

Manuale del kit *therascreen*[®] UGT1A1 Pyro[®]



Versione 1



Per uso diagnostico in vitro



971540



1061270IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3

MAT

1061270IT



Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

- nella purificazione di DNA, RNA e proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca su microRNA e RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Contenuto

Uso previsto	5
Riassunto e spiegazione	5
Principio della procedura	6
Controlli	7
Materiale fornito	8
Contenuto del kit	8
Materiale necessario ma non fornito	10
Miscelatori per piastre raccomandati	11
Avvertenze e precauzioni	11
Informazioni per la sicurezza	11
Precauzioni generali	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	13
Conservazione e manipolazione dei campioni	13
Procedura	14
Isolamento del DNA	14
Protocolli	
■ 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24	15
■ 2: analisi PCR con i reagenti inclusi nel kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	17
■ 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance	20
■ 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24	22
■ 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24	26
■ 6: analisi di un processo PyroMark Q24	29
Interpretazione dei risultati	30
Guida alla risoluzione dei problemi	32
Controllo di qualità	35
Limitazioni	36
Caratteristiche prestazionali	36
Precisione	36
Valutazione diagnostica	37

Riferimenti bibliografici	39
Simboli	40
Indirizzi utili	40
Appendice A: configurazione dei dosaggi <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	41
Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti	43
Informazioni per gli ordini	45

Uso previsto

Il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro è un test in vitro destinato alla rilevazione della sequenza dell'acido nucleico, basato sulla tecnologia Pyrosequencing® per la genotipizzazione delle varianti alleliche *28 e *6 nel gene UGT1A1 umano in DNA genomico ottenuto da campioni di tessuto umano.

L'uso del kit *therascreen* UGT1A1 Pyro fornisce ai medici informazioni utili per la selezione dei pazienti che presentano maggiori rischi di riduzione dell'attività della UDP-glucuronosiltransferasi. Per uso diagnostico in vitro.

Da utilizzarsi esclusivamente con il sistema PyroMark® Q24. I sistemi PyroMark Q24 comprendono:

- Gli strumenti PyroMark Q24 e PyroMark Q24 MDx.
- Le stazioni di lavoro del vuoto PyroMark Q24 e PyroMark Q24 MDx.
- Il software PyroMark Q24 (versione 2.0) e il software PyroMark Q24 MDx (versione 2.0).

Il prodotto è destinato ad utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle procedure diagnostiche in vitro e nell'uso delle tecniche di biologia molecolare e del sistema PyroMark Q24.

Riassunto e spiegazione

Il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro viene utilizzato per la genotipizzazione della variante allelica *28 (distinzione tra ripetizioni 6 e 7 TA) e della variante allelica *6 (distinzione tra genotipo G e A) del gene UGT1A1 umano. Il kit è costituito da due dosaggi: uno per la genotipizzazione della variante allelica *28 e uno per la genotipizzazione della variante allelica *6 (Figura 1). Le due regioni vengono amplificate separatamente tramite PCR e sequenziate lungo tutta la regione definita. Le sequenze attorno alle posizioni definite servono da picchi di riferimento e di normalizzazione per la genotipizzazione e la valutazione della qualità dell'analisi.

La variante allelica *28 viene sequenziata nella direzione inversa, mentre la variante allelica *6 viene sequenziata nella direzione in avanti.

Il prodotto è costituito da una miscela di primer per PCR e da un primer di sequenziamento per ogni dosaggio. I primer vengono forniti in soluzione. Ogni fiala contiene 24 µl di ogni primer o miscela di primer.

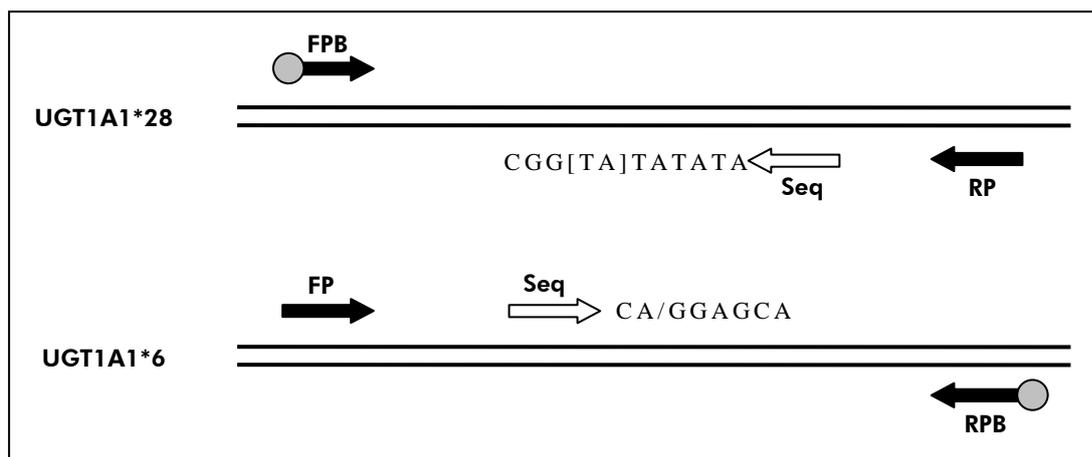


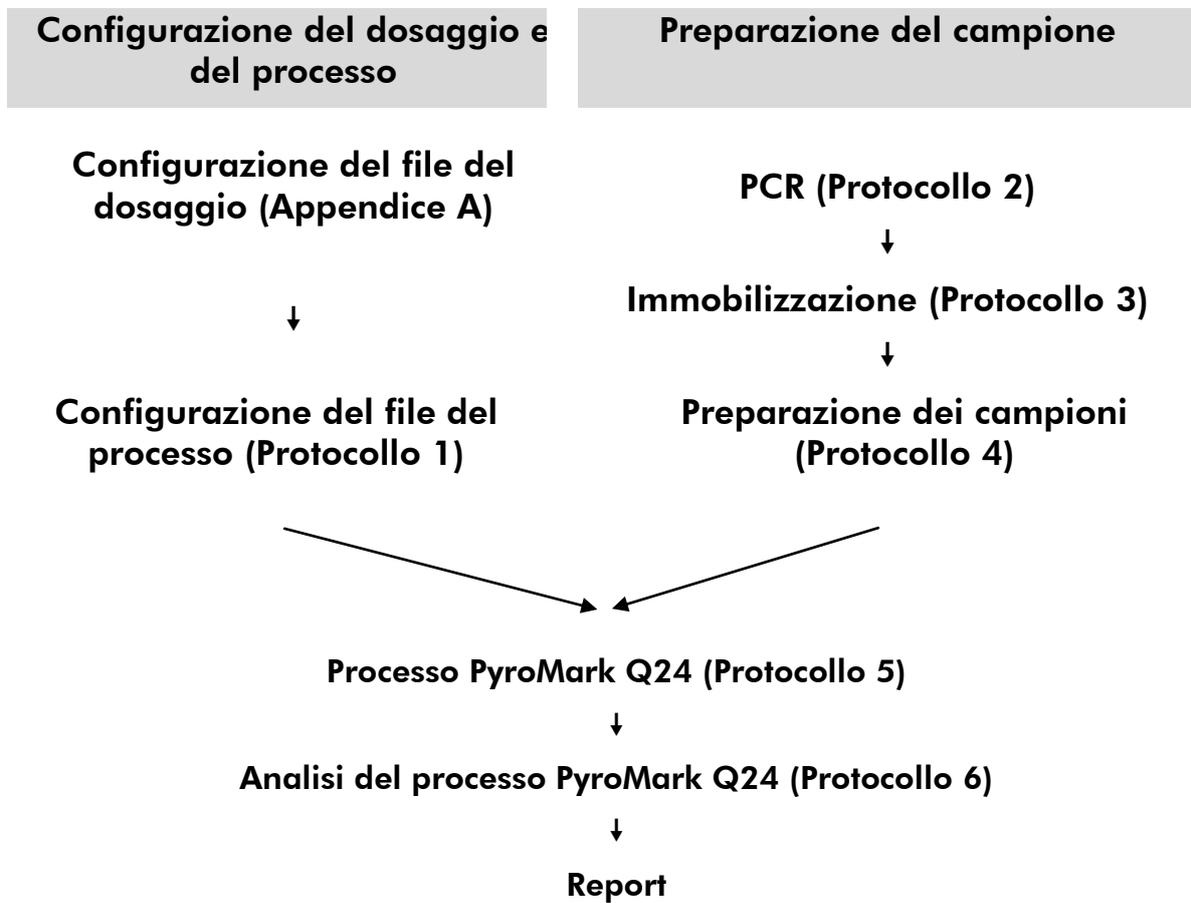
Figura 1. Illustrazione dei dosaggi *therascreen* UGT1A1 È riportata la sequenza analizzata con nucleotidi polimorfici indicati da parentesi quadrate o barre. Le ripetizioni TA analizzate con il dosaggio UGT1A1 *28 sono coperte in parte dal primer di sequenziamento. **FP, FPB**: Forward PCR Primer, primer diretto per PCR (B indica biotinilazione); **RP, RPB**: Reverse PCR Primer, primer inverso per PCR (B indica biotinilazione); **Seq**: Primer di sequenziamento.

