

Manual do kit *therascreen*[®] NRAS Pyro[®]



Versão 1



Apenas para utilização de diagnóstico in vitro



REF 971530

HB 1061828PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R3 **MAT** 1061828PT



Tecnologias de amostras e testes da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostras e testes, permitindo isolar e detectar o conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso, desde a amostra até ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Testes de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microRNA e RNAi
- Automatização de tecnologias de amostras e testes

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com.

Índice

Utilização prevista	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	6
Controlos	7
Materiais fornecidos	8
Conteúdo do kit	8
Materiais necessários mas não fornecidos	10
Misturadores de placas recomendados	11
Advertências e precauções	11
Informações de segurança	11
Precauções gerais	12
Armazenamento e manuseamento de reagentes	13
Armazenamento e manuseamento de amostras	13
Procedimento	15
Isolamento de ADN	15
Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24	16
Protocolo 2: PCR com os reagentes fornecidos com o kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro	19
Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho	22
Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24	24
Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24	29
Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24	32
Interpretação de resultados	34
Interpretação de resultados da análise e detecção de mutações de baixo nível	34
Guia de resolução de problemas	38
Controlo de qualidade	40
Limitações	41
Características de desempenho	42
Limite em branco e limite de detecção	42
Linearidade	44

Precisão	45
Avaliação de diagnóstico	45
Bibliografia	47
Símbolos	48
Informações de contacto	48
Anexo A: Preparação de ensaios <i>therascreen</i> NRAS Pyro	50
Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos	53
Informações para encomendar	55

Utilização prevista

O kit *therascreen* NRAS Pyro é um teste de detecção in vitro de ácido nucleico com base em sequências, baseado na tecnologia Pyrosequencing[®], para a detecção quantitativa de mutações em códons 12, 13, e 61 do gene humano NRAS no ADN genómico derivado de amostras de tecido humano.

O kit *therascreen* NRAS Pyro destina-se a fornecer aos médicos informações para ajudar na selecção de doentes com cancro com maior probabilidade de beneficiar de terapias anti-EGFR. Apenas para utilização de diagnóstico in vitro.

Apenas para utilização no sistema PyroMark[®] Q24. Os sistemas PyroMark Q24 incluem o seguinte:

- O equipamento PyroMark Q24 e o equipamento PyroMark Q24 MDx.
- A estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 e a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 MDx.
- O software de PyroMark Q24 (versão 2.0) e o software de PyroMark Q24 MDx (versão 2.0).

O produto deve ser utilizado por utilizadores profissionais, como técnicos e médicos especializados em procedimentos de diagnóstico in vitro, em técnicas de biologia molecular e no sistema PyroMark Q24.

Resumo e explicação

O kit *therascreen* NRAS Pyro é utilizado para as medições quantitativas das mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene humano NRAS.

O kit consiste em dois ensaios (Imagem 1): um para a detecção de mutações nos códons 12 e 13 e o outro para a detecção de mutações no códon 61.

As duas regiões são amplificadas em separado por PCR e sequenciadas pela região definida. As sequências em redor das posições definidas servem como picos de normalização e de referência para a quantificação e avaliação da qualidade da análise.

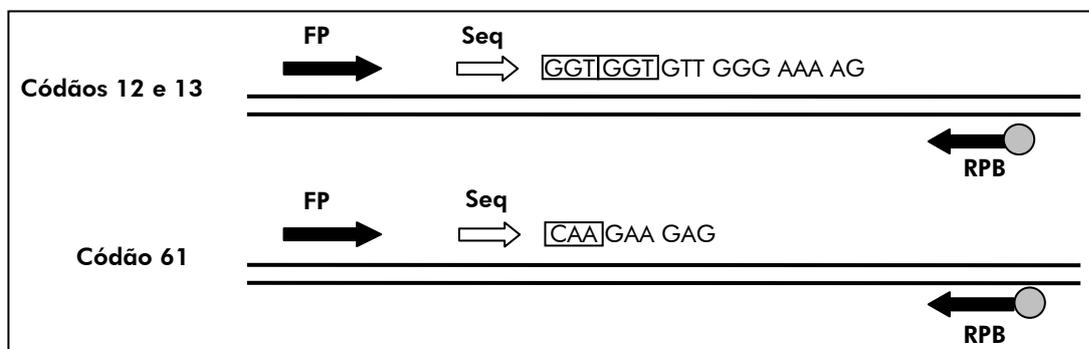


Imagem 1. Ilustração do ensaio de NRAS. A sequência indicada é a sequência analisada para uma amostra wild type. **FP:** Iniciadores de PCR para a frente; **RPB:** Iniciadores PCR de inversão (B indica biotilação); **Seq:** Iniciadores de sequenciação.

Ambos os ensaios são sequenciados na direcção em frente.

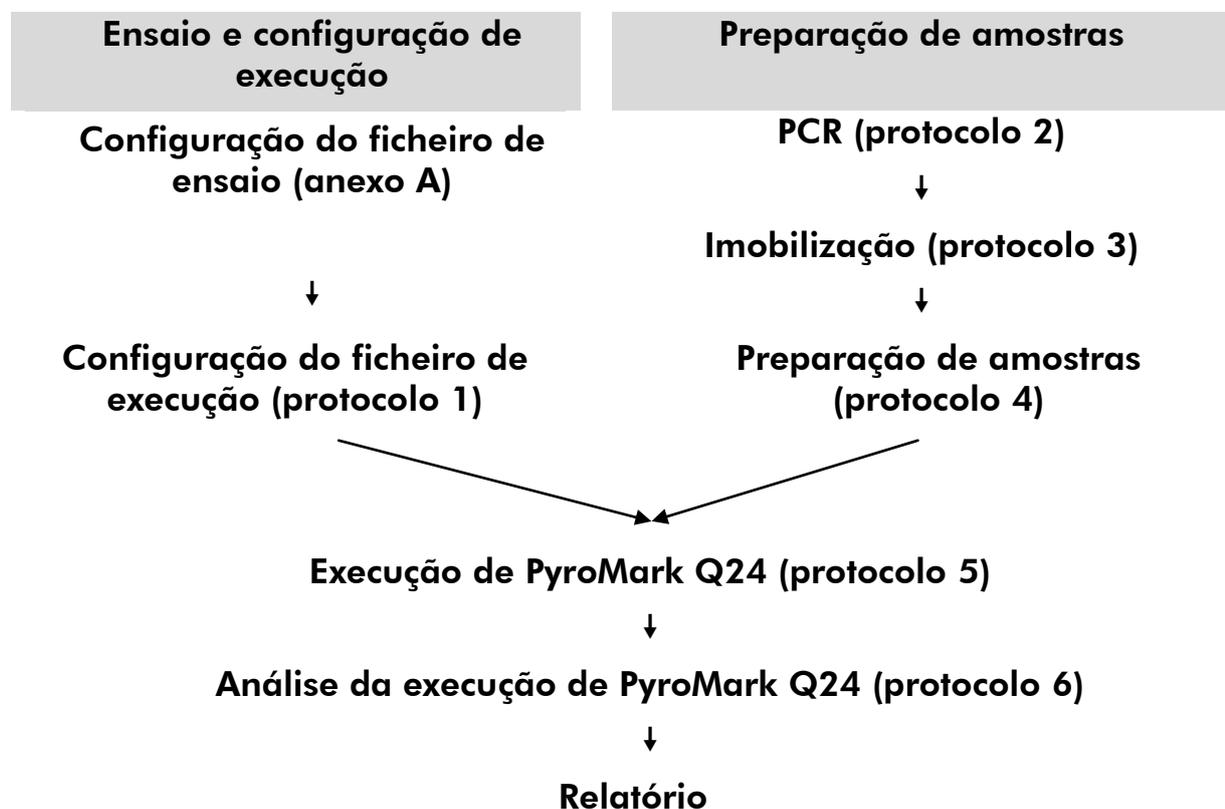
O produto consiste numa mistura de iniciadores de PCR e num iniciador de sequenciação para cada ensaio. Os iniciadores são fornecidos em solução. Cada frasco contém 24 µl de cada iniciador ou mistura de iniciadores.

Princípio do procedimento

O fluxo de trabalho a seguir ilustra o procedimento de ensaio. Depois de a PCR utilizar iniciadores que visam os códãos 12/13 e o códão 61, os amplicons são imobilizados em bandas de Streptavidin Sepharose® High Performance. É preparado ADN de cadeia simples e os iniciadores de sequenciação correspondentes são hibridizados para o ADN. Em seguida, as amostras são analisadas no PyroMark Q24, usando um ficheiro de configuração de execução e um ficheiro de execução. A “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) pode ser ajustada para a detecção de mutações raras após a execução (consultar “Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24”, página 32).

Nota: O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado à revisão R1 do *Manual do kit therascreen NRAS Pyro* (consultar “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24”, na página 24).

Fluxo de trabalho do procedimento de *therascreen* NRAS Pyro



Controlos

O ADN de controlo não metilado está incluído no kit como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação. Este ADN de controlo tem um genótipo wild type nas regiões sequenciadas utilizando este kit e é necessário para a interpretação adequada dos resultados e a identificação de mutações de nível baixo (consultar “Interpretação de resultados”, na página 34). Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação.

