

therascreen® KRAS RGQ PCR

жинағы

Қолдану жөніндегі нұсқаулық (нұсқаулық)



24

1 нұсқа



In vitro сапалы диагностикасы

Rotor-Gene® QMDx 5plexHRM-мен пайдалану үшін

QIAamp® DNAFFPE Tissue Kit-пен пайдалану үшін



874011



QIAGEN GmbH (КиагенГмбХ),
QIAGEN Strasse 1,
40724 Хильден, ГЕРМАНИЯ
1127513EN



Sample to Insight

Мазмұны

Мақсатты пайдалану	7
Жиынтық және түсіндірме ақпарат	8
Процедура принципі.....	9
Мутациялық реакциялардың қоспалары	9
ARMS.....	10
Scorpions.....	10
Теру форматы	11
Талдаулар	11
Бақылау реакциясы.....	11
Бақылау талдауы	11
Ішкі бақылау	12
Оң бақылау	12
Теріс бақылау	12
Үлгіні бағалау.....	12
Платформа және бағдарламалық жасақтама	13
Жинақпен ұсынылған материалдар.....	14
Жинақтың ішінде	14
Қажетті, бірақ ұсынылмайтын материалдар	15
Реагенттер.....	15
Шығын материалдары	15
Аспап	15

Ескертулер мен сақтық шаралары.....	17
Қауіпсіздік техникасы туралы ақпарат	17
Жалпы сақтық шаралары	17
Реагенттерді сақтау және қолдану	19
Үлгілерді жинау, талдауға дайындау және сақтау	20
Тін үлгілерін дайындау	20
КРО тінінен ДНҚ шығарып алу үшін тін үлгілерін дайындау.....	20
ҰЕӨО бар тіннен ДНҚ шығарып алу үшін тін үлгілерін дайындау	21
Үлгілерді сақтау	21
Процедура	22
КРО үлгілері үшін ДНҚ шығарып алу.....	22
ҰЕӨО үлгілері үшін ДНҚ бөліп алу.....	23
Хаттама: ДНҚ үлгісін бағалау	25
Нәтижелерді түсіндіру (қолмен).....	36
Бағдарламалық жасақтаманы талдау баптамалары.....	37
Үлгілерді бағалау деректерін талдау.....	37
Талдау үлгісі	41
Хаттама: KRAS мутацияларын анықтау.....	46
Нәтижелерді түсіндіру	60
Мутацияны талдау және анықтау.....	61
Шектеулер	62
Пайдалану сипаттамалары.....	63
Аналитикалық эталондық әдіспен салыстыру: КРО	64
Эталондық аналитикалық әдіспен салыстыру: ҰЕӨО.....	67
Анықтау шегі (LOD).....	70

ДНҚ енгізу және сызықтығы	72
Интерференциялайтын заттар	76
Айқаспалы ластану	Error! Bookmark not defined.
Эксклюзивтілігі/айқаспалы реактивтілігі.....	77
Қайталану және қайта жаңартылу.....	80
Үлгілерді өңдеудің өзгергіштігі	93
Сынамаларды іріктеу әдістерінің эквиваленттілігі (тек ҰЕӨӨ)	96
Ақаулықтарды жою жөніндегі нұсқаулық	106
Сапаны бақылау.....	113
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	114
Келтірілген дереккөздер	114
Символдар.....	117
Байланыс ақпараты	118
1-қосымша. <i>Therascreen</i> KRAS RQG PCR Kit жинағы бойынша нұсқаулық хаттамасы	119
Хаттама: үлгіні бағалау (қолмен).....	131
Хаттама: KRAS мутациясын анықтау (қолмен)	131
Хаттама: <i>therascreen</i> KRASPCRRGQ орнату.....	132
2-қосымша: <i>Therascreen</i> KRAS талдау пакетін орнату	136
Процедура (сақтау)	136
Процедура (CD).....	137
Тапсырыс туралы ақпарат	140
Құжатты қайта қарау тарихы.....	142
Мақсатты пайдалану	7

Жиынтық және түсіндірме ақпарат	8
Процедура принципі.....	9
Жинақпен ұсынылған материалдар	14
Жинақтың ішінде	14
Қажетті, бірақ ұсынылмайтын материалдар	15
Ескертулер мен сақтық шаралары.....	17
Қауіпсіздік техникасы туралы ақпарат	17
Жалпы сақтық шаралары	17
Реагенттерді сақтау және қолдану	19
Үлгілерді жинау, талдауға дайындау және сақтау	20
Процедура	22
Хаттама: ДНҚ үлгісін бағалау	25
Нәтижелерді түсіндіру (қолмен)	36
Бағдарламалық жасақтаманы талдау баптамалары.....	37
Үлгілерді бағалау деректерін талдау.....	37
Талдау үлгісі	41
Хаттама: KRAS мутацияларын анықтау.....	46
Нәтижелерді түсіндіру	60
Мутацияны талдау және анықтау.....	61
Шектеулер	62
Пайдалану сипаттамалары.....	63
Аналитикалық эталондық әдіспен салыстыру: KPO	64
Эталондық аналитикалық әдіспен салыстыру: ¥EӨO.....	67
Анықтау шегі (LOD).....	70
ДНҚ енгізу және сызықтығы	72
Интерференциялайтын заттар	76

Айқаспалы ластану	Error! Bookmark not defined.
Эксклюзивтілігі/айқаспалы реактивтілігі.....	77
Қайталану және қайта жаңартылу.....	80
Үлгілерді өңдеудің өзгергіштігі	93
Сынамаларды іріктеу әдістерінің эквиваленттілігі (тек ҰЕӨӨ)	96
Ақаулықтарды жою жөніндегі нұсқаулық	106
Сапаны бақылау.....	113
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	114
Символдар.....	117
Байланыс ақпараты	118
1-қосымша. Therascreen KRAS RQG PCR Kit жинағы бойынша нұсқаулық хаттамасы	119
2-қосымша: Therascreen KRAS талдау пакетін орнату	136
Тапсырыс туралы ақпарат	140
Құжатты қайта қарау тарихы.....	142

Мақсатты пайдалану

Therascreen® KRAS RGQPCR Kit жинағы Rotor-GeneQMDx 5plexHRM құралын пайдалана отырып, KRAS онкогенінің 12 және 13 адам кодондарындағы 7 соматикалық мутацияны анықтауға арналған нақты уақыт режиміндегі сапалы ПТР талдауы болып табылады. Жинақ резекция, негізгі ине биопсиясы (НИБ) немесе жұқа ине аспирациясы (ЖИА) арқылы алынған формалинде бекітілген және парафинмен (FFPE) толтырылған колоректальді обыр (КРО) немесе ұсақ жасушалы емес өкпе обыры (ҰЕӨӨ) үлгілерінен бөлінген ДНҚ-мен бірге пайдалануға арналған.

