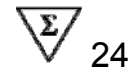


Εγχειρίδιο PyroMark KRAS Kit



Έκδοση 1

IVD

Το κιτ PyroMark KRAS Kit που φέρει σήμανση CE-IVD επιτρέπει την ποσοτική μέτρηση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS. Παρέχει στους κλινικούς επιστήμονες πληροφορίες που συμβάλλουν στην επιλογή ασθενών οι οποίοι πάσχουν από ορθοκολικό καρκίνο και είναι πιο πιθανό να ωφεληθούν από θεραπείες που στρέφονται ενάντια στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR).

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση



REF

971450

HB

1056444EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R2

MAT

1056444EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN είναι κυρίαρχος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, οι οποίες επιτρέπουν την απομόνωση και την ανίχνευση των περιεχομένων οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα εξελιγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας διασφαλίζουν την επιτυχία από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει τα πρότυπα στους τομείς:


- Καθαρισμός (απομόνωση) DNA, RNA και πρωτεϊνών
- Προσδιορισμοί νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- Έρευνα microRNA και RNAi
- Αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Η αποστολή μας είναι να σας δώσουμε τη δυνατότητα να έχετε εξαιρετική επιτυχία και να επιτύχετε εξαιρετικές καινοτομίες. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα του κιτ	4
Σύμβολα	4
Αποστολή και αποθήκευση	5
Χρήση για την οποία προορίζεται	5
Περιορισμοί στη χρήση του προϊόντος	6
Τεχνική βοήθεια	6
Έλεγχος ποιότητας	7
Πληροφορίες για την ασφάλεια	7
Εισαγωγή	8
Αρχή και διαδικασία	8
Χαρακτηριστικά απόδοσης	9
Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που παρέχονται από το χρήστη	14
Σημαντικές σημειώσεις	15
Γενικές προφυλάξεις	15
Υλικό δείγματος	15
Απομόνωση DNA	15
Μάρτυρες	16
Πρωτόκολλα	
■ Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx	17
■ Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των κιτ HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit και PyroMark KRAS Kit	19
■ Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση προϊόντων PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance	22
■ Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση Pyrosequencing στο σύστημα PyroMark Q24 MDx	24
■ Πρωτόκολλο 5: Λειτουργία του συστήματος PyroMark Q24 MDx	28
■ Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx	30
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	35
Παράρτημα Α: Ρύθμιση προσδιορισμών PyroMark KRAS	37
Παράρτημα Β: Άδειασμα του περιέκτη αποβλήτων και των δοχείων	39
Βιβλιογραφία	40
Πληροφορίες παραγγελιών	41

Περιεχόμενα του Kit

PyroMark KRAS Kit	(24)
Αρ. καταλόγου	971450
Αριθμός αντιδράσεων	24
Seq Primer KRAS 12/13	24 μl
Seq Primer KRAS 61	24 μl
PCR Primer KRAS 12/13	24 μl
PCR Primer KRAS 61	24 μl
wt KRAS Control DNA	100 μl
Mutant KRAS Control DNA	100 μl
Εγχειρίδιο	 1

Σύμβολα



Περιέχει αντιδραστήρια για <N> εξετάσεις



Ημερομηνία λήξης



Ιατροτεχνολογικό προϊόν για *in vitro* διαγνωστική χρήση



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιέχει



Αριθμός



Περιορισμοί θερμοκρασίας



Νόμιμος κατασκευαστής



Ανατρέξτε στις πληροφορίες που παρέχονται στο εγχειρίδιο



Σημαντική σημείωση

Αποστολή και αποθήκευση

Το kit PyroMark KRAS Kit αποστέλλεται σε ξηρό πάγο και θα πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ κατά την παραλαβή. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επανειλημμένη απόψυξη και κατάψυξη ($> 5\text{ x}$). Το kit PyroMark KRAS Kit παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit εφόσον φυλάσσεται υπό αυτές τις συνθήκες.

Χρήση για την οποία προορίζεται

Υπάρχει ισχυρή επικέντρωση στην ανάλυση μετάλλαξης του γονιδίου KRAS στην Ευρώπη λόγω της χορήγησης άδειας κυκλοφορίας, υπό προϋποθέσεις, των ranitumumab και cetuximab από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου για ασθενείς με μη μεταλλαγμένο (φυσικού τύπου) γονίδιο KRAS. Αυτό σημαίνει ότι τα φάρμακα ranitumumab και cetuximab μπορούν να χορηγηθούν μόνο σε ασθενείς στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί έλεγχος της κατάστασης μετάλλαξης του γονιδίου KRAS.

Η χρήση για την οποία προορίζεται είναι να βοηθήσει τους ιατρούς στην αναγνώριση ασθενών οι οποίοι πάσχουν από ορθοκολικό καρκίνο και είναι πιο πιθανό να ωφεληθούν από θεραπείες που στρέφονται ενάντια στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), όπως οι θεραπείες με ranitumumab και cetuximab. Προορίζεται ως επικουρικό μέσο άλλων προγνωστικών παραγόντων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την επιλογή κατάλληλων ασθενών για θεραπεία με αγωγές που στρέφονται ενάντια στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), με βάση την κατάσταση μετάλλαξης του ασθενούς στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS. Η κατάσταση μετάλλαξης του ασθενούς πρέπει να ληφθεί υπόψη σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες της νόσου προκειμένου να αποφασίσει ο κλινικός ιατρός σχετικά με τη θεραπεία. Η κατάσταση μετάλλαξης του γονιδίου KRAS δεν πρέπει να αποτελέσει τη μοναδική βάση επιλογής αγωγής σε καρκινοπαθείς.

Το προϊόν προορίζεται για ποσοτικές μετρήσεις μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS. Το προϊόν αποτελείται από 2 προσδιορισμούς: έναν ο οποίος ανιχνεύει μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 και έναν δεύτερο ο οποίος ανιχνεύει μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61. Και οι δύο προσδιορισμοί περιέχουν ειδικούς εκκινητές PCR και εκκινητή αλληλούχισης.

Περιορισμοί στη χρήση του προϊόντος

Τα αποτελέσματα από το προϊόν πρέπει να ερμηνεύονται στα πλαίσια όλων των σχετικών κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση μόνον από προσωπικό ειδικά εκπαιδευμένο και έμπειρο σε διαδικασίες *in vitro* διαγνωστικών προϊόντων και στο σύστημα PyroMark Q24 MDx.

Οι μελέτες επικύρωσης διενεργήθηκαν με χρήση ανθρώπινου DNA που εκχυλίστηκε από δείγματα όγκων τα οποία είχαν σταθεροποιηθεί με φορμόλη και εγκλειστεί σε παραφίνη.

Τα υλικά για τον καθαρισμό (απομόνωση) του DNA, την ενίσχυση με PCR και την παρασκευή του δείγματος για ανάλυση Pyrosequencing® δεν περιλαμβάνονται στο προϊόν. Το προϊόν έχει επικυρωθεί με προϊόντα καθαρισμού (απομόνωσης) DNA και αντιδραστήρια PCR από την QIAGEN. Χρησιμοποιήστε τα συνιστώμενα προϊόντα ενίσχυσης με PCR και καθαρισμού (απομόνωσης) DNA, όπως καθορίζονται στις σελίδες 14 και 15.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση μόνο με το σύστημα PyroMark Q24 MDx.

Επιβάλλεται η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήσης για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Αραίωση αντιδραστηρίων, διαφορετική από αυτήν που περιγράφεται σε αυτό το εγχειρίδιο, δεν συνιστάται και θα προκαλέσει μείωση της απόδοσης.

Πρέπει να δίνετε προσοχή στην ημερομηνία λήξης και τις συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Να μη χρησιμοποιούνται συστατικά των οποίων η ημερομηνία λήξης έχει παρέλθει ή συστατικά που δεν έχουν φυλαχθεί σωστά.

Τεχνική βοήθεια

Στην QIAGEN, είμαστε υπερήφανοι για την ποιότητα και τη διαθεσιμότητα της τεχνικής μας υποστήριξης. Τα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της εταιρείας μας στελεχώνονται από έμπειρους επιστήμονες με εκτεταμένη πρακτική και θεωρητική κατάρτιση στις τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών, καθώς και στη χρήση των προϊόντων της QIAGEN. Εάν έχετε τυχόν απορίες ή αντιμετωπίζετε τυχόν δυσκολίες σχετικά με το kit PyroMark KRAS Kit ή με προϊόντα της QIAGEN γενικά, μη διστάσετε να επικοινωνήσετε μαζί μας.

Οι πελάτες της QIAGEN αποτελούν σημαντική πηγή πληροφοριών σχετικά με προχωρημένες ή εξειδικευμένες χρήσεις των προϊόντων μας. Αυτές οι πληροφορίες βοηθούν άλλους επιστήμονες, καθώς επίσης και τους ερευνητές της QIAGEN. Συνεπώς, σας ενθαρρύνουμε να επικοινωνήσετε μαζί μας σε περίπτωση που έχετε τυχόν προτάσεις σχετικά με την απόδοση του προϊόντος ή σχετικά με νέες εφαρμογές και τεχνικές.

Για τεχνική βοήθεια και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Technical Support Center (Κέντρο τεχνικής υποστήριξης) της εταιρείας μας στην

ιστοσελίδα www.qiagen.com/Support ή επικοινωνήστε με τα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τους τοπικούς διανομείς (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με σήμα ISO σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του kit PyroMark KRAS Kit ελέγχεται ως προς προκαθορισμένες προδιαγραφές για να διασφαλιστεί η σταθερή ποιότητα των προϊόντων.

Πληροφορίες για την ασφάλεια

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, να φοράτε πάντοτε εργαστηριακή ποδιά, αναλώσιμα γάντια και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα Material Safety Data Sheets (δελτία δεδομένων ασφαλείας του προϊόντος) (MSDSs). Διατίθενται ηλεκτρονικά σε συμβατική και μορφή συμπιεσμένου αρχείου PDF στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/support/MSDS.aspx όπου μπορείτε να βρείτε, να δείτε και να εκτυπώσετε MSDS για κάθε kit και συστατικό kit της QIAGEN.

Πληροφορίες επείγουσας ανάγκης καθ' όλο το 24-ωρο

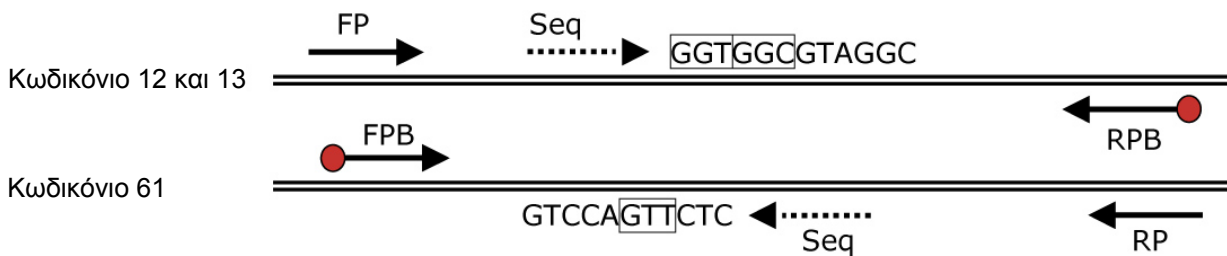
Μπορείτε να λάβετε ιατρικές πληροφορίες επείγουσας ανάγκης στα Αγγλικά, Γαλλικά και Γερμανικά 24 ώρες την ημέρα από το:

Die Beratungsstelle bei Vergiftungen (Κέντρο πληροφοριών δηλητηριάσεων)
Μάιντζ, Γερμανία

Τηλ.: +49-6131-19240

Εισαγωγή

Το kit PyroMark KRAS Kit που φέρει σήμανση CE-IVD προορίζεται για την ποσοτική μέτρηση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του ανθρώπινου γονιδίου KRAS. Το προϊόν αποτελείται από 2 προσδιορισμούς: έναν για την αναγνώριση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 και ένα δεύτερο για την αναγνώριση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 61. Οι δύο περιοχές ενισχύονται ξεχωριστά με PCR και αλληλουχίζονται στην προκαθορισμένη περιοχή. Οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις προκαθορισμένες θέσεις εξυπηρετούν ως κορυφές κανονικοποίησης και αναφοράς για την ποσοτικοποίηση και την αξιολόγηση της ποιότητας της ανάλυσης.



Εικόνα 1. Απεικόνιση του προσδιορισμού KRAS. Η αλληλουχία που υποδεικνύεται είναι η αλληλουχία η οποία αναλύεται για ένα κανονικό δείγμα. **FP** και **FPB**: Πρόσθιοι εκκινητές PCR (το B υποδεικνύει βιοτυνιλίωση), **RP** και **RPB**: Αντίστροφοι εκκινητές PCR (το B υποδεικνύει βιοτυνιλίωση), **Seq**: Εκκινητές αλληλούχισης.

