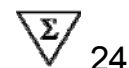


# Podręcznik PyroMark KRAS Kit



Wersja 1



Zestaw PyroMark KRAS Kit posiadający oznakowanie CE-IVD umożliwia ilościowy pomiar mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu KRAS. Dostarcza klinicytom danych ułatwiających wyselekcjonowanie pacjentów z rakiem jelita grubego, u których istnieje większe prawdopodobieństwo odniesienia korzyści z leczenia przeciwciałami anti-EGFR.

Do zastosowania w diagnostyce in vitro



971450



1056444PL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R2

MAT

1056444PL



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii próbek i testów, umożliwiających izolację i wykrywanie zawartości jakiegokolwiek próbki biologicznej. Nasze zaawansowane, wysokiej jakości produkty i usługi zapewniają sukces od chwili pobrania próbki do uzyskania wyniku.

### **Firma QIAGEN ustala normy w zakresie:**


- Oczyszczania DNA, RNA i białek
- Oznaczania kwasów nukleinowych i białek
- Badań naukowych w zakresie mikroRNA i RNAi
- Automatyzacji technologii próbek i testów

Naszą misją jest umożliwienie Państwu osiągnięcia znakomitych sukcesów i przełomowych osiągnięć. Więcej informacji można uzyskać w witrynie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Spis treści

Zawartość zestawu	4
Symbole	4
Transport i przechowywanie	5
Przeznaczenie	5
Ograniczenia zastosowania produktu	6
Pomoc Techniczna	6
Kontrola jakości	7
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	7
Wstęp	8
Zasada i procedura testu	8
Charakterystyka działania	9
Aparatura i odczynniki dostarczane przez użytkownika	14
Ważne uwagi	15
Ogólne środki ostrożności	15
Materiał próbki	15
Izolacja DNA	15
Kontrole	16
Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu PyroMark Q24 MDx	17
Protokół 2: PCR z zastosowaniem zestawu HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit i zestawu PyroMark KRAS Kit	19
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR na granulkach Streptavidin Sepharose High Performance	22
Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą Pyrosequencing w systemie PyroMark Q24 MDx	24
Protokół 5: Wykonywanie testu w systemie PyroMark Q24 MDx	27
Protokół 6: Analiza przebiegu PyroMark Q24 MDx	29
Przewodnik rozwiązywania problemów	34
Załącznik A: Konfigurowanie testów PyroMark KRAS	36
Załącznik B: Opróżnianie pojemnika odpadów i korytek	38
Bibliografia	39
Informacja dotycząca zamawiania	40

## Zawartość zestawu

<b>Zestaw PyroMark KRAS Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Nr katalogowy</b>	<b>971450</b>
<b>Liczba reakcji</b>	<b>24</b>
Seq Primer KRAS 12/13	24 $\mu$ l
Seq Primer KRAS 61	24 $\mu$ l
PCR Primer KRAS 12/13	24 $\mu$ l
PCR Primer KRAS 61	24 $\mu$ l
wt KRAS Control DNA	100 $\mu$ l
Mutant KRAS Control DNA	100 $\mu$ l
Podręcznik	 1

## Symbole



<N>

Zawiera odczynniki do przeprowadzenia <N> testów



Użyć przed



Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii



Numer materiału



Składniki



Skład



Numer



Przestrzegać zakresu temperatury



Legalny producent



Zapoznać się z informacjami podanymi w podręczniku



Ważna uwaga

## Transport i przechowywanie

Zestaw PyroMark KRAS Kit jest transportowany w suchym lodzie i od chwili otrzymania przesyłki powinien być przechowywany w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Należy unikać wielokrotnego ( $> 5\text{ x}$ ) rozmrażania i zamrażania. Zestaw PyroMark KRAS Kit pozostaje stabilny do upływu daty ważności, jeśli będzie przechowywany w tych warunkach.

## Przeznaczenie

Analiza mutacji genu KRAS znalazła się w centrum zainteresowania w Europie ze względu na warunkowe dopuszczenie do obrotu przez Komisję Europejską leków panitumumab i cetuximab do leczenia przerzutowego raka jelita grubego u pacjentów z niezmutowaną (dziką) postacią genu KRAS. Oznacza to, że panitumumab i cetuximab mogą być podawane wyłącznie pacjentom, u których przeprowadzono badanie przesiewowe pod kątem stanu mutacji genu KRAS.

Test ma na celu ułatwienie lekarzom identyfikacji pacjentów z rakiem jelita grubego, u których istnieje większe prawdopodobieństwo odniesienia korzyści z leczenia przeciwciałami anty-EGFR, takimi jak panitumumab i cetuximab. Test powinien być stosowany jako uzupełnienie do innych czynników prognostycznych używanych obecnie do selekcji odpowiednich pacjentów do leczenia przeciwciałami anty-EGFR, na podstawie stanu mutacji kodonów 12, 13 i 61 genu KRAS pacjenta. W celu podjęcia decyzji terapeutycznej przez klinicystę stan mutacji u pacjenta musi być rozważany w połączeniu z innymi czynnikami chorobowymi. Stan mutacji genu KRAS nie może stanowić wyłącznego kryterium podejmowania decyzji terapeutycznej u pacjentów z nowotworami.

Produkt służy do ilościowego pomiaru mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu KRAS. Produkt składa się z 2 testów: jednego wykrywającego mutacje w kodonach 12 i 13 oraz drugiego wykrywającego mutacje w kodonie 61. Oba testy zawierają swoiste startery PCR i starter sekwencyjny.

## Ograniczenia zastosowania produktu

Wyniki uzyskane z zastosowaniem tego produktu muszą być interpretowane w kontekście wszystkich właściwych danych klinicznych i laboratoryjnych.

Produkt przeznaczony jest do stosowania wyłącznie przez personel specjalnie poinstruowany i wyszkolony w zakresie procedur diagnostyki in vitro i systemu PyroMark Q24 MDx.

Badania walidacyjne zostały przeprowadzone z zastosowaniem ludzkiego DNA ekstrahowanego z próbek guza utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie.

Z produktem nie są dostarczane materiały do oczyszczania DNA, amplifikacji PCR i przygotowania próbki do analizy Pyrosequencing®. Produkt został poddany walidacji z zastosowaniem produktów do oczyszczania DNA i odczynników do PCR firmy QIAGEN. Należy stosować zalecane produkty do amplifikacji PCR i oczyszczania DNA wyszczególnione na stronie 14 i 15.

Produkt jest przeznaczony wyłącznie do użycia w systemie PyroMark Q24 MDx.

W celu uzyskania optymalnych wyników wymagane jest ściśle przestrzeganie instrukcji dla użytkownika. Nie zaleca się rozcieńczania odczynników, inaczej niż podano w niniejszym podręczniku, ponieważ spowoduje to utratę charakterystyki produktu.

Należy zwrócić uwagę na daty ważności i warunki przechowywania wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich elementów. Nie wolno używać elementów po upływie terminu ważności lub jeśli były nieprawidłowo przechowywane.

## Pomoc Techniczna

W firmie QIAGEN jesteśmy dumni z jakości i dostępności naszej pomocy technicznej. Nasze Działy Pomocy Technicznej są obsadzone przez doświadczonych naukowców, posiadających szeroką praktyczną i teoretyczną wiedzę specjalistyczną w zakresie technologii próbek i testów oraz używania produktów firmy QIAGEN. W przypadku jakichkolwiek pytań lub trudności dotyczących zestawu PyroMark KRAS Kit lub ogólnie produktów firmy QIAGEN, należy bez wahania skontaktować się z nami.

Klienci QIAGEN są głównym źródłem informacji na temat zaawansowanych lub specjalistycznych zastosowań naszych produktów. Informacje te są przydatne dla innych naukowców oraz badaczy w firmie QIAGEN. Dlatego zachęcamy Państwa do kontaktowania się z nami, jeśli mają Państwo jakiegokolwiek sugestie na temat charakterystyki działania produktów lub nowych zastosowań lub technik.

W celu uzyskania pomocy technicznej i dodatkowych informacji należy wejść do naszego Centrum Pomocy Technicznej na stronie [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) lub zadzwonić do jednego z Działów Pomocy Technicznej lub lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN (patrz okładka tylna lub odwiedź stronę [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kontrola jakości

Zgodnie z Systemem Zarządzania Jakością firmy QIAGEN posiadającym certyfikat ISO, każda partia zestawu PyroMark KRAS Kit została przetestowana według wstępnie podanej specyfikacji, aby zapewnić stałą jakość produktów.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy z odczynnikami chemicznymi należy zawsze zakładać odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki substancji niebezpiecznej (Material Safety Data Sheet, MSDS). Są one dostępne w Internecie w dogodnym i zwartym formacie PDF na stronie [www.qiagen.com/support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/support/MSDS.aspx), gdzie można znaleźć, przejrzeć i wydrukować kartę MSDS dla każdego zestawu i elementu zestawu firmy QIAGEN.

### Całodobowa informacja w sytuacji nagłej

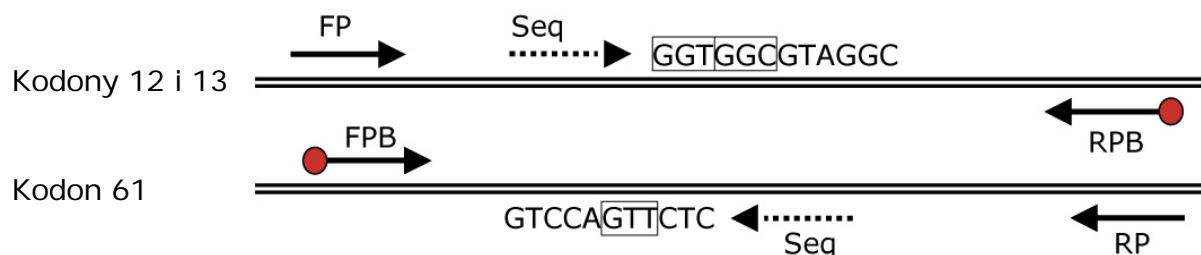
Informacje medyczne w sytuacji nagłej w języku angielskim, francuskim i niemieckim można uzyskać przez 24 godziny na dobę w:

Die Beratungsstelle bei Vergiftungen (Centrum Informacji Toksykologicznej)  
Mainz w Niemczech

Tel.: +49-6131-19240

## Wstęp

Zestaw PyroMark KRAS Kit posiadający oznakowanie CE-IVD jest przeznaczony do ilościowych pomiarów mutacji w kodonach 12, 13 i 61 ludzkiego genu KRAS. Produkt składa się z 2 testów: jednego wykrywającego mutacje w kodonach 12 i 13 oraz drugiego wykrywającego mutacje w kodonie 61. Dwa regiony są amplifikowane oddzielnie metodą PCR i sekwencjonowane do określonego regionu. Sekwencje otaczające określone pozycje służą jako piki normalizacji i odniesienia do oceny ilościowej i oceny jakości analizy.



**Rycina 1. Ilustracja testu genu KRAS.** Wskazana sekwencja jest analizowaną sekwencją prawidłowej próbki. **FP** i **FPB**: Startery postępujące PCR (B oznacza biotynylację); **RP** i **RPB**: startery odwrotne PCR (B oznacza biotynylację); **Seq**: startery sekwencyjne.