KRAS геніндегі соматикалық мутациялар КРО емдеуге арналған панитумумаб және цетуксимаб сияқты адамның эпидермалық өсу факторы рецепторына (EGFR) бағытталған терапияға

төзімділіктің ықтимал болжамды биомаркерлері болып табылады. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы сондай-ақ KRASG12C мутациясын анықтау нәтижелерінің негізінде соторасибпен (LUMYKRAS®) емдеуге арналған ҰЕӨО бар пациенттерді идентификациялауға көмектесуге арналған.

KRAS геніндегі соматикалық мутациялар сондай-ақ басқа ҰЕӨО емдеу әдістерімен емдеу туралы шешім қабылдау үшін әлеуетті болжамды биомаркер ретінде де көрсетілуі мүмкін.

Терапия туралы шешім қабылдаған кезде дәрігер аурудың басқа факторларымен бірге пациенттің мутациялық күйін ескереді. Онкологиялық науқастарды емдеу туралы бірде-бір шешім тек KRAS мутациясының күйіне негізделмеуі керек.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы КРО, ҰЕӨО немесе басқа ауруларды диагностикалауға арналмаған.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы - бұл invitro диагностикасына арналған медициналық құрылғы.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы оқытылған персоналға кәсіби зертханалық жағдайда пайдалануға арналған.

Жиынтық және түсіндірме ақпарат

KRAS онкогеніндегі мутациялар көбінесе адам обырында кездеседі (1-4). ARMS® (ARMS® (Аллель-рефрактерлік мутациялық жүйесі) және Scorpions® (5, 6) технологияларын пайдалана отырып, Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы жабайы типті геномдық ДНҚ аясында KRAS онкогенінің 12 және 13 кодондарындағы 7 мутацияны анықтауға мүмкіндік береді (1-кесте). COSMIC (2015 v72) деректер базасының деректеріне сәйкес, Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен анықталған 7 мутация КРО бар пациенттерде тіркелген барлық KRAS мутацияларының >95% және ҰЕӨО (7) бар пациенттерде тіркелген барлық мутациялардың >88% құрайды.

1-кесте. Мутациялар тізімі және COSMIC каталогы

Мутация	Негізді өзгерту	COSMIC ИДЕНТИФИКАТОРЫ*

GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

* COSMIC ИДЕНТИФИКАТОРЛАРЫ обыр кезіндегі соматикалық мутациялар каталогынан алынған (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Тест жабайы типті ДНҚ аясында мутантты ДНҚ-ның төмен пайызын анықтауға мүмкіндік беретін жоғары спецификалық және сезімталдыққа ие. ДНҚ-ның жеткілікті көшірмелері болған кезде жабайы типті геномдық ДНҚ аясында 0,8% мутация анықталуы мүмкін.

Therascreen KRAS RGQ PCR Kit жинағы полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) процедурасында қолданылады. Жинақтың артықшылығы нысанаға өте тән, тез және тиімді жұмыс істейді және нәтижелерді анықтауда субъективтілікті қажет етпейді.

Процедура принципі

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы нақты уақыттағы ПТР мутацияларын анықтау үшін 2 технологияны — ARMS және Scorpions пайдаланады.

Мутациялық реакциялардың қоспалары

Өнімнің амплификациясын одан әрі анықтау үшін ДНҚ мутацияланған және Scorpions праймерін селективті амплификациясы үшін әрбір реакциялық қоспа мутацияға спецификалық ARMS праймерін пайдаланады.

ARMS

Аллель-спецификалық амплификациясына ARMS арқылы қол жеткізіледі, ол ДНҚ-Тақ полимеразасының ПТР праймерінің 3'ұшындағы сәйкес және сәйкес келмейтін негіздерді ажырату қабілетін пайдаланады. Амплификация праймердің толық сәйкестігі кезінде толық тиімділікпен жүреді. 3'-негіз сәйкес келмеген кезде, тек төмен деңгейлі фондық амплификация өтуі мүмкін. Демек, мутантты реттілік ДНҚ-ның көп бөлігінде мутация жоқ үлгілерде де таңдамалы түрде амплификацияланады.

Scorpions

Амплификацияны анықтау Scorpions көмегімен орындалады. Scorpions зондпен ковалентті байланысқан ПТР праймері бар бифункционалды молекулалар болып табылады. Зондқа флуорофор карбоксифлуоресцеин (FAM™) және сөндіргіш кіреді. Соңғысы флуорофордың флуоресценциясын сөндіреді. ПТР кезінде зонд ARMS ампликонымен байланысқан кезде флуорофор мен сөндіргіш бөлінеді, бұл флуоресценцияның айтарлықтай жоғарылауына әкеледі.

Теру форматы

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағында 8 талдау бар:

- 1 бақылау талдауы (реакциялық бақылау қоспасы [CTRL])
- 7 мутация талдауы (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Реакциялық қоспалар дуплексті болып табылады және нысананы анықтау үшін FAM таңбалауы бар реагенттерден және ішкі бақылауларды анықтау үшін HEX™ таңбалауы бар реагенттерден тұрады. Реактивті қоспалар мен оң бақылау реагенттерінде Трис-ЭДТА буфері бар, ал оң бақылауда поли-А-PHҚ тасығышы бар.

Талдаулар

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы екі сатылы процедураны қамтиды. Бірінші кезеңде үлгідегі жалпы амплификацияланатын KRAS ДНҚ-ны бағалау үшін бақылау талдауы жүргізіледі. Екінші кезеңде мутантты ДНҚ-ның болуын немесе болмауын анықтау үшін мутациялық және бақылау талдаулары жасалады.