Principio della procedura

Il flusso di lavoro a pagina 7 illustra la procedura del dosaggio. Dopo l'analisi PCR con primer che hanno come target le varianti alleliche *28 e *6, gli ampliconi vengono immobilizzati su grani di streptavidina (Streptavidin Sepharose® High Performance). Viene preparato DNA a filamento singolo e i primer di sequenziamento si riassociano al DNA (annealing). A questo punto i campioni vengono analizzati sul sistema PyroMark Q24 utilizzando un file di configurazione del dosaggio e un file del processo.

Nota: il flusso di lavoro è stato leggermente modificato rispetto a quello descritto nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual* (vedere "Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24", pagina 22).

Flusso di lavoro della procedura *therascreen* UGT1A1 Pyro



Controlli

Il DNA di controllo umano è incluso nel kit come controllo positivo per la PCR e le reazioni di sequenziamento. Il DNA di controllo ha un genotipo TA6/TA6 e G/G omozigote quando viene analizzato rispettivamente per le varianti alleliche *28 e *6.

È necessario includere un controllo negativo (senza DNA template) in ogni allestimento PCR con almeno un dosaggio.

Materiale fornito

Contenuto del kit

Kit *therascreen* UGT1A1 Pyro (scatola 1/2)

Kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	(24)
N° di catalogo	971540
N° di reazioni	24
Miscela di primer per PCR UGT1A1 *28	24 μ l
Miscela di primer per PCR UGT1A1 *6	24 μ l
Primer di sequenziamento UGT1A1 *28	24 μ l
Primer di sequenziamento UGT1A1 *6	24 μ l
Master Mix per PCR PyroMark, 2x	850 μ l
Concentrato CoralLoad®, 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
DNA di controllo umano, 2 ng/ μ l	100 μ l

Tamponi e reagenti *therascreen* (scatola 2/2)

Tamponi e reagenti <i>therascreen</i>		
Tampone di legame PyroMark		10 ml
Tampone di annealing PyroMark		10 ml
Soluzione di denaturazione PyroMark*		250 ml
Tampone di lavaggio PyroMark, 10x		25 ml
Miscela enzimatica		1 fiala
Miscela di substrato		1 fiala
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Manuale		1

* Contiene idrossido di sodio.

Materiale necessario ma non fornito

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

- Kit di isolamento del DNA (vedere "Isolamento del DNA", pagina 14)
- Pipette (regolabili)*
- Puntali per pipette sterili (con filtri per l'allestimento PCR)
- Microcentrifuga da tavolo*
- Termociclatore* e provette per PCR idonee
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n° di catalogo 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (n° di catalogo 9001514 o 9001513)*†
- Software PyroMark Q24 (n° di catalogo 9019062 o 9019063)†
- Piastra PyroMark Q24 (n° di catalogo 979301)†
- Cartuccia PyroMark Q24 (n° di catalogo 979302)†
- Stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 (n° di catalogo 9001515 o 9001517)*†
- Miscelatore per piastre* per immobilizzazione su grani (vedere "Miscelatori per piastre raccomandati", pagina 11)
- Blocco riscaldante* in grado di raggiungere 80°C
- Piastra per PCR a 24 pozzetti o strisce
- Tappi per strisce
- Acqua altamente depurata (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)
Nota: il prodotto contiene una quantità di acqua sufficiente per la PCR, l'immobilizzazione del DNA e il dissolvimento delle miscele enzimatica e di substrato; è necessario reperire altra acqua altamente depurata per la diluizione del tampone di lavaggio PyroMark 10x.
- Etanolo (70%)‡

*Assicurarsi che tutti gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

† Con marchio CE-IVD, in conformità alla Direttiva UE 98/79/CE. Tutti gli altri prodotti citati non hanno il marchio CE-IVD in base alla Direttiva UE 98/79/CE.

‡ Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

Miscelatori per piastre raccomandati

Con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro è consigliabile utilizzare i miscelatori per piastre elencati nella Tabella 1.

Tabella 1. Miscelatori per piastre raccomandati per l'uso con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro

Produttore	Prodotto	Numero di catalogo
Eppendorf	Termomiscelatore comfort (strumento base)	5355 000.011
	Termoblocco per piastre di microtitolazione	5363 000.012
	Piastra adattatore per provette PCR 96 x 0,2 ml, da inserire nel blocco intercambiabile per piastre di microtitolazione	5363 007.009
H+P Labortechnik Gmbh	Agitatore magnetico Variomag® Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Agitatore magnetico Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Informazioni per la sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare le schede SDS per ognuno dei kit e dei componenti dei kit QIAGEN®.

Le seguenti frasi precauzionali e di rischio sono valide per i componenti del kit *therascreen* UGT1A1 Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Attenzione! Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può essere corrosivo per i metalli. Assorbire la fuoriuscita per evitare danni materiali. Conservare soltanto nel contenitore originale. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

PyroMark Enzyme Mixture



Contiene: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Pericolo! Provoca irritazione cutanea. Provoca gravi lesioni oculari. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. In caso di esposizione o possibile esposizione: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un dottore/medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

PyroMark Substrate Mixture



Contiene: acetic acid. Attenzione! Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

Precauzioni generali

L'utente deve prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni.

- Per ottenere risultati ottimali, è necessario osservare scrupolosamente le istruzioni fornite nel manuale utente. La diluizione dei reagenti, salvo con le modalità descritte in questo manuale, è sconsigliata in quanto potrebbe determinare un decadimento delle prestazioni.
- Il flusso di lavoro è stato leggermente modificato rispetto a quello descritto nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual* (vedere "Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24", pagina 22).
- I componenti di questo prodotto sono sufficienti per analizzare 24 reazioni in un massimo di 5 processi indipendenti.
- Utilizzare puntali per pipette sterili (con filtri per PCR).
- Conservare ed estrarre il materiale positivo (campioni, controlli positivi e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungere questi componenti alla miscela di reazione in un'area del laboratorio separata fisicamente.
- Scongela completamente tutti i componenti a temperatura ambiente (15-25°C) prima di iniziare un test.
- Dopo lo scongelamento, miscelare i componenti (pipettando più volte su e giù o agitando in vortex ad impulsi) e centrifugare brevemente.

- I risultati errati non possono essere utilizzati come base per una valutazione del genotipo.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro viene consegnato in due scatole. Il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro (scatola 1/2) viene spedito in ghiaccio secco. Subito dopo la consegna, conservare la soluzione Master Mix per PCR PyroMark, il concentrato CoralLoad, il DNA di controllo e tutti i primer a una temperatura compresa tra -30 e -15°C.

Il contenuto della scatola 2/2 dei tamponi e dei reagenti Pyro (tamponi, miscela enzimatica, miscela di substrato, dATP α S, dCTP, dGTP e dTTP, in altre parole i reagenti per l'analisi di pirosequenziamento), viene spedito in confezioni refrigerate. Conservare questi componenti a 2-8°C dal momento della consegna. Per ridurre al minimo la perdita di attività, è consigliabile conservare sia la miscela enzimatica che la miscela di substrato nelle fiale originali.

Le miscele enzimatiche e di substrato ricostituite sono stabili per almeno 10 giorni a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, è possibile congelare le miscele enzimatiche e di substrato e conservarle nelle fiale originali a una temperatura compresa tra -30 e -15°C. I reagenti congelati non devono essere sottoposti a più di 6 cicli di congelamento-scongelo.

Nota: i nucleotidi non devono essere congelati.

Il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro è stabile fino alla data di scadenza indicata, se conservato alle condizioni raccomandate.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.