**i** Kodony 12 i 13 są sekwencjonowane w kierunku postępującym; kodon 61 – w kierunku odwrotnym.

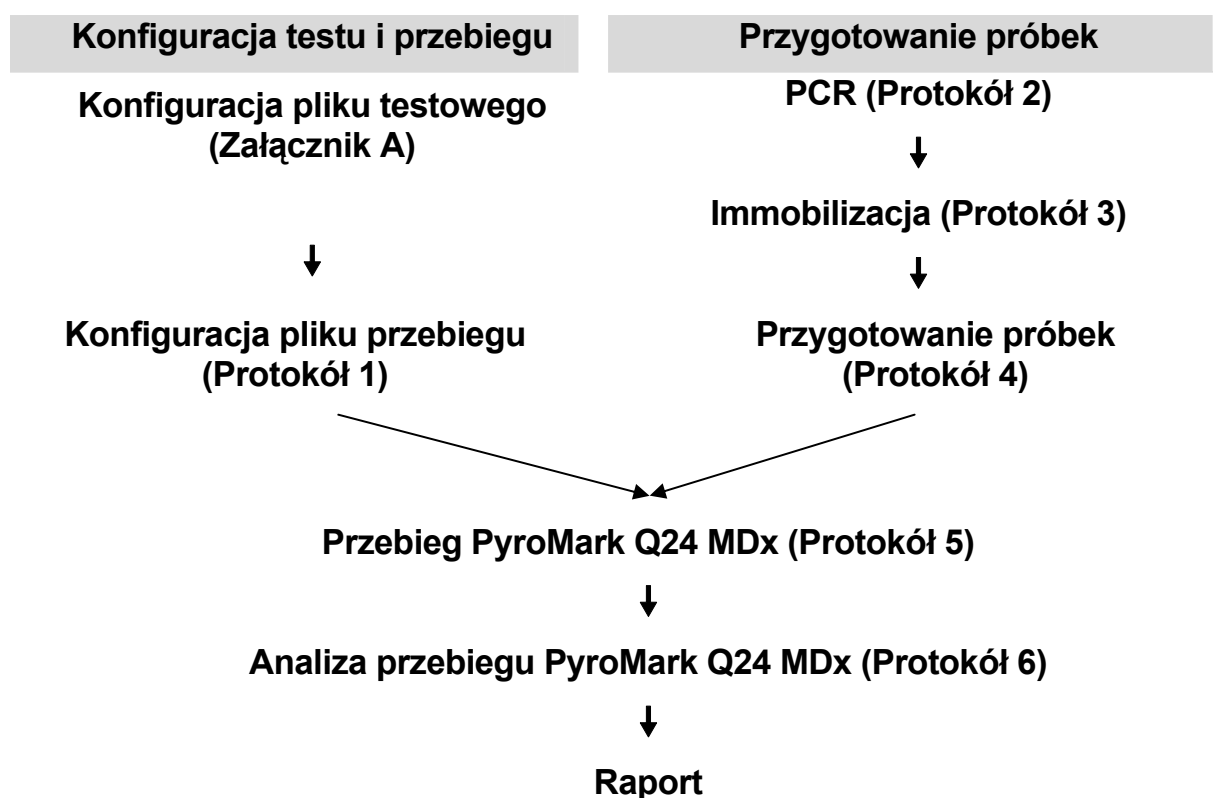
Produkt zawiera mieszaninę starterów PCR i starter sekwencyjny dla każdego testu. Startery są dostarczane w roztworze. Każda fiolka zawiera 24  $\mu$ l każdego startera lub mieszaniny starterów.

## Zasada i procedura testu

Schemat czynności na stronie 9 ilustruje procedurę testu. Po PCR z zastosowaniem starterów swoistych dla kodonów 12/13 i kodonu 61, amplikony są unieruchamiane na granulkach Streptavidin Sepharose High Performance. Przygotowywany jest jednoniciowy DNA i odpowiednie startery sekwencyjne się do niego przyłączają. Następnie próbki są analizowane w systemie PyroMark Q24 MDx z wykorzystaniem pliku konfiguracji przebiegu i pliku przebiegu. Po przebiegu można zmodyfikować ustawienia opcji Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) celem wykrycia rzadszych mutacji (patrz „Protokół 6: Analiza przebiegu PyroMark Q24 MDx”, strona 29, i Załącznik A, strona 36).



## Schemat procedury testu PyroMark KRAS



## Charakterystyka działania

### Granica próby zerowej i granica wykrywalności

Granica próby zerowej (limit of blank, LOB) i granica wykrywalności (limit of detection, LOD) zostały określone dla szeregu mutacji z zastosowaniem mieszanin plazmidów podobnych do tych dostarczonych w zestawie. W zależności od rodzaju mutacji zastosowano dwie metody.

- **Mutacje, które powodują wystąpienie pików w pozycji zerowej, w której pik normalnie nie występuje:** LOB i LOD zostały określone zgodnie z zaleceniami wytycznych NCCLS EP17-A Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline (Protokół określania granic wykrywalności i granic oznaczalności; zatwierdzone wytyczne). Błędy  $\alpha$  i  $\beta$  (odpowiednio, fałszywie dodatni i fałszywie ujemny) były ustawione na 5%.
- **Mutacja GGT → GTT w kodonie 12:** Mutacja ta skutkuje zmianami powodującymi pojedynczy i podwójny pik i nie daje liniowej odpowiedzi przy niskich poziomach mutacji. Pozycja ta dała LOB, która niezmiennie wynosiła 0% jednostek ( $n = 72$ ). Najniższa wartość sygnału, która wskazuje obecność mutacji w tej pozycji, została ustawiona na 1% jednostki, co jest wyraźnie powyżej jednolitego poziomu wyjściowego wynoszącego 0% jednostki. Podczas analizy próbki zawierającej 7% jednostek mutacji, 95% wyników ( $n = 89$ ) dawało sygnał, który mógł zostać uznany za pozytywny

(≥ 1% jednostki). W ten sposób LOD dla tej mutacji została ustawiona na 7% jednostek i wszystkie próbki dające sygnał powyżej 1% jednostki zostały uznane za pozytywne dla tej mutacji.

**Tabela 1. LOB i LOD określone dla specyficznych mutacji**

Mutacja	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
<b>Kodon 12 (GGT)</b>			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	nd	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
<b>Kodon 13 (GGC)</b>			
GAC	0,3	1,9	532
<b>Kodon 61 (CAA), przy testowaniu w odwrotnym kierunku (TTG)</b>			
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

\* Z Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Katalog mutacji somatycznych w nowotworach), dostępnego w Internecie na stronie Sanger Institute: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).  
nd: nie dotyczy.

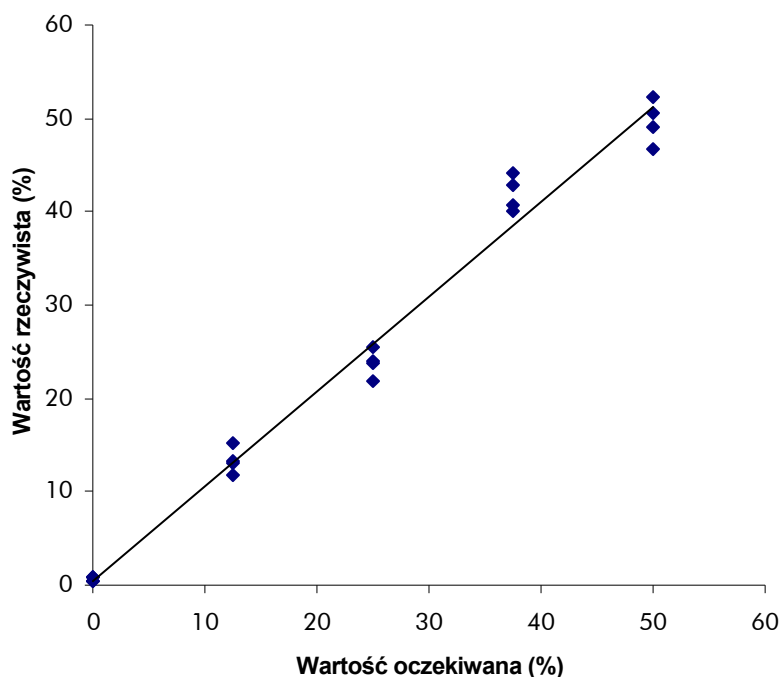
**i** Wartości te pochodzą z przebiegów, w których sygnał przekraczał 60 RLU, co zwykle uzyskuje się z 10 ng DNA izolowanego z tkanki utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie. Zaleca się, aby parametry metody zostały potwierdzone w laboratorium.

### Liniowość

Liniowość została zmierzona zgodnie z dokumentem EP6-A Clinical and Laboratory Standards Institute pt. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline (Ocena

liniowości procedur pomiarów ilościowych: ujęcie statystyczne; zatwierdzone wytyczne).

Sekwencje prawidłowe i zmutowane zostały wymieszane w proporcjach odpowiednich do uzyskania następujących poziomów mutacji: 0, 12,5, 25, 37,5 i 50%. Na płytce w sposób losowy umieszczono i poddano analizie cztery repliki mieszanin. Wyniki mutacji GGT → TGT w kodonie 12 analizowano z zastosowaniem oprogramowania Analyse-it® Software wer. 2.04 (Analyse-it Software, Ltd., Wielka Brytania) i przedstawiono na Rycinie 2.



**Rycina 2. Liniowość mutacji GGT → TGT w kodonie 12.**

Całkowita powtarzalność wynosiła 1,64% jednostek i wyniki zachowywały liniowość przy dopuszczalnej nieliniowości wynoszącej 3%. Podobne wyniki uzyskano dla mutacji GGC → GAC w kodonie 13.

### **Nieprecyzyjność pośrednia**

Określenie liniowości mutacji GGT → TGT w kodonie 12 zostało powtórzone przez 3 operatorów w 3 różnych dniach z zastosowaniem odmiennych kombinacji systemu PyroMark Q24 MDx i odczynników PyroMark Gold Q24 Reagents. Wyniki 3 przebiegów przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2. Nieprecyzyjność pośrednia**

Oczekiwane	Przebieg 1		Przebieg 2		Przebieg 3		Podsumowanie	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
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

Wszystkie wartości podano jako % jednostek. SD: odchylenie standardowe.

Wartości nieprecyzyjności pośredniej (SD) wynosiły więc 0,6–2,0% jednostek w mierzonym zakresie 0–50%.

### Specyficzność i czułość diagnostyczna

Zestaw PyroMark KRAS Kit był oceniany w ramach badania. W porównaniu z zestawem DxS Therascreen®: K-RAS Mutation Kit, przeanalizowano prospektywnie 100 próbek raka jelita grubego pod kątem mutacji w kodonach 12 i 13.

DNA do badań było izolowane z zastosowaniem zestawu EZ1 DNA Tissue Kit, a analiza została przeprowadzona zestawem PyroMark KRAS Kit w systemie PyroMark Q24 MDx, natomiast dla zestawu Therascreen: K-RAS Mutation Kit – w systemie ABI PRISM® 7900HT SDS.

Na 100 analizowanych próbek, stan mutacji można było określić dla 91 próbek badanych zestawem DxS. Zastosowanie analizy Pyrosequencing umożliwiło określenie stanu mutacji dla 94 próbek w zakresie kodonów 12 i 13.