Бақылау реакциясы

CTRL KRAS генінің қысқа 4 экзон тізбегін амплификациялау үшін Scorpions праймерін және таңбаланбаған праймерді пайдаланады. Бақылау реакциясы үлгіде амплификацияланатын ДНҚ-ның тиісті деңгейінің бар-жоғын анықтау үшін қолданылады және мутация күйін анықтау үшін қолданылатын аналитикалық есептеулерде қолданылатын фактор болып табылады.

Бақылау талдауы

FAM деп таңбаланған бақылау талдауы үлгідегі жалпы амплификацияланатын KRAS ДНҚ-сын бағалау үшін қолданылады. Бақылау талдауы KRAS генінің 4 экзон аймағын амплификациялайды. Scorpion праймерлері мен зондтары кез келген белгілі KRAS полиморфизміне қарамастан амплификациялауға арналған.

Мутацияларды талдаулар

Әрбір мутация талдауында Scorpion зонды, таңбаланған FAM және жабайы типті ДНҚ мен белгілі бір мутацияның ДНҚ-сын ажыратуға арналған ARMS праймері бар.

Бақылаулар

Ескертпе. Барлық эксперименттік өткізулерде оң және теріс бақылаулар болуы керек.

Ішкі бақылау

Әрбір реакциялық қоспа мақсатты реакцияға қосымша ішкі бақылауды қамтиды. Ақаулық пробиркада тежегіштер болуы мүмкін екенін көрсетеді, бұл дұрыс емес нәтижеге әкелуі мүмкін немесе оператор баптауда қате жіберген. Егер ішкі бақылаудың ақаулығы ПТР тежелуінен туындаса, үлгіні сұйылту тежегіштердің әсерін төмендетуі мүмкін. Дегенмен, бұл сондай-ақ ДНҚ-нысананы сұйылтатынын атап өткен жөн. Жиынтыққа үлгіні (Dil.) сұйылтуға арналған суы бар пробирка кіреді. Үлгіні сұйылту үлгіні (Dil.) сұйылту үшін суды қолдану арқылы жасалуы керек.

Оң бақылау

Әрбір өткізу 1-5 пробиркаларда оң бақылауды қамтуы керек. TherascreenKRAS RGQPCR жиынтығы құрамында оң бақылау реакциясында матрица ретінде қолданылатын KRAS (PC) оң бақылауы бар. Бақылаудың оң нәтижелері жинақтың белгіленген қабылдау критерийлеріне сәйкес келуін қамтамасыз ету үшін бағаланады.

Теріс бақылау

Әрбір циклде 9-13 пробиркаларда теріс бақылау (матрицасыз бақылау) болуы керек. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағында NTC (NTC) үшін су бар, оны матрицасыз бақылау үшін матрица ретінде пайдалану керек. Матрицасыз бақылау циклды орнату кезінде кез келген ықтимал ластануды бағалау және ішкі бақылау реакциясының тиімділігін бағалау үшін қолданылады.

Үлгіні бағалау

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен бірге жеткізілетін реакциялық бақылау қоспасы (CTRL) үлгідегі жалпы амплификацияланатын KRAS ДНҚ-сын бағалау үшін қолданылады. Бақылау талдауы KRAS генінің 4 экзон аймағын амплификациялайды. Оң бақылау ретінде KRAS (PC) оң

бақылауды және матрицасыз бақылау ретінде NTC үшін суды пайдалана отырып, үлгілерді тек бақылау талдауы үшін дайындау ұсынылады.

Платформа және бағдарламалық жасақтама

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабымен пайдалану үшін арнайы әзірленген. Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасы мен Therascreen KRAS талдауларына арналған пакетті www.qiagen.com сайтында Интернет арқылы немесе компакт-дискіде бөлек жүктеуге болады.

- Үйлесімді RGQ бағдарламалық жасақтамасы және Therascreen KRAS талдауы пакетінің нұсқалары туралы ақпарат алу үшін "Қажетті, бірақ ұсынылмаған материалдарды" қараңыз, 12-бет.
- Аспап туралы ақпаратты аспаптың пайдаланушы нұсқаулығынан қараңыз.
- Бақылаулар және үлгілер құсбелгілерінің санын азайту үшін, орнату процедуралары мен орнына қойылатын талаптарға сәйкес Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабын орналастыруға қатысты thescreen KRAS RGQ PCR PCR Kit жинағын қолдану жөніндегі нұсқаулықты қатаң сақтау қажет.
- Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау пакетін орнату бойынша нұсқаулар алу үшін Therascreen KRAS талдау пакетін орнату 2-қосымшасынан қараңыз, 134-бет.

Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспаптарына аспаптың пайдаланушы нұсқаулығында баяндалған талаптарға сәйкес қызмет көрсету керек. Аспап туралы ақпаратты пайдаланушы нұсқаулығынан қараңыз.

Орнату жөніндегі нұсқаулықты TherascreenKRAS талдау пакетін орнату 2-қосымшасынан қараңыз.

Жинақпен ұсынылған материалдар

Жинақтың ішінде

TTherascreen KRAS RGQ PCR жинағы				(24)
Каталог нөмірі				874011
Дайындық саны		Пробирканы идентификациялау		24
Түс	Идентификация			Көлемі
Қызыл	Реакциялық бақылау қоспасы	1	CTRL	2 x 600 мкл
Күлгін	12ALA реакциялық қоспасы	2	12ALA	600 мкл
Қызғылт сары	12ASP реакциялық қоспасы	3	12ASP	600 мкл
Қызғылт	12ARG реакциялық қоспасы	4	12ARG	600 мкл
Жасыл	12CYS реакциялық қоспасы	5	12CYS	600 мкл
Сары	12SER реакциялық қоспасы	6	12SER	600 мкл
Сұр	12VAL реакциялық қоспасы	7	12VAL	600 мкл
Көк	13ASP реакциялық қоспасы	8	13ASP	600 мкл
ақшыл сары	KRAS оң бақылау	9	PC	250 мкл
Жалбыз	Taq ДНҚ полимеразасы	Taq		80 мкл
NTC үшін ақ су	NTC	1.9 мл		
Ақ	Dil үлгісін сұйылтуға арналған су	1.9 мл		
Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын қолдану жөніндегі нұсқаулық (ағылшын тілі)				1

Қажетті, бірақ ұсынылмайтын материалдар

Химиялық заттармен жұмыс істегенде әрқашан қолайлы зертханалық халат, бірреттік қолғап және қорғағыш көзілдірікті киіңіз. Қосымша ақпарат алу үшін өнім жеткізушісінен алуға болатын тиісті қауіпсіздік паспорттарын (SDS) қараңыз.