Il materiale campione è DNA umano estratto da sangue o da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Non è consentito l'uso di campioni umani prelevati da soggetti in cura con eparina. Non è consentito l'uso di campioni ematici raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. L'eparina compromette la PCR.

Procedura

Isolamento del DNA

Le prestazioni del sistema sono state determinate utilizzando i kit EZ1[®] DNA Tissue e QIAamp[®] DNA FFPE Tissue per l'estrazione del DNA umano a partire da campioni tumorali FFPE. Per quanto riguarda il sistema del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini, le prestazioni sono state determinate utilizzando campioni ematici di donatori sani arricchiti con cellule tumorali.

È consigliato l'uso dei kit QIAGEN descritti nella Tabella 2 per la purificazione del DNA dei tipi di campioni umani da analizzare con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro. Eseguire la purificazione del DNA nel rispetto delle istruzioni contenute nei manuali dei kit.

Tabella 2. Kit di purificazione del DNA consigliati per l'uso con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro

Materiale campione	Kit per l'isolamento degli acidi nucleici	N° di catalogo (QIAGEN)
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*	61104
Tessuto incluso in paraffina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48) [†]	953034

* Con marchio CE-IVD, conforme alla Direttiva UE 98/79/CE.

[†] Seguire il protocollo per l'uso con tessuto incluso in paraffina. Utilizzare il prodotto EZ1 DNA Tissue Kit con la combinazione EZ1 Advanced (n° di cat. 9001410 o 9001411) ed EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9018298), con la combinazione EZ1 Advanced XL (n° di cat. 9001492) ed EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9018700) oppure con la combinazione BioRobot[®] EZ1 (n° di cat. 9000705; non più disponibile) ed EZ1 DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9015862).

Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24

Prima di iniziare

- Creare una configurazione del dosaggio come descritto nella sezione "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* UGT1A1 Pyro", pagina 41. Questa operazione deve essere effettuata una sola volta, prima di eseguire il dosaggio *therascreen* UGT1A1 per la prima volta.

Procedura

- 1. Fare clic su  nella barra degli strumenti.**
Viene creato un nuovo file di processo.
- 2. Immettere i parametri del processo (vedere "Parametri del processo", pagina 16).**
- 3. Allestire la piastra aggiungendo i dosaggi per le varianti alleliche *28 e *6 nei pozzetti che corrispondono ai campioni da analizzare.**

Nota: è necessario includere un campione di controllo negativo (senza DNA templatato) in ogni configurazione PCR con almeno un dosaggio.

Nota: è possibile includere un campione con DNA di controllo umano per ogni dosaggio come controllo positivo per le reazioni PCR e di sequenziamento (vedere "Controlli", pagina 7).

- 4. Quando il processo è configurato e pronto per essere avviato sul sistema PyroMark Q24, stampare un elenco dei volumi richiesti per quanto riguarda la miscela enzimatica, la miscela di substrato e i nucleotidi, oltre alla configurazione della piastra. Selezionare "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione) dal menu "Tools" (Strumenti) e, quando viene visualizzato il report, fare clic su .**
- 5. Chiudere il file di processo e copiarlo su una penna USB (fornita con il sistema) utilizzando Windows® Explorer.**

La stampa delle informazioni pre-elaborazione può essere utilizzata come modello per la configurazione del campione (vedere "Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance", pagina 20).

Per avviare l'elaborazione della piastra sul sistema PyroMark Q24, vedere "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 26.

Parametri del processo

“Run name” (Nome processo):	Il nome del processo viene assegnato al momento del salvataggio del file. Se il file viene ridenominato, anche il processo viene ridenominato.
“Instrument method” (Metodo strumento):	Selezionare il metodo dello strumento in base alla cartuccia che verrà utilizzata per il processo. Fare riferimento alle istruzioni fornite con i prodotti.
“Plate ID” (ID della piastra):	Facoltativo: immettere l’ID della piastra PyroMark Q24.
“Bar code” (Codice a barre):	Facoltativo: immettere un numero di codice a barre per la piastra oppure, se un lettore di codici a barre è collegato al computer, fare clic nella casella di testo “Barcode” (Codice a barre) e avviare la scansione.
“Reagent ID” (ID reagente):	Facoltativo: immettere i numeri di lotto delle scatole 1 e 2 del kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro da utilizzare. I numeri di lotto sono indicati sull’etichetta del prodotto. Nota: indicare sempre il numero di lotto, in modo da facilitare la ricostruzione di eventuali problemi imprevisti con il kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro.
“Run note” (Nota sul processo):	Facoltativo: immettere un commento per spiegare il contenuto o la finalità del processo.

Aggiungere i file dei dosaggi

Per aggiungere un dosaggio in un pozzetto, sono disponibili due alternative:

- Fare clic con il pulsante destro del mouse sul pozzetto, quindi selezionare “Load Assay” (Carica dosaggio) dal menu di scelta rapida.
- Selezionare il dosaggio nel browser dei collegamenti, quindi fare clic e trascinare il dosaggio fino al pozzetto.

Il colore del pozzetto cambia a seconda del dosaggio caricato.

Immettere gli ID dei campioni e le note

Per immettere l’ID di un campione o una nota, selezionare la cella e inserire il testo.

Per modificare l’ID di un campione o una nota, selezionare la cella (verrà selezionato il contenuto corrente) oppure fare doppio clic sulla cella.

Protocollo 2: analisi PCR con i reagenti inclusi nel kit *therascreen* UGT1A1 Pyro

Questo protocollo prevede l'uso del kit *therascreen* UGT1A1 Pyro per eseguire l'amplificazione PCR di una regione ai fini della genotipizzazione della variante allelica *28 e, a parte, l'amplificazione PCR di una regione ai fini della genotipizzazione della variante allelica *6.

Punti importanti prima di iniziare

- La DNA polimerasi HotStarTaq® contenuta nel Master Mix PCR PyroMark necessita di una fase di attivazione di **15 minuti a 95°C**.
- Preparare tutte le miscele di reazione in un'area del laboratorio separata dall'area in cui si esegue la purificazione del DNA, l'aggiunta del DNA template alla PCR, l'analisi del prodotto della PCR o la preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento.
- Utilizzare puntali monouso contenenti filtri idrofobici per ridurre al minimo la contaminazione crociata.

Prima di iniziare

- Prima di aprire le provette con i primer per PCR, centrifugare brevemente per fare depositare il contenuto sul fondo delle provette.
- Se necessario, correggere la concentrazione del DNA del campione fino a 0,4-2 ng/μl. **Nota:** il DNA di controllo umano incluso nel kit viene fornito a una concentrazione di 2 ng/μl.

Procedura

1. Scongelare tutti i componenti necessari.

Miscelare con cura prima dell'uso.

2. Preparare una miscela di reazione per ogni set di primer per PCR, facendo riferimento alla Tabella 3.

La miscela di reazione contiene in genere tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

Preparare un volume maggiorato rispetto alla miscela di reazione necessaria per il numero totale di dosaggi PCR da eseguire.

Tabella 3. Preparazione della miscela di reazione per ogni miscela di primer per PCR

Componente	Volume/reazione (µl)
Master Mix per PCR PyroMark, 2x	12,5
Concentrato CoralLoad, 10x	2,5
Miscela di primer per PCR per variante allelica UGT1A1 *28 ○ miscela di primer per PCR per variante allelica UGT1A1 *6	1,0
Acqua (H ₂ O, fornita)	4,0
Volume totale	20,0

3. Mescolare la miscela di reazione accuratamente, quindi dispensare 20 µl in ogni provetta per PCR.

Non è necessario conservare le provette per PCR su ghiaccio, in quanto la DNA polimerasi HotStarTaq è inattiva a temperatura ambiente.

4. Aggiungere 5 µl di DNA template (2-10 ng di DNA genomico) nelle singole provette per PCR (vedere la Tabella 4), quindi miscelare con cura.

Nota: è necessario includere un campione di controllo negativo (senza DNA template) in ogni configurazione PCR con almeno un dosaggio.

Nota: è possibile includere un campione con DNA di controllo umano per ogni dosaggio come controllo positivo per le reazioni PCR e di sequenziamento (vedere "Controlli", pagina 7).

Tabella 4. Preparazione della PCR

Componente	Volume/reazione (µl)
Miscela di reazione	20
DNA campione	5
Volume totale	25

5. Programmare il termociclatore nel rispetto delle istruzioni del produttore, adottando le condizioni descritte nella Tabella 5.