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

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

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

Kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro (24)	(24)
Ref.^o	971530
Número de reacções	24
Iniciador de Seq NRAS 12/13	24 µl
Iniciador de Seq NRAS 61	24 µl
Iniciador de PCR NRAS 12/13	24 µl
Iniciador de PCR NRAS 61	24 µl
Mistura principal de PCR PyroMark, 2x	850 µl
Concentrado CoralLoad [®] , 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
ADN de controlo não metilado, 10 ng/µl	100 µl

Soluções tampão e reagentes *therascreen* (caixa 2/2)

Soluções tampão e reagentes <i>therascreen</i>		
Tampão de ligação PyroMark		10 ml
Tampão de "annealing" PyroMark		10 ml
Solução de desnaturação PyroMark*		250 ml
Tampão de lavagem PyroMark, 10x		25 ml
Mistura de enzimas		1 frasco
Mistura de substrato		1 frasco
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Manual		1

* Contém hidróxido de sódio.

Materiais necessários mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ADN (consulte “Isolamento de ADN”, página 15)
- Pipetas (ajustáveis)*
- Pontas de pipeta esterilizadas (com filtros para configuração de PCR)
- Microcentrifugadora de bancada*
- Termociclador* e tubos de PCR adequados
- Estreptavidina Sepharose High Performance (GE Healthcare, ref.º 175113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (ref.º 9001513 ou 9001514)*†
- Software PyroMark Q24 (ref.º 9019063 ou 9019062)†
- Placa PyroMark Q24 (ref.º 979301)†
- Cartucho PyroMark Q24 (ref.º 979302)†
- Estação de trabalho de vácuo (ref.º 9001515 ou 9001517)*†
- Misturador e placa* para a imobilização de bandas
- Bloco de aquecimento* capaz de atingir os 80 °C
- Placa de PCR de 24 poços ou tiras
- Tampas de tiras
- Água de grande pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou equivalente).
Nota: É fornecida água suficiente no kit para a PCR, a imobilização de ADN e para dissolver a mistura de enzimas e a mistura de substrato; é necessária água adicional de grande pureza para diluir o tampão de lavagem PyroMark, 10x.
- Etanol (70%)‡

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

† Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE. Todos os outros produtos apresentados não têm o símbolo CE-IVD, com base na directiva europeia 98/79/CE.

‡ Não utilizar álcool desnaturado, que contém outras substâncias como o metanol ou o metil-etil-cetona.

Misturadores de placas recomendados

Os misturadores de placas indicados no Quadro 1 são recomendados para utilização com o kit *therascreen* NRAS Pyro.

Quadro 1. Misturadores de placas recomendados para utilização com o kit *therascreen* NRAS Pyro

Fabricante	Produto	Ref. ^o
Eppendorf	Thermomixer comfort (dispositivo básico)	5355 000.011
	Termo bloco para placas de microtitulação	5363 000.012
	Placa adaptadora para tubos de PCR de 96 x 0,2ml para inserir em blocos de placas de microtitulação	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Informações de segurança

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online num formato PDF compacto e adequado em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as SDS para cada kit QIAGEN e componente de kit.

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do kit *therascreen* NRAS Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Atenção! Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave.

Pode ser corrosivo para os metais. Absorver o produto derramado a fim de evitar danos materiais. Conservar unicamente no recipiente de origem. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

PyroMark Enzyme Mixture



Contém: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Perigo! Provoca irritação cutânea. Provoca lesões oculares graves. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. EM CASO DE exposição ou preocupação: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENO ou um médico. Retirar a roupa contaminada e lavar-lo antes de reutilizar. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

PyroMark Substrate Mixture



Contém: acetic acid. Atenção! Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Retirar a roupa contaminada e lavar-lo antes de reutilizar. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

Precauções gerais

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- É necessário o cumprimento estrito do manual de utilizador para a obtenção de resultados optimizados. Não se recomenda a diluição de reagentes não descritos neste manual pois pode resultar numa redução do seu desempenho.
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado (consultar “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24”, na página 24) quando comparado à revisão R1 do *Manual do kit thetascreen NRAS Pyro*.
- Os componentes deste produto são suficientes para executar as 24 reacções em até 5 execuções independentes.
- Utilize pontas de pipeta esterilizadas com filtros (para configuração da PCR).

- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controlos positivos e amplicons) separadamente de todos os reagentes restantes e adicione-os à mistura de reacção numa instalação em separado.
- Descongele completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar um ensaio.
- Quando estiver descongelado, misture os componentes (ao pipetar repetidamente para cima e para baixo ou ao vibrar com agitação) e centrifugue com brevidade.
- Resultados falhados não são uma base para uma decisão de estado de mutação.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O kit *therascreen* NRAS Pyro é transportado em duas caixas. O kit *therascreen* NRAS Pyro (caixa 1/2) é transportada em gelo seco. A mistura principal de PCR PyroMark, o concentrado CoralLoad, o ADN de controlo não metilado e todos os iniciadores devem ser armazenados a –30 até –15°C, após a chegada.

As soluções tampão e os reagentes *therascreen* (caixa 2/2) que contêm soluções tampão, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP e dTTP (os reagentes para análise de piro-sequenciação) são transportados em embalagens refrigeradas. Estes componentes devem ser armazenados a 2–8 °C, após a chegada. Para minimizar a perda de acção, é aconselhável manter a mistura de enzimas e a mistura de substrato nos frascos fornecidos.

As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas permanecem estáveis durante, pelo menos, 10 dias a 2–8 °C. As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas podem ser congeladas e armazenadas nos seus frascos entre –30 e –15°C. Os reagentes congelados não devem ser sujeitos a mais de 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

Nota: Os nucleótidos não devem ser congelados.

O kit *therascreen* NRAS Pyro mantém-se estável até à data de prazo de validade do kit, quando armazenado nestas condições.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

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

Não se deve utilizar amostras humanas submetidas a tratamento de heparina. Não se deve utilizar as amostras de sangue que tenham sido recolhidas em tubos que continham heparina como anticoagulante. A heparina afecta a PCR.

Procedimento

Isolamento de ADN

O desempenho do sistema foi estabelecido através do kit EZ1[®] DNA Tissue e do kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue para a extracção de ADN humano de amostras de tumor fixadas em formalina e envolvidas em parafina. No sistema de kit QIAamp DSP DNA Blood Mini, o desempenho foi estabelecido através de amostras de sangue de dador saudável, perfurada parcialmente com células de tumor.

Os kits QIAGEN[®] apresentados no Quadro 2 são recomendados para a purificação do ADN dos tipos de amostras humanas indicadas para a utilização com o kit *therascreen* NRAS Pyro. Efectuar a purificação de ADN de acordo com as instruções dos manuais do kits.

Quadro 2. Kits de purificação de ADN recomendados para utilização com o kit *therascreen* NRAS Pyro

Material de amostras	Kit de isolamento do ácido nucleico	Ref. ^o (QIAGEN)
Tecido envolvido em parafina	Kit QIAamp DNA FFPE Tissue (50)	56404
	Kit EZ1 DNA Tissue (48)*	953034
Sangue	Kit QIAamp DSP DNA Blood Mini [†]	61104

* Siga o protocolo para a utilização de tecido conservado em parafina. O kit EZ1 DNA Tissue deve ser utilizado em conjunto com o EZ1 Advanced (ref.^o 9001410 ou 9001411) e o cartão EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9018298), com o EZ1 Advanced XL (ref.^o 9001492) e o cartão EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9018700), ou com o BioRobot[®] EZ1 (ref.^o 9000705; já não está disponível) e o cartão EZ1 DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9015862).

[†] Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE.

Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24

Aspecto importante antes do início do procedimento

- Se necessário, o LOB pode ser confirmado utilizando uma amostra wild type para gerar uma placa inteira de resultados. Para mais informações, consulte a directriz EP17-A do CLSI “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada).

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Crie uma configuração de ensaio, como descrito no anexo A, página 50. Isto tem de ser feito apenas uma vez, antes de executar o ensaio *therascreen* NRAS Pyro pela primeira vez.

Procedimento

1. **Clique em  na barra de ferramentas.**
É criada uma nova execução.
2. **Introduza os parâmetros de execução (consulte “Parâmetros de execução”, página 18).**
3. **Configure a placa, adicionando ensaios para os códãos 12/13 e códão 61 aos poços que correspondem às amostras a analisar.**
Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.
Nota: Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação (consultar “Controlos”, na página 7).
4. **Quando a execução está configurada e pronta a executar no sistema PyroMark Q24, imprima uma lista dos volumes necessários de mistura de enzimas, mistura de substrato e nucleótidos e a configuração da placa. Selecione “Pre Run Information” (Informações de pré-execução) do menu “Tools” (Ferramentas) e, quando o relatório aparece, clique em .**
5. **Feche o ficheiro de execução e copie-o para um dispositivo de armazenamento de dados USB (fornecido com o sistema), usando o Windows® Explorer.**

As informações de pré-execução impressas podem ser utilizadas como modelo para a configuração de amostras (ver “Protocolo 3: Imobilização

de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho”, página 22).

Para executar a placa no PyroMark Q24, consulte “Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24”, página 29.