Реагенттер

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit жинағы (каталог нөмірі 56404)
- Ксилол
- Этанол (96-100%)*

Шығын материалдары

- Сүзгілері бар пипеткаларға арналған стерильді ұштықтар (айқаспалы ластануды болдырмау үшін аэрозольді тосқауыл тамшуыр ұштарын ұсынамыз)
- Негізгі қоспаларды дайындауға арналған стерильді микроцентрифугалық пробиркалар
- 72 ойықшалы ротормен пайдалануға арналған стриптердегі 0,1 мл пробиркалар мен қақпақтар (каталог нөмірі 981103 немесе 981106)

Аспап

- CyclingGreen және CyclingYellow үшін флуоресцентті каналдары бар Rotor-GeneQMDx 5plexHRM (сәйкесінше FAM және HEX анықтау)
- Мутацияны автоматты түрде анықтауға арналған, орнатылған KRAS талдау пакетімен (3.0.3 нұсқасы) 2.3.1 немесе одан кейінгі нұсқасындағы Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасы

Ескерте. Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасын мутацияларды қолмен анықтау үшін KRAS талдау пакетінсіз пайдалануға болады. TherascreenKRAS RGQPCR үшін жинақ хаттамасы бойынша нұсқаулық 1-қосымшасыз қараңыз.

* Құрамында метанол немесе метилэтилкетон сияқты басқа заттар бар денатуратталған спиртті қолданбаңыз.

- Термомиксер*, жылытылатын орбиталық инкубатор, 56°C және 90°C температурада инкубациялау мүмкіндігі бар жылыту блогы немесе су моншасы
- көлемі 1,5 мл пробирка роторы бар үстел үсті центрифугасы†
- Үстел үсті вортексі†
- Сынама дайындауға арналған арнайы (реттелетін) пипеткалар†
- Негізгі ПТР қоспасын дайындауға арналған арнайы (реттелетін) пипеткалар*
- ДНҚ матрицасын дозалауға арналған арнайы (реттелетін) пипеткалар*

* Аспаптар өндірушінің ұсынымдарына сәйкес тексерілгеніне және калибрленгеніне көз жеткізіңіз.

† Құрамында метанол немесе метилэтилкетон сияқты басқа заттар бар денатуратталған спиртті қолданбаңыз.

Ескертулер мен сақтық шаралары

Invitro диагностикасы үшін

Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабымен пайдалану үшін

QIAampDNAFFPETissueKit тіндер жинағымен пайдалану үшін

Қауіпсіздік техникасы туралы ақпарат

Химиялық заттармен жұмыс істегенде әрқашан қолайлы зертханалық халат, бірреттік қолғап және қорғағыш көзілдірікті киіңіз. Қосымша ақпарат алу үшін тиісті қауіпсіздік паспорттарын (SDS) қараңыз. Олар www.qiagen.com/safety сайтында ыңғайлы және шағын PDF форматында онлайн режимінде қол жетімді, әрбір QIAGEN жинағы мен оның компоненттері үшін қауіпсіздік паспорттарын таба, қарай және басып шығара аласыз.

Жалпы сақтық шаралары

Пайдаланушы ПТР арналған Therascreen KRAS RGQ жинағын пайдаланған кезде әрқашан мыналарға назар аударуы керек:

- Тест формалинмен бекітілген және парафинмен толтырылған тін үлгілерімен бірге қолдануға арналған.
- Барлық химиялық заттар мен биологиялық материалдар қауіпті болуы мүмкін. Үлгілер мен сынамалар ықтимал инфекциялық болып табылады және биологиялық қауіпті материалдар ретінде қарастырылуы керек.
- Жергілікті қауіпсіздік техникасы ережелеріне сәйкес сынамалар мен талдаулардың қалдықтарын утилизациялаңыз.
- Therascreen KRAS RGQ ПТР жинағына арналған реагенттер оңтайлы сұйылтылған. Реагенттерді бұдан әрі сұйылтпаңыз, себебі бұл өнімділіктің төмендеуіне әкелуі мүмкін. Реакциялық қоспаның көлемдерін (реакциялық қоспа плюс үлгі) 25 мкл-ден кем пайдаланбаңыз.
- Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының құрамына кіретін барлық реагенттер тек therascreen KRAS RGQ PCR жинағының басқа реагенттерімен бірге пайдалануға

арналған. Therascreen KRAS RGQ PCR жинақтарындағы реагенттерді алмастырмаңыз, себебі бұл тиімділікке әсер етуі мүмкін.

- Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының жиынтығына кіретін Taq полимеразаcы ДНҚ (Taq пробиркасы) ғана пайдаланыңыз. Сол немесе басқа типті басқа жинақтардағы Taq полимеразаcы ДНҚ немесе басқа жеткізушінің Taq полимеразаcы ДНҚ алмастырмаңыз.
- Мерзімі өткен немесе дұрыс сақталмаған компоненттерді пайдаланбаңыз.
- Бақылаулар мен үлгілерге арналған құсбелгілердің санын азайту үшін, Therascreen KRAS RGQ ПТPre арналған жинақты қолдану жөніндегі нұсқаулықты қатаң сақтау қажет, соның ішінде, бірақ олармен шектелмейді:
 - Реагенттерді дұрыс араластыру, талдауды баптау кезінде араластырудың әр кезеңінде қамтамасыз ету керек.
 - Орнату процедуралары мен алаң талаптарына сәйкес Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабын орналастыру.

Ескертпе. Бақылау және реакциялық қоспасы реагенттерінің оң бақылау реагентіндегі синтетикалық материалдармен ластануын болдырмау үшін өте сақ болыңыз.

Ескертпе. Реакциялық қоспаларды дайындау және оң бақылау реагенттерін қосу үшін бөлек арнайы пипеткаларды пайдаланыңыз.