Po wykluczeniu próbek, których nie udało się oznaczyć za pomocą jednego lub obu zestawów, stwierdzono 100% korelację pomiędzy zestawami PyroMark KRAS Kit i Therascreen: Czuość diagnostyczna zestawu PyroMark KRAS Kit wyniosła 100%, podobnie specyficzność diagnostyczna wyniosła 100% (Tabela 3).

**Tabela 3. Wyniki prospektywnie analizowanych próbek raka jelita grubego pod kątem kodonów 12 i 13**

		Zestaw Therascreen: K-RAS Mutation Kit		
		Zmutowany	Typ dziki (prawidłowy)	Łącznie
Zestaw PyroMark KRAS Kit	Zmutowany	33	0	33
	Typ dziki (prawidłowy)	0	57	57

## **Analiza kodonu 61**

Te same 100 próbek analizowano pod kątem mutacji w kodonie 61 z zastosowaniem zestawu PyroMark KRAS Kit. Ocena jakościowa testu kodonu 61 nie powiodła się tylko w przypadku jednej próbki. Ocena tej próbki nie powiodła się również w przypadku testów PyroMark i Therascreen dla kodonów 12 i 13, co wskazuje, że DNA było zbyt słabej jakości. Lepszy odsetek skuteczności w przypadku testu kodonu 61 wskazuje, że badanie w mniejszym stopniu zależne jest od jakości DNA niż oba testy (PyroMark i Therascreen) dla kodonów 12 i 13. Ponieważ test Therascreen nie bada mutacji w kodonie 61, nie jest możliwe bezpośrednie porównanie testów.

Mutacje w kodonie 61 zostały wykryte w 4 na 99 próbek. Trzy z nich obejmowały częste mutacje (CAC, CAT, CTA) w kodonie 61, podczas gdy czwarta próbka zawierała mutacje zarówno w kodonie 60 (GGT → GGA) jak i kodonie 61 (CAA → AAA).

## Aparatura i odczynniki dostarczane przez użytkownika

Podczas pracy z odczynnikami chemicznymi należy zawsze zakładać odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, należy zapoznać się z właściwą kartą MSDS, dostępną u dostawcy produktu.

- Zestaw do izolacji DNA (patrz Izolacja DNA, strona 15)
- Pipety (regulowane)\*
- Jałowe końcówki pipet z filtrami
- Mikrowirówka laboratoryjna\*
- Odczynniki do PCR (zestaw PyroMark KRAS Kit został zwalidowany z zastosowaniem zestawu HotStarTaq® Plus Master Mix Kit, nr kat. 203643, 203645 lub 203646)
- Termocykler\* i odpowiednie probówki do PCR
- Odczynnik Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 MDx (nr kat. 9001513)\*†
- Oprogramowanie PyroMark Q24 MDx Software (nr kat. 9019063)†
- Płytki PyroMark Q24 Plate (nr kat. 979301)†
- Wkład PyroMark Q24 Cartridge (nr kat. 979302)†
- Próżniowa stacja robocza PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (nr kat. 9001515 lub 9001517)\*†
- Odczynniki PyroMark Gold Reagents (nr kat. 971802)†
- Bufor wiążący PyroMark Binding Buffer (nr kat. 979306)†
- Roztwór denaturujący PyroMark Denaturation Solution (nr kat. 979307)†
- Bufor płuczający PyroMark Wash Buffer, koncentrat (nr kat. 979308)†
- Bufor przyłączający PyroMark Annealing Buffer (nr kat. 979309)†
- Mieszadło płytki\* do immobilizacji na granulkach
- Blok grzejny\* z możliwością osiągnięcia temperatury 80 °C
- 24-studzienkowa płytka lub paski do PCR
- Nasadki paskowe
- Woda o wysokiej czystości (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm lub odpowiednik)
- Etanol (70%)

\* Należy dopilnować, aby narzędzia zostały skontrolowane i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

† Oznaczenie CE-IVD zgodne z Dyrektywą UE 98/79/KE. Wszystkie inne wymienione produkty nie posiadają oznakowania CE-IVD zgodnego z Dyrektywą UE 98/79/KE.

## Ważne uwagi

### Ogólne środki ostrożności

- ① Użytkownik powinien zawsze zwrócić uwagę na następujące elementy:
  - Używać jałowych końcówek pipet z filtrami.
  - Materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) należy przechowywać i wyjmować odrębnie od wszystkich innych odczynników oraz dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w wydzielonej przestrzeni pracowni.
  - Wszystkie elementy należy całkowicie rozmrozić w temperaturze pokojowej (15–25 °C) przed rozpoczęciem testu.
  - Po rozmrożeniu wymieszać elementy (wielokrotnie dodając i pobierając je pipetą lub stosując mieszadło pulsacyjne) i przez chwilę odwirować.

### Materiał próbek

- ① Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Materiał próbek to ludzkie DNA wyekstrahowane z krwi lub próbek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie.
- ① Nie wolno używać próbek pochodzących od ludzi leczonych heparyną. Próbki krwi, które zostały pobrane do próbek zawierających heparynę jako antykoagulant, nie mogą być używane. Heparyna wpływa na PCR.

### Izolacja DNA

Zestawy firmy QIAGEN przedstawione w Tabeli 4 są zalecane do oczyszczania DNA ze wskazanych rodzajów próbek ludzkich do stosowania z zestawem PyroMark KRAS Kit. Oczyszczanie DNA przeprowadzić zgodnie z instrukcją podaną w podręczniku dołączonym do zestawu.


**Tabela 4. Zestawy do oczyszczania DNA zalecane do stosowania z zestawem PyroMark KRAS Kit**


<b>Materiał próbki</b>	<b>Zestaw do izolacji kwasów nukleinowych</b>	<b>Numer katalogowy (QIAGEN)</b>
Tkanka zatopiona w parafinie	Zestaw QIAamp <sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	Zestaw EZ1 <sup>®</sup> DNA Tissue Kit (48)*	953034
Krew	Zestaw QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit <sup>†</sup>	61104

\* Zgodnie z protokołem stosowania z tkanką zatopioną w parafinie. Zestaw EZ1 DNA Tissue Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu ze stacją roboczą EZ1 Advanced (nr kat. 9001410 lub 9001411) i kartą EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018298), stacją roboczą EZ1 Advanced XL (nr kat. 9001492 lub 9001493) i kartą EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018700) lub stacją roboczą BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (nr kat. 9000705; już niedostępna) i kartą EZ1 DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9015862).

<sup>†</sup> Oznaczenie CE-IVD zgodne z Dyrektywą UE 98/79/KE.

## Kontrole

 Do produktu dołączono dwie kontrole pozytywne. Służą one jako kontrole w reakcjach PCR i sekwencjonowania. Kontrola wt KRAS Control DNA zawiera prawidłową sekwencję genu KRAS, podczas gdy kontrola Mutant KRAS Control DNA zawiera mutacje we wszystkich 3 kodonach. Obie kontrole mają zamienioną zasadę w kodonie 15 i kodonie 59 w celu odróżnienia ich od genomowego DNA. Kontrole mogą być dołączone oddzielnie do analizy lub wymieszane w preferowanych stosunkach. Sekwencje kontroli są przedstawione w Tabeli 5.

 W celu przeprowadzenia analizy kontroli Mutant KRAS Control DNA, należy ustawić opcję Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) jako **NGTGRCGTAGGYA**, ustawiając jako docelową pierwszą zasadę kodonu 12 (patrz Załącznik A, strona 36).

**Tabela 5. Sekwencje kontroli**

<b>Kontrola</b>	<b>Kodon 12</b>	<b>Kodon 13</b>	<b>Kodon 15</b>	<b>Kodon 59</b>	<b>Kodon 61</b>
Prawidłowa	GGT	GGC	GGT	GTA	CAA
Zmutowana	TGT	GAC	GGT	GTA	CAC

 Ponadto, zawsze należy dołączyć kontrolę ujemną (bez matrycowego DNA).



# Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu PyroMark Q24 MDx



## Ważne punkty przed rozpoczęciem


- W razie potrzeby wartość LOB można potwierdzić, używając normalnej próbki lub dostarczonej kontroli wt KRAS Control DNA w celu stworzenia pełnej palety wyników. Aby uzyskać szczegółowe informacje, należy zapoznać się z zaleceniami wytycznych NCCLS Guideline EP17-A pt. Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline (Protokół określania granic wykrywalności i granic oznaczalności; zatwierdzone wytyczne).

## Co należy wykonać przed rozpoczęciem

- Utworzyć konfigurację testu zgodnie z opisem w Załączniku A. Trzeba tego dokonać tylko raz przed pierwszorazowym wykonaniem testu PyroMark KRAS (patrz Załącznik A, strona 36).


## Procedura

1. **Kliknąć  na pasku narzędzi.**  
Utworzony zostanie nowy plik przebiegu.
2. **Wprowadzić parametry przebiegu (patrz Run parameters [Parametry przebiegu] poniżej).**
3. **Skonfigurować płytkę, dodając testy dla obu kodonów 12/13 i kodonu 61 do studzienek odpowiadających analizowanym próbkom. Jako kontrole zaleca się zastosowanie próbki negatywnej (bez DNA) oraz dostarczonych kontroli wt KRAS Control DNA i Mutant KRAS Control DNA.**
4. **Gdy przebieg jest skonfigurowany i gotowy do przeprowadzenia w analizatorze PyroMark Q24 MDx: wydrukować listę wymaganych objętości mieszaniny enzymatycznej, mieszaniny substratu oraz nukleotydów i konfigurację płytki. Wybrać Pre Run Information (Dane wstępne przebiegu) z menu Tools (Narzędzia) i po wyświetleniu raportu kliknąć . Zamknąć plik przebiegu i skopiować go na kartę pamięci USB (dostarczoną z systemem), używając Eksploratora Windows®.**

 Wydrukowane Pre Run Information (dane wstępne przebiegu) można wykorzystać jako szablon do ustawiania próbek (patrz „Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR na granulach Streptavidin Sepharose High Performance”, strona 22).

Aby wykonać przebieg dla płytki w systemie PyroMark Q24 MDx, patrz „Protokół 5: Wykonywanie testów w systemie PyroMark Q24 MDx”, strona 27.

## Parametry przebiegu

Run name (Nazwa przebiegu):	Nazwa przebiegu nadawana jest w chwili zapisywania pliku. Zmiana nazwy pliku powoduje również zmianę nazwy przebiegu.
Instrument method (Metoda instrumentalna):	Wybrać metodę instrumentalną odpowiednio do odczynników i wkładu, które będą używane dla próby; patrz instrukcje dostarczone z produktami.
Plate ID (ID płytki):	<b>Opcjonalnie:</b> Wprowadzić ID płytki PyroMark Q24 Plate.
Bar code (Kod kreskowy):	<b>Opcjonalnie:</b> Wprowadzić numer kodu kreskowego dla płytki lub, jeśli do komputera podłączony jest czytnik kodów kreskowych, umieścić kursor myszki w polu tekstowym Barcode (Kod kreskowy) (klikając to pole) i zeskanować kod kreskowy.
Reagent ID (ID odczynnika):	<b>Opcjonalnie:</b> Wprowadzić numer serii odczynników PyroMark Gold Q24 Reagents, które będą używane. Numer serii znajduje się na etykiecie produktu.   Zaleca się wprowadzenie Reagent ID (ID odczynnika), aby możliwe było śledzenie jakichkolwiek nieoczekiwanych problemów z odczynnikami.
Run note (Uwagi do przebiegu):	<b>Opcjonalnie:</b> Wprowadzić uwagi na temat zawartości lub celu przebiegu.