Parâmetros de execução

“Run name” (Nome de execução):	O nome da execução é atribuído quando o ficheiro é guardado. Ao mudar o nome do ficheiro também altera o nome da execução.
“Instrument method” (Método do equipamento):	Seleccione o método do equipamento de acordo com o cartucho que será utilizado na execução. Consultar as instruções fornecidas com os produtos.
“Plate ID” (ID da placa):	Opcional: Introduza a ID da placa PyroMark Q24.
“Bar code” (Código de barras):	Opcional: Introduza um número de código de barras para a placa ou, se tiver algum leitor de códigos de barras conectado ao seu computador, coloque o cursor do rato na caixa de texto “Barcode” (Código de barras) (ao clicar na caixa) e faça a leitura do código de barras.
“Kit and Reagent ID” (ID de reagente e de kit):	Opcional: Introduza o número de lote do kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro a usar. Pode encontrar o número de lote no rótulo do produto. Nota: Recomenda-se a introdução de ambas as ID's de reagente e do kit, para que seja possível detectar quaisquer problemas inesperados com os reagentes.
“Run note” (Nota de execução):	Opcional: Introduza uma nota sobre os conteúdos ou objectivo da execução.

Adicionar ficheiros de ensaio

Para adicionar um ensaio a um poço, pode:

- Clicar com o botão direito do rato no poço e seleccionar “Load Assay” (Carregar ensaio) no menu de contexto.
- Seleccionar o ensaio no browser de atalhos, clicar e arrastar o ensaio para o poço.

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

Introdução de ID's de amostras e de notas

Para introduzir uma ID de amostra ou nota, seleccione a célula e introduza o texto.

Para editar uma ID de amostra ou nota, seleccione a célula (os conteúdos actuais serão seleccionados) ou faça duplo clique na célula.

Protocolo 2: PCR com os reagentes fornecidos com o kit *therascreen* NRAS Pyro

Este protocolo serve para as amplificações de PCR de uma região que contém o códon 12 e o códon 13 e para uma amplificação de PCR em separado de uma região que contém o códon 61, usando o kit *therascreen* NRAS Pyro.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- A polimerase HotStarTaq[®] de ADN na mistura principal PyroMark necessita de um passo de activação de **15 minutos a 95 °C**.
- Configure todas as misturas de reacção numa área diferente da utilizada para a purificação de ADN, adicionando o modelo de ADN à PCR, à análise do produto de PCR ou preparação de amostras antes da análise da piro-sequenciação.
- Utilize as pontas descartáveis que contêm filtros hidrofóbicos para minimizar a contaminação cruzada.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de abrir os tubos com iniciadores de PCR, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- Se necessário, ajuste a concentração do controlo e do ADN de amostra para 0,4 a 2 ng/ μ l.

Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários (consultar o quadro 3).

Misture bem antes da utilização.

2. Prepare uma mistura de reacção para cada iniciador de PCR, definida de acordo com o quadro 3.

Geralmente, a mistura de reacção contém todos os componentes necessários para a PCR, excepto a amostra.

Prepare um volume de mistura de reacção superior ao necessário para o número total de ensaios de PCR a efectuar.

Quadro 3. Preparação de mistura de reacção para cada mistura de iniciadores de PCR

Componente	Volume/reacção (μ l)
Mistura principal de PCR PyroMark, 2x	12,5
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5
Iniciador de PCR NRAS 12/13 ou iniciador de PCR NRAS 61	1,0
Água (H ₂ O, fornecida)	4,0
Volume total	20,0

3. Misture cuidadosamente a mistura de reacção e distribua 20 μ l em cada tubo de PCR.

Não é necessário manter os tubos de PCR no gelo, uma vez que a polimerase HotStarTaq de ADN é inactiva à temperatura ambiente.

4. Adicione 5 μ l de modelo de ADN (2 a 10 ng de ADN genómico) aos tubos de PCR individuais (consultar o quadro 4) e misture cuidadosamente.

Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.

Nota: Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação (consultar "Controlos", na página 7).

Quadro 4. Preparação de PCR

Componente	Volume/reacção (μ l)
Mistura de reacção	20
ADN da amostra	5
Volume total	25

5. Programe o termociclador de acordo com as instruções do fabricante, com as condições descritas no quadro 5.

Quadro 5. Protocolo de ciclagem otimizada

			Comentários
Passo de activação inicial:	15 minutos	95 °C	A polimerase HotStarTaq de ADN é activada por este passo de aquecimento.
Ciclagem de 3 passos:			
Desnaturação	20 segundos	95 °C	
Annealing	30 segundos	53 °C	
Extensão	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
Extensão final:	5 minutos	72 °C	

6. Coloque os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.
7. Após a amplificação, continue com o "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho", página 22.

Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho

Este protocolo serve para a imobilização do modelo de ADN em Estreptavidina Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes da análise no sistema PyroMark Q24.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Permitir que todos os reagentes e soluções necessárias atinjam a temperatura ambiente (15–25°C) antes de iniciar.

Procedimento

1. **Agite cuidadosamente o frasco que contém Estreptavidina Sepharose High Performance até se tornar numa solução homogénea.**
2. **Prepare uma mistura principal para a imobilização de ADN, de acordo com o Quadro 6. Prepare um volume 10% superior ao necessário para o número total de reacções a efectuar.**

Quadro 6. Mistura principal para a imobilização de ADN

Componente	Volume/reacção (µl)
Estreptavidina Sepharose High Performance	2
Tampão de ligação PyroMark	40
Água (H ₂ O, fornecida)	28
Volume total	70

3. **Adicione 70 µl da mistura principal aos poços de uma placa de PCR de 24 poços ou tiras como predefinido na configuração de execução (consulte o “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, página 16).**
4. **Adicione 10 µl de produto de PCR biotilado do protocolo 2 a cada poço que contém mistura principal, como predefinido na configuração da execução (consulte o “Protocolo 2: PCR com os reagentes fornecidos com o kit *therascreen* NRAS Pyro”, página 19).**
O volume total por poço deve ser 80 µl após a adição da mistura principal e do produto de PCR.

- 5. Vede a placa de PCR (ou tiras) com tampas de tiras.**
Certifique-se de que não são possíveis fugas entre os poços.
- 6. Agite a placa de PCR à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 5 a 10 minutos, a 1400 rpm.**
Durante este passo, prepare a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 para a preparação de amostras como descrito no *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*.
- 7. Continue imediatamente com o “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24”, página 24.**
Nota: As bandas de sefarose depositam-se rapidamente. A captação de bandas deve ser efectuada imediatamente a seguir à agitação.
Se tiver decorrido mais de 1 minuto desde que a placa (ou tiras) foi agitada, agite de novo durante 1 minuto antes da captação das bandas.

Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24

Este protocolo serve para a preparação de ADN de cadeia simples e para "annealing" do iniciador de sequenciação para o modelo antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de abrir os tubos com iniciadores de sequenciação, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- Adicione os 2 iniciadores de sequenciação diferentes no mesmo padrão, como predefinido para a placa na configuração da execução (consulte o "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", página 16), dependendo da região da análise (códãos 12 e 13, ou código 61).
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado à revisão R1 do *Manual do kit thetascreen NRAS Pyro* (passo 18). Não reduza o tempo para arrefecer as amostras depois do aquecimento para 80 °C.
- Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no *PyroMark Q24 User Manual* (Manual do Utilizador do PyroMark Q24) e substitua as sondas de filtro quando for indicado.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Coloque um suporte da placa PyroMark Q24 num bloco de aquecimento pré-aquecido a 80 °C, para utilizar no passo 17. Deixe um segundo suporte da placa PyroMark Q24 à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para utilizar no passo 18.
- O tampão de lavagem PyroMark é fornecido como um concentrado 10x. Antes da primeira utilização, dilua numa solução de trabalho 1x, ao adicionar 225 ml de água de grande pureza a 25 ml de tampão de lavagem PyroMark 10x (volume final de 250 ml).

A solução de trabalho de 1x tampão de lavagem PyroMark mantém-se estável entre 2 e 8 °C até ao prazo de validade indicado.

Procedimento

- 1. Dilua uma quantidade suficiente de cada iniciador de sequenciação, iniciador de Seq NRAS 12/13 e iniciador de Seq NRAS 61, em tampão de "Annealing" PyroMark, como descrito no quadro 7.**

Prepare um volume de iniciador de sequenciação diluído superior ao necessário para o número total de amostras a ser sequenciadas (número de amostras + um adicional).

Quadro 7. Exemplo de diluição dos iniciadores de sequenciação

Componente	Volume/reacção (μ l)	Volume para reacções 9 + 1 (μ l)
Iniciador de Seq NRAS 12/13 ou iniciador de Seq NRAS 61	0,8	8
Tampão de "annealing" PyroMark	24,2	242
Volume total	25	250

2. **Adicione 25 μ l do iniciador de sequenciação diluído a cada poço da placa PyroMark Q24, de acordo com a configuração de execução (consulte o "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", página 16).**

Mantenha um dos suportes de placa PyroMark Q24 (fornecidos com a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24) à temperatura ambiente (15–25 °C), e utilize-o como apoio durante a preparação e movimentação da placa.

3. **Coloque a placa de PCR (ou tiras) do protocolo 3 e a placa PyroMark Q24 sobre a mesa de trabalho (Imagem 2).**

Certifique-se de que a placa tem a mesma orientação que tinha quando as amostras foram carregadas.



Imagem 2. Colocação da placa de PCR (ou tiras) e da placa PyroMark Q24 na estação de trabalho de vácuo.

4. **Aplique vácuo à ferramenta ao ligar o vácuo.**
5. **Baixe cuidadosamente as sondas de filtro para a ferramenta de vácuo na direção da placa de PCR (ou tiras) para captar as bandas que contêm modelo imobilizado. Mantenha as sondas no lugar durante 15 segundos. Tenha cuidado ao recolher a ferramenta de vácuo.**

Nota: As bandas de sefarose depositam-se rapidamente. A captação de bandas deve ser efectuada imediatamente a seguir à agitação.