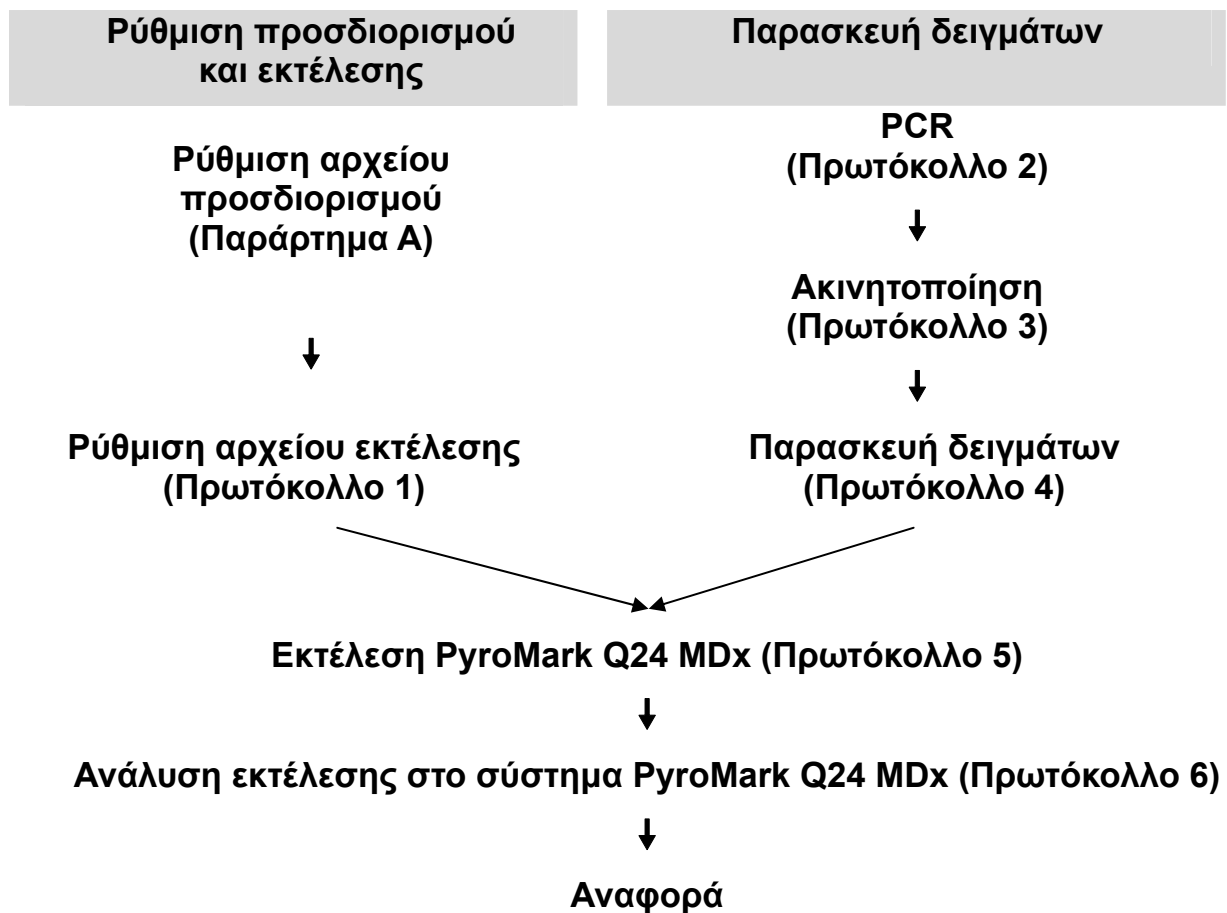
i Τα κωδικόνια 12 και 13 αλληλουχίζονται προς τα εμπρός, το κωδικόνιο 61 αλληλουχίζεται ανάστροφα.

Το προϊόν αποτελείται από μίγμα εκκινητών PCR και έναν εκκινητή αλληλούχισης για κάθε προσδιορισμό. Οι εκκινητές χορηγούνται σε διάλυμα. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 24 μl κάθε εκκινητή ή μίγματος εκκινητών.

Αρχή και διαδικασία

Η ροή εργασιών στη σελίδα 9 απεικονίζει τη διαδικασία του προσδιορισμού. Μετά την PCR με χρήση εκκινητών που στοχεύουν στα κωδικόνια 12/13 και στο κωδικόνιο 61, τα αμπλικόνια ακινητοποιούνται σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance. Παρασκευάζεται μονόκλωνο DNA και οι αντίστοιχοι εκκινητές αλληλούχισης υβριδοποιούν το DNA. Κατόπιν, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα PyroMark Q24 MDx χρησιμοποιώντας ένα αρχείο ρύθμισης εκτέλεσης και ένα αρχείο εκτέλεσης. Η επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία που θα αναλυθεί) μπορεί να προσαρμοστεί για την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων μετά από την εκτέλεση (βλ. «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 30 και Παράρτημα Α, σελίδα 37).

Ροή εργασιών της διαδικασίας PyroMark KRAS



Χαρακτηριστικά απόδοσης

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

Το όριο τυφλού (LOB) και το όριο ανίχνευσης (LOD) έχουν προσδιοριστεί για διάφορες μεταλλάξεις χρησιμοποιώντας μίγμα πλασμιδίων τα οποία είναι παρόμοια με αυτά τα οποία παρέχονται με το kit. Χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης.

- **Μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφής σε μια θέση τυφλού υπό άλλες συνθήκες:** Τα όρια LOB και LOD προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις της κατευθυντήριας οδηγίας EP17-A της NCCLS «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» (Πρωτόκολλο προσδιορισμού των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικοποίησης, εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία). Το σφάλμα συντελεστή άλφα και το σφάλμα συντελεστή βήτα (ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά, αντίστοιχα) ορίστηκε στο 5%.
- **Η μετάλλαξη GGT → GTT στο κωδικόνιο 12:** Αυτή η μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στις οποίες περιλαμβάνονται μονές και διπλές κορυφές και δεν δίνει γραμμική απόκριση σε χαμηλά επίπεδα

μεταλλάξεων. Αυτή η θέση έδωσε όριο LOB το οποίο ήταν σταθερά 0% (ποσοστιαίες) μονάδες ($n = 72$). Το χαμηλότερο σήμα το οποίο υποδεικνύει την παρουσία μετάλλαξης σε αυτή τη θέση καθορίστηκε στην 1% μονάδα, το οποίο είναι σαφώς υψηλότερο από το σταθερό επίπεδο γραμμής βάσης της 0% μονάδας. Κατά την ανάλυση ενός δείγματος που περιέχει μεταλλάξεις 7% μονάδων, το 95% των αποτελεσμάτων ($n = 89$) έδωσε σήμα που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως θετικό ($\geq 1\%$ μονάδα). Συνεπώς το όριο LOD για αυτή τη μετάλλαξη καθορίστηκε στις 7% μονάδες και όλα τα δείγματα που έδωσαν σήμα υψηλότερο από 1% μονάδα θεωρήθηκαν ως θετικά για αυτή τη μετάλλαξη.

Πίνακας 1. Τα όρια LOB και LOD τα οποία προσδιορίστηκαν για συγκεκριμένες μεταλλάξεις

Μετάλλαξη	LOB (%)	LOD (%)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ Σ COSMIC* (V42)
Κωδικόνιο 12 (GGT)			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	μ.δ.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
Κωδικόνιο 13 (GGC)			
GAC	0,3	1,9	532
Κωδικόνιο 61 (CAA), όπως αναλύθηκε αντίστροφα (TTG)			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

* Από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), ο οποίος διατίθεται ηλεκτρονικά από το Sanger Institute στην ιστοσελίδα www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

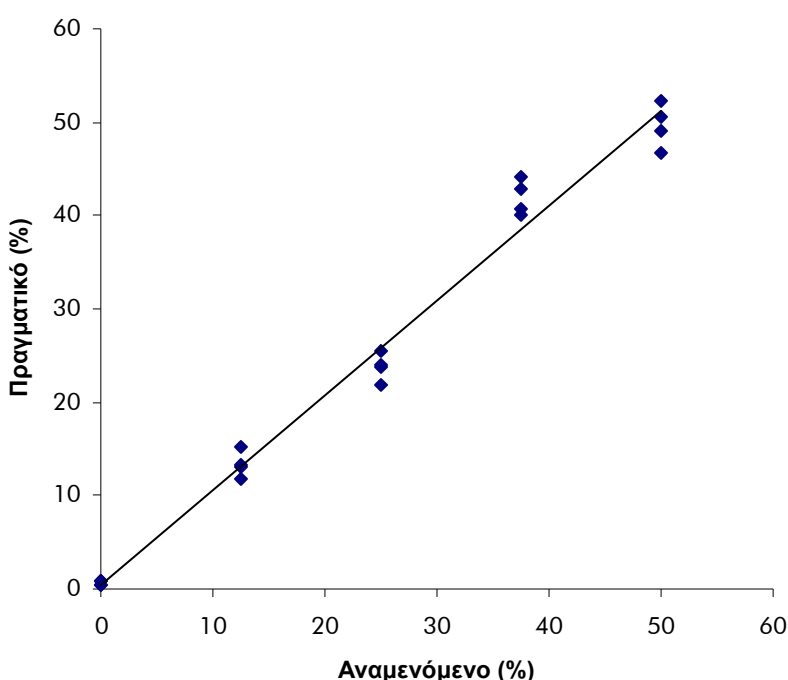
μ.δ.: μη διαθέσιμο.

ⓘ Αυτές οι τιμές βασίστηκαν σε εκτελέσεις στις οποίες το σήμα ήταν υψηλότερο από 60 RLU, το οποίο τυπικά λαμβάνεται από 10 ng DNA που έχει απομονωθεί από ιστό ο οποίος έχει σταθεροποιηθεί με φορμόλη και εγκλειστεί σε παραφίνη. Συνιστάται η επικύρωση της απόδοσης της μεθόδου στο εργαστήριο.

Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα μετρήθηκε σύμφωνα με το έγγραφο EP6-A του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute) «Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline» (Αξιολόγηση της γραμμικότητας διαδικασιών ποσοτικής μέτρησης: στατιστική προσέγγιση, εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία).

Οι φυσιολογικές και οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες αναμίχθηκαν σε αναλογίες για να δώσουν τα ακόλουθα επίπεδα μετάλλαξης: 0, 12,5, 25, 37,5 και 50%. Τοποθετήθηκαν σε τυχαία σειρά σε μια πλάκα και αναλύθηκαν τέσσερα αντίγραφα των μιγμάτων. Τα αποτελέσματα για τη μετάλλαξη GGT → TGT στο κωδικόνιο 12 αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Analyse-it® v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) και εμφανίζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Γραμμικότητα της μετάλλαξης GGT → TGT στο κωδικόνιο 12.

Η συνολική επαναληψιμότητα ήταν 1,64% μονάδες και τα αποτελέσματα ήταν γραμμικά εντός αποδεκτής μη γραμμικότητας 3%. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τη μετάλλαξη GGC → GAC στο κωδικόνιο 13.

Ενδιάμεση ακρίβεια

Ο προσδιορισμός της γραμμικότητας της μετάλλαξης GGT → TGT στο κωδικόνιο 12 επαναλήφθηκε από 3 χειριστές σε 3 διαφορετικές ημέρες χρησιμοποιώντας το όργανο PyroMark Q24 MDx και αντιδραστήρια PyroMark Gold Q24 Reagents. Τα αποτελέσματα των 3 εκτελέσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Ενδιάμεση ακρίβεια

Αναμενόμενη τιμή	Εκτέλεση 1		Εκτέλεση 2		Εκτέλεση 3		Συνολικά	
	Μέση τιμή	T.A.	Μέση τιμή	T.A.	Μέση τιμή	T.A.	Μέση τιμή	T.A.
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

Όλες οι τιμές δίνονται σε % (εκατοστιαίες) μονάδες. T.A.: τυπική απόκλιση.

Οι τιμές της ενδιάμεσης ακρίβειας (T.A.) ήταν συνεπώς 0,6–2,0% μονάδες σε εύρος μέτρησης 0–50%.

Διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα

Το kit PyroMark KRAS Kit αξιολογήθηκε σε μια μελέτη. Σε σύγκριση με το DxS Therascreen®: kit K-RAS Mutation Kit, αναλύθηκαν 100 δείγματα πιθανού ορθοκολικού καρκίνου για μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13.