## Dodawanie plików testu

Aby dodać test do studzienki, można skorzystać z jednej z poniższych opcji:

- Kliknąć prawym przyciskiem myszki na studzienkę i wybrać Load Assay (Załaduj test) z menu kontekstowego.
- Wybrać test w wyszukiwarce skrótów, następnie kliknąć i przeciągnąć test do studzienki.

Studzienka jest kodowana kolorem zgodnie z testem załadowanym do studzienki.

## Wprowadzanie ID próbek i uwag

Aby wprowadzić ID próbki lub uwagę, wybrać komórkę i wpisać tekst.

Aby edytować ID próbki lub uwagę, albo wybrać komórkę (wybrana zostanie bieżąca zawartość) albo dwukrotnie kliknąć komórkę.

## Protokół 2: PCR z zastosowaniem zestawu HotStarTaq Plus Master Mix Kit i zestawu PyroMark KRAS Kit

Niniejszy protokół służy do amplifikacji metodą PCR regionu zawierającego kodon 12 i kodon 13 oraz odrębnej amplifikacji PCR regionu zawierającego kodon 61 z zastosowaniem zestawu PyroMark KRAS Kit.

### Ważne uwagi przed rozpoczęciem

- Polimeraza HotStarTaq Plus DNA Polymerase wymaga etapu aktywacji trwającego **5 min w temp. 95 °C** (patrz *Podręcznik HotStarTaq Plus PCR*).
- Ustawić wszystkie mieszaniny reakcyjne w obszarze innym niż obszar używany dla oczyszczania DNA, dodając matrycowy DNA do reakcji PCR, analizę produktów PCR lub przygotowanie próbek przed analizą Pyrosequencing.
- Stosować jednorazowe końcówki zawierające filtry hydrofobowe, aby zminimalizować zanieczyszczenie krzyżowe.

### Co należy wykonać przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek ze starterami PCR, odwirować je przez chwilę, aby zgromadzić zawartość na dnie probówek.
- Dostosować stężenie DNA w próbce, jeśli to konieczne, do 0,4–2 ng/μl.

### Procedura

- 1. Rozmrozić roztwory starterów i matrycowy kwas nukleinowy.**  
Wymieszać dobrze przed użyciem.
- 2. Przygotować mieszaninę reakcyjną dla każdego zestawu startera PCR zgodnie z Tabelą 6.**  
Standardowo mieszanina reakcyjna zawiera wszystkie elementy potrzebne do reakcji PCR z wyjątkiem próbki.  
Przygotować mieszaninę reakcyjną w objętości większej niż wymagana dla łącznej liczby testów PCR, które mają być wykonane.

**Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdej mieszaniny startera PCR**


<b>Składnik</b>	<b>Objętość na reakcję</b>
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, 2x	12,5 $\mu$ l
PCR Primer KRAS 12/13 <b>lub</b> PCR Primer KRAS 61	1 $\mu$ l
Woda o wysokiej czystości	6,5 $\mu$ l
<b>Całkowita objętość</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

**3. Dokładnie wymieszać mieszaninę reakcyjną i odmierzyć 20  $\mu$ l do każdej probówki do PCR.**

Nie ma potrzeby trzymania probówek do PCR w lodzie, ponieważ polimeraza HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase jest nieaktywna w temperaturze pokojowej.

**4. Dodać 5  $\mu$ l matrycowego DNA (2–10 ng genomowego DNA) do każdej probówki do PCR (patrz Tabela 7), i dokładnie wymieszać.**

 Zawsze należy dołączyć kontrolę negatywną (bez matrycowego DNA).

 Dołączyć reakcje z kontrolami w KRAS Control DNA i Mutant KRAS Control DNA jako kontrolami pozytywnymi (patrz „Kontrole”, strona 16).

**Tabela 7. Przygotowanie reakcji PCR**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość na reakcję</b>
Mieszanina reakcyjna	20 $\mu$ l
DNA próbki	5 $\mu$ l
<b>Całkowita objętość</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

5. Zaprogramować termocykler zgodnie z instrukcją producenta, stosując warunki wyszczególnione w Tabeli 8.

Tabela 8. Zoptymalizowany protokół cykli

			Uwagi
<b>Wstępny etap aktywacji:</b>	5 min	95 °C	W trakcie tego etapu ogrzewania aktywowana jest polimeraza HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase.
<b>Cykl 3-etapowy:</b>			
Denaturacja	20 s	95 °C	
Przylączenie (annealing)	30 s	53 °C	
Elongacja	20 s	72 °C	
Liczba cykli	40		
<b>Ostateczna elongacja:</b>	5 min	72 °C	

6. Umieścić próbki do PCR w termocyklerze i rozpocząć program cyklu.
7. Po amplifikacji przejść do części „Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR na granulkach Streptavidin Sepharose High Performance”.

## Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR na granulkach Streptavidin Sepharose High Performance

Protokół ten służy do immobilizacji matrycowego DNA na granulkach Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) przed analizą w systemie PyroMark Q24 MDx.

### Co należy wykonać przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem odczekać, aby wszystkie wymagane odczynniki i roztwory osiągnęły temperaturę pokojową (15–25 °C).


### Procedura

1. Delikatnie wstrząsać buteleczką zawierającą Streptavidin Sepharose High Performance do uzyskania jednorodnego roztworu.
2. Przygotować mieszaninę główną do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 9. Przygotować mieszaninę reakcyjną w objętości o 10% większej niż wymagana dla łącznej liczby reakcji, które mają być wykonane.

Tabela 9. Mieszanina główna do immobilizacji DNA

Składnik	Objętość na próbkę
Streptavidin Sepharose High Performance	2 $\mu$ l
Bufor wiążący PyroMark Binding Buffer	40 $\mu$ l
Woda o wysokiej czystości	28 $\mu$ l
<b>Całkowita objętość</b>	<b>70 <math>\mu</math>l</b>

3. Dodać 70  $\mu$ l głównej mieszaniny do studzienek 24-studzienkowej płytki lub pasków do PCR wstępnie zdefiniowanych w konfiguracji przebiegu (patrz „Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu PyroMark Q24 MDx”, strona 17).
4. Dodać 10  $\mu$ l biotynylowanego produktu PCR z Protokołu 2 do każdej studzienki zawierającej roztwór główny, zgodnie z wcześniejszym ustaleniem w konfiguracji przebiegu (patrz „Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu Pyromark Q24 MDx”, strona 17).

 Po dodaniu roztworu głównego i produktu PCR całkowita objętość każdej studzienki powinna wynosić 80  $\mu$ l.

**5. Uszczelnić płytkę do PCR (lub paski), używając nasadek paskowych.**

ⓘ Dopilnować, aby nie był możliwy przeciek pomiędzy studzienkami.

**6. Wytrząsać płytkę do PCR w temperaturze pokojowej (15–25 °C) przez 5–10 min przy 1400 obr./min.**

ⓘ W trakcie tego etapu przygotować próżniową stację roboczą PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation celem przygotowania próbek zgodnie z opisem w *Instrukcji użytkowania systemu PyroMark Q24*.

**7. Przejść niezwłocznie do punktu „Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą Pyrosequencing w systemie PyroMark Q24 MDx”.**

ⓘ Granulki Sepharose ulegają szybkiej sedymentacji. Pobranie granulek musi nastąpić natychmiast po wytrząsaniu.

## Protokół 4: Przygotowanie próbek przed analizą Pyrosequencing w systemie PyroMark Q24 MDx

Protokół ten służy do przygotowania jednoniciowego DNA i przyłączania startera sekwencyjnego do matrycy przed analizą Pyrosequencing w systemie PyroMark Q24 MDx.

### Ważne uwagi przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek ze starterami sekwencyjnymi odwirować je przez chwilę, aby zgromadzić zawartość na dnie probówek.
- Dodać 2 różne startery sekwencyjne w sposób wstępnie zdefiniowany dla płytki w konfiguracji przebiegu (patrz „Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu PyroMark Q24 MDx”, strona 17), w zależności od regionu analizy (kodony 12 i 13 lub kodon 61).

### Co należy wykonać przed rozpoczęciem

- Umieścić uchwyt płytki PyroMark Q24 Plate Holder na bloku grzejmym w temperaturze 80 °C w celu jego użycia w kroku 17.

### Procedura

- 1. Rozcieńczyć wystarczającą ilość każdego startera sekwencyjnego (Seq Primer KRAS 12/13 i Seq Primer KRAS 61) w buforze przyłączającym PyroMark, jak przedstawiono w Tabeli 10.**

Przygotować rozcieńczony starter sekwencyjny w objętości większej niż wymagana do łącznej liczby próbek do sekwencjonowania (dla danej liczby próbek + jednej dodatkowej).

**Tabela 10. Przykładowe rozcieńczenie starterów sekwencyjnych**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość na próbkę</b>	<b>Objętość dla 9 + 1 reakcji</b>
Seq Primer KRAS 12/13 <b>lub</b> Seq Primer KRAS 61	0,8 µl	8 µl
Bufor przyłączający PyroMark Annealing Buffer	24,2 µl	242 µl
<b>Całkowita objętość</b>	<b>25 µl</b>	<b>250 µl</b>

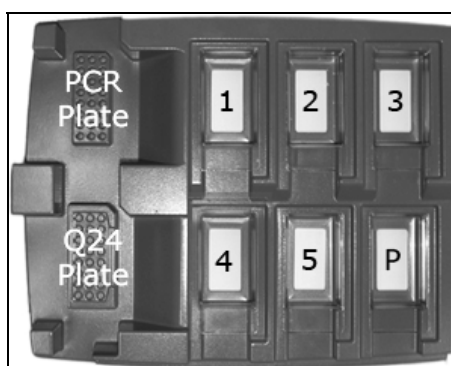


2. Dodać 25  $\mu$ l rozcieńczonego startera sekwencyjnego do każdej studzienki płytki PyroMark Q24 Plate zgodnie z konfiguracją przebiegu (patrz „Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu Pyromark Q24 MDx”, strona 17).

**i** Utrzymywać jeden z uchwytów płytki PyroMark Q24 Plate Holders (dostarczony z próżniową stacją roboczą PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation) w temperaturze pokojowej (15–25°C), i wykorzystać go jako wsparcie podczas przygotowywania i przesuwania płytki.

3. Umieścić płytkę do PCR lub paski przygotowane w Protokole 3 i płytkę PyroMark Q24 Plate na stole roboczym (patrz Rycina 3).

**i** Upewnić się, że ukierunkowanie płytki jest takie samo jak podczas ładowania próbek.



Rycina 3. Umieszczanie płytki do PCR (lub pasków) oraz płytki PyroMark Q24 Plate w próżniowej stacji roboczej.


4. Włączyć podciśnienie w urządzeniu, otwierając włącznik próżni.
5. Ostrożnie obniżyć sondy z filtrem do płytki do PCR (lub pasków) w celu pobrania granulek zawierających unieruchomiony matrycowy kwas nukleinowy. Utrzymać sondy w miejscu przez 15 s. Zachować ostrożność, unosząc narzędzie.