Se tiver decorrido mais de 1 minuto desde que a placa (ou tiras) foi agitada, agite de novo durante 1 minuto antes da captação das bandas.

6. **Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de etanol a 70% (Imagem 2). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.**
7. **Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de solução de desnaturação (Imagem 2). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.**
8. **Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 50 ml de tampão de lavagem (Imagem 2). Enxagúe as sondas de filtro durante 10 segundos.**
9. **Levante a ferramenta de vácuo para cima e para trás, para além dos 90° na vertical, durante 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Imagem 3).**



Imagem 3. Ilustração da ferramenta de vácuo levantada acima de 90° na vertical.

10. **Enquanto a ferramenta de vácuo for mantida sobre a placa PyroMark Q24, desligue o comutador de vácuo na ferramenta (Off).**
11. **Liberte as bandas na placa PyroMark Q24, mergulhando as sondas de filtro no iniciador de sequenciação diluído e movendo a ferramenta cuidadosamente na horizontal.**

Tenha cuidado para não danificar a placa PyroMark Q24 riscando-a com as sondas de filtro.

- 12. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém água de grande pureza (Imagem 2) e agite-a durante 10 segundos.**
- 13. Lave as sondas de filtro, mergulhando as sondas em água de grande pureza (Imagem 2) e aplicando vácuo. Enxagúe as sondas com 70 ml de água de grande pureza.**
- 14. Levante a ferramenta de vácuo para cima e para trás, para além dos 90º na vertical, durante 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Imagem 3).**
- 15. Desligue o comutador de vácuo na ferramenta (Off) e coloque a ferramenta de vácuo na posição de parque (P).**
- 16. Desligue a bomba de vácuo.**

Nota: No final do dia de trabalho, deve-se eliminar os desperdícios líquidos e as soluções restantes e a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 deve ser verificada quanto a poeiras e derramamentos, consulte o anexo B, página 53).
- 17. Aqueça a placa PyroMark Q24 com as amostras a 80 °C durante 2 minutos, utilizando o suporte de placa pré-aquecido PyroMark Q24.**
- 18. Retire a placa PyroMark Q24 do suporte de placa quente e coloque-a num segundo suporte de placa PyroMark Q24 que foi mantido à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para deixar as amostras arrefecer à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos.**
- 19. Continue imediatamente com o “Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24”, página 29.**

Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24

Este protocolo descreve a preparação e o carregamento dos reagentes PyroMark Gold Q24 no cartucho PyroMark Q24, e o início e a conclusão da execução no PyroMark Q24. Para uma descrição detalhada sobre como configurar uma execução, consulte o *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de Utilizador do PyroMark Q24).

Aspecto importante antes do início do procedimento

- O relatório de informações de pré-execução, que se encontra no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração da execução (consultar "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", na página 16), fornece informações sobre o volume de nucleótidos, enzimas e tampão de substrato necessário para uma execução específica.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Ligue o PyroMark Q24. O interruptor está situado na parte traseira do equipamento.

Procedimento

- 1. Dissolva cada enzima liofilizada e as misturas de substrato em 620 µl de água (H₂O, fornecida).**
- 2. Misture, agitando cuidadosamente o frasco.**
Não misture com agitação forte!
De forma a assegurar que a mistura está completamente dissolvida, deixe-a à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 5 a 10 minutos. Certifique-se de que a solução não está turva antes de encher o cartucho PyroMark Q24. Se não utilizar de imediato os reagentes, coloque os frascos de reagente no gelo* ou num frigorífico.
- 3. Deixe os reagentes e o cartucho PyroMark Q24 atingirem a temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).**
- 4. Coloque o cartucho PyroMark Q24 com o rótulo virado para si.**
- 5. Carregue o cartucho PyroMark Q24 com os volumes adequados de nucleótidos, enzimas e misturas de substrato de acordo com a Imagem 4.**

Certifique-se que não são transferidas bolhas de ar da pipeta para o cartucho.

* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consultar as

fichas de dados de segurança (SDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

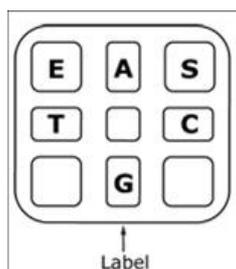


Imagem 4. Ilustração do cartucho PyroMark Q24 visto de cima. As anotações correspondem ao rótulo nos frascos de reagente. Adicione mistura de enzimas (**E**), mistura de substrato (**S**), e nucleótidos (**A**, **T**, **C**, **G**) de acordo com a informação do volume indicada no relatório de informações de pré-execução que se encontra no menu “Tools” (Ferramentas) da configuração da execução.

- 6. Abra a porta do compartimento dos cartuchos e introduza o cartucho cheio de reagente, com o rótulo virado para fora. Empurre totalmente o cartucho e, em seguida, empurre para baixo.**
- 7. Certifique-se de que a linha está visível à frente do cartucho e feche a porta.**
- 8. Abra a estrutura de suporte da placa e coloque a placa no bloco de aquecimento.**
- 9. Feche a estrutura de suporte da placa e a tampa do equipamento.**
- 10. Introduza o dispositivo de armazenamento de dados USB (que contém um ficheiro de execução) na porta USB, na parte dianteira do equipamento.**

Não remova o dispositivo de armazenamento de dados USB antes da conclusão da execução.
- 11. Seleccione “Run” (Execução) no menu principal (com os botões do ecrã ▲ e ▼ e prima “OK”).**
- 12. Seleccione o ficheiro de execução com os botões do ecrã ▲ e ▼.**

Para ver os conteúdos de uma pasta, seleccione a pasta e prima em “Select” (Seleccionar). Para voltar à vista anterior, prima “Back” (Anterior).
- 13. Quando o ficheiro de execução estiver seleccionado, prima “Select” (Seleccionar) para iniciar a execução.**
- 14. Se a execução estiver concluída e o equipamento confirmar que a execução foi guardada no dispositivo de armazenamento de dados USB, prima “Close” (Fechar).**
- 15. Remova o dispositivo de armazenamento de dados USB.**
- 16. Abra a tampa do equipamento.**
- 17. Abra a porta do compartimento dos cartuchos e retire o cartucho de reagente, levantando-o para cima e puxando-o para fora.**
- 18. Feche a porta.**

- 19. Abra a estrutura de suporte da placa e retire a placa do bloco de aquecimento.**
- 20. Feche a estrutura de suporte da placa e a tampa do equipamento.**
- 21. Elimine a placa e limpe o cartucho, conforme as instruções no folheto do produto fornecido com o cartucho.**
- 22. Analise a execução de acordo com o “Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24”, página 32.**

Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24

Este protocolo descreve a análise de mutação de uma execução de NRAS concluída, usando o software de PyroMark Q24.

Procedimento

1. **Conecte o dispositivo de armazenamento de dados USB, que contém o ficheiro da execução processada, na porta USB do computador.**
2. **Copie o ficheiro de execução do dispositivo de armazenamento de dados USB para a localização pretendida no computador, usando o Windows Explorer.**
3. **Abra o ficheiro de execução no modo AQ do software PyroMark Q24, seleccionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou fazendo duplo clique no ficheiro (👉) no browser de atalhos.**
4. **Verifique se o factor de redução do pico A (separador "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) no separador "Analysis Setup" (Configuração de análise)) está definido em 0,86 para os ensaios do código 61 de NRAS.**
5. **Para analisar a execução e obter uma perspectiva geral dos resultados, clique num dos botões de Análise.**



Analisar todos os poços.



Analisar o poço seleccionado.

Os resultados da análise (frequências dos alelos) e a avaliação de qualidade são apresentados por cima da posição variável, na curva de Pyrogram[®]. Para mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o *PyroMark Q24 User Manual*.

6. **Para criar um relatório, seleccione "AQ Full Report" (Relatório completo AQ) ou "AQ Analysis Results" (Resultados de análise AQ) no menu "Reports" (Relatórios).**

As mutações mais frequentes dos três códigos de NRAS analisados encontram-se no nucleótido 35 (segunda base do código 12), nucleótido 38 (segunda base do código 13) e no nucleótido 182 (segunda base do código 61). Por isso, a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) padrão definida na configuração de análise endereça estas mutações nestas posições (ver anexo A, página 50). Se uma amostra contiver uma mutação no nucleótido 34, nucleótido 37, nucleótido 181 ou no nucleótido 183, a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) pode ser alterada para também analisar o estado de mutação nestas posições, como descrito no anexo A.

As frequências actualizadas das mutações no gene humano NRAS, nos códãos 12/13 e códão 61 são fornecidas via online pelo Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Nota: Para resultados fiáveis, recomenda-se alturas de picos individuais acima de 30 RLU. Defina 20 ou 30 RLU, respectivamente, como “required peak height for passed quality” (altura de pico necessária para qualidade aprovada) na configuração do ensaio (consultar o *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de Utilizador do PyroMark Q24) e o Anexo A).

Nota: O relatório “AQ Analysis Results” (Resultados da análise AQ) deverá ser utilizado para documentação e interpretação da quantificação dos alelos. Os números apresentados no pirograma são arredondados e não indicam a quantificação exacta.

Nota: O pirograma deverá ser sempre comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Os picos medidos deverão corresponder às alturas das barras do histograma.