Απομονώθηκε DNA για έλεγχο χρησιμοποιώντας το kit EZ1 DNA Tissue Kit και η ανάλυση διενεργήθηκε με το kit PyroMark KRAS Kit στο σύστημα PyroMark Q24 MDx και με το Therascreen: kit K-RAS Mutation Kit στο ABI PRISM® 7900HT SDS.

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν, η κατάσταση μεταλλάξεων ήταν δυνατό να προσδιοριστεί σε 91 δείγματα με την ανάλυση DxS. Με την ανάλυση Pyrosequencing κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της κατάστασης μεταλλάξεων για 94 δείγματα για τα κωδικόνια 12 και 13.

Εξαιρουμένων των δειγμάτων που δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν με το ένα ή και τα δύο kit, υπήρξε μια συσχέτιση 100% του kit PyroMark KRAS Kit συγκριτικά με το Therascreen: kit K-RAS Mutation Kit. Η διαγνωστική ευαισθησία του kit PyroMark KRAS Kit ήταν 100% και η ειδικότητα 100% (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα των δειγμάτων με πιθανό ορθοκολικό καρκίνο τα οποία αναλύθηκαν για τα κωδικόνια 12 και 13

		Therascreen: K-RAS Mutation Kit		
		Μεταλλαγμένο	φυσ. τύπου	Σύνολο
PyroMark KRAS Kit	Μεταλλαγμένο	33	0	33
	φυσ. τύπου	0	57	57

Ανάλυση κωδικονίου 61

Τα ίδια 100 δείγματα αναλύθηκαν για μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 χρησιμοποιώντας το kit PyroMark KRAS Kit. Μόνον ένα δείγμα δεν πέρασε με επιτυχία την αξιολόγηση ποιότητας για τον προσδιορισμό του κωδικονίου 61. Αυτό το δείγμα απέτυχε επίσης στον προσδιορισμό PyroMark και στον προσδιορισμό Therascreen για τα κωδικόνια 12 και 13, υποδεικνύοντας ότι το DNA ήταν πολύ χαμηλής ποιότητας. Το υψηλότερο ποσοστό επιτυχίας του προσδιορισμού για το κωδικόνιο 61 υποδεικνύει ότι εξαρτάται σε μικρότερο βαθμό από την ποιότητα του DNA από τους προσδιορισμούς PyroMark και Therascreen για τα κωδικόνια 12 και 13. Καθώς ο προσδιορισμός Therascreen δεν ελέγχει μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61, δεν είναι δυνατή η άμεση σύγκριση των προσδιορισμών.

Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 ανιχνεύτηκαν σε 4 από τα 99 δείγματα. Τρία περιελάμβαναν συχνές μεταλλάξεις (CAC, CAT, CTA) στο κωδικόνιο 61, ενώ το τέταρτο δείγμα περιείχε μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 60 (GGT → GGA) και στο κωδικόνιο 61 (CAA → AAA).

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που παρέχονται από το χρήστη

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, να φοράτε πάντοτε εργαστηριακή ποδιά, αναλώσιμα γάντια και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα Material Safety Data Sheets (δελτία δεδομένων ασφαλείας του προϊόντος) (MSDSs), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. «Απομόνωση DNA», σελίδα 15)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρα
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου εργασίας*
- Αντιδραστήρια PCR (το κιτ PyroMark KRAS Kit πιστοποιήθηκε με χρήση του κιτ HotStarTaq[®] Plus Master Mix Kit, αρ. κατ. 203643, 203645 ή 203646)
- Θερμοκυκλοποιητής* και κατάλληλα σωληνάρια PCR
- Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Healthcare, αρ. κατ. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 MDx (αρ. κατ. 9001513)*[†]
- PyroMark Q24 MDx Software (αρ. κατ. 9019063)[†]
- PyroMark Q24 Plate (αρ. κατ. 979301)[†]
- PyroMark Q24 Cartridge (αρ. κατ. 979302)[†]
- PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (αρ. κατ. 9001515 ή 9001517)*[†]
- PyroMark Gold Reagents (αρ. κατ. 971802)[†]
- PyroMark Binding Buffer (αρ. κατ. 979306)[†]
- PyroMark Denaturation Solution (αρ. κατ. 979307)[†]
- PyroMark Wash Buffer, συμπύκνωμα (αρ. κατ. 979308)[†]
- PyroMark Annealing Buffer (αρ. κατ. 979309)[†]
- Ανακινήτηρας πλακών* για ακινητοποίηση σε σφαιρίδια
- Θερμαντικό στοιχείο* ικανό για επίτευξη θερμοκρασίας 80 °C
- Πλάκα ή ταινίες PCR με 24 πηγάδια
- Πώματα ταινιών
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q[®] 18,2 MΩ x cm ή ισοδύναμο)
- Αιθανόλη (70%)

* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις των κατασκευαστών.

[†] Σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Όλα τα άλλα προϊόντα που παρατίθενται δεν φέρουν σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Σημαντικές σημειώσεις

Γενικές προφυλάξεις

- ① Ο χρήστης θα πρέπει πάντοτε να προσέχει τα εξής:
 - Να χρησιμοποιεί στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρα.
 - Να φυλάσσει και να εκχυλίζει τα θετικά υλικά (παρασκευάσματα, θετικούς μάρτυρες και αμπλικόνια) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και να τα προσθέτει στο μίγμα της αντίδρασης σε μια χωρικά διαχωρισμένη εγκατάσταση.
 - Αποψύξτε όλα τα συστατικά ενδεδειγμένα σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) προτού ξεκινήσετε έναν προσδιορισμό.
 - Κατά την απόψυξη, αναμείξτε τα συστατικά (με μεταφορά με πιπέτα επανειλημμένα επάνω-κάτω ή με παλμικό αναδευτήρα τύπου vortex) και φυγοκεντρήστε για λίγο.

Υλικό δείγματος

- ① Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα ως δυνητικά μολυσματικό υλικό.

Το υλικό του παρασκευάσματος είναι ανθρώπινο DNA που εκχυλίστηκε από αίμα ή δείγματα τα οποία είχαν σταθεροποιηθεί με φορμόλη και εγκλειστεί σε παραφίνη.

- ① Τα δείγματα που προέρχονται από ανθρώπους οι οποίοι υποβάλλονται σε αγωγή με ηπαρίνη δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. Δείγματα αίματος που έχουν συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιέχουν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Η ηπαρίνη επηρεάζει την PCR.

Απομόνωση DNA

Τα kit από την QIAGEN που εμφανίζονται στον πίνακα 4 συνιστώνται για τον καθαρισμό (απομόνωση) DNA από του υποδεικνυόμενους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων για χρήση με το kit PyroMark KRAS Kit. Διενεργήστε τον καθαρισμό (απομόνωση) του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στα εγχειρίδια των kit.

Πίνακας 4. Κιτ καθαρισμού (απομόνωσης) DNA τα οποία συνιστώνται για χρήση με το κιτ PyroMark KRAS Kit

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου (QIAGEN)
Ιστός ο οποίος έχει εγκλειστεί σε παραφίνη	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1® DNA Tissue Kit (48)*	953034
Αίμα	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Ακολουθώντας το πρωτόκολλο για χρήση με ιστό ο οποίος έχει εγκλειστεί σε παραφίνη. Το κιτ EZ1 DNA Tissue Kit προορίζεται να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την κάρτα EZ1 Advanced (αρ. κατ. 9001410 ή 9001411) και την κάρτα EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018298), με την κάρτα EZ1 Advanced XL (αρ. κατ. 9001492 ή 9001493) και την κάρτα EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018700) ή με την κάρτα BioRobot® EZ1 (αρ. κατ. 9000705, η οποία δεν διατίθεται πλέον) και την κάρτα EZ1 DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9015862).

† Σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Μάρτυρες

ⓘ Περιλαμβάνονται δύο θετικοί μάρτυρες στο προϊόν. Αυτοί εξυπηρετούν το ρόλο του μάρτυρα για τις αντιδράσεις PCR και τις αντιδράσεις αλληλούχισης. Το wt KRAS Control DNA περιέχει τη φυσιολογική ακολουθία KRAS και το Mutant KRAS Control DNA περιέχει μεταλλάξεις και στα 3 κωδικόνια. Και οι δύο μάρτυρες παρουσιάζουν ανταλλαγή βάσεων στο κωδικόνιο 15 και στο κωδικόνιο 59 για να διακρίνονται από το γενωμικό DNA. Οι μάρτυρες μπορούν είτε να περιλαμβάνονται ξεχωριστά στην ανάλυση είτε να αναμειγνύονται στις προτιμώμενες αναλογίες. Οι αλληλουχίες των μαρτύρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

ⓘ Για την ανάλυση του Mutant KRAS Control DNA, ρυθμίστε την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) σε **NGTGRCGTAGGYA**, στοχεύοντας στην πρώτη βάση του κωδικονίου 12 (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 37).

Πίνακας 5. Αλληλουχίες των μαρτύρων

Μάρτυρας	Κωδικόνιο 12	Κωδικόνιο 13	Κωδικόνιο 15	Κωδικόνιο 59	Κωδικόνιο 61
Φυσιολογικός	GGT	GGC	GGT	GTA	CAA
Μεταλλαγμένος	TGT	GAC	GGT	GTA	CAC

ⓘ Επιπλέον, θα πρέπει πάντοτε να περιλαμβάνεται ένας αρνητικός μάρτυρας (χωρίς μήτρα DNA).

Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx



Σημαντική σημείωση προτού ξεκινήσετε


- Εάν απαιτείται, το όριο LOB μπορεί να επιβεβαιωθεί χρησιμοποιώντας ένα φυσιολογικό δείγμα ή το wt KRAS Control DNA που παρέχονται για να δημιουργηθεί μια πλήρης πλάκα αποτελεσμάτων. Για λεπτομέρειες, συμβουλευτείτε την κατευθυντήρια οδηγία EP17-A της NCCLS «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» (Πρωτόκολλο προσδιορισμού των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικοποίησης, εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία).

Πράγματα που πρέπει να κάνετε προτού ξεκινήσετε

- Δημιουργήστε μια ρύθμιση προσδιορισμού, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα Α. Αυτό πρέπει να γίνει μία φορά μόνο, πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού PyroMark KRAS για πρώτη φορά (βλ. Παράρτημα Α, σελίδα 37).


Διαδικασία

1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων.
Δημιουργείται ένα νέο αρχείο εκτέλεσης.
2. Καταχωρίστε τις παραμέτρους εκτέλεσης (βλ. «Παράμετροι εκτέλεσης» παρακάτω).
3. Ρυθμίστε την πλάκα προσθέτοντας προσδιορισμούς και για τα δύο κωδικόνια 12/13, καθώς και για το κωδικόνιο 61 στα πηγάδια που αντιστοιχούν στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν. Συνιστώνται ως μάρτυρες ένα αρνητικό δείγμα (χωρίς DNA), το wt KRAS Control DNA και το Mutant KRAS Control DNA, οι οποίοι παρέχονται.
4. Όταν η εκτέλεση έχει ρυθμιστεί και είναι έτοιμη να εκτελεστεί στο σύστημα PyroMark Q24 MDx: Εκτυπώστε μια λίστα των απαιτούμενων όγκων μίγματος ενζύμων, μίγματος υποστρωμάτων και νουκλεοτιδίων, καθώς και τη ρύθμιση της πλάκας. Επιλέξτε «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) από το μενού «Tools» (Εργαλεία) και, όταν εμφανιστεί η αναφορά, κάντε κλικ στο . Κλείστε το αρχείο εκτέλεσης και αντιγράψτε το σε ένα USB stick (παρέχεται μαζί με το σύστημα) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα εξερεύνησης των Windows®.

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

Για εκτέλεση ανάλυσης της πλάκας στο σύστημα PyroMark Q24 MDx, βλ. «Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση ανάλυσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 28.