**i** Granulki Sepharose ulegają szybkiej sedymentacji. Jeśli od wytrząsania płytki (lub pasków) upłynęła więcej niż 1 min, ponownie przeprowadzić wytrząsanie przez 1 min przed pobraniem granulek.

6. Przenieść narzędzie do korytka zawierającego 70% etanol (korytko nr 1). Płukać sondy z filtrami przez 5 s.
7. Przenieść narzędzie do korytka zawierającego roztwór denaturujący (korytko nr 2). Płukać sondy z filtrami przez 5 s.
8. Przenieść narzędzie do korytka zawierającego bufor do przemywania (korytko nr 3). Płukać sondy z filtrami przez 10 s.
9. Unieść narzędzie pionowo do tyłu o kąt przekraczający 90° na 5 s, a następnie opuścić, aby odsączyć płyn z sond z filtrami (patrz Rycina 4).



Rycina 4. Ilustracja przedstawiająca narzędzie próżniowe uniesione pionowo o kąt przekraczający 90°.

10. W momencie trzymania narzędzia ponad płytką PyroMark Q24 Plate, zamknąć włącznik próżni aparatu (Off [Wył.]).
11. Zwolnić granulki w płytce zawierającej startery sekwencyjne Seq Primers, wstrząsając delikatnie narzędziem na boki. Umożliwić oparcie się sond z filtrami na dnie studzienek.
12. Przenieść narzędzie do korytka zawierającego wodę pozbawioną nukleazy (korytko 4) i wytrząsać narzędziem przez 10 s.
13. Przepłukać sondy z filtrami, opuszczając sondy do wody pozbawionej nukleazy (korytko 5) i włączając próżnię. Przepłukać sondy 70 ml wody pozbawionej nukleazy.
14. Unieść narzędzie pionowo do tyłu o kąt przekraczający 90° na 5 s, a następnie opuścić, aby odsączyć płyn z sond z filtrami (patrz Rycina 4).
15. Zamknąć włącznik próżni na narzędziu (Off [Wył.]) i umieścić narzędzie w pozycji Parking (P).
16. Wyłączyć pompę próżniową.  
 Na zakończenie dnia pracy usunąć zlewki i pozostałe roztwory oraz skontrolować próżniową stację roboczą PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation pod kątem obecności kurzu i rozpryskanej cieczy; patrz Załącznik B, strona 38.
17. Wygrzewać płytkę PyroMark Q24 Plate z próbkami w temperaturze 80 °C przez 2 min, używając wstępnie podgrzanego uchwytu płytki PyroMark Q24 Plate Holder.
18. Usunąć płytkę PyroMark Q24 Plate z uchwytu płytki i odczekać do ochłodzenia się próbek do temperatury pokojowej (15–25 °C) przez co najmniej 5 min.
19. Przejść do punktu „Protokół 5: Wykonywanie testu w systemie PyroMark Q24 MDx”.

## Protokół 5: Wykonywanie testu w systemie PyroMark Q24 MDx

Protokół ten opisuje proces ładowania odczynników PyroMark Gold Q24 Reagents do wkładu PyroMark Q24 Cartridge oraz rozpoczynanie i kończenie przebiegu w systemie PyroMark Q24 MDx. Szczegółowe informacje na temat konfigurowania przebiegu znajdują się w *Instrukcji użytkownika systemu PyroMark Q24*.

### Ważne punkty przed rozpoczęciem


- Raport ze Pre Run information (wstępnymi danymi przebiegu) znajduje się w menu Tools (Narzędzia) w konfiguracji przebiegu (patrz „Protokół 1: Konfigurowanie przebiegu dla systemu PyroMark Q24 MDx”, strona 17), i zawiera informacje na temat objętości nukleotydów, enzymu i buforu substratu potrzebnych dla danego testu.

### Procedura

1. Ładowanie do wkładu PyroMark Q24 Cartridge odpowiednich objętości nukleotydów, enzymu i buforów substratu.
2. Otworzyć drzwiczki wkładu i wprowadzić wkład wypełniony odczynnikami, z etykietą skierowaną na zewnątrz. Całkowicie wepchnąć wkład i następnie wcisnąć go w dół.
3. Upewnić się, że z przodu wkładu widoczna jest linia i zamknąć drzwiczki.
4. Otworzyć ramkę utrzymującą płytkę i umieścić płytkę na bloku grzejnym.
5. Zamknąć ramkę utrzymującą płytkę i wieko aparatu.
6. Włożyć kartę pamięci USB (zawierającą plik przebiegu) do portu USB na przedniej ściance aparatu.

 Nie usuwać karty pamięci USB przed zakończeniem przebiegu.

7. Wybrać Run (Przebieg) w głównym menu (używając przycisków ekranowych  $\blacktriangle$  lub  $\blacktriangledown$ ) i nacisnąć OK.
8. Wybrać plik przebiegu, używając przycisków ekranowych  $\blacktriangle$  i  $\blacktriangledown$ .

 Aby przejrzeć zawartość folderu, wybrać folder i nacisnąć Select (Wybierz). Aby cofnąć się do poprzedniego widoku, nacisnąć Back (Wstecz).

9. Po wybraniu pliku przebiegu nacisnąć Select (Wybierz), aby rozpocząć przebieg.
10. Po zakończeniu przebiegu i potwierdzeniu przez aparat, że plik przebiegu został zapisany na karcie pamięci USB, nacisnąć Close (Zamknij).

11. Usunąć kartę pamięci USB.
12. Otworzyć wieko aparatu.
13. Otworzyć drzwiczki wkładu i usunąć wkład z odczytnikami, unosząc go i wyciągając na zewnątrz.
14. Zamknąć drzwiczki.
15. Otworzyć ramkę utrzymującą płytkę i usunąć płytkę z bloku grzejnego.
16. Zamknąć ramkę utrzymującą płytkę i wieko aparatu.
17. Wyrzucić płytkę i wyczyścić wkład.
18. Dokonać analizy przebiegu zgodnie z punktem „Protokół 6: Analiza przebiegu PyroMark Q24 MDx”.

## Protokół 6: Analiza przebiegu PyroMark Q24 MDx

Protokół ten opisuje analizę mutacji po zakończeniu przebiegu testu KRAS z zastosowaniem oprogramowania PyroMark Q24 MDx Software.

### Procedura

1. Umieścić kartę pamięci USB (zawierającą przetworzony plik przebiegu) w porcie USB komputera.
2. Przenieść plik przebiegu z karty pamięci USB do żądanej lokalizacji w komputerze, używając Eksploratora Windows.
3. Otworzyć plik przebiegu w trybie AQ oprogramowania PyroMark Q24 MDx Software, albo wybierając Open (Otwórz) w menu File (Plik), albo dwukrotnie klikając plik (☑) w wyszukiwarce skrótów.
4. W celu wykonania analizy przebiegu i uzyskania raportu z wynikami należy kliknąć jeden z przycisków Analizy (Analizuj).



Analizuj wszystkie studzienki



Analizuj wybraną studzienkę

Wyniki analizy (częstotliwości dla alleli) i ocena jakości są wyświetlane powyżej pozycji zmiennej w zapisie pirogramu. Szczegółowe informacje na temat analizowania przebiegu znajdują się w *Instrukcji użytkownika systemu PyroMark Q24*.

5. Aby utworzyć raport, wybrać **Full Report (Pełen raport)** z opcji **Reports for AQ runs (Raporty dla przebiegów QA)** w menu.



Najczęściej mutacje w genie KRAS znajdują się w nukleotydzie 35 (druga zasada kodonu 12). Z tego względu ustawienie opcji Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) w Analysis Setup (Konfiguracja analizy) dotyczy standardowo mutacji w tej pozycji (patrz Załącznik A, strona 36). Jeśli próbka zawiera mutację w nukleotydzie 34 (pierwsza zasada kodonu 12) opcja Sequence to Analyze może być zmieniona, aby analizować również stan mutacji w tej pozycji, według opisu w Załączniku A.

Zaktualizowane częstotliwości występowania mutacji w ludzkim genie KRAS w kodonie 12/13 i kodonie 61 podawane są w Internecie przez Sanger Institute na stronie [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).



W celu uzyskania wiarygodnych wyników zalecamy uwzględnianie pojedynczych pików o wysokości powyżej 30 RLU. Wartość 30 RLU należy ustawić w konfiguracji testu jako „required peak height for passed quality” (wymagana wysokość pików dla akceptowalnej jakości testu) (patrz Załącznik A i *Instrukcja użytkownika systemu PyroMark Q24*).

**i** Raport z wynikami analizy AQ powinien być używany do udokumentowania kwantyfikacji alleli. Liczby przedstawione w pirogramie są zaokrąglone i nie ukazują dokładnych wartości.

**i** **Ponowna analiza próbek, w których nie wykryto mutacji w nukleotydzie 35, lub z oceną jakości oznaczoną jako Check (Skontrolować) lub Failed (Niepowodzenie)**

Stanowczo zalecamy powtórzenie analizy wszystkich próbek, dla których nie wykryto mutacji w nukleotydzie 35, oraz próbek, dla których ocena jakości została oznakowana jako Check (Skontrolować) lub Failed (Niepowodzenie) przy wskazaniu w opcji Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) docelowych mutacji w nukleotydzie 34. Oceny jakości Check i Failed mogą wskazywać pik odniesienia w pozycji, w której nie jest oczekiwana mutacja w nukleotydzie 35. Obecność pików w którymkolwiek z pierwszych 3 preparatów wskazuje na obecność mutacji w nukleotydzie 34.

Aby ponownie przeanalizować próbkę i ustawić docelowe mutacje w nukleotydzie 34, przejść do Analysis Setup (Konfiguracja analizy) i zmienić ustawienie opcji Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) z **GNTGRCGTAGGYA** na **NGTGRCGTAGGYA**. Nacisnąć przycisk Apply (Zastosuj) i kliknąć To All (Do wszystkich), gdy wyświetlone zostanie okno Apply Analysis Setup (Zastosuj ustawienia analizy).

**i** **Ponowne testowanie próbek w celu wykrycia mutacji o niskim poziomie**

Stanowczo zaleca się dołączenie normalnej próbki do każdego przebiegu w celu porównania. Jakakolwiek próbka z częstotliwością mutacji większą niż dla odpowiedniej pozycji w normalnej próbce powinna zostać zbadana w odniesieniu do tabeli przedstawiającej granicę wykrywalności (patrz Tabela 11, strona 31). Próbki można również porównać między sobą w celu ujawnienia mutacji o niezwykle wysokich częstotliwościach.

Jako regułę można przyjąć, że próbki, które podejrzewa się o mutację w zakresie od LOD (Tabela 11) do LOD + 3% jednostek, należy poddać ponownej analizie w dwóch egzemplarzach wraz z analizą duplikatów próbki normalnej. Jeśli oba duplikaty uzyskają ten sam wynik jak w oryginalnej analizie i będą wyraźnie różnić się od kontroli normalnej, wówczas próbkę można uznać za pozytywną w zakresie danej mutacji. Należy zaznaczyć, że decyzja dotycząca leczenia pacjentów z nowotworem nie może opierać się wyłącznie na stanie mutacji genu KRAS.

**i** Jeśli podejrzewa się mutację GGT → GTT, za pozytywny można uznać wynik powyżej 1%. Poziom ten może różnić się istotnie pomiędzy replikami (patrz „Granica próby zerowej i granica wykrywalności”, strona 9).

