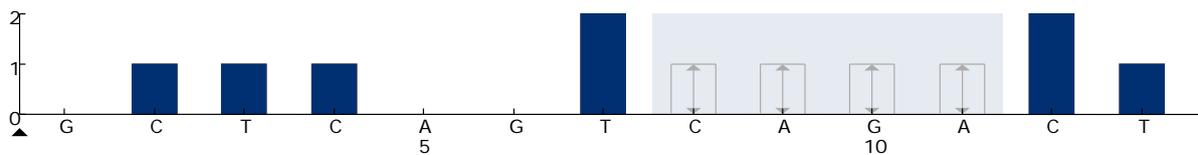


Figura 17. Histograma para o códon 61 (nucleotídeo 182) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) *CTCTTSACCTG*.

- Clique na guia "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Limiar de altura de pico – Altura de pico necessária para qualidade aprovada) para 30.
- Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "KRAScodon 61".

## Anexo B: Esvaziando o contêiner de resíduos e os canais

<p>AVISO</p> 	<p>Produtos químicos perigosos</p> <p>A Denaturation Solution usada com a estação de trabalho de vácuo contém hidróxido de sódio, que pode causar irritação nos olhos e na pele.</p> <p>Sempre use jaleco, luvas e óculos de proteção.</p> <p>O responsável (por exemplo, o gerente do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para garantir que os arredores da estação de trabalho estejam seguros e que os operadores do instrumento não sejam expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas ou biológicas) conforme definido nas folhas de dados de segurança (SDSs) ou nos documentos OSHA,* ACGIH† ou COSHH‡ aplicáveis.</p> <p>A expulsão de gases e o descarte de resíduos devem estar de acordo com todas as leis e regulamentos de saúde e segurança locais, estaduais e nacionais.</p>
--	--

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (EUA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (EUA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Reino Unido)

Certifique-se de observar os regulamentos ambientais locais, estaduais e federais quanto ao descarte de resíduos laboratoriais.

Ponto importante antes de começar

- Este protocolo requer a utilização de água de alta pureza (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com), ou equivalente).

Procedimento

1. Garanta que não seja aplicado vácuo à ferramenta de vácuo. Certifique-se de que o vácuo esteja fechado (Off) e de que a bomba de vácuo esteja desligada.
2. Descarte quaisquer soluções deixadas nos canais.
3. Lave os canais com água de alta pureza ou os substitua, se necessário.
4. Esvazie o contêiner de resíduos.  
Nota: A tampa pode ser removida sem desconectar o tubo.

5. Se a estação de trabalho de vácuo precisar ser limpa (por exemplo, devido a poeira e derramamentos), siga as instruções no *Manual do usuário do PyroMark Q24*.

## Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Ref.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	Para 24 reações em sistemas PyroMark Q24: Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP, e H <sub>2</sub> O	971460
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detecção baseada em sequência para Pyrosequencing de 24 amostras em paralelo	9001513
PyroMark Q24	Plataforma de detecção baseada em sequência para Pyrosequencing de 24 amostras em paralelo	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para o preparo de 24 amostras em paralelo, desde o produto de PCR até o modelo de fita simples	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para o preparo de 24 amostras em paralelo, desde o produto de PCR até o modelo de fita simples	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicativo	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de análise	9019062
Acessórios		

\* Apenas Reino Unido.

† Resto do mundo.

Produto	Conteúdo	Ref.
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reação de sequenciamento de 24 poços	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para distribuição de nucleotídeos e reagentes	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas de filtro reutilizáveis para a PyroMark Vacuum Workstation Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para verificação de instalação do sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para confirmação de desempenho do sistema	979304
Produtos relacionados		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de DNA: 50 colunas QIAamp MinElute®, Proteinase K, tampões, tubos de coleta (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparações: Reagent Cartridges (Tissue) (Cartuchos de reagentes [Tecido]), Disposable Filter-Tips (Ponteiras com filtro descartáveis), Disposable Tip-Holders (Suportes de ponteiras descartáveis), Sample Tubes (Tubos de amostra) (2 ml), Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml), Buffer G2 (Tampão G2), Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: colunas giratórias QIAamp Mini, tampões, reagentes, tubos, VacConnectors	61104

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais dos kits QIAGEN e os manuais do usuário estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência técnica da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente



Aos países aplicáveis:

A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO PERMITE AO COMPRADOR O SEU USO PARA EFETUAR SERVIÇOS DE DIAGNÓSTICO EM PROCESSOS DE DIAGNÓSTICO HUMANO IN VITRO. ESTE DOCUMENTO NÃO CONCEDE NENHUMA PATENTE GERAL OU OUTRAS LICENÇAS DE QUALQUER TIPO, AFORA ESTE DIREITO DE USO ESPECÍFICO DECORRENTE DA AQUISIÇÃO.

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

Acordo de licença limitada

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou usuário do *therascreen* KRAS Pyro Kit dos termos seguintes:

1. O *therascreen* KRAS Pyro Kit somente poderá ser usado em conformidade com o *Manual do theascreen KRAS Pyro Kit* e apenas com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual nem incorpora os componentes deste kit com nenhum componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do theascreen KRAS Pyro Kit* e nos protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Esse kit e seus componentes são licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, à exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário dos kits concordam em não tomar ou permitir que qualquer outra pessoa tome medidas que possam levar a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Acordo de licença limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, veja [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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)