Παράμετροι εκτέλεσης

Run name (Όνομασία εκτέλεσης):	Η ονομασία της εκτέλεσης δίνεται όταν αποθηκεύεται το αρχείο. Η μετονομασία του αρχείου αλλάζει επίσης την ονομασία της εκτέλεσης.
Instrument method (Μέθοδος οργάνου):	Επιλέξτε τη μέθοδο του οργάνου σύμφωνα με τα αντιδραστήρια και τη φύσιγγα που θα χρησιμοποιηθούν για την εκτέλεση. Δείτε τις οδηγίες οι οποίες παρέχονται με τα προϊόντα.
Plate ID (Κωδικός αναγνώρισης πλάκας):	Προαιρετικό: Καταχωρίστε τον κωδικό αναγνώρισης της πλάκας PyroMark Q24 Plate.
Bar code (Γραμμωτός κωδικός):	Προαιρετικό: Καταχωρίστε τον αριθμό του γραμμωτού κωδικού της πλάκας ή, εάν διαθέτετε συσκευή ανάγνωσης γραμμωτών κωδικών συνδεδεμένη με τον υπολογιστή σας, τοποθετήστε το δρομέα του ποντικιού στο πλαίσιο κειμένου «Barcode» (Γραμμωτός κωδικός) (κάνοντας κλικ στο πλαίσιο) και σαρώστε τον γραμμωτό κωδικό.
Reagent ID (Κωδικός αναγνώρισης αντιδραστηρίου):	Προαιρετικό: Καταχωρίστε τον αριθμό παρτίδας των αντιδραστηρίων PyroMark Gold Q24 Reagents που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Ο αριθμός παρτίδας μπορεί να βρεθεί στην ετικέτα του προϊόντος.
	 Συνιστάται η καταχώριση του κωδικού αναγνώρισης αντιδραστηρίου προκειμένου να μπορούν να εντοπιστούν τυχόν μη αναμενόμενα προβλήματα με τα αντιδραστήρια.
Run note (Σημείωση εκτέλεσης):	Προαιρετικό: Καταχωρίστε μια σημείωση σχετικά με τα περιεχόμενα ή τον σκοπό της εκτέλεσης.

Προσθήκη αρχείων προσδιορισμού

Για την προσθήκη ενός προσδιορισμού σε ένα πηγάδι, μπορείτε είτε να:

- κάνετε δεξί κλικ στο πηγάδι και να επιλέξετε «Load Assay» (Φόρτωση προσδιορισμού) από το μενού περιεχομένου.
- να επιλέξετε τον προσδιορισμό στο πρόγραμμα περιήγησης συντομεύσεων και να κάνετε κλικ και να σύρετε τον προσδιορισμό στο πηγάδι.

Κάθε πηγάδι φέρει χρωματική κωδικοποίηση σύμφωνα με τον προσδιορισμό που έχει φορτωθεί σε αυτό.

Καταχώριση κωδικών αναγνώρισης δειγμάτων και σημειώσεων

Για την καταχώριση κωδικού αναγνώρισης δείγματος ή σημείωσης, επιλέξτε το κελί και καταχωρίστε το κείμενο.

Για την επεξεργασία κωδικού αναγνώρισης δείγματος ή σημείωσης, είτε επιλέξτε το κελί (θα επιλεγούν τα τρέχοντα περιεχόμενα) είτε κάντε διπλό κλικ στο κελί.

Πρωτόκολλο 2: PCR με χρήση των κιτ HotStarTaq Plus Master Mix Kit και PyroMark KRAS Kit

Αυτό το πρωτόκολλο προορίζεται για ενίσχυση με PCR μια περιοχής η οποία περιέχει το κωδικόνιο 12 και το κωδικόνιο 13, καθώς και μια ξεχωριστή ενίσχυση με PCR μιας περιοχής η οποία περιέχει το κωδικόνιο 61 χρησιμοποιώντας το κιτ PyroMark KRAS Kit.

Σημαντικές σημειώσεις προτού ξεκινήσετε

- Η HotStarTaq Plus DNA Polymerase απαιτεί ένα βήμα ενεργοποίησης διάρκειας **5 λεπτών σε θερμοκρασία 95 °C** (βλ. *Εγχειρίδιο PCR HotStarTaq Plus*).
- Ρύθμιση όλων των μιγμάτων αντίδρασης σε μια περιοχή ξεχωριστή από αυτήν η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό (απομόνωση) DNA, προσθήκη μήτρας DNA στην PCR, ανάλυση προϊόντων PCR ή παρασκευή δειγμάτων πριν από την ανάλυση Pyrosequencing.
- Χρησιμοποιήστε αναλώσιμα ρύγχη τα οποία περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα για την ελαχιστοποίηση τυχόν διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

Πράγματα που πρέπει να κάνετε προτού ξεκινήσετε

- Πριν από το άνοιγμα των σωληναρίων με εκκινητές PCR, φυγοκεντρήστε για λίγο προκειμένου να συγκεντρωθούν τα περιεχόμενα στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσαρμόστε τη συγκέντρωση DNA του δείγματος, εάν είναι απαραίτητα, έως τα 0,4–2 ng/μl.

Διαδικασία

- 1. Αποψύξτε τα διαλύματα εκκινητών και το νουκλεϊκό οξύ της μήτρας.**
Αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση.
- 2. Παρασκευάστε ένα μίγμα αντίδρασης για κάθε σετ εκκινητών PCR, σύμφωνα με τον Πίνακα 6.**

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

Παρασκευάστε έναν όγκο μίγματος αντίδρασης μεγαλύτερο από αυτόν ο οποίος απαιτείται για το συνολικό αριθμό προσδιορισμών PCR οι οποίοι πρόκειται να εκτελεστούν.

Πίνακας 6. Παρασκευή μίγματος αντίδρασης για κάθε μίγμα εκκινήτων PCR

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, 2x	12,5 μ l
PCR Primer KRAS 12/13 ή PCR Primer KRAS 61	1 μ l
Νερό υψηλής καθαρότητας	6,5 μ l
Συνολικός όγκος	20 μl

3. Αναμίξτε ενδελεχώς το μίγμα της αντίδρασης και διανείμετε 20 μ l σε κάθε σωληνάριο PCR.

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

4. Προσθέστε 5 μ l μήτρας DNA (2–10 ng γενωμικού DNA) στα μεμονωμένα σωληνάρια PCR (βλ. Πίνακα 7) και αναμίξτε ενδελεχώς.

i Θα πρέπει πάντοτε να περιλαμβάνεται ένας αρνητικός μάρτυρας (χωρίς μήτρα DNA).

i Συμπεριλάβετε αντιδράσεις με το wt KRAS Control DNA και το Mutant KRAS Control DNA ως θετικούς μάρτυρες (βλ. «Μάρτυρες», σελίδα 16).

Πίνακας 7. Προετοιμασία της PCR

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση
Μίγμα αντίδρασης	20 μ l
DNA δείγματος	5 μ l
Συνολικός όγκος	25 μl

5. Προγραμματίστε το θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο κυκλοποίησης

			Σχόλια
Αρχικό βήμα ενεργοποίησης:	5 λεπτά	95 °C	Η HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase ενεργοποιείται από αυτό το βήμα θέρμανσης.
Κυκλοποίηση 3 βημάτων:			
Αποδιάταξη	20 s	95 °C	
Υβριδοποίηση	30 s	53 °C	
Επέκταση	20 s	72 °C	
Αριθμός κύκλων	40		
Τελική επέκταση:	5 λεπτά	72 °C	

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

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

Αυτό το πρωτόκολλο προορίζεται για την ακίνητοποίηση της μήτρας DNA σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) πριν από την ανάλυση στο σύστημα PyroMark Q24 MDx.

Πράγματα που πρέπει να κάνετε προτού ξεκινήσετε

- Αφήστε όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια και διαλύματα να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) προτού ξεκινήσετε.

Διαδικασία

1. Ανακινήστε με ήπιες κινήσεις τη φιάλη που περιέχει τα σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.
2. Παρασκευάστε το κύριο μίγμα για την ακίνητοποίηση του DNA σύμφωνα με τον Πίνακα 9. Παρασκευάστε όγκο κατά 10% μεγαλύτερο από αυτόν ο οποίος απαιτείται για το συνολικό αριθμό αντιδράσεων οι οποίες πρόκειται να εκτελεστούν.

Πίνακας 9. Κύριο μίγμα για την ακίνητοποίηση του DNA


Συστατικό	Όγκος/δείγμα
Streptavidin Sepharose High Performance	2 μ l
PyroMark Binding Buffer	40 μ l
Νερό υψηλής καθαρότητας	28 μ l
Συνολικός όγκος	70 μl

3. Προσθέστε 70 μ l του κυρίου μίγματος στα πηγάδια της πλάκας ή των ταινιών 24 πηγαδιών PCR, όπως προκαθορίζεται στη ρύθμιση της εκτέλεσης (Βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 17).
4. Προσθέστε 10 μ l βιοτυνιλιωμένου προϊόντος PCR από το Πρωτόκολλο 2 σε κάθε πηγάδι που περιέχει το κύριο μίγμα, όπως προκαθορίζεται στη ρύθμιση της εκτέλεσης (Βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 17).




Ο συνολικός όγκος ανά πηγάδι θα πρέπει να είναι 80 μ l μετά την προσθήκη του κυρίου μίγματος και του προϊόντος PCR.


5. Σφραγίστε την πλάκα (ή τις ταινίες) PCR χρησιμοποιώντας πώματα ταινιών.

 Βεβαιωθείτε ότι δεν είναι δυνατή τυχόν διαρροή μεταξύ των πηγαδιών.

6. Αναδεύστε την πλάκα PCR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) επί 5–10 λεπτά στις 1400 σ.α.λ. (rpm).

 Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, προετοιμάστε το σταθμό εργασίας PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation για την παρασκευή των δειγμάτων, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος PyroMark Q24*.

7. Προχωρήστε αμέσως στο «Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση Pyrosequencing στο σύστημα PyroMark Q24 MDx».

 Τα σφαιρίδια Sepharose καθιζάνουν ταχέως. Η σύλληψη των σφαιριδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την ανάδευση.

Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση Pyrosequencing στο σύστημα PyroMark Q24 MDx

Αυτό το πρωτόκολλο προορίζεται για την παρασκευή μονόκλωνου DNA και την υβριδοποίηση του εκκινητή αλληλούχισης στη μήτρα πριν από την ανάλυση Pyrosequencing στο σύστημα PyroMark Q24 MDx.

Σημαντικές σημειώσεις προτού ξεκινήσετε

- Πριν από το άνοιγμα των σωληναρίων με εκκινητές αλληλούχισης, φυγοκεντρήστε για λίγο προκειμένου να συγκεντρωθούν τα περιεχόμενα στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσθέστε τους 2 διαφορετικούς εκκινητές αλληλούχισης με τον ίδιο τρόπο, όπως προκαθορίζεται για την πλάκα στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 17), ανάλογα με την περιοχή της ανάλυσης (κωδικόνια 12 και 13 ή κωδικόνιο 61).

Πράγματα που πρέπει να κάνετε προτού ξεκινήσετε

- Τοποθετήστε τη διάταξη συγκράτησης πλακών PyroMark Q24 Plate Holder σε ένα θερμαντικό στοιχείο σε θερμοκρασία 80 °C για χρήση στο βήμα 17.

Διαδικασία

1. **Αραιώστε επαρκή ποσότητα κάθε εκκινητή αλληλούχισης, Seq Primer KRAS 12/13 και Seq Primer KRAS 61, σε ρυθμιστικό διάλυμα PyroMark Annealing Buffer, όπως εμφανίζεται στον Πίνακα 10.**
Παρασκευάστε έναν όγκο αραιωμένου εκκινητή αλληλούχισης μεγαλύτερο από αυτόν ο οποίος απαιτείται για το συνολικό αριθμό δειγμάτων τα οποία πρόκειται να αλληλουχιστούν (για τον αριθμό των δειγμάτων + ένα επιπλέον).

Πίνακας 10. Υπόδειγμα αραιώσης των εκκινητών αλληλούχισης

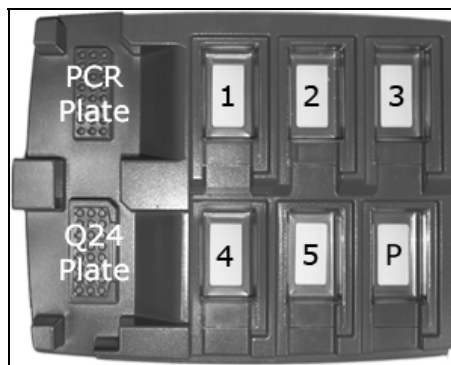
Συστατικό	Όγκος/δείγμα	Όγκος για 9 + 1 αντιδράσεις
Seq Primer KRAS 12/13 ή Seq Primer KRAS 61	0,8 μl	8 μl
PyroMark Annealing Buffer	24,2 μl	242 μl
Συνολικός όγκος	25 μl	250 μl

2. Προσθέστε 25 μl αραιωμένου εκκινητή αλληλούχισης σε κάθε πηγάδι της πλάκας PyroMark Q24 Plate σύμφωνα με τη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 17).

i Διατηρήστε μία από τις διατάξεις συγκράτησης πλακών PyroMark Q24 Plate Holders (παρέχονται μαζί με το σταθμό εργασίας PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) και χρησιμοποιήστε την ως υποστήριγμα κατά την προετοιμασία και τη μετακίνηση της πλάκας.

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

i Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα έχει τον ίδιο προσανατολισμό που είχε κατά την φόρτωση των δειγμάτων.



Εικόνα 3. Τοποθέτηση της πλάκας (ή των ταινιών) PCR της πλάκας PyroMark Q24 Plate στο σταθμό εργασίας κενού.