Nova análise de amostras sem mutações detectadas no nucleótido 35, 38 ou 182 com avaliação de qualidade “Check” (Verificada) ou “Failed” (Falhada)

Recomenda-se vivamente a nova análise de todas as amostras sem mutação detectada com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) padrão no nucleótido 35, 38 ou 182, bem como de amostras que tenham recebido a avaliação de qualidade “Check” (verificada) ou “Failed” (Falhada). As avaliações de qualidade “Check” (Verificada) ou “Failed” (Falhada) podem indicar uma mutação numa posição diferente do nucleótido 35, 38 ou 182, resultando em desvios de altura de picos nas distribuições de referência. Por exemplo, um pico em qualquer uma das 3 primeiras distribuições nos ensaios de códãos 12/13 mostra que há uma mutação no nucleótido 34 do códão 12.

Para reanalisar e detectar mutações nos nucleótidos 34 e 37, vá a “Analysis Setup” (Configuração de análise) e altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) de **GNTGNTGTTGGGAAAAGC** para **NGTNGTGTGGGAAAAGC**. Clique em “Apply” (Aplicar) e, em seguida, clique em “To All” (Para todos), quando aparecer a janela “Apply Analysis Setup” (Aplicar a configuração de análise).

Para reanalisar e planear mutações no nucleótido 181, aceda a “Analysis Setup” (Configuração de análise) e altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) de **CNAGAAGAGTA** para **VAAGAAGAGTA**.

Para reanalisar e detectar as mutações no nucleótido 183, altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) para **CANGAAGAGTA**. Clique em “Apply” (Aplicar) e, em seguida, clique em “To All” (Para todos), quando aparecer a janela “Apply Analysis Setup” (Aplicar a configuração de análise).

Nota: Depois de alterar a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar), certifique-se de que o limiar da altura dos picos individuais está definido para 30 RLU. Além disso, certifique-se de que o factor de redução do pico A está definido para 0,86 para a análise do códon 61 do NRAS.

Nota: No caso dos picos medidos não corresponderem às alturas das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras ou inesperadas, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.

Interpretação de resultados

Interpretação de resultados da análise e detecção de mutações de baixo nível

Recomenda-se vivamente a inclusão do ADN de controlo não metilado em todas as execuções, para efeitos de comparação e como controlo de níveis de referência. A frequência medida da amostra de controlo deverá ser igual ou menor que o limite em branco (LOB).

Todas as amostras deverão ser examinadas em relação ao limite de detecção (LOD, ver Quadro 8) e interpretadas conforme se segue.

- Frequência de mutação $< \text{LOD}$: Wild type
- Frequência de mutação $\geq \text{LOD}$ e $\leq \text{LOD} + 3$ unidades de %: Nível de mutação potencialmente baixo
- Frequência de mutação $> \text{LOD} + 3$ unidades de %: Mutação

As amostras com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo deverão ser consideradas positivas quanto à mutação, se confirmadas por nova execução em duplicado, juntamente com uma amostra com ADN de controlo não metilado. O resultado de ambos os duplicados deverá ser $\geq \text{LOD}$ e diferente da amostra de controlo. Caso contrário, a amostra deverá ser considerada wild type.

Uma frequência medida acima do LOB na amostra de controlo indica um nível de fundo maior que o habitual na respectiva execução, que poderá ter impacto na quantificação dos alelos, especialmente para níveis de mutação baixos. Neste caso, as frequências medidas no intervalo de LOD (Quadro 8) até $\text{LOD} + 3$ unidades de % não são uma base para uma decisão do estado de mutação. Recomenda-se que as amostras com um nível de mutação potencialmente baixo sejam novamente executadas.

Nota: Uma decisão de tratamento de doentes com cancro não se deve basear unicamente no estado de mutação do NRAS.

Quadro 8. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição de ácido nucleico	Substituição de amino-ácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V47)
Código 12 (GGT)				
AGT	G12S	1,4	3,4	563
TGT	G12C	0,6	2,5	562
CGT	G12R	0,4	2,4	561
GAT	G12D	1,8	3,8	564
GTT	G12V	3,8	8,8	566
GCT	G12A	0,5	2,5	565
Código 13 (GGT)				
AGT	G13S	1,2	3,2	571
TGT	G13C	1,2	3,2 (4) [†]	570
CGT	G13R	0,3	2,3	569
GAT	G13D	0,8	2,8	573
GTT	G13V	0,0	2,0 (5) [†]	574
GCT	G13A	0,8	2,8	575
Código 61 (CAA)				
AAA	Q61K	4,1	6,7	580
CGA	Q61R	0,8	2,2	584
CTA	Q61L	0,7	2,1	583
CAT	Q61H	0,4	1,8	585
CAC	Q61H	5,4	8,0	586
CAG	Q61Q	2,1	5,8	587

* Do Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro, disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Nível mais baixo de mutação numa amostra que resulta numa frequência medida \geq LOD.

Resultados representativos

Os resultados representativos do pirograma estão apresentados nas imagens 5 a 7.

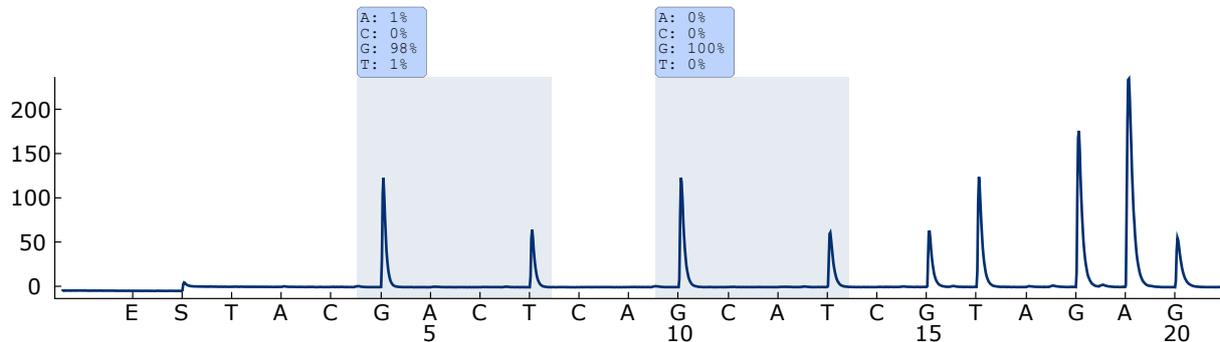


Imagem 5. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com um genótipo wild type no códão 12–13.

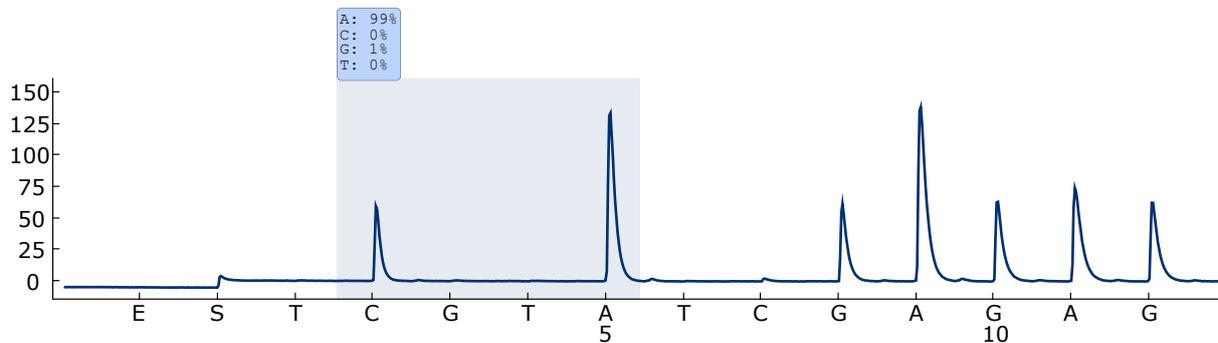


Imagem 6. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com um genótipo wild type nos códãos 61.

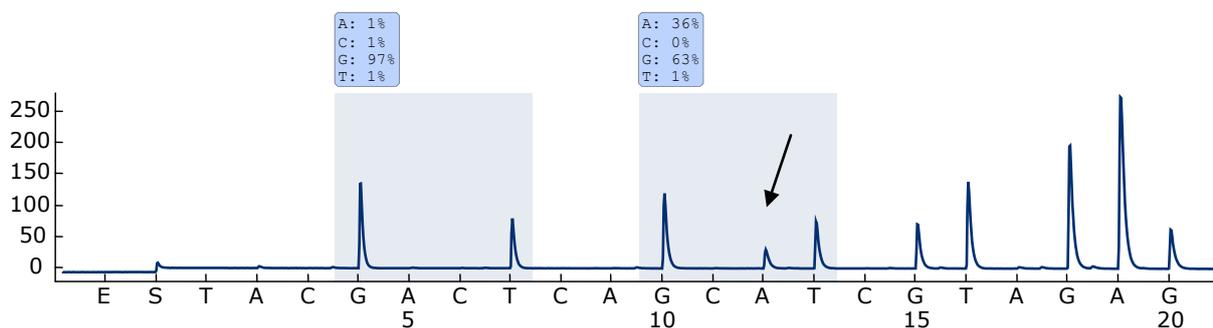


Imagem 7. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com uma mutação GGT → GAT na base 2 do códão 13 (nucleótido 38, indicado com uma seta) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) GNTGNTGTTGGGAAAAGC.