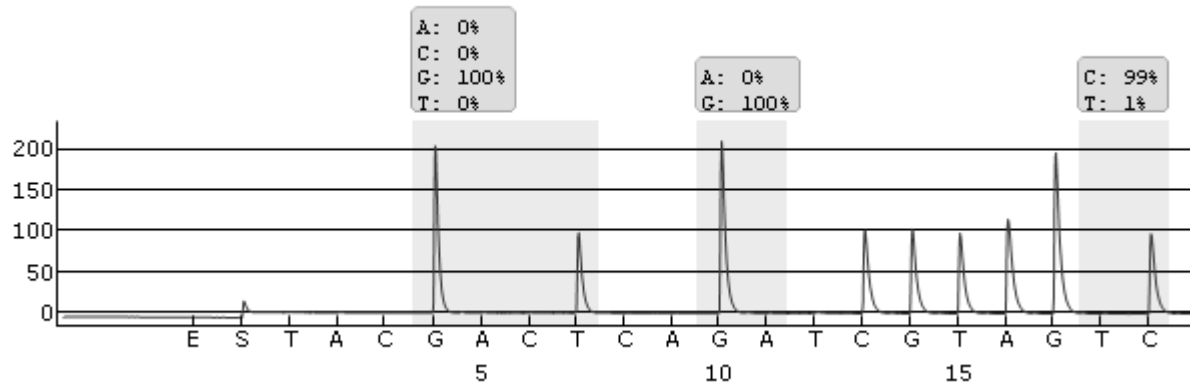
**Tabela 11. LOB i LOD określone dla specyficznych mutacji**

<b>Mutacja</b>	<b>LOB (%)</b>	<b>LOD (%)</b>	<b>COSMIC ID* (V42)</b>
<b>Kodon 12 (GGT)</b>			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	nd	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
<b>Kodon 13 (GGC)</b>			
GAC	0,3	1,9	532
<b>Kodon 61 (CAA), przy testowaniu w odwrotnym kierunku (TTG)</b>			
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

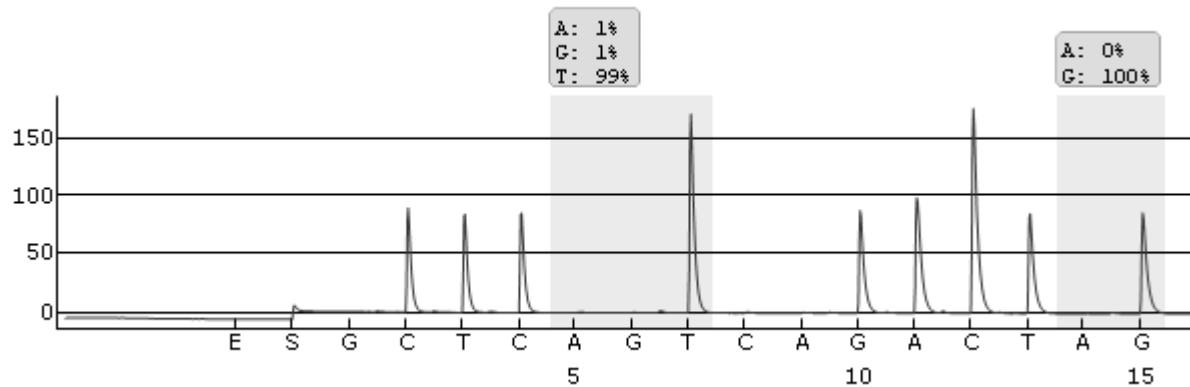
\* Z Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Katalog mutacji somatycznych w nowotworach), dostępnego w Internecie na stronie Sanger Institute: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).  
nd: nie dotyczy.

## Wyniki reprezentatywne

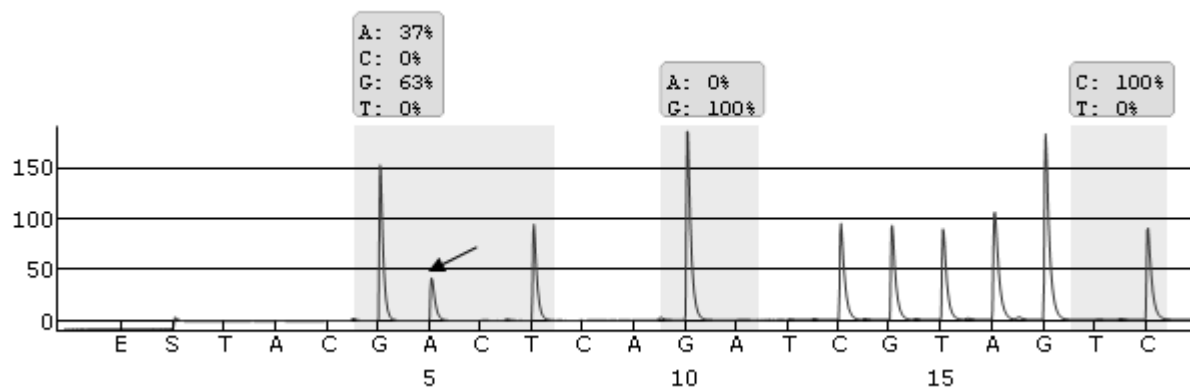
Reprezentatywne wyniki pirogramów przedstawiono na Rycinach 5–10.



Rycina 5. Wykres pirogramu uzyskany po analizie próbki z prawidłowym genotypem w kodonach 12 i 13.

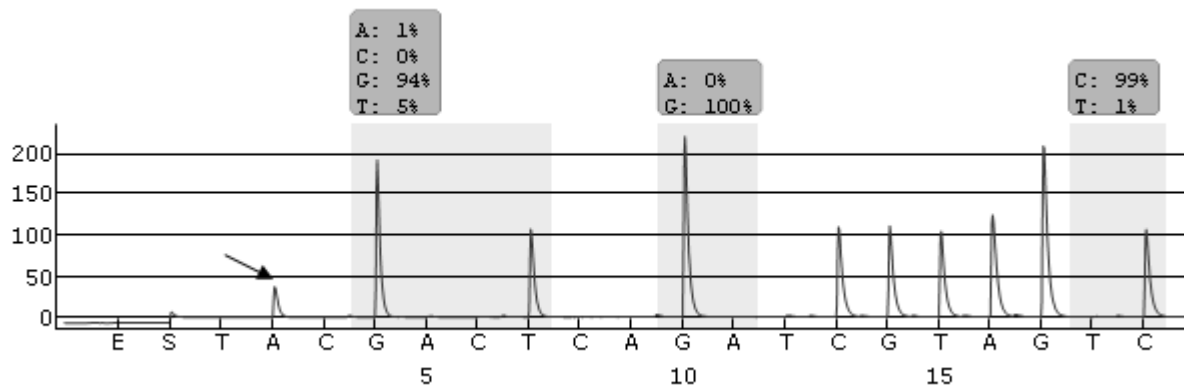


Rycina 6. Wykres pirogramu uzyskany po analizie próbki z prawidłowym genotypem w kodonie 61.

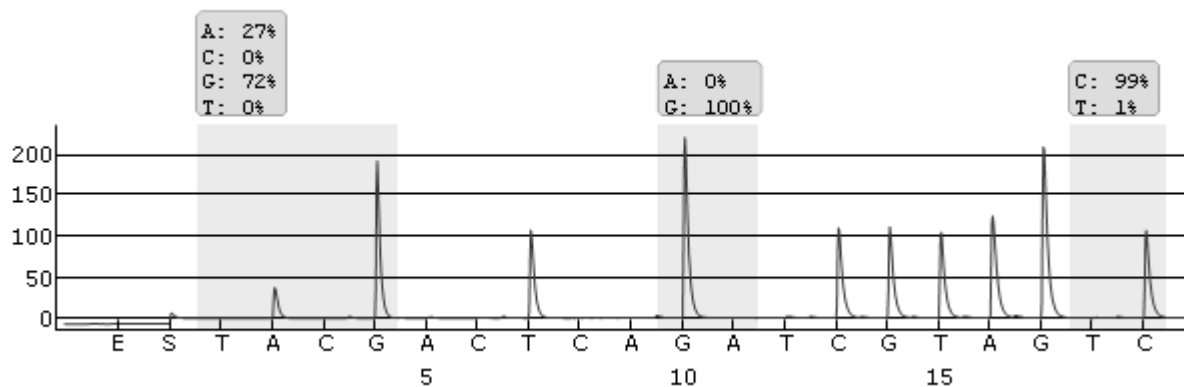


Rycina 7. Wykres pirogramu uzyskany po analizie próbek z mutacją GGT → GAT w zasadzie 2 kodonu 12 (nukleotydy 35, wskazany strzałką).

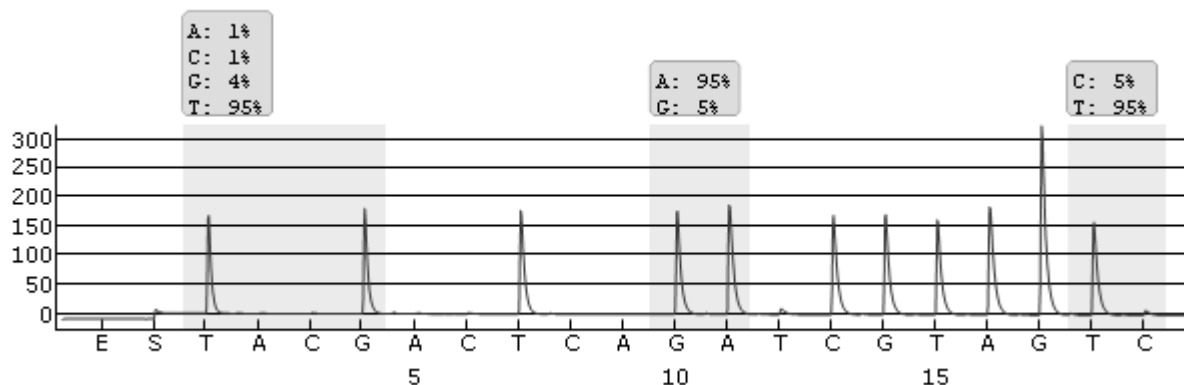




**Rycina 8. Wykres pirogramu uzyskany po analizie próbki z mutacją GGT → AGT w zasadzie 1 kodonu 12 (nukleotyd 34, wskazany strzałką) z opcją Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) GNTGRCGTAGGYA nakierowaną na zasadę 2 w kodonie 12 (nukleotyd 35). Kolorem żółtym wskazano nieoczekiwaną sekwencję, która wymaga skontrolowania.**



**Rycina 9. Wykres pirogramu i wynik uzyskany po ponownej analizie próbki z Ryciny 8. Mutacja GGT → AGT została ponownie przeanalizowana z ustawieniem opcji Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) jako NGTGRCGTAGGYA na docelową zasadę 1 w kodonie 12 (nukleotyd 34).**



**Rycina 10. Wykres pirogramu uzyskany po analizie kontroli Mutant KRAS Control DNA z opcją Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) ustawioną jako NGTGRCGTAGGYA na pierwszą zasadę kodonu 12.**

## Przewodnik rozwiązywania problemów

Ten przewodnik rozwiązywania problemów może być przydatny w rozwiązywaniu wszelkich problemów, które mogą się pojawić. Więcej informacji można uzyskać również na stronie Frequently Asked Questions (Często zadawane pytania) naszego Centrum Pomocy Technicznej: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Naukowcy w Dziale Pomocy Technicznej firmy QIAGEN zawsze z przyjemnością odpowiedzą na wszelkie pytania, które mogą się pojawić i dotyczyć informacji i protokołów zawartych w niniejszym podręczniku lub technologii próbek i testów (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej okładce lub na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**i** Ogólne informacje na temat rozwiązywania problemów znajdują się w *Instrukcji użytkownika aparatu PyroMark Q24*.