4. Εφαρμόστε κενό στο εργαλείο ανοίγοντας τον διακόπτη κενού.
5. Χαμηλώστε προσεκτικά τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου στην πλάκα (ή τις ταινίες) PCR για τη σύλληψη των σφαιριδίων τα οποία περιέχουν την ακινητοποιημένη μήτρα. Κρατήστε τις μεταλλικές ράβδους στη θέση τους επί 15 δευτερόλεπτα. Προσέξτε κατά την ανύψωση του εργαλείου.

i Τα σφαιρίδια Sepharose καθιζάνουν ταχέως. Εάν έχει παρέλθει πάνω από 1 λεπτό από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταινιών), αναδεύστε ξανά επί 1 λεπτό πριν από τη σύλληψη των σφαιριδίων.

6. Μεταφέρετε το εργαλείο στο δοχείο το οποίο περιέχει αιθανόλη 70% (δοχείο 1). Εκπλύνετε τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου επί 5 δευτερόλεπτα.
7. Μεταφέρετε το εργαλείο στο δοχείο το οποίο περιέχει διάλυμα αποδιάταξης (δοχείο 2). Εκπλύνετε τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου επί 5 δευτερόλεπτα.

8. Μεταφέρετε το εργαλείο στο δοχείο το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (δοχείο 3). Εκπλύνετε τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου επί 10 δευτερόλεπτα.
9. Ανασηκώστε το εργαλείο προς τα επάνω και πίσω, πέρα από τις 90° καθέτως, επί 5 δευτερόλεπτα για να αποστραγγίξετε το υγρό από τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου (βλ. Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απεικόνιση του εργαλείου κενού ανυψωμένου πέραν των 90° καθέτως.

10. Ενώσω κρατάτε το εργαλείο επάνω από την πλάκα PyroMark Q24 Plate, κλείστε το διακόπτη κενού του εργαλείου (Off) (Απενεργοποίηση).
11. Απελευθερώστε τα σφαιρίδια στην πλάκα που περιέχει τους εκκινητές Seq Primer ανακινώντας με ήπιες κινήσεις το εργαλείο δεξιά-αριστερά. Αφήστε τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου να ακουμπήσουν στον πυθμένα των πηγαδιών.
12. Μεταφέρετε το εργαλείο στο δοχείο το οποίο περιέχει νερό χωρίς νουκλεάση (δοχείο 4) και αναδεύστε επί 10 δευτερόλεπτα.
13. Πλύνετε τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου χαμηλώνοντας τις μεταλλικές ράβδους στο νερό που δεν περιέχει νουκλεάση (δοχείο 5) και εφαρμόζοντας κενό. Εκπλύνετε τις μεταλλικές ράβδους με 70 ml νερό που δεν περιέχει νουκλεάση.
14. Ανασηκώστε το εργαλείο προς τα επάνω και πίσω, πέρα από τις 90° καθέτως, επί 5 δευτερόλεπτα για να αποστραγγίξετε το υγρό από τις μεταλλικές ράβδους του φίλτρου (βλ. Εικόνα 4).
15. Κλείστε το διακόπτη κενού του εργαλείου (Off) (Απενεργοποίηση) και τοποθετήστε το εργαλείο σε θέση στάσης (P).
16. Απενεργοποιήστε την αντλία κενού.

i Στο τέλος κάθε εργάσιμης ημέρας, θα πρέπει να απορρίπτετε τα υγρά απόβλητα και τα διαλύματα που έχουν απομείνει και θα πρέπει να ελέγχετε το σταθμό εργασίας PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation για τυχόν σκόνη και έκχυση υγρών. Βλ. Παράρτημα Β, σελίδα 39.

17. Θερμάνετε την πλάκα PyroMark Q24 Plate με τα δείγματα σε θερμοκρασία 80 °C επί 2 λεπτά χρησιμοποιώντας τη διάταξη

συγκράτησης πλακών PyroMark Q24 Plate Holder την οποία έχετε προθερμάνει.

18. Αφαιρέστε την πλάκα PyroMark Q24 Plate από τη διάταξη συγκράτησης πλακών και αφήστε τα δείγματα να κρυώσουν για να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) επί τουλάχιστον 5 λεπτά.
19. Προχωρήστε στο «Πρωτόκολλο 5: Λειτουργία του συστήματος PyroMark Q24 MDx».

Πρωτόκολλο 5: Λειτουργία του συστήματος PyroMark Q24 MDx

Αυτό το πρωτόκολλο περιγράφει τη φόρτωση των αντιδραστηρίων PyroMark Gold Q24 Reagents στο φυσίγγιο PyroMark Q24 Cartridge, καθώς και την έναρξη και την ολοκλήρωση μιας εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx. Για λεπτομερή περιγραφή σχετικά με τον τρόπο ρύθμισης μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος PyroMark Q24*.





Σημαντική σημείωση προτού ξεκινήσετε


- Η αναφορά «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση), βρίσκεται στο μενού «Tools» (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. «Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx», σελίδα 17), παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον όγκο των νουκλεοτιδίων, του ενζύμου και του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος τα οποία απαιτούνται για ένα συγκεκριμένο προσδιορισμό.

Διαδικασία

1. Φορτώστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 Cartridge με τους κατάλληλους όγκους νουκλεοτιδίων, ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος.
2. Ανοίξτε τη θύρα φυσιγγίων και εισαγάγετε το φυσίγγιο αντιδραστηρίων το οποίο έχετε πληρώσει με την ετικέτα στραμμένη προς τα έξω. Ωθήστε το φυσίγγιο πλήρως προς τα μέσα και κατόπιν πιέστε το προς τα κάτω.
3. Βεβαιωθείτε ότι η γραμμή είναι ορατή μπροστά από το φυσίγγιο και κλείστε τη θύρα.
4. Ανοίξτε το πλαίσιο συγκράτησης πλακών και τοποθετήστε την πλάκα στο θερμαντικό στοιχείο.
5. Κλείστε το πλαίσιο συγκράτησης πλακών και το καπάκι του οργάνου.
6. Εισαγάγετε το USB stick (το οποίο περιέχει το αρχείο εκτέλεσης) στη θύρα USB που βρίσκεται στην πρόσοψη του οργάνου.

 Μην αφαιρείτε το USB stick προτού ολοκληρωθεί η εκτέλεση.

7. Επιλέξτε «Run» (Εκτέλεση) στο κύριο μενού (χρησιμοποιώντας τα κουμπιά της οθόνης  και ) και πατήστε «OK».
8. Επιλέξτε το αρχείο εκτέλεσης χρησιμοποιώντας τα κουμπιά της οθόνης  και .

 Για να δείτε τα περιεχόμενα ενός φακέλου, επιλέξτε το φάκελο και πατήστε «Select» (Επιλογή). Για να μεταβείτε πίσω στην προηγούμενη οθόνη, πατήστε το κουμπί «Back» (Πίσω).

9. Όταν έχει επιλεγεί το αρχείο εκτέλεσης, πατήστε «Select» (Επιλογή) για να ξεκινήσει η εκτέλεση.
10. Όταν ολοκληρωθεί η εκτέλεση και το όργανο επιβεβαιώσει ότι το αρχείο εκτέλεσης έχει αποθηκευτεί στο USB stick, πατήστε «Close» (Κλείσιμο).
11. Αφαιρέστε το USB stick.
12. Ανοίξτε το καπάκι του οργάνου.
13. Ανοίξτε τη θύρα φυσιγγίων και αφαιρέστε το φυσίγγιο αντιδραστηρίων ανασηκώνοντάς το και τραβώντας το προς τα έξω.
14. Κλείστε τη θύρα.
15. Ανοίξτε το πλαίσιο συγκράτησης πλακών και αφαιρέστε την πλάκα στο θερμαντικό στοιχείο.
16. Κλείστε το πλαίσιο συγκράτησης πλακών και το καπάκι του οργάνου.
17. Απορρίψτε την πλάκα και καθαρίστε το φυσίγγιο.
18. Αναλύστε την εκτέλεση σύμφωνα με το «Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx».

Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24 MDx

Αυτό το πρωτόκολλο περιγράφει την ανάλυση μεταλλάξεων μιας ολοκληρωμένης εκτέλεσης KRAS χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24 MDx Software.

Διαδικασία

1. Εισαγάγετε το **USB stick** (το οποίο περιέχει το αρχείο επεξεργασμένης εκτέλεσης) στη θύρα **USB** του υπολογιστή.
2. Μεταφέρετε το αρχείο από το **USB stick** στην επιθυμητή τοποθεσία του υπολογιστή χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα εξερεύνησης των **Windows**.
3. Ανοίξτε το αρχείο εκτέλεσης στον τρόπο λειτουργίας **AQ** του λογισμικού **PyroMark Q24 MDx Software** είτε επιλέγοντας «**Open**» (Άνοιγμα) στο μενού «**File**» (Αρχείο) είτε κάνοντας διπλό κλικ στο αρχείο (✓) στο πρόγραμμα περιήγησης συντομεύσεων.
4. Για να αναλύσετε την εκτέλεση και να λάβετε μια επισκόπηση των αποτελεσμάτων κάντε κλικ σε ένα από τα κουμπιά **Analyze** (Ανάλυση).



Ανάλυση όλων των πηγαδιών.



Ανάλυση του επιλεγμένου πηγαδιού.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (συχνότητες αλληλόμορφων) και η αξιολόγηση ποιότητας προβάλλονται επάνω από την θέση της μεταβλητής στο ίχνος της χρωματογραφίας πυρόλυσης. Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος PyroMark Q24*.

5. Για τη δημιουργία αναφοράς, επιλέξτε **Full Report** (Πλήρης αναφορά) από το μενού «**Reports for AQ runs**» (Αναφορές για εκτελέσεις AQ).



Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS ανευρίσκονται στο νουκλεοτίδιο 35 (δεύτερη βάση του κωδικονίου 12). Συνεπώς το πρότυπο «**Sequence to Analyze**» (Αλληλουχία προς ανάλυση) που ορίζεται στην επιλογή **Analysis Setup** (Ρύθμιση ανάλυσης) καλύπτει μεταλλάξεις σε αυτή τη θέση (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 37). Εάν ένα δείγμα περιέχει μια μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 34 (πρώτη βάση του κωδικονίου 12) η επιλογή «**Sequence to Analyze**» (Αλληλουχία προς ανάλυση) μπορεί να αλλάξει για να αναλυθεί επίσης η κατάσταση των μεταλλάξεων σε αυτή τη θέση, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα A.

Ενημερωμένες συχνότητες μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονίδιο KRAS στο κωδικόνιο 12/13 και στο κωδικόνιο 61 διατίθενται ηλεκτρονικά από το **Sanger Institute** στην ιστοσελίδα www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

i Για αξιόπιστα αποτελέσματα, συνιστώνται ύψη μονής κορυφής μεγαλύτερα από 30 RLU. Οι 30 RLU θα πρέπει να ρυθμιστούν ως «required peak height for passed quality» (απαιτούμενο ύψος κορυφής για επιτυχή έλεγχο ποιότητας) στη ρύθμιση προσδιορισμού (βλ. Παράρτημα Α και *Εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος PyroMark Q24*).

i Η αναφορά αποτελεσμάτων ανάλυσης AQ θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την τεκμηρίωση της ποσοτικοποίησης των αλληλόμορφων. Οι αριθμοί οι οποίοι εμφανίζονται στη χρωματογραφία πυρόλυσης έχουν υποστεί στρογγυλοποίηση και δεν καταδεικνύουν την ακριβή ποσοτικοποίηση.

i **Εκ νέου ανάλυση των δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 35 ή με αξιολόγηση ποιότητας «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Ανεπιτυχής)**

Συνιστάται έντονα η εκ νέου ανάλυση όλων των δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύτηκε καμία μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 35, καθώς επίσης και στα δείγματα τα οποία παρουσίασαν μήνυμα αξιολόγησης ποιότητας «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Ανεπιτυχής) με την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία που θα αναλυθεί) να στοχεύει σε μεταλλάξεις στο νουκλεοτίδιο 34. Τα μηνύματα αξιολόγησης ποιότητας «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Ανεπιτυχής) θα μπορούσαν να υποδηλώνουν κορυφή αναφοράς σε μη αναμενόμενη θέση για μετάλλαξη του νουκλεοτιδίου 35. Μια κορυφή σε οποιαδήποτε από τις 3 πρώτες διανομές αποδεικνύει την ύπαρξη μετάλλαξης στο νουκλεοτίδιο 34.