Tabella 5. Protocollo di ciclaggio ottimizzato

			Commenti
Fase di attivazione iniziale:	15 minuti	95°C	La DNA polimerasi HotStarTaq viene attivata da questa fase di riscaldamento.
Ciclaggio a 3 fasi:			
Denaturazione	20 secondi	95°C	
Annealing	30 secondi	53°C	
Estensione	20 secondi	72°C	
Numero di cicli	42		
Estensione finale:	5 minuti	72°C	

6. Posizionare le provette PCR nel termociclatore e avviare il programma di ciclaggio.
7. Dopo l'amplificazione, passare al "Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance", pagina 20.

Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance

Questo protocollo prevede l'immobilizzazione del DNA template su grani di streptavidina (Streptavidin Sepharose High Performance, di GE Healthcare) prima dell'analisi con il sistema PyroMark Q24.

Prima di iniziare

- Prima di iniziare, attendere che tutti i reagenti e le soluzioni raggiungano la temperatura ambiente (15-25°C).

Procedura

1. **Agitare delicatamente il flacone contenente i grani Streptavidin Sepharose High Performance finché la soluzione appare omogenea.**
2. **Preparare una soluzione Master Mix per l'immobilizzazione del DNA facendo riferimento alla Tabella 6.** Preparare un volume maggiorato del 10% rispetto al volume necessario per il numero totale di reazioni da eseguire.

Tabella 6. Soluzione Master Mix per l'immobilizzazione del DNA

Componente	Volume/campione (μ l)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Tampone di legame PyroMark	40
Acqua (H ₂ O, fornita)	28
Volume totale	70

3. **Aggiungere 70 μ l di soluzione Master Mix nei pozzetti della piastra per PCR a 24 pozzetti (o nelle strisce), in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 15).**
4. **Aggiungere 10 μ l di prodotto della PCR biotinilato (ottenuto dal Protocollo 2) in ogni pozzetto contenente la soluzione Master Mix, in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 2: analisi PCR con i reagenti inclusi nel kit *therascreen* UGT1A1 Pyro", pagina 17).**

Il volume totale contenuto in ogni pozzetto dovrebbe essere di 80 μ l, dopo l'aggiunta della soluzione Master Mix e del prodotto della PCR.

5. **Sigillare la piastra per PCR (o le strisce) utilizzando i tappi per strisce.**

Assicurarsi che il liquido non possa filtrare da un pozzetto all'altro.

6. Agitare la piastra per PCR a temperatura ambiente (15-25°C) per 5-10 minuti a 1400 rpm.

Nel mentre preparare la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 per la preparazione dei campioni, secondo le indicazioni contenute nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

7. Passare immediatamente al “Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell’analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24”, pagina 22.

Nota: i grani Sepharose sedimentano velocemente. La cattura dei grani deve avvenire immediatamente dopo l’agitazione.

Se è trascorso più di 1 minuto dall’agitazione della piastra (o delle strisce), agitare di nuovo per 1 minuto prima di catturare i grani.

Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24

Questo protocollo prevede la preparazione del DNA a filamento singolo e l'annealing del primer di sequenziamento con il template prima dell'analisi di pirosequenziamento sullo strumento PyroMark Q24.

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di aprire le provette con i primer di sequenziamento, centrifugare brevemente per fare depositare il contenuto sul fondo delle provette.
- Aggiungere i 2 diversi primer di sequenziamento secondo lo stesso schema impostato per la piastra nella configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 15), a seconda della regione prescelta per l'analisi (variante allelica *28 o variante allelica *6).
- Il flusso di lavoro è stato leggermente modificato rispetto a quello descritto nel manuale *PyroMark Q24 User Manual* (punto 18). Non abbreviare il periodo di raffreddamento dei campioni dopo averli riscaldati a 80°C.
- Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro in base alle istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*, rispettando scadenze regolari e sostituendo le sonde del filtro se necessario.

Prima di iniziare

- Posizionare un portapiastre PyroMark Q24 su un blocco preriscaldato a 80°C (da utilizzare al punto 17). Lasciare un secondo portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25°C) (da utilizzare al punto 18).
- Il tampone di lavaggio PyroMark viene fornito in forma concentrata 10x. Prima di utilizzare il tampone per la prima volta, aggiungere acqua altamente depurata a 25 ml di tampone di lavaggio PyroMark 10x, così da ottenere un volume finale di 250 ml e una soluzione di lavoro 1x.

La soluzione di lavoro tampone di lavaggio PyroMark 1x è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

Procedura

- 1. Diluire una quantità sufficiente di ogni primer di sequenziamento (Seq Primer UGT1A1 *28 e Seq Primer UGT1A1 *6) nel tampone di annealing PyroMark, secondo le indicazioni della Tabella 7.**

Preparare il primer di sequenziamento diluito in volume maggiorato rispetto al volume necessario per eseguire il sequenziamento di tutti i campioni (una quantità sufficiente per il numero di campioni + uno).

Tabella 7. Esempio di diluizione dei primer di sequenziamento

Componente	Volume/campione (μl)	Volume per 9 + 1 reazioni (μl)
Seq Primer UGT1A1 *28	0,8	8,0
• Seq Primer UGT1A1 *6		
Tampone di annealing PyroMark	24,2	242,0
Volume totale	25,0	250,0

- 2. Aggiungere 25 μl di primer di sequenziamento diluito in ogni pozzetto della piastra PyroMark Q24, in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 15).**

Conservare uno dei portapiastre PyroMark Q24 (forniti con la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24) a temperatura ambiente (15-25°C) e utilizzarlo come sostegno durante la preparazione e il trasferimento della piastra.

- 3. Appoggiare sul tavolo da lavoro la piastra per PCR (o le strisce) del Protocollo 3 e la piastra PyroMark Q24 (Figura 2).**

Assicurarsi che la piastra abbia lo stesso orientamento che aveva durante il caricamento dei campioni.



Figura 2. Posizionamento della piastra per PCR (o delle strisce) e della piastra PyroMark Q24 sulla stazione del vuoto.

- 4. Applicare il vuoto allo strumento aprendo l'interruttore del vuoto.**

- 5. Immergere delicatamente le sonde del filtro nella piastra per PCR (o nelle strisce), in modo da catturare i grani contenenti il template immobilizzato. Tenere le sonde in posizione per 15 secondi. Estrarre lo strumento del vuoto con cautela.**

Nota: I grani Sepharose sedimentano velocemente. La cattura dei grani deve avvenire immediatamente dopo l'agitazione.

Se è trascorso più di 1 minuto dall'agitazione della piastra (o delle strisce), agitare di nuovo per 1 minuto prima di catturare i grani.

- 6. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 40 ml di etanolo al 70% (Figura 2). Sciacquare le sonde del filtro per 5 secondi.**
- 7. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 40 ml di soluzione di denaturazione (Figura 2). Sciacquare le sonde del filtro per 5 secondi.**
- 8. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 50 ml di tampone di lavaggio (Figura 2). Sciacquare le sonde del filtro per 10 secondi.**
- 9. Sollevare lo strumento del vuoto e mantenerlo reclinato di oltre 90° in senso verticale per 5 secondi, in modo che tutto il liquido possa defluire dalle sonde del filtro (Figura 3).**



Figura 3. Illustrazione dello strumento del vuoto sollevato e inclinato di oltre 90° in senso verticale.