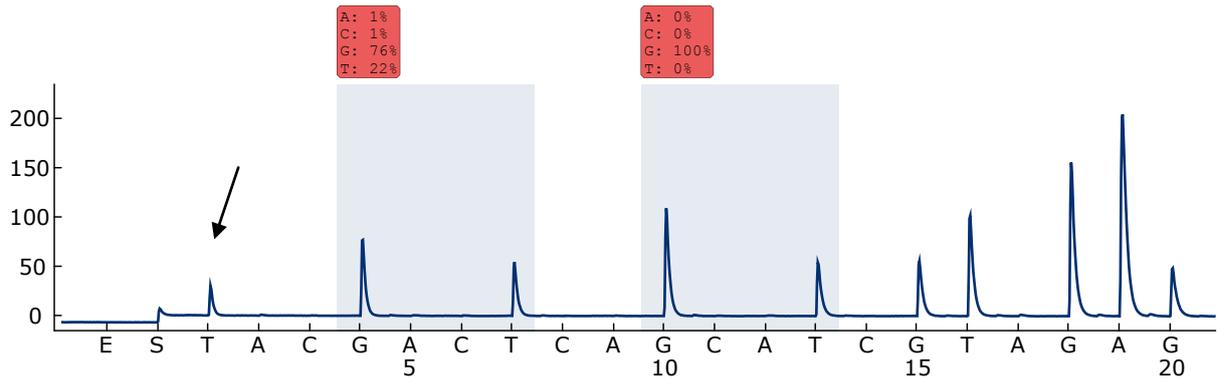


Imagem 8. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com uma mutação GGT → AGT na base 1 do códon 12 (nucleótido 34, indicado com uma seta) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) GNTGNTGTTGGGAAAAGC que visa a base 2 no códon 12 (nucleótido 35). O vermelho indica que esta sequência é inesperada e deve ser verificada.

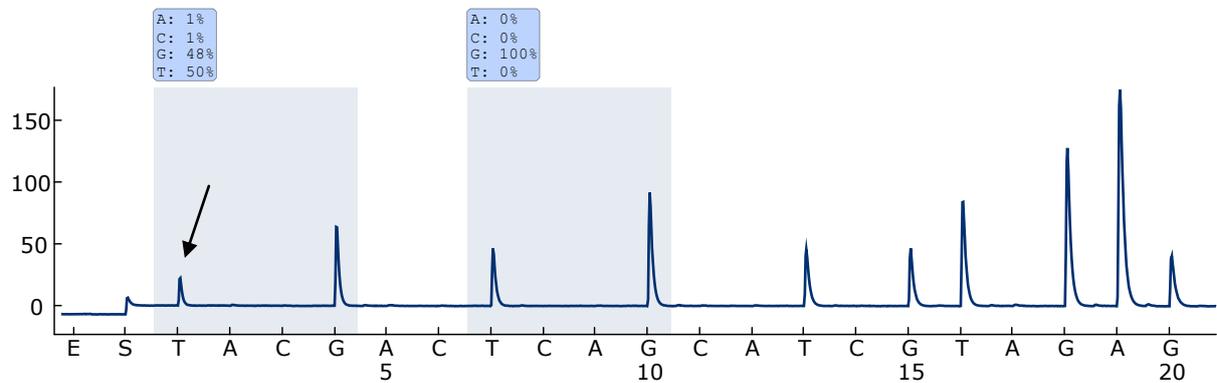


Imagem 9. Curva de pirograma obtida após a reanálise da amostra na Figura 8. A mutação GGT → TGT foi reanalisada com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) NGTNGTGTGGGAAAAGC, que visa a base 1 no códon 12 (nucleótido 34).

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Nota: Consulte o *Manual de Utilizador do PyroMark Q24* para resolução de problemas gerais do equipamento.

Comentários e sugestões

Sinais no controlo sem modelo (controlo negativo)

- | | |
|------------------------------|--|
| a) Interferência entre poços | O sinal de um poço é detectado num poço vizinho. Evite colocar as amostras com intensidades de sinal altas junto a poços de controlos sem modelo. |
| b) Contaminação de PCR | Utilize pontas de pipeta esterilizadas com filtros. Armazene e extraia os materiais, como amostras, controlos e amplicons, separadamente dos reagentes de PCR. |

Sequência pobre ou inesperada

- | | |
|------------------------------------|--|
| a) ADN genómico de baixa qualidade | ADN genómico de baixa qualidade pode causar a falha da PCR. Analise as amostras de PCR utilizando uma técnica de electroforese (por exemplo, o sistema QIAxcel [®] ou a electroforese em gel de agarose). |
|------------------------------------|--|

Comentários e sugestões

Resultado “Check” (verificado) ou “failed” (falhado)

- a) Altura de pico baixa
- Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR ou na preparação de amostras antes da piro-sequenciação podem resultar em picos baixos. Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no *PyroMark Q24 User Manual* (Manual do Utilizador do PyroMark Q24) e substitua as sondas de filtro quando for indicado.
- Em caso de um aviso “Check”, compare cuidadosamente o pirograma ao histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Se os picos medidos corresponderem às alturas das barras do histograma, o resultado é válido. Caso contrário, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.
- b) Mutação não definida em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar)
- Ajuste a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) na configuração do ensaio (consultar o Anexo A, na página 50) e reanalise a execução.
- c) Mutação rara inesperada
- Uma avaliação de qualidade “Check” (Verificada) ou “Failed” (Falhada) pode ser causada por um padrão inesperado de picos. Isto poderá indicar uma mutação inesperada, que não é analisada pela “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) fornecida. Estas amostras devem ser analisadas com as “Sequences to Analyze” (Sequências a analisar) alternativas, tendo em conta mutações inesperadas.
- d) Aviso de desvio da altura de pico alta durante uma distribuição
- O pirograma deverá ser sempre comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Em caso dos picos medidos não corresponderem às alturas das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.

Comentários e sugestões

Plano de fundo alto

- | | |
|--|---|
| a) Armazenamento incorrecto de nucleótidos | Armazene os nucleótidos entre 2 e 8 °C. O armazenamento entre -15 e -25 °C pode provocar um aumento no plano de fundo. |
| b) Pouco tempo de arrefecimento das amostras antes da análise de piro-sequenciação | Mantenha as amostras num suporte de placa PyroMark Q24 à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Não reduza o tempo de arrefecimento. |
| c) Contaminação do cartucho | Limpe cuidadosamente o cartucho conforme descrito no folheto do produto. Guarde o cartucho protegido da luz e da poeira. |

Sem sinais no controlo positivo (ADN de controlo não metilado)

- | | |
|--|---|
| a) Enzima insuficiente ou mistura de substrato para todos os poços | Certifique-se de que enche o cartucho PyroMark Q24 de acordo com as "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas). |
| b) Reagentes armazenados ou diluídos incorrectamente | Prepare os reagentes <i>therascreen</i> de acordo com as instruções no "Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24", página 29. |
| c) Falha da PCR ou da preparação da amostra | Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR, na programação do ciclador de PCR ou na preparação de amostras antes da piro-sequenciação podem resultar em falta de sinais. Efectue o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no <i>PyroMark Q24 User Manual</i> (Manual de Utilizador do PyroMark Q24) e substitua as sondas de filtro quando necessário. Repita a PCR e a análise de piro-sequenciação. |

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão de Qualidade Total certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do kit *therascreen* NRAS Pyro são testados quanto às especificações predeterminadas, a fim de garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outras descobertas clínicas ou laboratoriais.

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam cobertos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Características de desempenho

Limite em branco e limite de detecção

O limite em branco (LOB) e o limite de detecção (LOD) foram determinados para um número de mutações, usando misturas de plasmídeos (quadro 9). O LOB e o LOD foram determinados de acordo com as recomendações da directriz EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os erros α e β (falso positivo e falso negativo, respectivamente) foram definidos em 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 observado como positivo para a respectiva mutação.

As mutações GGT → TGT e GGT → GTT no códon 13.

Para estas mutações, as medições em branco eram principalmente de 0 unidades de %, resultando numa distribuição não-Gaussiana. Consequentemente, o LOD foi determinado com um método diferente, de acordo com as recomendações da directriz EP17A do CLSI. O sinal mais baixo que indica a presença de uma mutação (LOD) nestas posições foi definido para unidades de 2 % acima do respectivo nível da linha de base, como definido pelo 95º percentil de medições em branco. Durante a análise de uma amostra com um nível de mutação indicado entre parêntesis no quadro 9, 95% dos resultados ($n = 72$) emitiram um sinal que pode ser considerado positivo (\geq LOD).

Quadro 9. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição de ácido nucleico	Substituição de amino-ácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V47)
Código 12 (GGT)				
AGT	G12S	1,4	3,4	563
TGT	G12C	0,6	2,5	562
CGT	G12R	0,4	2,4	561
GAT	G12D	1,8	3,8	564
GTT	G12V	3,8	8,8	566
GCT	G12A	0,5	2,5	565
Código 13 (GGT)				
AGT	G13S	1,2	3,2	571
TGT	G13C	1,2	3,2 (4) [†]	570
CGT	G13R	0,3	2,3	569
GAT	G13D	0,8	2,8	573
GTT	G13V	0,0	2,0 (5) [†]	574
GCT	G13A	0,8	2,8	575
Código 61 (CAA)				
AAA	Q61K	4,1	6,7	580
CGA	Q61R	0,8	2,2	584
CTA	Q61L	0,7	2,1	583
CAT	Q61H	0,4	1,8	585
CAC	Q61H	5,4	8,0	586
CAG	Q61Q	2,1	5,8	587

* Do Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro, disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Nível mais baixo de mutação numa amostra que resulta numa frequência medida \geq LOD.