Για εκ νέου ανάλυση και στόχευση μεταλλάξεων στο νουκλεοτίδιο 34, μεταβείτε στην επιλογή «Analysis Setup» (Ρύθμιση ανάλυσης) και αλλάξτε την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) από **GNTGRCGTAGGYA** σε **NGTGRCGTAGGYA**. Πατήστε το κουμπί «Apply» (Εφαρμογή), και κάντε κλικ στο κουμπί «To All» (Σε όλα) όταν εμφανιστεί το παράθυρο «Apply Analysis Setup» (Εφαρμογή ρύθμισης ανάλυσης).

i **Εκ νέου εκτέλεση των δειγμάτων για την ανίχνευση μικρών μεταλλάξεων**

Συνιστάται έντονα να περιλαμβάνεται ένα φυσιολογικό δείγμα σε κάθε εκτέλεση για σύγκριση. Οποιοδήποτε δείγμα εμφανίζει συχνότητα μεταλλάξεων μεγαλύτερη από την αντίστοιχη θέση στο φυσιολογικό δείγμα θα πρέπει να εξετάζεται σε σχέση με τον πίνακα ο οποίος παρουσιάζει το όριο ανίχνευσης (βλ. Πίνακα 11, σελίδα 32). Τα δείγματα μπορούν επίσης να συγκριθούν μεταξύ τους για να αποκαλυφθούν τυχόν ασυνήθιστα υψηλές συχνότητες μεταλλάξεων.

Ως οδηγός, τα δείγματα για τα οποία υπάρχει υποψία μετάλλαξης στο εύρος από το όριο LOD (Πίνακας 11) έως το όριο LOD + 3 % μονάδες θα πρέπει να αναλύονται εκ νέου εις διπλούν μαζί με ένα φυσιολογικό δείγμα εις διπλούν. Εάν και οι δύο επαναληπτικές αναλύσεις παρουσιάσουν το ίδιο αποτέλεσμα με

την αρχική ανάλυση και αυτό είναι εμφανώς διαφορετικό από τον φυσιολογικό μάρτυρα, τότε το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό για τη μετάλλαξη. Σημειώστε ότι η επιλογή αγωγής για καρκινοπαθείς δεν πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στην κατάσταση μετάλλαξης του γονιδίου KRAS.

ⓘ Σε περίπτωση κατά την οποία υποψιάζεστε μετάλλαξη GGT → GTT, αποτέλεσμα μεγαλύτερο από 1% μπορεί να θεωρηθεί θετικό. Αυτό το επίπεδο μπορεί να ποικίλει σημαντικά μεταξύ των αντιγράφων (βλ. «Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης», σελίδα 9).

Πίνακας 11. Τα όρια LOB και LOD τα οποία προσδιορίστηκαν για συγκεκριμένες μεταλλάξεις

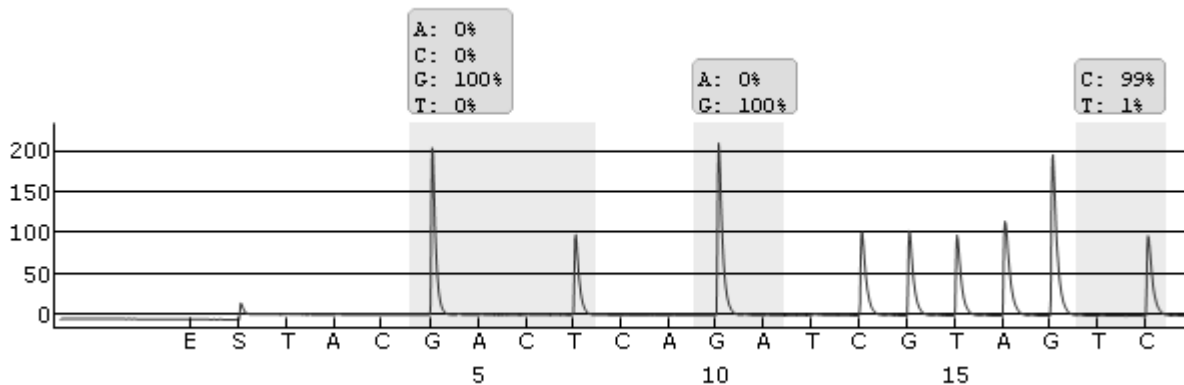
Μετάλλαξη	LOB (%)	LOD (%)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ COSMIC* (V42)
Κωδικόνιο 12 (GGT)			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	μ.δ.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
Κωδικόνιο 13 (GGC)			
GAC	0,3	1,9	532
Κωδικόνιο 61 (CAA), όπως αναλύθηκε αντίστροφα (TTG)			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

* Από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), ο οποίος διατίθεται ηλεκτρονικά από το Sanger Institute στην ιστοσελίδα www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

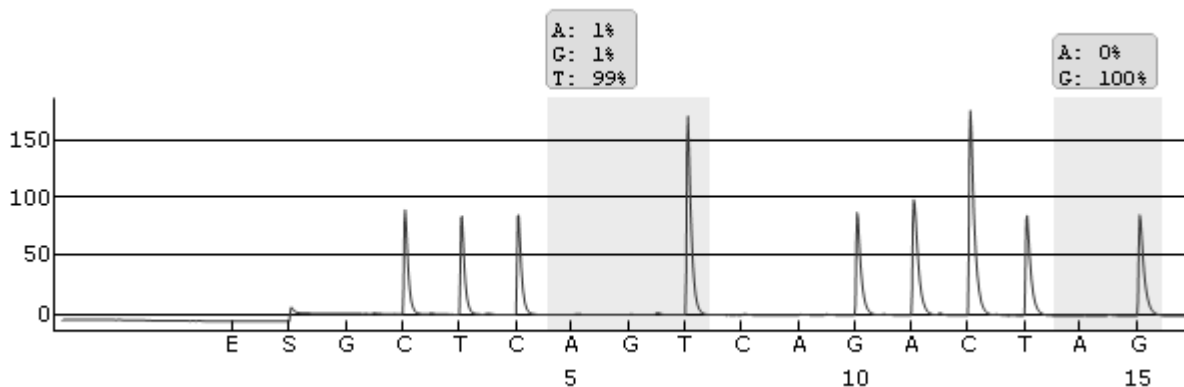
μ.δ.: μη διαθέσιμο.

Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα

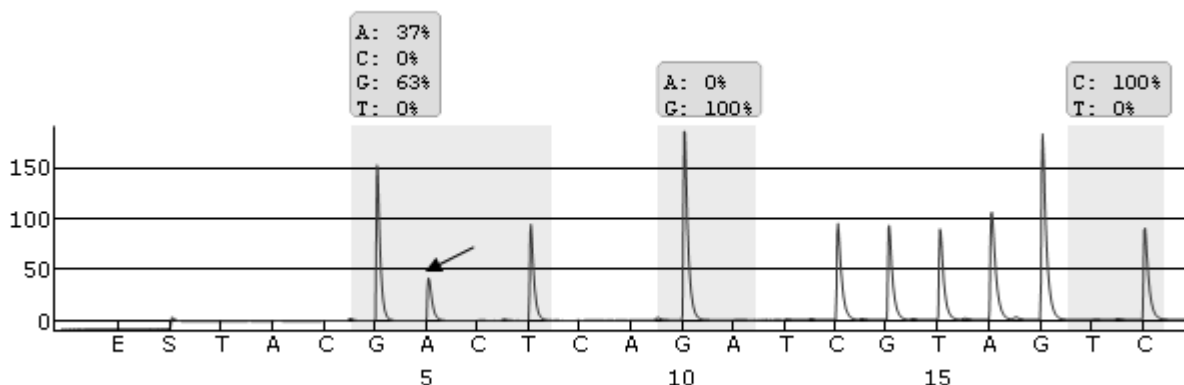
Στις εικόνες 5–10 προβάλλονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα χρωματογραφίας πυρόλυσης.



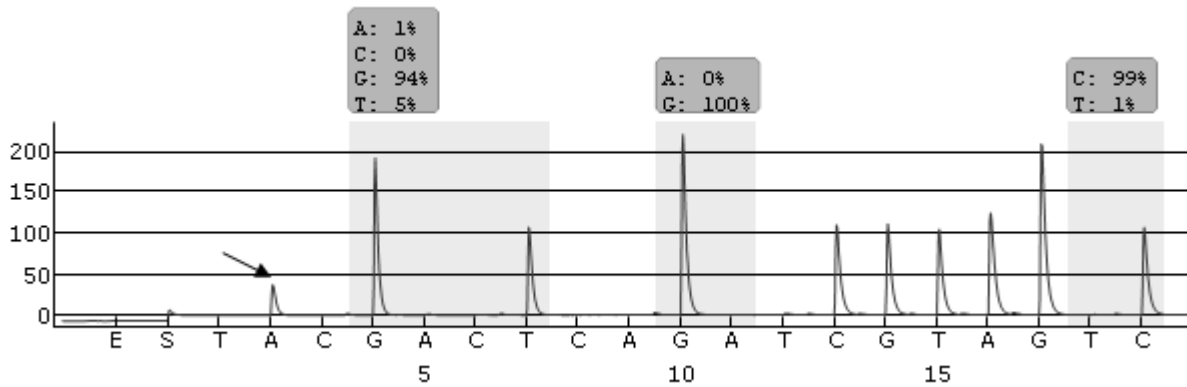
Εικόνα 5. Ήχος χρωματογραφίας πυρόλυσης που λαμβάνεται από την ανάλυση ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο στα κωδικόνια 12 και 13.



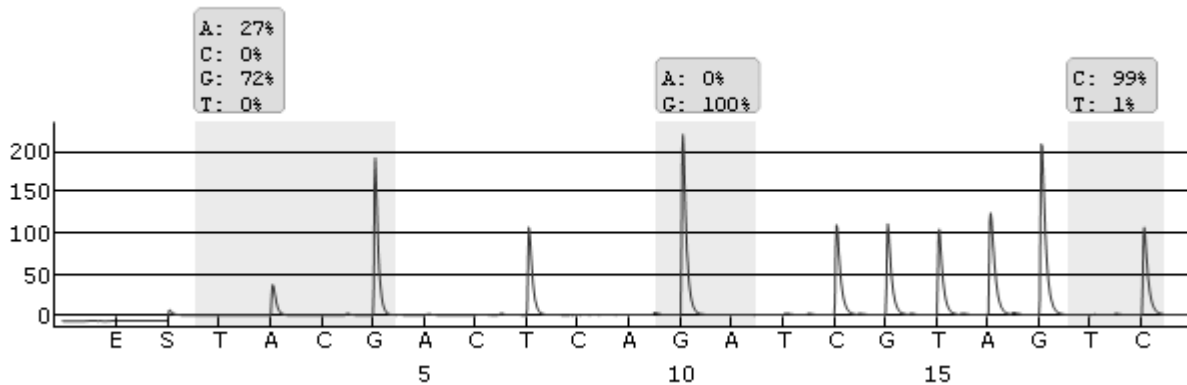
Εικόνα 6. Ήχος χρωματογραφίας πυρόλυσης που λαμβάνεται από την ανάλυση ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο στο κωδικόνιο 61.



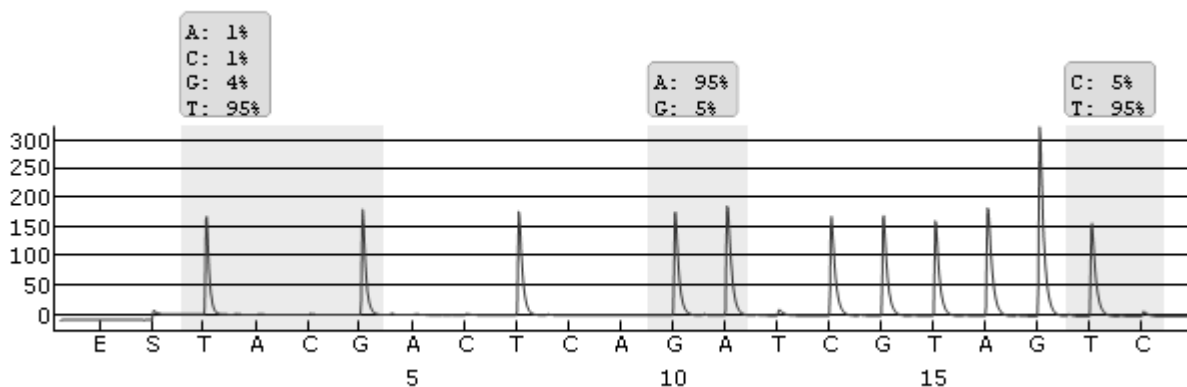
Εικόνα 7. Ήχος χρωματογραφίας πυρόλυσης που λαμβάνεται μετά από την ανάλυση δειγμάτων με μετάλλαξη GGT → GAT στη βάση 2 του κωδικονίου 12 (νουκλεοτίδιο 35, υποδεικνύεται με ένα βέλος).