- 10. Tenendo lo strumento del vuoto sopra la piastra PyroMark Q24, chiudere l'interruttore del vuoto sullo strumento (Off).**
- 11. Liberare i grani nella piastra PyroMark Q24 immergendo le sonde del filtro nel primer di sequenziamento diluito e muovendo con cautela lo strumento da un lato all'altro.**

Fare attenzione a non danneggiare la superficie della piastra PyroMark Q24 graffiandola con le sonde del filtro.
- 12. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene acqua altamente depurata (Figura 2) e agitare lo strumento per 10 secondi.**

- 13. Lavare le sonde del filtro immergendole nell'acqua altamente depurata (Figura 2) e applicando il vuoto. Sciacquare le sonde con 70 ml di acqua altamente depurata.**
- 14. Sollevare lo strumento e mantenerlo reclinato di oltre 90° in senso verticale per 5 secondi, in modo che tutto il liquido possa defluire dalle sonde del filtro (Figura 3).**
- 15. Chiudere l'interruttore del vuoto sullo strumento (Off), quindi sistemare lo strumento nella posizione di sosta (P).**
- 16. Spegnerne la pompa del vuoto.**

Nota: al termine della giornata di lavoro, smaltire il materiale di scarto liquido e le soluzioni residue e verificare che non vi siano polveri o perdite sulla stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 (vedere "Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti", pagina 43).
- 17. Riscaldare la piastra PyroMark Q24 contenente i campioni a 80°C per 2 minuti utilizzando il portapiastre PyroMark Q24 preriscaldato.**
- 18. Rimuovere la piastra PyroMark Q24 dal portapiastre caldo e posizionarla su un secondo portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25°C), lasciando raffreddare i campioni a temperatura ambiente per 10-15 minuti.**
- 19. Passare alla procedura "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 26.**

Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24

Questo protocollo descrive la preparazione e il caricamento dei reagenti PyroMark Gold Q24 sulla cartuccia PyroMark Q24 e l'esecuzione di un processo completo sullo strumento PyroMark Q24. Per informazioni dettagliate sulla configurazione di un processo, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

Punti importanti prima di iniziare

- Il report "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione), disponibile nel menu "Tools" (Strumenti) durante la configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 15), contiene informazioni relativamente ai volumi dei nucleotidi, del tampone enzimatico e del tampone di substrato che sono necessari per un processo specifico.

Prima di iniziare

- Accendere il sistema PyroMark Q24. L'interruttore di alimentazione si trova sul retro dello strumento.

Procedura

- 1. Sciogliere le miscele enzimatiche e di substrato liofilizzate in 620 µl di acqua ognuna (H₂O, inclusa nel kit).**
- 2. Miscelare agitando delicatamente la fiala con un movimento rotatorio. Non agitare in vortex.**

Per verificare che la miscela si sia completamente sciolta, lasciarla riposare a temperatura ambiente (15–25°C) per 5–10 minuti. Prima di riempire la cartuccia PyroMark Q24, assicurarsi che la soluzione non sia torbida. Se i reagenti non devono essere utilizzati immediatamente, conservare le fiale in ghiaccio* o in frigorifero.
- 3. Attendere che i reagenti e la cartuccia PyroMark Q24 raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C).**
- 4. Posizionare la cartuccia PyroMark Q24 con l'etichetta rivolta verso l'operatore.**
- 5. Caricare la cartuccia PyroMark Q24 con i volumi appropriati di nucleotidi, miscela enzimatica e miscela di substrato (Figura 4).**

Assicurarsi che non vengano trasferite bolle d'aria dalla pipetta alla cartuccia.

* Durante la manipolazione di sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

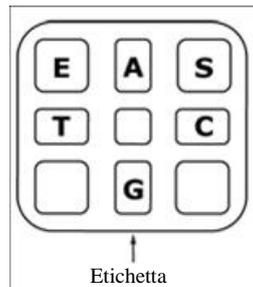


Figura 4. Illustrazione della cartuccia PyroMark Q24 vista dall'alto. Le annotazioni corrispondono all'etichetta sulle fiale dei reagenti. Aggiungere la miscela enzimatica (E), la miscela di substrato (S), e i nucleotidi (A, T, C, G) rispettando i volumi indicati nel report "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione), disponibile nel menu "Tools" (Strumenti) durante la configurazione del processo.

6. **Aprire lo sportellino della cartuccia e inserire la cartuccia reagenti piena con l'etichetta rivolta verso l'esterno. Spingere la cartuccia completamente verso l'interno e poi verso il basso.**
7. **Verificare che la linea sul lato anteriore della cartuccia sia visibile, quindi chiudere lo sportellino.**
8. **Aprire il telaio portapietra e posizionare la piastra sul blocco riscaldante.**
9. **Chiudere il telaio portapietra e il coperchio dello strumento.**
10. **Inserire la penna USB (contenente il file del processo) nella porta USB sul lato anteriore dello strumento.**
Non rimuovere la penna USB prima che il processo sia terminato.
11. **Selezionare "Run" (Elabora) nel menu principale (utilizzare i pulsanti ▲ e ▼ dello schermo), quindi premere "OK".**
12. **Selezionare il file del processo utilizzando i pulsanti ▲ e ▼ dello schermo.**
Per visualizzare il contenuto di una cartella, selezionare la cartella desiderata e premere "Select" (Seleziona). Per tornare alla vista precedente, premere "Back" (Indietro).
13. **Dopo avere selezionato il file del processo, premere "Select" (Seleziona) per avviare l'elaborazione.**
14. **Quando il processo è terminato e lo strumento conferma che il file del processo è stato salvato sulla penna USB, premere "Close" (Chiudi).**
15. **Rimuovere la penna USB.**
16. **Aprire il coperchio dello strumento.**
17. **Aprire lo sportellino della cartuccia e rimuovere la cartuccia reagenti sollevandola e tirando verso l'esterno.**
18. **Chiudere lo sportellino.**
19. **Aprire il telaio portapietra e rimuovere la piastra dal blocco riscaldante.**
20. **Chiudere il telaio portapietra e il coperchio dello strumento.**
21. **Smaltire la piastra e pulire la cartuccia seguendo le istruzioni contenute nel foglio illustrativo allegato alla cartuccia.**

22. Analizzare il processo in base alla procedura "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 29.

Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24

Questo protocollo descrive l'analisi della genotipizzazione per un processo *therascreen* UGT1A1 completo eseguito con il software PyroMark Q24.

Procedura

1. Nella porta USB del computer inserire la penna USB contenente il file del processo elaborato.
2. Utilizzando Windows Explorer (Esplora risorse), spostare il file del processo dalla penna USB alla posizione desiderata sul computer.
3. Aprire il file del processo nella modalità AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (👉) nel browser dei collegamenti.
4. Per analizzare il processo e visualizzare un riepilogo generale dei risultati, fare clic su uno dei pulsanti "Analyze" (Analizza).



Analizzare tutti i pozzetti.



Analizzare il pozzetto selezionato.

Per maggiori dettagli su come analizzare un processo, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

5. Per generare un report, nel menu "Reports" selezionare "SNP Full Report" (Report completo SNP) oppure "SNP Overview Report" (Report riassuntivo SNP).

Nota: per ottenere risultati attendibili, è consigliabile utilizzare altezze del picco singolo superiori a 30 RLU. Nella configurazione dei dosaggi impostare 30 RLU come "required peak height for passed quality" (altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato). Vedere "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* UGT1A1 Pyro", page 41, e il manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

Nota: è necessario confrontare sempre il tracciato Pyrogram® con l'istogramma (per visualizzare quest'ultimo, fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra del pirogramma). I picchi misurati devono corrispondere all'altezza delle barre dell'istogramma.

Interpretazione dei risultati

È possibile utilizzare il DNA di controllo umano per un confronto dei risultati. Il DNA di controllo ha un genotipo TA6/TA6 e G/G omozigote quando viene analizzato rispettivamente per le varianti alleliche *28 e *6.

L'analisi di genotipizzazione viene eseguita automaticamente dal software PyroMark Q24 e viene visualizzata nei report "SNP Full Report" (Report completo SNP) e "SNP Overview Report" (Report riassuntivo SNP).

Nota: la valutazione della qualità e le avvertenze generate nei report SNP sono importanti per l'analisi di genotipizzazione. Le altre valutazioni della qualità e avvertenze generate nella modalità AQ del software PyroMark Q24 possono essere ignorate.

Risultati rappresentativi

Nelle Figure 5-10 sono illustrati risultati rappresentativi dei tracciati Pyrogram.

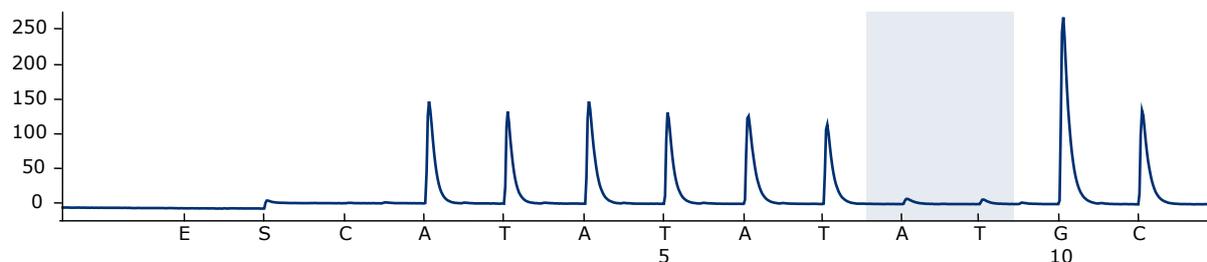


Figura 5. Tracciato Pyrogram ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo -- (TA6/TA6) per la variante allelica *28.