Ескертпе. Оң бақылауды қосу үшін пайдаланылғаннан басқа аймақта реакциялық қоспаларды дайындауды және дозалауды орындаңыз.

Ескертпе. Цикл аяқталғанға дейін Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабын ашпаңыз.

Ескертпе. Талдау аяқталғаннан кейін Rotor-GeneQ пробиркаларын ашпаңыз.

Ескертпе. Үлгіні дұрыс емес енгізуге, жүктеу қатесіне және пипеткалау қатесіне баса назар аударатырып, үлгіні дұрыс тестілеуді қамтамасыз ету үшін абай болу керек.

Реагенттерді сақтау және қолдану

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы құрғақ мұзда жеткізіледі. Егер therascreen KRAS RGQ PCR жинағының қандай да болсын компоненті әкелген кезде мұздатып қатырылмаған болса, сыртқы қаптама тасымалдау кезінде ашылған немесе пакетте қаптау бойынша нұсқаулық, нұсқау немесе реагенттер болмаса, QIAGEN техникалық қолдау бөлімдерінің біріне немесе жергілікті дистрибьюторларға хабарласыңыз (мұқабаның сыртын қараңыз немесе www.qiagen.com веб-сайтқа кіріңіз).

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын алғаннан кейін бірден тұрақты температурада мұздатып қатырып, камерада және жарықтан қорғалған жерде -30 °C-ден -15°C-ге дейінгі температурада сақтау керек. Барлық флуоресцентті таңбаланған молекулалар сияқты, Scorpions фотосуреттің түссізденуін және пайдалану сипаттамаларын жоғалтпау үшін жарықтан қорғалуы керек.

Ұсынылған шарттарда түпнұсқалық қаптамада сақталған кезде therascreen KRAS RGQ PCR жинағы белгіленген жарамдылық мерзімі аяқталғанға дейін тұрақты болады. Қайта жібіту мен мұздатып қатырудан аулақ болу керек. Мұздатып қатыру-жібітуді ең көп дегенде 6 циклдан асырмаңыз.

Үлгілерді жинау, талдауға дайындау және сақтау

Ескертпе. Барлық үлгілерді ықтимал инфекциялық материал ретінде өңдеу керек.

Үлгінің материалы тіннен алынған адамның геномдық ДНҚ-сы болуы керек. Үлгілердің сапасына кепілдік беру үшін үлгілерді стандартты патологоанатомиялық әдістемеге сәйкес тасымалдау керек. Ісік үлгілері біртекті емес және ісік үлгісіндегі деректер сол ісіктің басқа бөліктерімен сәйкес келмеуі мүмкін. Ісік үлгілерінде ісік емес тін де болуы мүмкін. Ісік емес тіннен алынған ДНҚ-да Therascreen KRAS RGQ ПТР жинағы көмегімен анықталған мутациялар болмайды деп күтілуде.

Тін үлгілерін дайындау

Ескертпе. Құрғақ скальпельдерді қолданыңыз. Бұл кезеңді ламинарлы ағын немесе сорып-тартатын шкаф жағдайында жасамаңыз.

- Әрбір үлгі үшін жаңа скальпельді пайдаланып, кесілген жерлерден ісік тінін таңбаланған микроцентрифугалық пробиркаларға салыңыз.

КРО тінінен ДНҚ шығарып алу үшін тін үлгілерін дайындау

- Стандартты материалдар мен әдістерді қолдана отырып, тін үлгісін 10% бейтарап буферлі формалинге (NBF) бекітіп, тін үлгісін парафинге батырыңыз. Микротомды қолданып, парафинді блоктан қалыңдығы 5 мкм болатын кезекті кесінділерді кесіп, оларды заттық шыныларға орнатыңыз.
- Оқытылған маман (мысалы, патологоанатом) ісіктің болуын және оның ауданын анықтау үшін гематоксилин мен эозинмен (H&E) боялған кесуді бағалауы керек. Ісікті қалыпты тіннен ажырату үшін боялған препаратты белгілеңіз. ДНҚ шығарып алу үшін дәйекті кесінділерді пайдаланыңыз.
- Макродиссекциясыз өңдеу үшін ауданы > 20% болатын ісік болуымен кесінділерді қолданыңыз (төменде қараңыз).

- Ауданы $\leq 20\%$ болатын ісіктің кесіктері үшін бір немесе бірнеше кесікті макродиссекция жүргізіңіз. Ісік емес тіндерді алып тастаңыз.
- 4 мм²-ден кем кесіктер үшін ісіктің жалпы аумағын кемінде 4 мм²-ге дейін ұлғайту үшін 2 немесе одан да көп кесіктерді өңдеңіз (макродиссекциясы бар және онсыз үлгілерге қолданылады). Ісік емес тіндерді алып тастаңыз.
- Тіннен артық парафинді жаңа, стерильді скальпельмен қырып алыңыз.

Ескертпе. Құрғақ скальпельдерді қолданыңыз. Бұл қадамды ламинарлы ағын немесе сорып-тартатын шкаф жағдайында жасамаңыз.

- Әрбір үлгі үшін жаңа скальпельді пайдаланып, кесілген жерлерден ісік тінін таңбаланған микроцентрифугалық пробиркаларға қырып алыңыз.

ҰЕӨО бар тіннен ДНҚ шығарып алу үшін тін үлгілерін дайындау

- Стандартты материалдар мен әдістерді қолдана отырып, тін үлгісін 10% NBF ерітіндісіне бекітіп, тін үлгісін парафинге батырыңыз. Микротомды қолданып, парафинді блоктан қалыңдығы 5 мкм болатын кезекті кесінділерді кесіп, оларды заттық шыныларға орнатыңыз.
- Оқытылған маман (мысалы, патологоанатом) боялған Н & Е кесікті ісік болуына бағалауы керек. ДНҚ шығарып алу үшін дәйекті кесінділерді пайдаланыңыз.
- Тіннен артық парафинді жаңа, стерильді скальпельмен қырып алыңыз.
- Жергілікті процедураларға сәйкес бақыланатын түрде шығарып алуға дайын ісік үлгілерін, блоктарды, заттық шыныларды, үлгілерді және микроцентрифугалық пробиркаларды таңбалаңыз, өңдеңіз және сақтаңыз.