### Komentarze i sugestie

---

#### Sygnaly w kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

- a) Przenikanie pomiędzy studzienkami **i** Sygnał z jednej studzienki jest wykrywany w sąsiedniej studzience. Unikać umieszczania próbek o wysokim natężeniu sygnału obok studzienek z kontrolą bez matrycy.
- b) Zanieczyszczenie reakcji PCR **i** Używać jałowych końcówek pipet z filtrami. Przechowywać i wyjmować materiały takie jak próbki, kontrolne plazmidy i amplikony oddzielnie od odczynników do PCR.

#### Słaba lub nieoczekiwana sekwencja

- Niska jakość genomowego DNA **i** Niska jakość genomowego DNA może powodować niepowodzenie reakcji PCR. Analizować próbki PCR z zastosowaniem techniki elektroforetycznej (używając np. systemu QIAxcel<sup>®</sup> lub elektroforezy w żelu agarozowym).

#### Wynik oznaczony jako Check (Skontrolować) lub Failed (Niepowodzenie)

- Rzadka mutacja nieokreślona w konfiguracji testu **i** Zmodyfikować sekwencję do analizy w konfiguracji testu (patrz Załącznik A, strona 36) i ponownie przeanalizować przebieg.

## Komentarze i sugestie

---

### Wysokie wartości tła

Nieprawidłowe przechowywanie nukleotydów

ⓘ Przechowywać nukleotydy w temperaturze 2–8 °C. Przechowywanie w temperaturze -20 °C może powodować zwiększenie wartości tła.

### Brak sygnałów dla kontroli pozytywnych (wł KRAS Control DNA i Mutant KRAS Control DNA)

a) Niewystarczająca ilość mieszaniny enzymu lub substratu dla wszystkich studzienek

ⓘ Dopilnować, aby napełnić wkład PyroMark Q24 Cartridge zgodnie z Pre Run Information (Dane wstępne przebiegu) w menu Tools (Narzędzia).

b) Odczynniki nieprawidłowo przechowywane lub rozcieńczone

ⓘ Przygotować odczynniki PyroMark Gold Q24 Reagents zgodnie z instrukcjami dostarczonymi z odczynnikiemami.

### Nieoczekiwany pik na wykresie w ostatniej pozycji zmiennej

Zanieczyszczenie kontrolnym plazmidowym DNA


ⓘ Kontrolne plazmidy, kontrole wł KRAS Control DNA i Mutant KRAS Control DNA, zawierają unikalną różnicę sekwencji, którą można wykorzystać do identyfikacji sygnałów pochodzących z kontroli (patrz „Kontrole”, strona 16 i „Załącznik A: Konfigurowanie testów PyroMark KRAS”, strona 36). Używać jałowych końcówek pipet z filtrami. Przechowywać i wyjmować materiały takie jak próbki, kontrolne plazmidy i amplikony oddzielnie od odczynników do PCR.

# Załącznik A: Konfigurowanie testów PyroMark KRAS


Przed pierwszorazowym wykonaniem testu PyroMark KRAS, należy skonfigurować plik testu według poniższego opisu.

## Procedura


### Kodony 12 i 13 genu KRAS

1. Skonfigurować test dla kodonów 12 (pozycja 2) i 13 (pozycja 2) genu KRAS, używając oprogramowania PyroMark Q24 MDx Software.
2. Kliknąć  na pasku narzędzi i wybrać New AQ Assay (Nowy test AQ).
3. Wpisać następującą sekwencję w opcji Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy).

**GNTGRCGTAGGYA**

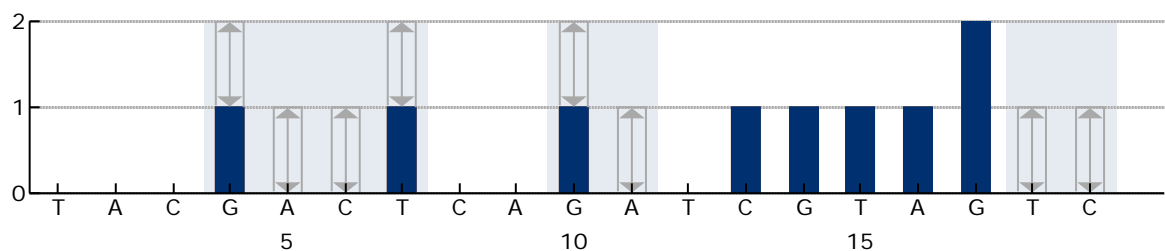
 Najczęstsze mutacje w kodonie 12 będą wykrywane w nukleotydzie 35 (druga pozycja). Jeśli mutacje będą obecne w nukleotydzie 34 (pierwsza pozycja), zmienić opcję Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) na następującą sekwencję.

**NGTGRCGTAGGYA**

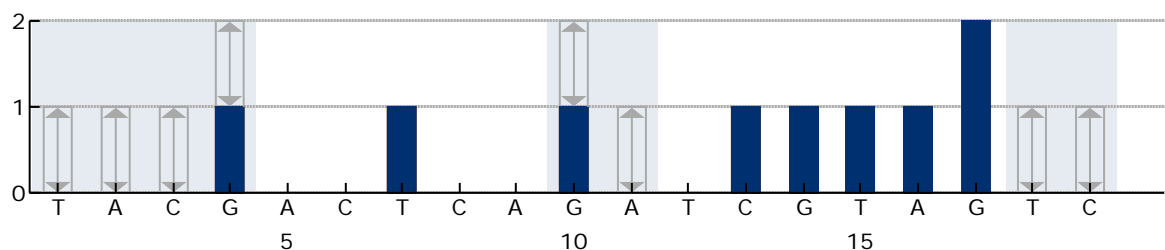
 Zmienna pozycja 3 (Y) umożliwi rozróżnienie pomiędzy sygnałami pochodzącymi od kontrolnych plazmidów (kontrolne wt KRAS Control DNA i Mutant KRAS Control DNA) oraz sygnałów genomowego DNA. Podczas gdy genomowy DNA daje C, kontrolne plazmidy dają T w zmiennej pozycji 3.

4. Ręcznie wprowadzić następujące zlecenie rozdziału (Dispensation Order).


**TACGACTCAGATCGTAGTC**




Rycina 11. Histogram dla kodonów 12 (nukleotyd 35) i 13 (nukleotyd 38) z ustawieniem Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) jako GNTGRCGTAGGYA.




Rycina 12. Histogram dla kodonów 12 (nukleotyd 34) i 13 (nukleotyd 38) z ustawieniem Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy) jako NGTGRCGTAGGYA.

- Kliknąć zakładkę **Analysis Parameters (Parametry analizy)** i zwiększyć wartość **Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:** (Próg wysokości piku - wymagana wysokość piku dla akceptowalnej jakości testu:) na **30**.
- Kliknąć  na pasku narzędzi i zapisać test jako **KRAScodon 12+13**.

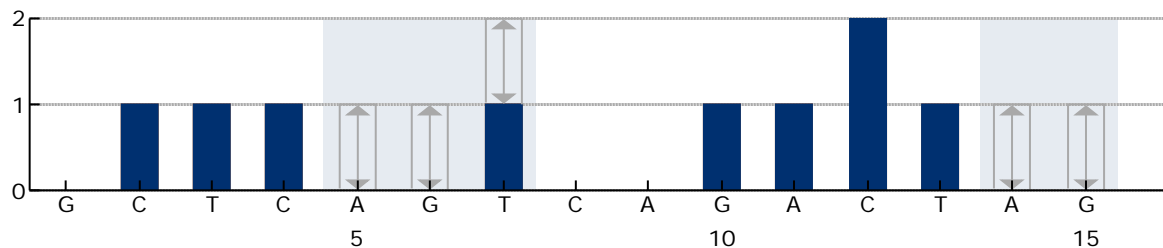
### Kodon 61 genu KRAS

- Kliknąć  na pasku narzędzi i wybrać **New AQ Assay (Nowy test AQ)**.
- Wpisać następującą sekwencję w opcji **Sequence to Analyze (Sekwencja do analizy)**.


**CTCDTGACCTRC**

 Zmienna pozycja 2 (R) umożliwia rozróżnienie pomiędzy sygnałami pochodzącymi od kontrolnych plazmidów (kontrolne wt KRAS Control DNA i Mutant KRAS Control DNA) oraz sygnałów genomowego DNA. Podczas gdy genomowy DNA daje G, kontrolne plazmidy dają A w zmiennej pozycji 2.


- Ręcznie dodać następujące zlecenie rozdziału (**Dispensation Order**).  
**GCTCAGTCAGACTAG**



Rycina 13. Histogram dla kodonu 61 (nukleotyd 183).

- Kliknąć zakładkę **Analysis Parameters (Parametry analizy)** i zwiększyć wartość **Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:** (Próg wysokości piku - wymagana wysokość piku dla akceptowalnej jakości testu) na **30**.
- Kliknąć  na pasku narzędzi i zapisać test jako **KRAScodon 61**.

## Załącznik B: Opróżnianie pojemnika odpadów i korytek

<b>OSTRZEŻENIE</b> 	<b>Niebezpieczne substancje chemiczne</b> <p>Roztwór denaturujący stosowany wraz z próżniową stacją roboczą zawiera wodorotlenek sodu, który działa drażniąco na oczy i skórę.</p> <p>Zawsze należy nosić ochronne okulary, rękawiczki i fartuch laboratoryjny.</p> <p>Podmiot odpowiedzialny (np. kierownik laboratorium) musi podjąć niezbędne środki ostrożności, aby zapewnić, że otaczająca przestrzeń robocza jest bezpieczna i osoby obsługujące aparaturę nie są narażone na groźne poziomy toksycznych substancji (chemicznych lub biologicznych) określone w stosownych kartach Material Safety Data Sheet (MSDS) lub dokumentach OSHA,* ACGIH<sup>†</sup> lub COSHH<sup>‡</sup>.</p> <p>Usuwanie oparów i odpadów musi odbywać się zgodnie ze wszystkimi krajowymi, stanowymi i miejscowymi zasadami i przepisami dotyczącymi zdrowia i bezpieczeństwa.</p>
---	---

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

<sup>†</sup> ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (USA)

<sup>‡</sup> COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Wielka Brytania)

Należy pamiętać o przestrzeganiu federalnych, stanowych i lokalnych przepisów dotyczących ochrony środowiska przy usuwaniu odpadów laboratoryjnych.

### **Ważne punkty przed rozpoczęciem**

- Protokół ten wymaga wody o wysokiej czystości (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com) lub odpowiednika).