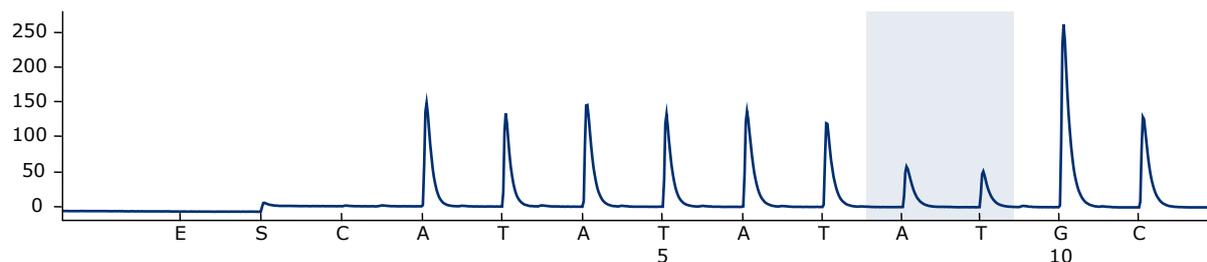


Figura 6. Tracciato Pyrogram ottenuto dall'analisi di un campione con genotipo -/TA (TA6/TA7) per la variante allelica *28.

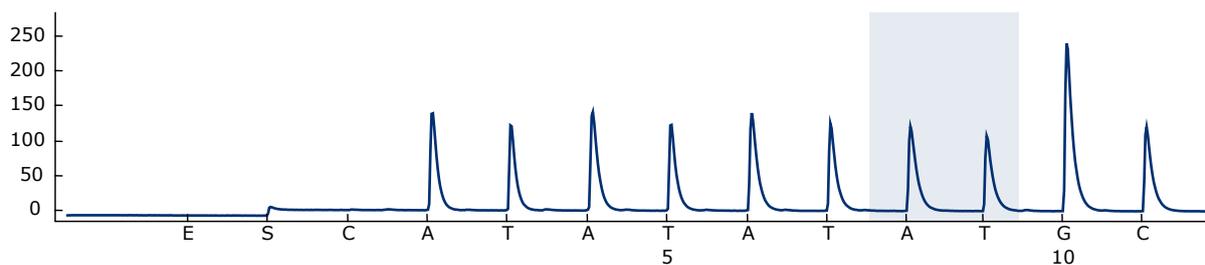


Figura 7. Tracciato Pyrogram ottenuto dall'analisi di un campione con genotipo TA/TA (TA7/TA7) per la variante allelica *28.

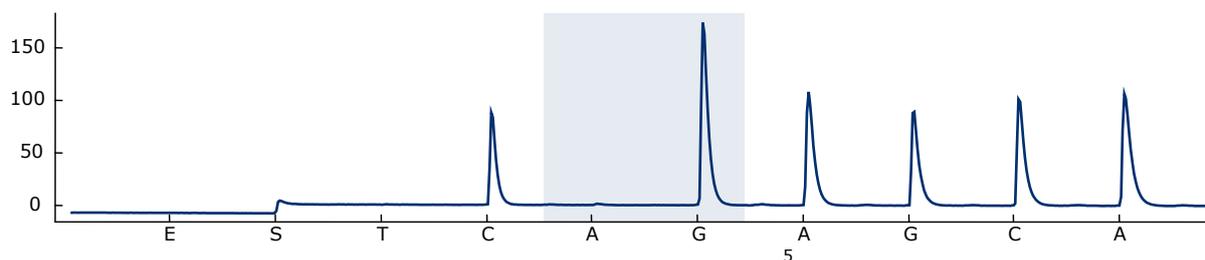


Figura 8. Tracciato Pyrogram ottenuto dall'analisi di campioni con genotipo G/G per la variante allelica *6.

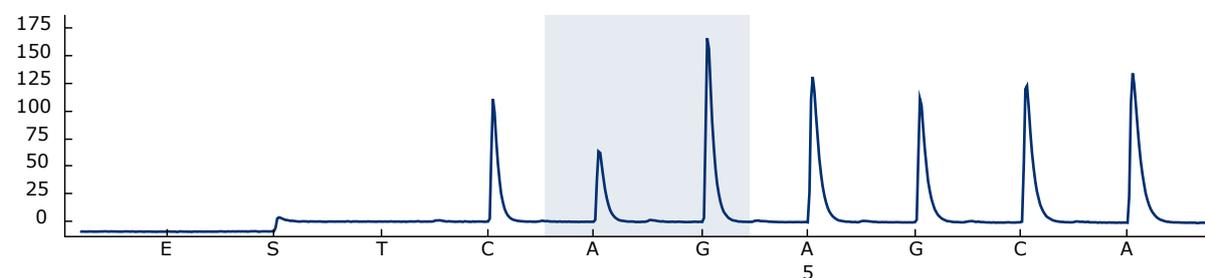


Figura 9. Tracciato Pyrogram ottenuto dall'analisi di campioni con genotipo G/A per la variante allelica *6.

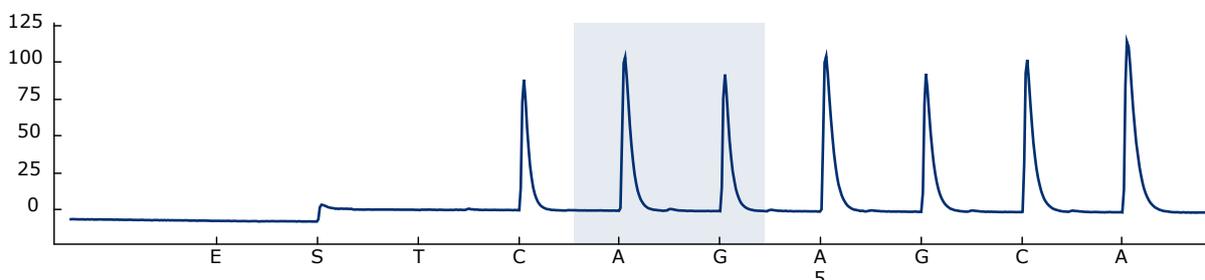


Figura 10. Tracciato Pyrogram ottenuto dall'analisi di campioni con genotipo A/A per la variante allelica *6.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del supporto tecnico QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante le informazioni e i protocolli descritti in questo manuale o le tecnologie relative a campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Nota: per risolvere i problemi generali dello strumento, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

Commenti e suggerimenti

Segnali nel controllo senza template (controllo negativo)

- | | |
|------------------------------|---|
| a) Interferenza tra pozzetti | Il segnale da un pozzetto viene rilevato in un pozzetto vicino. Evitare di posizionare i campioni con un segnale ad alta intensità vicino ai pozzetti contenenti i controlli senza template. |
| b) Contaminazione della PCR | Utilizzare puntali per pipette sterili e dotati di filtri. La conservazione e l'estrazione di materiali come campioni, controlli e ampliconi deve avvenire in luoghi separati dai reagenti per PCR. |

Sequenza scarsa o inattesa

- | | |
|-------------------------------|--|
| DNA genomico di bassa qualità | Un DNA genomico di scarsa qualità può determinare il fallimento della PCR. Analizzare i campioni della PCR applicando una tecnica elettroforetica (ad esempio, sistema QIAxcel® o elettroforesi su gel di agarosio). |
|-------------------------------|--|

Commenti e suggerimenti

Risultato "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato) nel report SNP

- a) Avvertenza
"Uncertain / Failed due to low peak height"
(Incerto/Fallito a causa di un'altezza del picco bassa)
- Eventuali errori di gestione relativi all'allestimento PCR o alla preparazione del campione prima della procedura di pirosequenziamento possono causare picchi bassi.
- È importante che i campioni siano aspirati completamente dallo strumento del vuoto. Assicurarsi che lo strumento del vuoto venga abbassato lentamente nei campioni e che la geometria della piastra per PCR (o delle strisce) usate per l'immobilizzazione consenta l'aspirazione completa dei campioni. Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro in base alle istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*, rispettando scadenze regolari e sostituendo le sonde del filtro se necessario.
- In presenza di un'avvertenza "Check" (Controllare), confrontare attentamente il pirogramma con l'istogramma, visualizzabile facendo clic con il pulsante destro del mouse nella finestra del pirogramma. Se i picchi misurati corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma, il risultato è valido. In caso contrario, è consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Commenti e suggerimenti