Үлгілерді сақтау

Заттық шынылар мен FFPE блоктарын бөлме температурасында сақтаңыз. Заттық шыныларды бөлме температурасында ДНҚ шығарып алынғанға дейін 4 аптаға дейін сақтауға болады.

Геномдық ДНҚ-ны экстракциядан кейін 1 апта ішінде 2-8°C температурада, содан кейін қолданар алдында -25°C-ден -15°C-ге дейін 8 аптаға дейін сақтауға болады.

Процедура

КРО үлгілері үшін ДНҚ шығарып алу

FFPEКРО-ден алынған үлгілерден геномдық ДНҚ-ны тазарту үшін төменде сипатталған хаттамаға өзгертулер енгізіп, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, санаты № 56404) жинағын пайдаланыңыз.

Ескертпе. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы QIAamp DNA FFPE Tissue Kit жинағының көмегімен бөліп алынған ДНҚ-ны пайдаланып, валидациядан өтті. ДНҚ экстракциялау үшін ешқандай басқа өнімдерді пайдаланбаңыз.

Төмендегілерді ескере отырып, DNA FFPE Tissue Kit (1-нұсқа) нұсқаулығындағы нұсқауларға сәйкес ДНҚ бөліп алуды орындаңыз:

- ДНҚ бөліп алмас бұрын үлгілерді дайындау туралы ақпаратты QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығынан қараңыз.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit тек қолмен қолданылуы керек.
- QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығында сипатталған РНҚаз кезеңін пайдаланбаңыз.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit жиынтығына кіретін депарафинизация үшін QIAGEN ерітіндісін пайдаланбаңыз. Депарафинизация үшін QI Aamp DNAFFPE Tissue Kit нұсқаулығында сипатталғандай тек ксилол/этанол әдісін қолданыңыз.
- Барлық қажетті кезеңдер үшін молекулалық-биологиялық қолдану үшін этанолды қолданыңыз*
- Әр экстракция үшін 1 заттық шыны қолданыңыз.
- К протеиназасының ыдырауы (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit нұсқаулығындағы 11 кезең) 1 сағат ішінде жүргізілуі керек.
- Үлгілерді QIAamp DNA FFPE Tissue Kit жинағынан 200 мкл элюция буферін (BufferATE) пайдаланып элюциялау қажет.

* Құрамында метанол немесе метилэтилкетон сияқты басқа заттар бар денатуратталған спиртті қолданбаңыз.

Ескертпе. Геномдық ДНҚ-ны экстракциядан кейін 1 апта бойы 2-8°C температурада, содан кейін қолданар алдында -25°C-ден -15°C-ге дейінгі температурада 8 апта сақтаңыз.

ҰЕӨО үлгілері үшін ДНҚ бөліп алу

FFPE ҰЕӨО кесіктерінен дайындалған үлгілерден геномдық ДНҚ-ны тазарту үшін төменде сипатталған хаттаманың модификацияларымен QIAampDNAFFPETissueKit (QIAGEN, санаты № 56404) жинағын пайдаланыңыз.

Ескертпе. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы QIAampDNAFFPETissueKit жинағының көмегімен бөліп алынған ДНҚ-ны пайдаланып, валидациядан өтті. ДНҚ экстракциялау үшін ешқандай басқа өнімдерді пайдаланбаңыз.

Төмендегілерді ескере отырып, QIAampDNAFFPETissueKit тіндер жинағы бойынша нұсқаулықтағы нұсқауларға сәйкес ДНҚ экстракциясын орындаңыз:

- QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығында сипатталған РНҚаз кезеңін пайдаланбаңыз.
- QIAampDNAFFPETissueKit жинағының құрамына кіретін депарафинизация үшін QIAGEN ерітіндісін қолданбаңыз. Депарафинизация үшін QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығында сипатталғандай тек ксилол/этанол әдісін қолданыңыз.
- Барлық қажетті кезеңдер үшін молекулалық-биологиялық қолдану үшін этанолды қолданыңыз*
- Экстракция үшін 5 мкм-ден 2 кесікті қолданыңыз.
- QIAampDNAFFPETissueKit жинағын тек қолмен пайдалану керек.
- QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығында сипатталған РНҚаз кезеңін пайдаланбаңыз.
- QIAampDNAFFPETissueKit жиынтығына кіретін QIAGEN депарафинизация ерітіндісін қолданбаңыз. Депарафинизация үшін QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығында сипатталған ксилол/этанол әдісін ғана қолданыңыз.
- К протеиназасының ыдырауы (QIAampDNAFFPETissueKit нұсқаулығындағы 11 кезең) 1 сағат ішінде жүргізілуі керек.

* Құрамында метанол немесе метилэтилкетон сияқты басқа заттар бар денатуратталған спиртті қолданбаңыз.

- QIAampDNAFFPETissueKit жинағынан 60 мкл элюция буферін (ATE) қосып, бөлме температурасында 2,5 минут инкубациялаңыз.
- 1 минут бойы толық жылдамдықпен центрифугалаңыз.
- QIAampDNAFFPETissueKit жинағынан тағы 60 мкл элюция буферін (ATE) қосып, бөлме температурасында 2,5 минут инкубациялаңыз.
- 1 минут бойы толық жылдамдықпен центрифугалаңыз.

Ескерте. Геномдық ДНҚ-ны экстракциядан кейін 1 апта бойы 2-8°C температурада, содан кейін қолданар алдында -25°C-ден -15°C-ге дейінгі температурада 8 апта сақтаңыз.

Хаттама: ДНҚ үлгісін бағалау

Бұл хаттама үлгілерді автоматты түрде бағалау үшін KRASCE үлгісін бағалау шаблонын (талдау пакеті) пайдалана отырып, үлгілердегі амплификацияланатын ДНҚ-ның жалпы санын бағалау үшін пайдаланылады.

Ескертпе. Үлгіні қолмен бағалау үшін қараңыз. 1-қосымша: Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы үшін қолмен талдау хаттамасы.

Жұмысты бастамас бұрын маңызды сәттер

Ескертпе. ДНҚ үлгісін талдау ПТР тежегіштерінің болуын анықтауға арналмаған, өйткені бақылау реакциясы арқылы үлгідегі амплификацияланатын ДНҚ-ның жалпы саны ғана бағаланады.