### **Procedura**

1. **Upewnić się, że narzędzie próżniowe nie jest podłączone do próżni. Upewnić się, że próżnia jest zamknięta (Off [Wył.]) i pompa próżniowa jest wyłączona.**
2. **Wyrzucić wszelkie pozostałości roztworów z korytek.**
3. **Przeplukać korytka wodą o wysokiej czystości lub wymienić je, jeśli jest to konieczne.**
4. **Opróżnić zbiornik na odpady.**

 Nasadkę można zdjąć bez odłączania przewodu.

5. Jeśli konieczne jest wyczyszczenie próżniowej stacji roboczej (np. z uwagi na kurz lub rozpryskanie cieczy), należy postępować zgodnie z *Instrukcją użytkownika systemu PyroMark Q24*.

## Bibliografia

Firma QIAGEN prowadzi dużą, aktualną internetową bazę danych publikacji naukowych na temat zastosowania produktów QIAGEN. Obszerne opcje wyszukiwania umożliwiają znalezienie potrzebnych artykułów albo poprzez proste wyszukiwanie słowa kluczowego, albo na podstawie określenia zastosowania, obszaru badań, tytułu itp.

Pełna lista piśmiennictwa znajduje się w internetowej bazie danych QIAGEN na stronie [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) lub można ją uzyskać kontaktując się z Działem Pomocy Technicznej QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem.

## Informacja dotycząca zamawiania

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Zestaw PyroMark KRAS Kit (24)	Na 24 reakcje w systemie PyroMark Q24 MDx: startery Seq Primers, PCR Primers, kontrole wt KRAS Control DNA, Mutant KRAS Control DNA	971450
PyroMark Q24 MDx	Platforma do wykrywania sekwencyjnego do analizy Pyrosequencing 24 próbek równolegle	9001513
Próżniowa stacja robocza PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Próżniowa stacja robocza (220 V) do przygotowywania 24 próbek równolegle, z produktu reakcji PCR do jednoniciowej matrycy	9001515* 9001517†
Oprogramowanie PyroMark Q24 MDx Software	Aplikacja	9019063
<b>Akcesoria</b>		
Płytki PyroMark Q24 Plate (100)	24-studzienkowa płytka reakcyjna do sekwencjonowania	979301
Wkład PyroMark Q24 Cartridge (3)	Wkłady do odmierzania nukleotydów i odczynników	979302
Odczynniki PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Dla 5 x 24 próbek: Mieszanina enzymu, mieszanina substratu i nukleotyd	971802
Bufor wiążący PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Do wiązania biotynylowanego produktu PCR do granulek Sepharose	979306
Roztwór denaturujący PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Do denaturacji dwuniciowego produktu PCR w jednoniciowy matrycowy DNA	979307
Bufor płuczający PyroMark Wash Buffer, koncentrat (200 ml)	Do płukania jednoniciowego DNA	979308
Bufor przyłączający PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Do przyłączania startera sekwencyjnego do jednoniciowego produktu PCR i reakcji Pyrosequencing	979309

\* Dla pozostałych krajów (z wyjątkiem Wielkiej Brytanii).

† Dla Wielkiej Brytanii.



<b>Produkt</b>	<b>Spis treści</b>	<b>Nr kat.</b>
Sonda z filtrem do przygotowywania próżniowego preparatów PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Wielorazowe sondy z filtrem do próżniowej stacji roboczej PyroMark Vacuum Workstation Q96 i Q24	979010
Kontrola PyroMark Control Oligo	Do kontroli systemu podczas instalacji	979303
Kontrola PyroMark Q24 Validation Oligo	Do potwierdzenia charakterystyki działania systemu	979304
<b>Produkty powiązane</b>		
Zestaw HotStarTaq Plus Master Mix Kit (250)	Dla 250 x 20 $\mu$ l reakcji: 3 x 0,85 ml zestawu HotStarTaq Plus Master Mix, zawierającego łącznie 250 jednostek polimerazy HotStarTaq Plus DNA Polymerase, 1 x 0,55 ml koncentratu CoralLoad <sup>®</sup> , 2 x 1,9 ml wody pozbawionej RNAzy	203643
Zestaw HotStarTaq Plus Master Mix Kit (1000)	Dla 1000 x 20 $\mu$ l reakcji: 12 x 0,85 ml zestawu HotStarTaq Plus Master Mix, zawierającego łącznie 1000 jednostek polimerazy HotStarTaq Plus DNA Polymerase, 4 x 0,55 ml koncentratu CoralLoad, 8 x 1,9 ml wody pozbawionej RNAzy	203645
Zestaw HotStarTaq Plus Master Mix Kit (2500)	Dla 2500 x 20 $\mu$ l reakcji: 25 ml zestawu HotStarTaq Plus Master Mix, zawierającego łącznie 2500 jednostek polimerazy HotStarTaq Plus DNA Polymerase, 5,5 ml koncentratu CoralLoad, 2 x 20 ml wody pozbawionej RNAzy	203646
Zestaw QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Dla 50 preparatów DNA: 50 kolumn QIAamp MinElute <sup>®</sup> , proteinaza K, bufory, probówki (2 ml)	56404
Zestaw EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Dla 48 preparatów: wkłady na odczynniki (tkankowe), jednorazowe końcówki z filtrem, jednorazowe uchwyty końcówek, probówki (2 ml), probówki do wymywania (1,5 ml), bufor G2, proteinaza K	953034

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Zestaw QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Dla 50 preparatów: kolumny QIAamp Mini Spin, bufory, odczynniki, probówki, łączniki VacConnector	61104

Aktualne informacje na temat licencji i gwarancji właściwych dla produktu znajdują się w odpowiednim podręczniku lub instrukcji użytkownika zestawu firmy QIAGEN. Podręczniki i instrukcje użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) lub na zamówienie z Działu Pomocy Technicznej lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Strona pusta, pozostawiona celowo

Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation lub jej filie); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose™ (GE Healthcare); Therascreen® (DxS Limited); Windows® (Microsoft Corporation).

#### **Ograniczona umowa licencyjna**

Stosowanie tego produktu oznacza zgodę jakiegokolwiek nabywcy lub użytkownika zestawu PyroMark KRAS Kit na następujące warunki:

1. Zestaw PyroMark KRAS Kit może być używany wyłącznie zgodnie z *Podręcznikiem zestawu PyroMark KRAS Kit* i wyłącznie w połączeniu z elementami dołączonymi do zestawu. Firma QIAGEN nie udziela pozwolenia w ramach żadnej ze swoich własności intelektualnych na stosowanie lub łączenie elementów dołączonych do tego zestawu z innymi elementami nie dołączonymi do tego zestawu, jeśli nie zostało to opisane w *Podręczniku zestawu PyroMark KRAS Kit* i dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Jeśli nie zostało to wyraźnie sformułowane w licencjach, firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie naruszy praw stron trzecich.
3. W ramach licencji zestaw i jego elementy są przeznaczone do jednorazowego użycia i nie można ich używać ponownie, odnawiać ani odsprzedawać.
4. QIAGEN szczególnie wyłącza wszelkie inne licencje, wyraźne lub dorozumiane, inne niż udzielone licencje wyraźne.
5. Nabywca lub użytkownik zestawu wyraża zgodę, że nie będzie podejmować ani nie dopuści innej osoby do podejmowania kroków, które mogłyby prowadzić do działań lub ułatwiać działania zakazane powyżej. Firma QIAGEN może dochodzić zakazów niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w jakimkolwiek sądzie, i uzyskać zwrot wszystkich kosztów dochodzeniowych i sądowych, w tym opłat adwokackich, poniesionych w ramach działań na rzecz dochodzenia warunków Ograniczonej umowy licencyjnej lub jakichkolwiek swoich praw do własności intelektualnej dotyczącej zestawu i/lub jego elementów.

Zaktualizowane warunki umowy licencyjnej znajdują się na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2009 QIAGEN. Wszelkie prawa zastrzeżone.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Zamówienia 03-9840-9800 ■ Faks 03-9840-9888 ■ Pomoc Techniczna 1-800-243-066

**Austria** ■ Zamówienia 0800/28-10-10 ■ Faks 0800/28-10-19 ■ Pomoc Techniczna 0800/28-10-11

**Belgia** ■ Zamówienia 0800-79612 ■ Faks 0800-79611 ■ Pomoc Techniczna 0800-79556

**Brazylia** ■ Zamówienia 0800-557779 ■ Faks 55-11-5079-4001 ■ Pomoc Techniczna 0800-557779

**Chiny** ■ Zamówienia 0086-21-3865-3865 ■ Faks 0086-21-3865-3965 ■ Pomoc Techniczna 800-988-0325, 800-988-0327

**Dania** ■ Zamówienia 80-885945 ■ Faks 80-885944 ■ Pomoc Techniczna 80-885942

**Finlandia** ■ Zamówienia 0800-914416 ■ Faks 0800-914415 ■ Pomoc Techniczna 0800-914413

**Francja** ■ Zamówienia 01-60-920-926 ■ Faks 01-60-920-925 ■ Pomoc Techniczna 01-60-920-930 ■ Oferty 01-60-920-928

**Hiszpania** ■ Zamówienia 91-630-7050 ■ Faks 91-630-5145 ■ Pomoc Techniczna 91-630-7050

**Holandia** ■ Zamówienia 0800-0229592 ■ Faks 0800-0229593 ■ Pomoc Techniczna 0800-0229602

**Hongkong** ■ Zamówienia 800 933 965 ■ Faks 800 930 439 ■ Pomoc Techniczna 800 930 425

**Irlandia** ■ Zamówienia 1800 555 049 ■ Faks 1800 555 048 ■ Pomoc Techniczna 1800 555 061

**Japonia** ■ Telefon 03-6890-7300 ■ Faks 03-5547-0818 ■ Pomoc Techniczna 03-6890-7300

**Kanada** ■ Zamówienia 800-572-9613 ■ Faks 800-713-5951 ■ Pomoc Techniczna 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**Korea (Południowa)** ■ Zamówienia 1544 7145 ■ Faks 1544 7146 ■ Pomoc Techniczna 1544 7145

**Luksemburg** ■ Zamówienia 8002-2076 ■ Faks 8002-2073 ■ Pomoc Techniczna 8002-2067

**Meksyk** ■ Zamówienia 01-800-7742-639 ■ Faks 01-800-1122-330 ■ Pomoc Techniczna 01-800-7742-639

**Niemcy** ■ Zamówienia 02103-29-12000 ■ Faks 02103-29-22000 ■ Pomoc Techniczna 02103-29-12400

**Norwegia** ■ Zamówienia 800-18859 ■ Faks 800-18817 ■ Pomoc Techniczna 800-18712

**Singapur** ■ Zamówienia 65-67775366 ■ Faks 65-67785177 ■ Pomoc Techniczna 65-67775366

**Szwajcaria** ■ Zamówienia 055-254-22-11 ■ Faks 055-254-22-13 ■ Pomoc Techniczna 055-254-22-12

**Szwecja** ■ Zamówienia 020-790282 ■ Faks 020-790582 ■ Pomoc Techniczna 020-798328

**USA** ■ Zamówienia 800-426-8157 ■ Faks 800-718-2056 ■ Pomoc Techniczna 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**Wielka Brytania** ■ Zamówienia 01293-422-911 ■ Faks 01293-422-922 ■ Pomoc Techniczna 01293-422-999

**Włochy** ■ Zamówienia 02-33430-420 ■ Faks 02-33430-426 ■ Pomoc Techniczna 800-787980