Εικόνα 8. Ίχνος χρωματογραφίας πυρόλυσης που λαμβάνεται μετά από την ανάλυση δειγμάτων με μετάλλαξη GGT → AGT στη βάση 1 του κωδικονίου 12 (νουκλεοτίδιο 34, υποδεικνύεται με ένα βέλος) με την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία που θα αναλυθεί) GNTGRCGTAGGYA να στοχεύει τη βάση 2 στο κωδικόνιο 12 (νουκλεοτίδιο 35). Το κίτρινο χρώμα υποδεικνύει ότι αυτή η αλληλουχία δεν είναι αναμενόμενη και πρέπει να ελεγχθεί.



Εικόνα 9. Ίχνος χρωματογραφίας πυρόλυσης και αποτέλεσμα που λαμβάνεται μετά από την εκ νέου ανάλυση του δείγματος στην Εικόνα 8. Η μετάλλαξη GGT → AGT αναλύθηκε εκ νέου με την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) NGTGRCGTAGGYA να στοχεύει τη βάση 1 στο κωδικόνιο 12 (νουκλεοτίδιο 34).



Εικόνα 10. Ίχνος χρωματογραφίας πυρόλυσης που λαμβάνεται μετά την ανάλυση του Mutant KRAS Control DNA, με την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) NGTGRCGTAGGYA να στοχεύει στην πρώτη βάση του κωδικονίου 12.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να βοηθήσει πολύ στην επίλυση προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να ανακύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, δείτε επίσης τη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές απορίες) στο Technical Support Center (Κέντρο τεχνικής υποστήριξης): www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες στα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν τυχόν απορίες που ενδέχεται να έχετε σχετικά είτε με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που υπάρχουν σε αυτό το εγχειρίδιο είτε με τις τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

i Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος PyroMark Q24* για γενικές οδηγίες αντιμετώπισης προβλημάτων του οργάνου.

Σχόλια και προτάσεις

Σήματα στον μάρτυρα χωρίς μήτρα (αρνητικός μάρτυρας)

- a) Διαπλοκή μεταξύ πηγαδιών **i** Σήμα από ένα πηγάδι που ανιχνεύεται σε γειτονικό πηγάδι. Αποφύγετε την τοποθέτηση δειγμάτων με υψηλές εντάσεις σήματος δίπλα σε πηγάδια με μάρτυρες που δεν περιέχουν μήτρα.
- b) Επιμόλυνση PCR **i** Να χρησιμοποιεί στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρα. Φυλάσσετε και εκχυλίζετε υλικά όπως παρασκευάσματα, πλασμίδια των μαρτύρων και αμπλικόνια ξεχωριστά από τα αντιδραστήρια PCR.

Κακή ή μη αναμενόμενη αλληλουχία

- Χαμηλή ποιότητα γενωμικού DNA **i** Η χαμηλή ποιότητα γενωμικού DNA μπορεί να προκαλέσει αστοχία της PCR. Αναλύστε δείγματα PCR χρησιμοποιώντας μια τεχνική ηλεκτροφόρησης (χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, το σύστημα QIAxcel[®] ή ηλεκτροφόρηση με γέλη αгарόζης).

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

- Σπάνια μετάλλαξη η οποία δεν ορίζεται στη ρύθμιση προσδιορισμού **i** Προσαρμόστε την ακολουθία που θα αναλυθεί στη ρύθμιση προσδιορισμού (βλ. Παράρτημα A, σελίδα 37) και εκτελέστε και πάλι τον προσδιορισμό.

Σχόλια και προτάσεις

Υψηλό σήμα υποβάθρου

Ακατάλληλη φύλαξη των νουκλεοτιδίων

i Φυλάσσετε τα νουκλεοτίδια σε θερμοκρασία 2–8 °C. Η φύλαξη σε θερμοκρασίες -20 °C μπορεί να προκαλέσει αύξηση του σήματος υποβάθρου.

Απουσία σημάτων σε θετικούς μάρτυρες (wt KRAS Control DNA και Mutant KRAS Control DNA)

a) Ανεπαρκές μίγμα ενζύμου ή υποστρώματος για όλα τα πηγάδια

i Φροντίστε να πληρώσετε το φυσίγγιο PyroMark Q24 Cartridge σύμφωνα με την αναφορά «Pre Run Information» (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) στο μενού «Tools» (Εργαλεία).

b) Εσφαλμένη φύλαξη ή αραίωση αντιδραστηρίων

i Παρασκευάστε τα αντιδραστήρια PyroMark Gold Q24 Reagents σύμφωνα με τις οδηγίες οι οποίες παρέχονται μαζί με τα αντιδραστήρια.

Μη αναμενόμενη κορυφή ιχνηθέτη στην τελευταία μεταβλητή θέση

Επιμόλυνση με DNA πλασμιδίου του μάρτυρα


i Τα πλασμίδια των μαρτύρων, wt KRAS Control DNA και Mutant KRAS Control DNA, περιέχουν μια μοναδική διαφορά αλληλουχίας η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση σημάτων από τους μάρτυρες (βλ. «Μάρτυρες», σελίδα 16 και «Παράρτημα A: Ρύθμιση προσδιορισμών PyroMark KRAS», σελίδα 37). Να χρησιμοποιεί στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρα. Φυλάσσετε και εκχυλίζετε υλικά όπως παρασκευάσματα, πλασμίδια των μαρτύρων και αμπλικόνια ξεχωριστά από τα αντιδραστήρια PCR.


Παράρτημα A: Ρύθμιση προσδιορισμών PyroMark KRAS


Πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού PyroMark KRAS για πρώτη φορά, χρειάζεται να ρυθμίσετε το αρχείο προσδιορισμού με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία

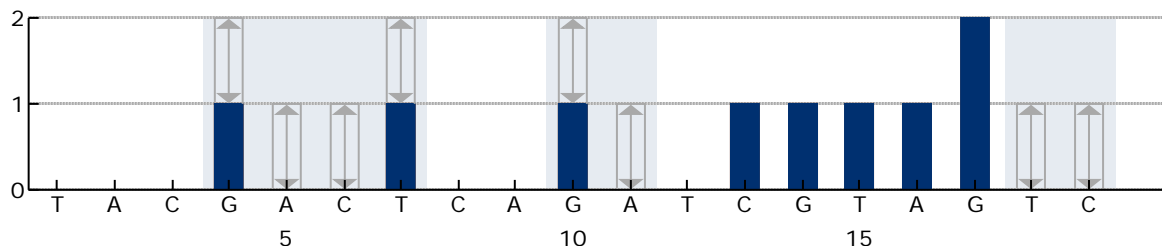
Κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS

1. Ρυθμίστε τον προσδιορισμό για τα κωδικόνια 12 (θέση 2) και 13 (θέση 2) του γονιδίου KRAS χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24 MDx Software.
2. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέος προσδιορισμός AQ).
3. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στην επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
GNTGRCGTAGGYA

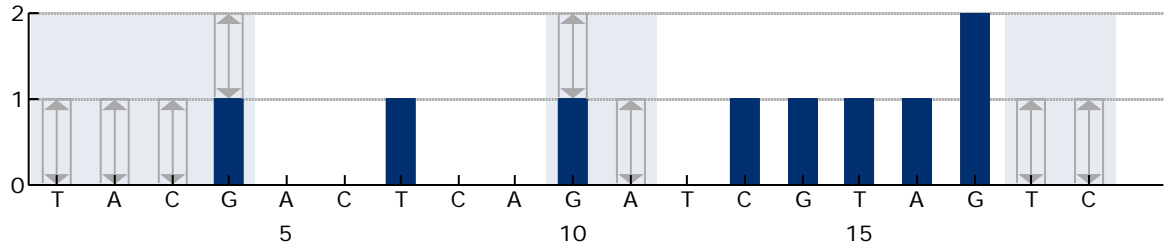
 Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 εντοπίζονται στο νουκλεοτίδιο 35 (δεύτερη θέση). Εάν υπάρχουν μεταλλάξεις στο νουκλεοτίδιο 34 (πρώτη θέση) αλλάξτε την επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) στην ακόλουθη αλληλουχία.
NGTGRCGTAGGYA

 Η μεταβλητή θέση 3 (Y) επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ σημάτων τα οποία προέρχονται από τα πλασμίδια των μαρτύρων (wt KRAS Control DNA και Mutant KRAS Control DNA) και των σημάτων από το γενωμικό DNA. Ενώ το γενωμικό DNA θα προκαλέσει την εμφάνιση βάσης C, τα πλασμίδια των μαρτύρων θα επιφέρουν την εμφάνιση βάσης T στη μεταβλητή θέση 3.


4. Καταχωρίστε μη αυτόματα την παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά διανομής).
TACGACTCAGATCGTAGTC




Εικόνα 11. Ιστόγραμμα για τα κωδικόνια 12 (νουκλεοτίδιο 35) και 13 (νουκλεοτίδιο 38) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) GNTGRCGTAGGYA.



Εικόνα 12. Ιστόγραμμα για τα κωδικόνια 12 (νουκλεοτίδιο 34) και 13 (νουκλεοτίδιο 38) με «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση) NGTGRCGTAGGYA.

5. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε την επιλογή «Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:» (Μέγιστο κατώφλι ύψους - απαιτούμενο ύψος κορυφής για επιτυχή έλεγχο ποιότητας:) σε 30.
6. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε τον προσδιορισμό ως *KRAScodon 12+13*.

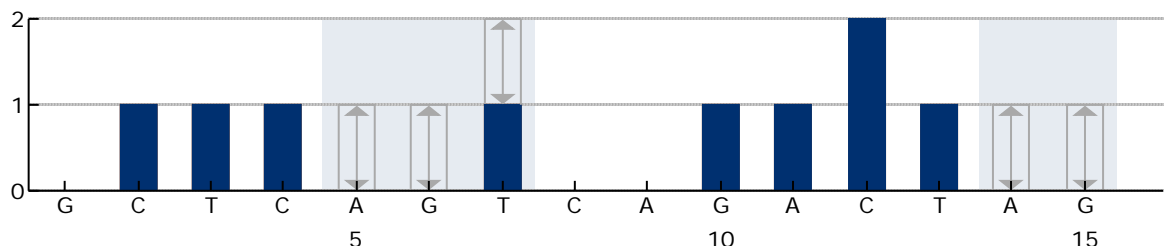
Κωδικόνιο 61 του γονιδίου KRAS

7. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε «New AQ Assay» (Νέος προσδιορισμός AQ).
8. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στην επιλογή «Sequence to Analyze» (Αλληλουχία προς ανάλυση).
CTCDTGACCTRC




Η μεταβλητή θέση 2 (R) επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ σημάτων τα οποία προέρχονται από τα πλασμίδια των μαρτύρων (wt KRAS Control DNA και Mutant KRAS Control DNA) και των σημάτων από το γενωμικό DNA. Ενώ το γενωμικό DNA θα προκαλέσει την εμφάνιση βάσης G, τα πλασμίδια των μαρτύρων θα επιφέρουν την εμφάνιση βάσης A στη μεταβλητή θέση 2.


9. Προσθέστε μη αυτόματα την παρακάτω «Dispensation Order» (Σειρά διανομής).
GCTCAGTCAGACTAG



Εικόνα 13. Ιστόγραμμα για το κωδικόνιο 61 (νουκλεοτίδιο 183).

10. Κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis Parameters» (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε την επιλογή «Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:» (Μέγιστο κατώφλι ύψους - απαιτούμενο ύψος κορυφής για επιτυχή έλεγχο ποιότητας:) σε 30.
11. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε τον προσδιορισμό ως *KRAScodon 61*.

Παράρτημα Β: Άδειασμα του περιέκτη αποβλήτων και των δοχείων

<p>ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ</p> 	<p>Επικίνδυνες χημικές ουσίες</p> <p>Το διάλυμα αποδιάταξης που χρησιμοποιείται με το σταθμό εργασίας κενού περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, το οποίο είναι ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα.</p> <p>Να φοράτε πάντα γυαλιά ασφαλείας, γάντια και εργαστηριακή ποδιά.</p> <p>Το αρμόδιο όργανο (π.χ., διευθυντής εργαστηρίου) πρέπει να λάβει τις απαραίτητες προφυλάξεις για να διασφαλίζει ότι ο περιβάλλον χώρος εργασίας είναι ασφαλής και ότι οι χειριστές του οργάνου δεν εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα τοξικών ουσιών (χημικών ή βιολογικών) όπως καθορίζεται από τα ισχύοντα Material Safety Data Sheets (δελτία δεδομένων ασφαλείας του προϊόντος) (MSDSs) ή τα έγγραφα των OSHA,* ACGIH,[†] ή COSHH[‡].</p> <p>Ο εξαερισμός των αναθυμιάσεων και η απόρριψη των αποβλήτων πρέπει να γίνονται σύμφωνα με όλους τους εθνικούς, πολιτειακούς και τοπικούς κανονισμούς και νόμους υγείας και ασφάλειας.</p>
---	---

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

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

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

Φροντίστε να τηρείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς και τοπικούς περιβαλλοντικούς κανονισμούς για την απόρριψη των εργαστηριακών αποβλήτων.