Ескертпе. Бұл бағалау үшін спектрофотометрияны немесе басқа балама әдістерді емес, төменде сипатталғандай реакциялық бақылау қоспасын пайдалану маңызды. Праймерлер ДНҚ-ның қысқа фрагменттерін құраса да, жоғары деградацияланған ДНҚ амплификацияланбауы мүмкін.

- Реакциялық бақылау қоспасының көмегімен (CTRL пробиркасы) 24 үлгіге дейін бағалауға болады.
- Мутацияны бағалау әдісі арқылы тестілеуден бұрын ДНҚ-ны бағалау үшін CTRL пайдаланыңыз.
- Therascreen KRAS RGQ PCR жинағына кіретін реагенттерді тиімді пайдалану үшін толық өткізу серияларын жасау үшін ДНҚ үлгілерін мүмкіндігінше жиі іріктеп алыңыз. Үлгілерді жеке немесе аз мөлшерде тестілеу кезінде көп реагенттер жұмсалады және бір Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен тестілеуге болатын үлгілердің жалпы саны азаяды.
- Тақ ДНҚ полимеразасын (Тақ пробиркасы) немесе құрамында Тақ ДНҚ полимеразасы бар кез келген қоспаны араластырмаңыз, себебі бұл ферментті белсенділігін жоюы мүмкін.

- Пипетканың ұшына артық ферменттің түсуіне жол бермеу үшін, ұшын тікелей сұйықтық беткейінің астына мұқият қойып, Тақ ДНҚ полимеразасын пипетканың көмегімен өлшеңіз.
- Бақылау қателіктерін азайту үшін Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын қолдану жөніндегі нұсқаулықта көрсетілген талаптарды қатаң сақтау қажет, мұнда реагенттерді дұрыс араластыру бойынша нұсқаулар берілген, оны талдауды баптау кезінде әр араластыру кезеңінде қамтамасыз ету керек.

Жұмысты бастамас бұрын не істеу керек

- RotorGeneQMDx 5plexHRM аспабын бірінші рет қолданар алдында Rotor-Gene бағдарламалық жасақтамасының нұсқасына сәйкес келетін Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау пакеті бағдарламалық жасақтаманың орнатылғанына көз жеткізіңіз Therascreen KRAS талдау пакетін орнату 2-қосымшасын қараңыз.
- Әрбір қолданар алдында барлық реагенттерді бөлме температурасында (15-25°C) кемінде 1 сағат бойы толығымен жібіту, 10 рет аударып-төңкеріп араластыру және пробирканың түбіне ішіндегісін жинау үшін қысқаша центрифугалау керек. Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет.
- Әр қолданар алдында Тақ ДНҚ полимеразасының (Тақ пробиркасы) бөлме температурасында (15-25°C) екеніне көз жеткізіңіз. Пробирканың түбіндегі ферментті жинау үшін пробирканы қысқа уақытқа центрифугалаңыз.

Процедура

1. Реакциялық бақылау қоспасын (CTRL түтігі), матрицасыз бақылауға арналған нуклеазасыз суды (NTC) және бөлме температурасында (15-25°C) KRAS (PC) оң бақылауын кемінде 1 сағат бойы толығымен жібітіңіз.
- Реагенттерді жібіту уақыты, ПТР баптамасы және циклды іске қоспас бұрын сақтау уақыты 2-кестеде көрсетілген.

2-кесте. Жібіту уақыты, ПТР дайындау уақыты және сақтау температурасы

Жібіту уақыты		* Сақтау температурасы	Максималды дайындық уақыты
Минимум	Максимум	ПТР баптамасынан кейін және ПТР сақтағаннан кейін	
1 сағат	4.5 сағат	Бөлме температурасы (15–30°C)	7 сағат
1 сағат	4.5 сағат	2–8°C	18 сағат

* Сақтау ПТР баптамасын аяқтау мен Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабында ПТР циклын бастау арасындағы уақытты білдіреді.

- Ескертпе.** ПТР баптамасы бөлме температурасында орындалуы керек.
2. Тұздардың жергілікті концентрациясын болдырмау үшін әр пробирканы 10 рет төңкеріп, жібітілген реагенттерді араластырыңыз, содан кейін пробирканың түбіне ішіндегісін жинау үшін қысқа центрифугалаңыз.
- Ескертпе.** Тақ ДНҚ полимеразасын (Taq) немесе құрамында Тақ бар кез келген қоспаны сілкімеңіз, себебі бұл ферменттің белсенділігі жоюы мүмкін.
- Ескертпе.** Тест жүйесін баптау кезінде реагенттерді дұрыс араластыру қажет.
3. 3-кестеде көрсетілген көлемдерге сәйкес төмендегілер үшін негізгі қоспаларды (реакциялық бақылау қоспасы [CTRL] плюс Тақ ДНҚ полимеразасы [Taq]) жеткілікті мөлшерде дайындаңыз:
- Барлық ДНҚ үлгілері
 - 1 KRAS оң бақылау реакциясы (PC)
 - 1 матрицасыз бақылау реакциясы үшін нуклеазасыз су (NTC)
 - ПТР баптамасы үшін жеткілікті артықшылықты қамтамасыз ету үшін 1 қосымша үлгі
- Бақылау талдауының негізгі қоспасында үлгіні қоспағанда, ПТР үшін қажетті барлық компоненттер бар.

3-кесте. Бақылау талдауы үшін негізгі қоспаны дайындау

Компонент	Көлемі
Реакциялық бақылау қоспасы (CTRL)	19.76 мкл (n+1)*
Тақ ДНҚ полимеразасы (Тақ)	0.24 мкл (n+1)*
Жалпы көлемі	20 мкл/реакция

* n = реакциялар саны (үлгілер плюс бақылау).

ПТР баптау үшін жеткілікті артық болуын қамтамасыз ету үшін қосымша үлгіге (n+1) негізгі қоспаның жеткілікті санын дайындаңыз. n мәні 24-тен аспауы керек (плюс бақылау), өйткені 24 — бұл циклда (өткізуда) талдауға болатын үлгілердің максималды саны.