Nota: Estes valores basearam-se em execuções em que misturas de plasmídeos que exibiam a sequência wild type ou a respectiva sequência mutada foram utilizadas como modelo da amplificação de PCR.

Recomenda-se que o desempenho do método seja confirmado no laboratório.

Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando misturas de plasmídeos que exibiam a sequência wild type ou mutante para as mutações GGT>GAT nos códons 12 e 13 e a mutação CAA>CGA no códon 61. Os plasmídeos foram misturados em proporções de modo a serem obtidos 4 níveis de mutação (5, 10, 30 e 50%). Cada mistura foi analisada com 3 lotes diferentes do kit *therascreen* NRAS Pyro, em 3 execuções de piro-sequenciação, com 3 exemplares cada.

Os resultados (n=9 para cada nível de mutação) foram analisados de acordo com a directriz EP6-A do CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Avaliação da linearidade dos procedimentos de medições quantitativas: uma abordagem estatística; directriz aprovada) utilizando o software Analyse-it® v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) e estão indicados na Imagem 10 para a mutação GGT>GAT no códon 12.

Os resultados foram lineares dentro de uma não linearidade permitida de 5 unidades de % no intervalo testado de 5 a 50% de nível de mutação.

Obtiveram-se resultados semelhantes para as mutações GGT>GAT no códon 13 e CAA>CGA no códon 61.

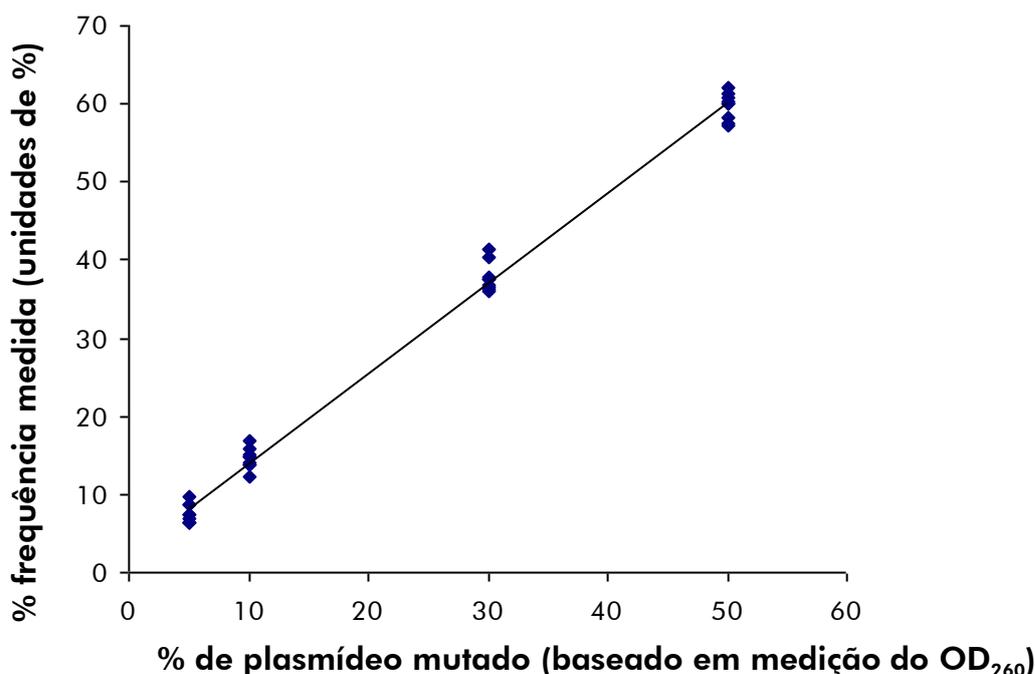


Imagem 10. Linearidade da mutação GGT → GAT no códon 12.

Precisão

Os dados da precisão permitem a determinação da variação total dos ensaios e foram obtidos a 3 diferentes níveis por análise das misturas de plasmídeos mencionadas acima, com 3 exemplares cada.

A repetitividade (variação intra-ensaio e inter-lotes) foi calculada com base nos dados para a determinação da linearidade (3 execuções no mesmo dia, utilizando variados lotes do kit *therascreen* NRAS Pyro). A precisão intermédia (variação intra-laboratorial) foi determinada em 3 execuções, em 1 laboratório, em 3 dias diferentes, com vários operadores, equipamentos PyroMark Q24 e lotes do kit *therascreen* NRAS Pyro. A reprodutibilidade (variação inter-laboratorial) foi calculada com 2 execuções, cada uma em um laboratório interno e um laboratório externo, e utilizando variados lotes do kit *therascreen* NRAS Pyro.

Os cálculos de precisão são expressos como desvio padrão das frequências de mutação medidas em unidades de % (Quadro 10). A repetitividade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade da mutação GGT>GAT no códon 12 foram de, respectivamente, 1,2 a 1,9, 1,0 a 2,0 e 1,3 a 3,1 unidades de %, no intervalo medido de 5 a 50% de nível de mutação. Obtiveram-se resultados semelhantes para as mutações GGT>GAT no códon 13 e CAA>CGA no códon 61.

Quadro 10. Precisão da mutação GGT>GAT no códon 12*

% de plasmídeo mutado [†]	Repetitividade		Precisão intermédia		Reprodutibilidade	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
5	7,5	1,2	7,3	1,0	6,7	1,3
10	14,6	1,3	13,5	1,1	13,7	1,3
30	37,8	1,9	37,9	1,5	36,1	2,9
50	59,8	1,7	60,4	2,0	57,5	3,1

* Todos os valores são dados em unidades de %.

[†] Baseado em medição do OD₂₆₀, DP: desvio padrão (n=9 para reprodutibilidade e precisão intermédia, n=12 para reprodutibilidade).

Avaliação de diagnóstico

O kit *therascreen* NRAS Pyro foi avaliado em comparação com a sequenciação Sanger. Foi extraído o ADN de 100 amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE) de tumor de medula óssea e analisado quanto a mutações nos códon 12/13 e códon 61.

O ADN foi isolado utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Foi realizada a análise de piro-sequenciação com o kit *therascreen* NRAS Pyro no PyroMark Q24 e a sequenciação Sanger no ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Das 100 amostras analisadas por sequenciação Sanger, foi possível determinar o estado de mutação em 97 amostras, tanto para os códãos 12/13 como para o códão 61. Com o kit *therascreen* NRAS Pyro foi possível determinar o estado de mutação em 97 e 98 amostras respectivamente para os códãos 12/13 e o códão 61.

Em 4 das 100 amostras, foi detectada uma mutação no códão 12 ou códão 13 por sequenciação Sanger. Em 2 destas amostras, foi possível reproduzir o estado de mutação com o kit *therascreen* NRAS Pyro, enquanto que para as outras 2 amostras não foi verificada qualquer mutação. Os resultados encontram-se ilustrados nos Quadros 11 e 12. Não foram detectadas quaisquer mutações no códão 61.

Excluindo as amostras que falharam em um ou em ambos os métodos, o kit *therascreen* NRAS Pyro e a sequenciação Sanger mostraram uma concordância de 98% e 100% nos resultados, respectivamente para os códãos 12/13 e o códão 61 (Quadros 11 e 12).

Quadro 11. Resultados das amostras de tumor da pele analisadas para os códãos 12/13

		Sequenciação Sanger			Total
		Mutante	Wild type	Des-conhecido	
Kit therascreen NRAS Pyro	Mutante	2	0	0	2
	Wild type	2	90	3	95
	Desconhecido	0	3	0	3
	Total	4	93	3	100

Quadro 12. Resultados das amostras de medula óssea analisadas para o códão 61

		Sequenciação Sanger			Total
		Mutante	Wild type	Des-conhecido	
Kit therascreen NRAS Pyro	Mutante	0	0	0	0
	Wild type	0	95	3	98
	Desconhecido	0	2	0	2
	Total	0	97	3	100

Nota: Estes valores foram baseados nas execuções em que o sinal era superior a 30 RLU, obtidos repetidamente de 10 ng de ADN isolado de tecido fixado em formalina e envolvido em parafina.

Bibliografia

A QIAGEN mantém uma vasta base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem-lhe localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa da bibliografia, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Símbolos

 <N>	Contém reagentes suficientes para <N> testes
	Prazo de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Ref. ^a
	Número de lote
	Número do material
	Componentes
	Conteúdo
	Número
	Hidróxido de sódio
	Número do item de comércio mundial
	Limitação de temperatura
	Fabricante
	Consultar instruções de utilização

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support ou contacte um dos

Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN
(consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* NRAS Pyro

Antes de executar o ensaio *therascreen* NRAS Pyro pela primeira vez, é necessário configurar o ficheiro do ensaio. Configure o ensaio dos códigos 12/13 e código 61 de NRAS através do software PyroMark Q24, como descrito a seguir.

Procedimento

Códãos 12 e 13 de NRAS

A1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione “New AQ Assay” (Novo ensaio AQ).

A2. Digite a sequência seguinte em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar).

GNTGNTGTTGGGAAAAGC

As mutações mais frequentes nos códigos 12 e 13 serão detectadas no nucleótido 35 e 38 (segunda posição) utilizando esta “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar).