- b) Avvertenza "Uncertain / Failed genotype determination" (Determinazione del genotipo incerta/fallita)
- In presenza di un'avvertenza "Check" (Controllare), confrontare attentamente il pirogramma con l'istogramma, visualizzabile facendo clic con il pulsante destro del mouse nella finestra del pirogramma. Se i picchi misurati corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma, il risultato è valido. In caso contrario, è consigliabile analizzare nuovamente il campione.
- Per quanto riguarda il dosaggio UGT1A1 *28, è possibile che l'avvertenza sia provocata da uno scorrimento della polimerasi lungo le ripetizioni TA, che potrebbe essere più pronunciato per i campioni tumorali FFPE. Assicurarsi di utilizzare DNA di alta qualità come template (ad esempio, DNA estratto da campioni ematici) o aumentare la quantità di DNA template.
- c) Varianti alleliche rare inattese
- Uno schema inatteso di picchi può determinare una valutazione di qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato). Ciò può indicare la presenza di una variante allelica inattesa, che non viene analizzata dalla sequenza specificata. I campioni interessati da questo fenomeno devono essere analizzati manualmente utilizzando la sequenza da analizzare alternativa, che tiene conto delle varianti alleliche inattese.
- d) Avvertenza relativa alla deviazione elevata nell'altezza del picco in corrispondenza della dispensazione x
- È necessario confrontare attentamente il pirogramma con l'istogramma (per visualizzare quest'ultimo, fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra del pirogramma). Se i picchi misurati non corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non può essere spiegato con varianti alleliche rare, è consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Commenti e suggerimenti

Fondo elevato

- | | |
|--|--|
| a) Conservazione impropria dei nucleotidi | Conservare i nucleotidi a 2-8°C. La conservazione tra -10 e -25°C può determinare un aumento del fondo. |
| b) Abbreviazione del tempo di raffreddamento dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento | Conservare i campioni su un portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente per 10–15 minuti. Non abbreviare il tempo di raffreddamento. |
| c) Contaminazione della cartuccia | Pulire accuratamente la cartuccia rispettando le istruzioni fornite nel foglio illustrativo del prodotto. Conservare la cartuccia al riparo da luce e polvere. |

Nessun segnale nei controlli positivi

- | | |
|---|---|
| a) Miscela enzimatica o di substrato insufficiente per tutti i pozzetti | Assicurarsi di riempire la cartuccia PyroMark Q24 in base alle informazioni di pre-elaborazione ("Pre Run Information", menu "Tools"). |
| b) Conservazione o diluizione errata dei reagenti | Preparare i reagenti <i>therascreen</i> in base alle istruzioni contenute nella sezione "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 26. |
| c) Errore relativo alla PCR o alla preparazione del campione | Eventuali errori di gestione nella configurazione PCR o nella preparazione del campione prima della procedura Pyrosequencing potrebbero determinare l'assenza di segnali. Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro seguendo le istruzioni descritte nel manuale utente <i>PyroMark Q24 User Manual</i> e sostituire le sonde del filtro quando indicato. Ripetere la PCR e l'analisi di pirosequenziamento. |

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto del kit *therascreen* UGT1A1 Pyro è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Tutti i risultati diagnostici che verranno generati dovranno essere interpretati unitamente ad altre rilevazioni cliniche o di laboratorio.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Caratteristiche prestazionali

Precisione

I dati relativi alla precisione consentono di determinare la variabilità totale del dosaggio con riferimento alla corretta genotipizzazione delle varianti alleliche *28 e *6. I plasmidi contenenti le varianti alleliche sono stati miscelati proporzionalmente (0, 50, 100%) per rappresentare i genotipi omo ed eterozigoti (*28 TA6/TA6, TA6/TA7 e TA7/TA7; *6 G/G, G/A e A/A). Ogni miscela è stata analizzata in sette processi di pirosequenziamento ripetuti tre volte ciascuno con diversi lotti di kit *therascreen* UGT1A1 Pyro, strumenti PyroMark Q24, operatori, giorni e laboratori.

La precisione è espressa come tasso di correttezza per quanto riguarda la classificazione dei risultati (in altre parole, la proporzione dei campioni analizzati che hanno un risultato di genotipizzazione corretto). I dosaggi per le analisi di genotipizzazione delle varianti alleliche *28 e *6, riportati rispettivamente nelle Tabelle 8 e 9, mostrano un tasso di correttezza del 100% per quanto riguarda la classificazione dei risultati per i campioni analizzati.

Tabella 8. Precisione della genotipizzazione delle varianti alleliche *28

Genotipo*	Numero di campioni	Classificazioni corrette
Omozigote TA6/TA6	21	21
Eterozigote TA6/TA7	21	21
Omozigote TA7/TA7	20	20

* Rappresentato da miscele di plasmidi (0, 50 e 100%) in base della misurazione della densità ottica₂₆₀.

Tabella 9. Precisione della genotipizzazione delle varianti alleliche *6

Genotipo*	Numero di campioni	Classificazioni corrette
Omozigote G/G	21	21
Eterozigote G/A	21	21
Omozigote A/A	21	21

* Rappresentato da miscele di plasmidi (0, 50 e 100%) in base della misurazione della densità ottica₂₆₀.

Valutazione diagnostica

È stata eseguita una valutazione del kit *therascreen* UGT1A1 Pyro rispetto al sequenziamento di Sanger. È stato estratto il DNA da 100 campioni tumorali FFPE ed è stata eseguita l'analisi del DNA per rilevare eventuali le varianti alleliche *28 e *6.

Il DNA è stato isolato utilizzando il kit QIAamp DNA FFPE Tissue. L'analisi di pirosequenziamento è stata eseguita con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro sullo strumento PyroMark Q24; il sequenziamento di Sanger è stato eseguito sul sistema ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Su un totale di 100 campioni analizzati, con il sequenziamento di Sanger è stato determinato il genotipo di 95 e 99 campioni, rispettivamente per le varianti alleliche *28 e *6. Con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro è stato determinato il genotipo di 98 e 99 campioni, rispettivamente per le varianti alleliche *28 e *6.

Con entrambi i metodi sono stati identificati 29, 49 e 12 campioni rispettivamente di genotipo TA6/TA6, TA6/TA7 e TA7/TA7. Con il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro sono stati inoltre identificati altri quattro campioni di genotipo TA6/TA6, mentre con il sequenziamento di Sanger è stato rilevato un campione di genotipo TA6/TA7 (Tabella 10).

Escludendo i campioni che non hanno superato uno o entrambi i metodi, la concordanza dei risultati tra il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro e il sequenziamento di Sanger è stata del 96% per quanto concerne la genotipizzazione delle varianti alleliche *28 (Tabella 10).

Tabella 10. Risultati della genotipizzazione per le varianti alleliche *28 in campioni di donatori di origine caucasica

		Sequenziamento di Sanger				Totale
		TA6/ TA6	TA6/ TA7	TA7/ TA7	Sconosciuti	
Kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Sconosciuti	0	1	0	1	2
	Totale	29	54	12	5	100

Tutti i campioni includevano un genotipo omozigote G/G per la variante allelica *6 sia in base al sequenziamento di Sanger, sia in base al kit *therascreen* UGT1A1 Pyro. Questo risultato è in linea con gli studi più avanzati, secondo i quali i genotipi A/G e A/A sono praticamente assenti nelle popolazioni caucasiche. Di conseguenza, il DNA di altri 26 campioni raccolti con tamponi orali da donatori asiatici con il prodotto QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit è stato estratto sul sistema QIAcube® ed è stato analizzato al fine di identificare le varianti alleliche *6.

Entrambi i metodi hanno rilevato in quindici, nove e due campioni rispettivamente il genotipo G/G, G/A e A/A (Tabella 11).

Escludendo i campioni che non hanno superato uno o entrambi i metodi, la concordanza dei risultati tra il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro e il sequenziamento di Sanger è stata del 100% per quanto concerne l'identificazione delle varianti alleliche *6 (Tabella 11).