Σημαντική σημείωση προτού ξεκινήσετε

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

Διαδικασία

- 1. Βεβαιωθείτε ότι δεν εφαρμόζεται κενό στο εργαλείο κενού. Βεβαιωθείτε ότι το κενό είναι απενεργοποιημένο (Off) (Απενεργοποίηση) και ότι η αντλία κενού είναι κλειστή.**
- 2. Απορρίψτε τυχόν διαλύματα που έχουν απομείνει στα δοχεία.**
- 3. Εκπλύνετε τα δοχεία με νερό υψηλής καθαρότητας ή αντικαταστήστε τα εάν είναι απαραίτητο.**

4. Αδειάστε τον περιέκτη αποβλήτων.



Το πώμα μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς την αποσύνδεση της σωλήνωσης.

5. Εάν πρέπει να καθαριστεί ο σταθμός εργασίας κενού (για παράδειγμα, λόγω σκόνης ή έκχυσης υγρών), ακολουθήστε τις οδηγίες του *Εγχειριδίου χρήσης του συστήματος PyroMark Q24*.

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί μια μεγάλη, ενημερωμένη ηλεκτρονική βάση επιστημονικών δημοσιεύσεων χρήσης των προϊόντων QIAGEN.

Ολοκληρωμένες επιλογές αναζήτησης σας επιτρέπουν να βρείτε τα άρθρα που χρειάζεστε, είτε με απλή αναζήτηση με λέξη-κλειδί είτε με καθορισμό της εφαρμογής, του πεδίου έρευνας, του τίτλου, κ. λπ.

Για ολοκληρωμένη λίστα βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την ηλεκτρονική βάση δεδομένων βιβλιογραφίας QIAGEN στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με τα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τους τοπικούς διανομείς.

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλόγου
PyroMark KRAS Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις στο σύστημα PyroMark Q24 MDx: Εκκινητές Seq, εκκινητές PCR, wt KRAS Control DNA, Mutant KRAS Control DNA	971450
PyroMark Q24 MDx	Πλατφόρμα ανίχνευσης με βάση την αλληλουχία για ανάλυση Pyrosequencing 24 δειγμάτων παράλληλα	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας κενού (220 V) για την παρασκευή 24 δειγμάτων παράλληλα, από προϊόν PCR σε μονόκλωνη μήτρα	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 MDx Software	Λογισμικό εφαρμογής	9019063
Παρελκόμενα		
PyroMark Q24 Plate (100)	Πλάκα 24 πηγαδιών για αντίδραση αλληλούχισης	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Φυσίγγια για τη διανομή νουκλεοτιδίων και αντιδραστηρίων	979302
Αντιδραστήρια PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Για 5 x 24 δείγματα: Μίγμα ενζύμων, μίγμα υποστρωμάτων και νουκλεοτίδιο	971802
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Για την πρόσδεση βιοτυνιλιωμένου προϊόντος PCR σε σφαιρίδια Sepharose	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Για την αποδιάταξη δίκλωνου προϊόντος PCR σε μονόκλωνη μήτρα DNA	979307
PyroMark Wash Buffer, συμπύκνωμα (200 ml)	Για πλύση μονόκλωνου DNA	979308

* Για τον υπόλοιπο κόσμο (όχι για το Ηνωμένο Βασίλειο).

† Για το Ηνωμένο Βασίλειο.

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλόγου
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Για υβριδοποίηση εκκινητή αλληλούχισης σε μονόκλωνο προϊόν PCR και για την αντίδραση Pyrosequencing	979309
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Επαναχρησιμοποιήσιμες μεταλλικές ράβδοι για το σταθμό εργασίας PyroMark Vacuum Workstation Q96 και Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Για έλεγχο εγκατάστασης του συστήματος	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Για επιβεβαίωση απόδοσης του συστήματος	979304
Σχετικά προϊόντα		
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (250)	Για 250 x 20 μl αντιδράσεις: 3 x 0,85 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, τα οποία περιέχουν συνολικά 250 μονάδες HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase, 1 x 0,55 ml συμπύκνωμα CoralLoad®, 2 x 1,9 ml νερό χωρίς ριβονουκλεάση	203643
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (1000)	Για 1000 x 20 μl αντιδράσεις: 12 x 0,85 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, τα οποία περιέχουν συνολικά 1000 μονάδες HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase, 4 x 0,55 ml συμπύκνωμα CoralLoad, 8 x 1,9 ml νερό χωρίς ριβονουκλεάση	203645
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (2500)	Για 2500 x 20 μl αντιδράσεις: 25 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, τα οποία περιέχουν συνολικά 2500 μονάδες HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase, 5,5 ml συμπύκνωμα CoralLoad, 2 x 20 ml νερό χωρίς ριβονουκλεάση	203646
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Για 50 παρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp MinElute®, πρωτεΐνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	56404

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλόγου
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Για 48 παρασκευές: Φυσίγγια αντιδραστηρίων (ιστός), αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, αναλώσιμες διατάξεις συγκράτησης ρυγχών, δοκιμαστικά σωληνάρια (2 ml), σωληνάρια έκλουσης (1,5 ml), ρυθμιστικό διάλυμα G2, πρωτεΐνάση K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Για 50 παρασκευές: Στήλες QIAamp Mini Spin, ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, VacConnectors	61104

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και αποποιήσεις ευθυνών ειδικές για τα προϊόντα, δείτε το εγχειρίδιο ή το εγχειρίδιο χρήσης του αντίστοιχου kit της QIAGEN. Εγχειρίδια ή εγχειρίδια χρήσης των kit της QIAGEN διατίθενται από την ιστοσελίδα www.qiagen.com ή μπορείτε να τα ζητήσετε από τα τμήματα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τους τοπικούς διανομείς.

Η σελίδα αυτή έχει αφεθεί σκόπιμα κενή

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation ή οι θυγατρικές της); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose™ (GE Healthcare); Therascreen® (DxS Limited); Windows® (Microsoft Corporation).

Σύμβαση παραχώρησης περιορισμένης άδειας χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος υποδηλώνει τη συμφωνία οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ PyroMark KRAS Kit με τους παρακάτω όρους:

1. Το κιτ PyroMark KRAS Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά με το εγχειρίδιο του κιτ *PyroMark KRAS Kit* και μόνο με τα συστατικά που περιέχονται σε αυτό το κιτ. Η QIAGEN δεν εκχωρεί καμία άδεια υπό οποιαδήποτε πνευματική της ιδιοκτησία για χρήση ή ενσωμάτωση των εσωκλειόμενων συστατικών αυτού του κιτ με οποιαδήποτε συστατικά δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ εκτός από αυτά που περιγράφονται στο εγχειρίδιο κιτ *PyroMark KRAS Kit* και τα πρόσθετα πρωτόκολλα που είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.
2. Εκτός από τις ρητά δηλωμένες άδειες χρήσης, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι αυτό το κιτ και/ή η χρήση(χρήσεις) του δεν παραβιάζει δικαιώματα τρίτων μερών.
3. Αυτό το κιτ και τα συστατικά του είναι εγκεκριμένα για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται να επαναχρησιμοποιηθούν, να επισκευαστούν ή να μεταπωληθούν.
4. Η QIAGEN αποποιείται συγκεκριμένα όλες τις άλλες άδειες χρήσης, ρητές ή έμμεσες, εκτός από αυτές οι οποίες αναφέρονται ρητώς.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του κιτ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε κανέναν άλλο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν την τέλεση οποιωνδήποτε πράξεων απαγορεύονται ανωτέρω. Η QIAGEN μπορεί να επιβάλλει τις απαγορεύσεις αυτής της σύμβασης παραχώρησης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλα τα έξοδα έρευνας και όλα τα δικαστικά έξοδα, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, σε οποιαδήποτε ενέργεια προβεί για να επιβάλλει αυτή τη σύμβαση παραχώρησης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιαδήποτε άλλα από τα δικαιώματα πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετίζονται με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

Για ενημερωμένους όρους άδειας χρήσης, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.

© 2009 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

www.qiagen.com

Αυστρία ■ Παραγγελίες 0800/28-10-10 ■ Αρ. φαξ 0800/28-10-19 ■ Τεχνικό τμήμα 0800/28-10-11

Αυστραλία ■ Παραγγελίες 03-9840-9800 ■ Αρ. φαξ 03-9840-9888 ■ Τεχνικό τμήμα 1-800-243-066

Βέλγιο ■ Παραγγελίες 0800-79612 ■ Αρ. φαξ 0800-79611 ■ Τεχνικό τμήμα 0800-79556

Βραζιλία ■ Παραγγελίες 0800-557779 ■ Αρ. φαξ 55-11-5079-4001 ■ Τεχνικό τμήμα 0800-557779

Γαλλία ■ Παραγγελίες 01-60-920-926 ■ Αρ. φαξ 01-60-920-925 ■ Τεχνικό τμήμα 01-60-920-930 ■ Προσφορές 01-60-920-928

Γερμανία ■ Παραγγελίες 02103-29-12000 ■ Αρ. φαξ 02103-29-22000 ■ Τεχνικό τμήμα 02103-29-12400

Δανία ■ Παραγγελίες 80-885945 ■ Αρ. φαξ 80-885944 ■ Τεχνικό τμήμα 80-885942

Ελβετία ■ Παραγγελίες 055-254-22-11 ■ Αρ. φαξ 055-254-22-13 ■ Τεχνικό τμήμα 055-254-22-12

Ηνωμένο Βασίλειο ■ Παραγγελίες 01293-422-911 ■ Αρ. φαξ 01293-422-922 ■ Τεχνικό τμήμα 01293-422-999

Η.Π.Α. ■ Παραγγελίες 800-426-8157 ■ Αρ. φαξ 800-718-2056 ■ Τεχνικό τμήμα 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Ιαπωνία ■ Τηλέφωνο 03-6890-7300 ■ Αρ. φαξ 03-5547-0818 ■ Τεχνικό τμήμα 03-6890-7300

Ιρλανδία ■ Παραγγελίες 1800 555 049 ■ Αρ. φαξ 1800 555 048 ■ Τεχνικό τμήμα 1800 555 061

Ισπανία ■ Παραγγελίες 91-630-7050 ■ Αρ. φαξ 91-630-5145 ■ Τεχνικό τμήμα 91-630-7050

Ιταλία ■ Παραγγελίες 02-33430-420 ■ Αρ. φαξ 02-33430-426 ■ Τεχνικό τμήμα 800-787980

Καναδάς ■ Παραγγελίες 800-572-9613 ■ Αρ. φαξ 800-713-5951 ■ Τεχνικό τμήμα 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Κίνα ■ Παραγγελίες 0086-21-3865-3865 ■ Αρ. φαξ 0086-21-3865-3965 ■ Τεχνικό τμήμα 800-988-0325, 800-988-0327

Κορέα (Νότια) ■ Παραγγελίες 1544 7145 ■ Αρ. φαξ 1544 7146 ■ Τεχνικό τμήμα 1544 7145

Λουξεμβούργο ■ Παραγγελίες 8002-2076 ■ Αρ. φαξ 8002-2073 ■ Τεχνικό τμήμα 8002-2067

Μεξικό ■ Παραγγελίες 01-800-7742-639 ■ Αρ. φαξ 01-800-1122-330 ■ Τεχνικό τμήμα 01-800-7742-639

Νορβηγία ■ Παραγγελίες 800-18859 ■ Αρ. φαξ 800-18817 ■ Τεχνικό τμήμα 800-18712

Ολλανδία ■ Παραγγελίες 0800-0229592 ■ Αρ. φαξ 0800-0229593 ■ Τεχνικό τμήμα 0800-0229602

Σιγκαπούρη ■ Παραγγελίες 65-67775366 ■ Αρ. φαξ 65-67785177 ■ Τεχνικό τμήμα 65-67775366

Σουηδία ■ Παραγγελίες 020-790282 ■ Αρ. φαξ 020-790582 ■ Τεχνικό τμήμα 020-798328

Φινλανδία ■ Παραγγελίες 0800-914416 ■ Αρ. φαξ 0800-914415 ■ Τεχνικό τμήμα 0800-914413

Χονγκ Κονγκ ■ Παραγγελίες 800 933 965 ■ Αρ. φαξ 800 930 439 ■ Τεχνικό τμήμα 800 930 425