A “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) pode ser alterada após a execução para analisar as mutações nas diferentes posições.

Para verificar se as mutações estão presentes no nucleótido 34 ou 37 (primeira posição), altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) para a seguinte sequência:

NGTNGTGTTGGGAAAAGC

Nota: Certifique-se de que o limiar da altura de picos únicos está definido em 30 RLU.

A3. Introduza manualmente o “Dispensation Order” (Pedido de distribuição) seguinte:

TACGACTCAGCATCGTAGAG

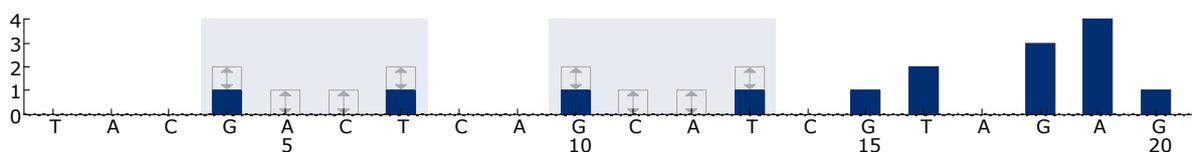


Imagem 11. Histograma de códigos 12 (nucleótido 35) e 13 (nucleótido 38) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) **GNTGNTGTTGGGAAAAGC**.

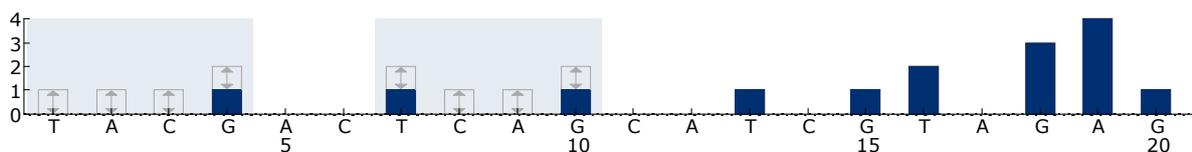


Imagem 12. Histograma de códãos 12 (nucleótido 34) e 13 (nucleótido 37) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) *NGTNGTGTTGGGAAAAGC*.

A4. Clique no separador “Analysis Parameters” (Parâmetros de análise) e aumente “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.

A5. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como “NRAScodons 12+13” (Códãos 12+13 de NRAS).

Códão 61 de NRAS

A1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione “New AQ Assay” (Novo ensaio AQ).

A2. Digite a sequência seguinte em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar).

CNAGAAGAGTA

A mutação mais frequente no códão 61 serão detectadas no nucleótido 182 (segunda posição) utilizando esta “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar).

A “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) pode ser alterada após a execução para analisar as mutações nas diferentes posições.

Para verificar se as mutações estão presentes no nucleótido 181 (primeira posição), altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) para a seguinte sequência:

VAAGAAGAGTA

Para verificar se as mutações estão presentes no nucleótido 183 (terceira posição), altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) para a seguinte sequência:

CANGAAGAGTA

Nota: Certifique-se de que o limiar da altura de picos únicos está definido em 30 RLU. Além disso, certifique-se de que o factor de redução do pico A está definido para 0,86 para a análise do códão 61 do NRAS.

A3. Adicione manualmente o “Dispensation Order” (Pedido de distribuição) seguinte.

TCGTATCGAGAG

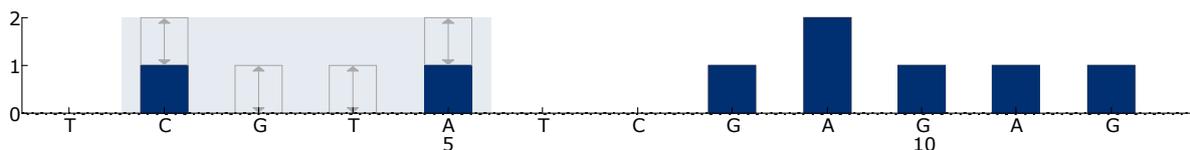


Imagem 13. Histograma do código 61 (nucleótido 182) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CNAGAAGAGTA.

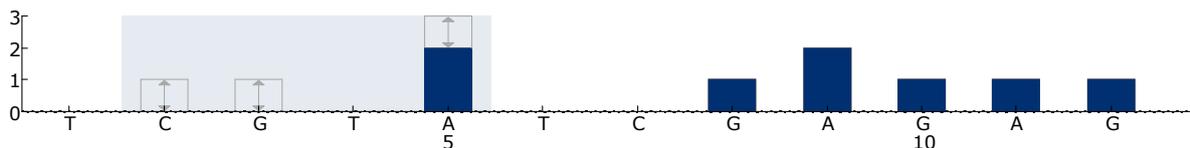


Imagem 14. Histograma do código 61 (nucleótido 181) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) VAAGAAGAGTA.

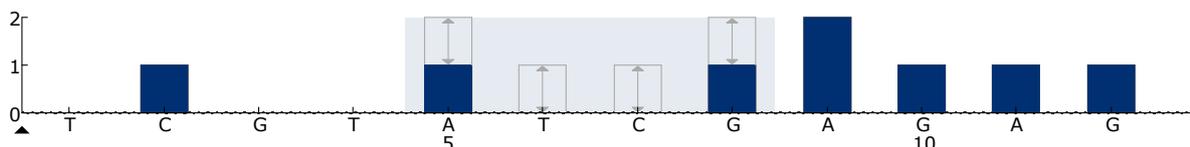


Imagem 15. Histograma do código 61 (nucleótido 183) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CANGAAGAGTA.

- A4. Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.**
- A5. Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e diminua o "A-peak reduction factor" (factor de redução do pico A): para 0,86.**
- A6. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como "NRAScodon 61" (Código 61 de NRAS).**

Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos

AVISO 	Químicos perigosos <p>A solução de desnaturação utilizada com a estação de trabalho de vácuo contém hidróxido de sódio, que irrita os olhos e a pele.</p> <p>Usar sempre óculos de segurança, luvas e uma bata de laboratório adequada.</p> <p>A entidade responsável (por ex., gestor de laboratório) tem de tomar as precauções necessárias para assegurar que o local de trabalho circundante está em segurança e que os operadores do equipamento não estão expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas e biológicas), como definido nas fichas de material de segurança (SDS's) aplicáveis ou nos documentos OSHA,* ACGIH,[†] ou COSHH[‡].</p> <p>A ventilação de gases e eliminação de desperdícios tem de estar em conformidade com todos os regulamentos e legislações nacionais, distritais e locais em matéria de saúde e de segurança.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Estados Unidos da América)

[†] ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Estados Unidos da América)

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

Certifique-se de que observa os regulamentos ambientais federais, distritais e locais relativamente à eliminação de desperdícios laboratoriais.

Aspecto importante antes do início do procedimento

- Este protocolo requer água de grande pureza.

Procedimento

B1. Assegure-se de que não há vácuo aplicado na ferramenta de vácuo. Certifique-se de que o vácuo está fechado (Off) e que a bomba de vácuo está desligada.

B2. Elimine quaisquer soluções que tenham ficado nos depósitos.

B3. Lave os depósitos com água de grande pureza ou substitua-os, se necessário.

B4. Esvazie o recipiente de desperdícios.

A tampa pode ser retirada sem retirar a tubagem.

B5. Se a estação de trabalho de vácuo tiver de ser limpa (por exemplo, devido a poeiras ou derramamentos), siga as instruções presentes no *PyroMark Q24 User Manual*.

Informações para encomendar

Produto	Índice	Ref. ^g
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	Para 24 reacções nos sistemas PyroMark Q24: Iniciadores de Seq, iniciadores de PCR, ADN de controlo não metilado, mistura principal de PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampão de ligação PyroMark, tampão de "annealing" PyroMark, solução de desnaturação PyroMark, tampão de lavagem PyroMark, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP, e H ₂ O	971530
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detecção baseada na sequência para a piro-sequenciação de 24 amostras em simultâneo	9001513
PyroMark Q24	Plataforma de detecção baseada na sequência para a piro-sequenciação de 24 amostras em simultâneo	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para preparar 24 amostras em simultâneo, desde o produto de PCR até ao modelo de cadeia simples	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para preparar 24 amostras em simultâneo, desde o produto de PCR até ao modelo de cadeia simples	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicação	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de análise	9019062
Acessórios		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacção de sequenciação de 24 poços	979301

* Apenas no Reino Unido.

† Restantes países.

Produto	Índice	Ref.ª
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para distribuir nucleótidos e reagentes	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas de filtro reutilizáveis para a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para a verificação da instalação do sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para a confirmação do desempenho do sistema	979304
Produtos relacionados		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas, Proteinase K, soluções tampão, tubos de recolha (2 ml) QIAamp MinElute®	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparações: Cartuchos de reagentes (tecido), pontas com filtros descartáveis, suportes de pontas descartáveis, tubos de amostra (2 ml), tubos de eluição (1,5 ml), tampão G2, Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: Colunas de rotação, soluções tampão, reagentes, tubos, conectores de vácuo mini do QIAamp	61104

Para informações actuais sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

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

Contrato de Licença Limitada

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *therascreen* NRAS Pyro dos seguintes termos:

1. O kit *therascreen* NRAS Pyro pode ser usado unicamente de acordo com o *Manual do kit therascreen NRAS Pyro* e apenas para a utilização com os componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito em contrário no *Manual do kit therascreen NRAS Pyro* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ 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 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

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 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

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

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

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

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

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

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)