Tabella 11. Risultati della genotipizzazione per le varianti alleliche *6 in campioni di donatori di origine asiatica

		Sequenziamento di Sanger				Totale
		G/G	G/A	A/A	Sconosciuti	
Kit therascreen UGT1A1 Pyro	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Sconosciuti	0	0	0	0	0
	Totale	15	9	2	0	26

Nota: in tutti i processi utilizzati per la determinazione delle caratteristiche prestazionali, il segnale ottenuto è stato superiore a 30 RLU, come di regola avviene con 10 ng di DNA estratto da sangue o tessuto FFPE.

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online che viene continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitate il QIAGEN Reference Database all'indirizzo www.qiagen.com/RefDB/search.asp o contattate il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Simboli

 Σ	Contenuto sufficiente per <N> test
	Utilizzare entro
IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
REF	Numero di catalogo
LOT	Codice del lotto
MAT	Numero di materiale
COMP	Componenti
CONT	Contenuto
NUM	Numero
NaOH	Irossido di sodio
GTIN	Global Trade Item Number
	Limiti di temperatura
	Produttore
	Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale

Indirizzi utili

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitate il sito del nostro servizio di supporto tecnico www.qiagen.com/Support o chiamate uno dei reparti del servizio tecnico di QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* UGT1A1 Pyro

Prima di eseguire il dosaggio *therascreen* UGT1A1 Pyro per la prima volta, è necessario configurare il file del dosaggio per le varianti alleliche UGT1A1 utilizzando il software PyroMark Q24, come descritto di seguito.

Procedura

UGT1A1 *28

1. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ).
2. Digitare la seguente sequenza in "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare):
ATATAT[AT]GGCA
3. Immettere manualmente il seguente "Dispensation Order" (Ordine di dispensazione):
CATATATGC
4. Fare clic sulla scheda "Analysis Parameters" (Parametri di analisi), quindi aumentare fino a 30 il valore "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Soglia altezza di picco - Altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato).
5. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi salvare il dosaggio come **UGT1A1 *28**.

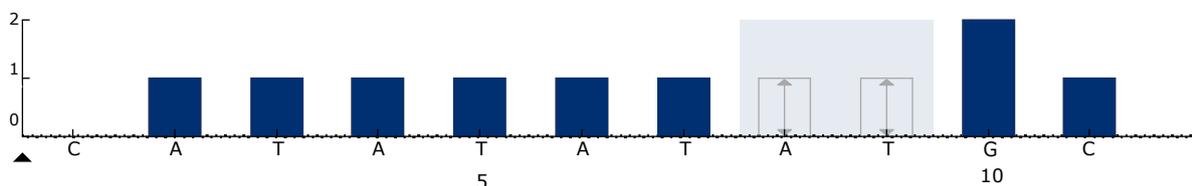


Figura 11. Istogramma per la genotipizzazione della variante allelica UGT1A1 *28.

UGT1A1 *6

1. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ).
2. Digitare la seguente sequenza in "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare):
CRGAGCAT
3. Immettere manualmente il seguente "Dispensation Order" (Ordine di dispensazione):
TCAGAGCA
4. Fare clic sulla scheda "Analysis Parameters" (Parametri di analisi), quindi aumentare fino a 30 il valore "Peak Height Threshold - Required peak

height for Passed quality:" (Soglia altezza di picco - Altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato).

5. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi salvare il dosaggio come UGT1A1 *6.

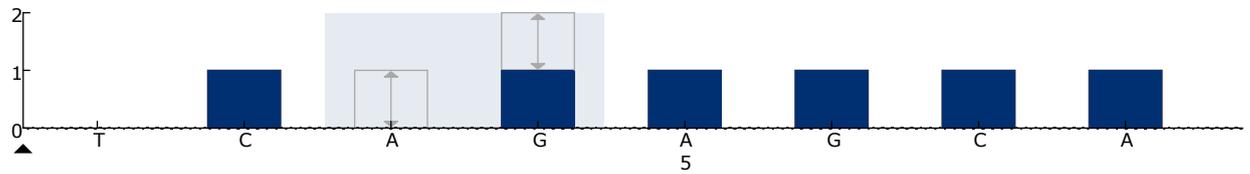


Figura 12. Istogramma per la genotipizzazione della variante allelica UGT1A1 *6.

Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti

AVVERTENZA 	Agenti chimici pericolosi <p>La soluzione di denaturazione utilizzata con la stazione di lavoro per il vuoto contiene idrossido di sodio, che è irritante per occhi e cute.</p> <p>Indossare sempre occhiali protettivi, guanti e un camice da laboratorio.</p> <p>L'ente responsabile (ad esempio, il direttore del laboratorio) deve adottare tutte le precauzioni necessarie per garantire che l'area circostante il luogo di lavoro sia sicura e che gli operatori non siano esposti a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), come definito nelle schede tecniche di sicurezza dei materiali (Material Safety Data Sheets, SDS) o nei documenti OSHA*, ACGIH† o COSHH‡ pertinenti.</p> <p>Lo sfiato dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti e le leggi su salute e sicurezza vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Stati Uniti d'America)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Stati Uniti d'America)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Regno Unito)

Verificare il rispetto di tutti i regolamenti e le leggi in vigore a livello nazionale, statale e locale per quanto riguarda lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

Punti importanti prima di iniziare

- Questo protocollo richiede l'uso di acqua altamente depurata.

Procedura

- B1. Assicurarsi che non sia applicato il vuoto allo strumento del vuoto.**
Assicurarsi che lo strumento del vuoto sia chiuso (Off) e che la pompa del vuoto sia spenta.
- B2. Gettare via tutte le soluzioni residue nei recipienti.**
- B3. Sciacquare i recipienti con acqua altamente depurata, oppure sostituirli se necessario.**
- B4. Svuotare il contenitore del materiale di scarto.**
È possibile rimuovere il tappo senza scollegare il tubo.

B5. Se è necessario pulire la stazione di lavoro per il vuoto (ad esempio, per la presenza di polvere o perdite), seguire le istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit (24)	Per 24 reazioni sui sistemi PyroMark Q24: primer di sequenziamento, primer per PCR, DNA di controllo umano, soluzione Master Mix per PCR PyroMark, concentrato CoralLoad, tampone di legame PyroMark, tampone di annealing PyroMark, soluzione di denaturazione PyroMark, tampone di lavaggio PyroMark, miscela enzimatica, miscela di substrato, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP e H ₂ O	971540
Accessori		
PyroMark Q24 Plate (100)	Piastra di reazione a 24 pozzetti per sequenziamento	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartucce per la dispensazione di nucleotidi e reagenti	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sonde dei filtri riutilizzabili per le stazioni del vuoto PyroMark Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Per controllare l'installazione del sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Per convalidare le prestazioni del sistema	979304
Prodotti correlati		
PyroMark Q24 MDx	Piattaforma di rilevazione basata sulle sequenze per sottoporre a pirosequenziamento 24 campioni in parallelo	9001513
PyroMark Q24	Piattaforma di rilevazione basata sulle sequenze per sottoporre a pirosequenziamento 24 campioni in parallelo	9001514

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Stazione di lavoro per il vuoto (220 V) per preparare 24 campioni in parallelo, dal prodotto della PCR al template a filamento singolo	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Stazione di lavoro per il vuoto (220 V) per preparare 24 campioni in parallelo, dal prodotto della PCR al template a filamento singolo	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software applicativo	9019063
PyroMark Q24 Software	Software di analisi	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 colonne QIAamp MinElute®, proteinasi K, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Per 48 preparazioni: cartucce reagenti (tessuto), puntali per filtri monouso, supporti portapuntali monouso, provette per campioni (2 ml), provette di eluizione (1,5 ml), tampone G2, proteinasi K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Per 50 preparazioni: colonne QIAamp Mini Spin, tamponi, reagenti, provette, VacConnector	61104

* Solo Regno Unito

† Resto del mondo

Per le informazioni di licenza aggiornate e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

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

Contratto di licenza limitata

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del kit *therascreen* UGT1A1 Pyro l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il kit *therascreen* UGT1A1 Pyro può essere utilizzato esclusivamente in conformità al *Manuale del kit theascreen UGT1A1 Pyro* e solo con i componenti contenuti nel kit stesso. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per quanto dichiarato nel *Manuale del kit theascreen UGT1A1 Pyro* e per i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo Kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terze parti.
3. Questo Kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del Kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo Kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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)