Ескерте. Негізгі қоспаны дайындау кезінде тиісті пробиркаға алдымен реакциялық бақылау қоспасының (CTRL) қажетті көлемі қосылады, ал Тақ ДНҚ полимеразасы (Тақ) соңғы кезекте қосылады.

Ескерте. Пипетканың ұштығын артық ферментпен жаппау үшін, ұштықты сұйықтың беткейінің астына мұқият қойып, Тақ ДНҚ полимеразасын енгізіңіз.

4.4-кестеде келтірілген орналасуға сәйкес жүктеу блогына стриптердегі ПТР үшін пробиркалардың тиісті санын (әр стрипе 4 пробирка) салыңыз. Пробиркаларды қақпақтармен жаппаңыз.

Ескерте. Қалпақшаларды қажет болғанша пластик контейнерде қалдырыңыз.

4-кесте. ДНҚ үлгісін бағалау үшін жүктеу блогындағы өткізудың сызбасы

Талдау									
Бақылау	1 (PC)	9	17	25	—	—	—	—	—
Бақылау	2 (NTC)	10	18	26	—	—	—	—	—
Бақылау	3	11	19	—	—	—	—	—	—
Бақылау	4	12	20	—	—	—	—	—	—
Бақылау	5	13	21	—	—	—	—	—	—
Бақылау	6	14	22	—	—	—	—	—	—
Бақылау	7	15	23	—	—	—	—	—	—
Бақылау	8	16	24	—	—	—	—	—	—

* Цифрлар жүктеу блогындағы позицияларды білдіреді және ротордың соңғы орнын көрсетеді.

5. Пипетканы реакциялық қоспаның жалпы көлемінен аз көлемге қойыңыз және толығымен жоғары және төмен 10 рет сорып, мұқият араластырыңыз.

Ескерте. Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет.

6. Стриптегі әрбір ПТР пробиркасына дереу 20 мкл негізгі қоспаны қосыңыз.

Ескертпе. Пробирканың орналасу сызбасын 4-кестеден қараңыз. ДНҚ үлгісін бағалау үшін бір РС пробиркасына, бір NTC пробиркасына және әрбір ДНҚ үлгісі үшін бір пробиркаға бақылау талдауы үшін негізгі қоспаны қосу керек.

7. Матрицасыз (NTC) бақылау үшін дереу 5 мкл нуклеазасыз суды NTC пробиркасына (2-пробирканың орны) қосып, пробирканы қақпақпен жабыңыз.

8. Үлгілерге арналған пробиркаларға (3-26 пробирка орындары) әрбір ДНҚ үлгісін 5 мл-ден қосыңыз және пробиркаларды қақпақтармен жабыңыз.

9. РС пробиркасына (1-пробирка орны) 5 мкл KRAS (PC) оң бақылауын қосып, пробирканы қақпақпен жабыңыз.

Ескертпе. Әрбір пробиркада жалпы реакциялық көлем 25 мкл болуы керек (3-кестеде 20 мкл дайындалған негізгі қоспа, плюс 5 мкл NTC/үлгі/ДК).

10. Перманентті маркерді пайдаланып, RotorGeneQMDx 5plexHRM аспабының 72 ойықшалы роторына пробиркалардың жүктелу бағдарын көрсету үшін, стриптегі 4 ПТР пробиркасының әрқайсысында ең аз нөмірі бар позициядағы бірінші пробиркалардың қақпақтарын белгілеңіз (мысалы, 1, 5 және 9 орындар және т.б.).

11. Үлгі мен реакциялық қоспаны араластыру үшін қақпақтары бар пробиркаларды 4 рет аударып-төңкеріңіз.

Ескертпе.Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет. Бағдарлау таңбаларын қолданып, іске қосу сызбасына сәйкес 72 ойықшалы ротордың тиісті орындарына ПТР пробиркалары бар барлық 4 стрипті салыңыз (4-кесте).

Ескертпе.егер ротор толық жүктелмесе, ротордағы барлық пайдаланылмаған орындар қақпағы бар бос пробиркалармен толтырылуы керек, бұл Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабының жылу тиімділігін сақтауға кепілдік береді.

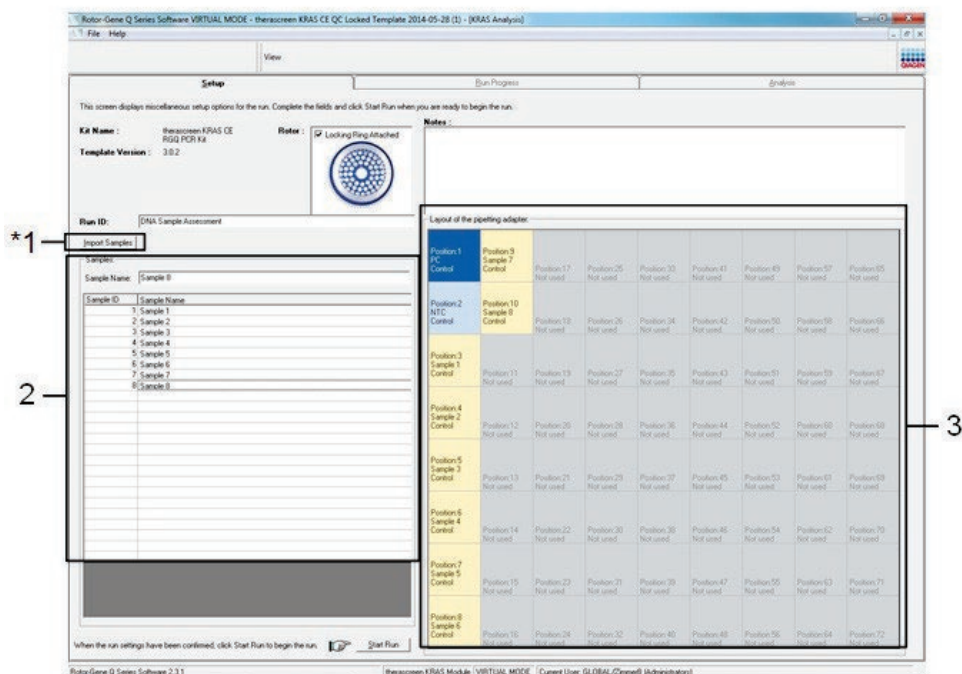
12. 72 ойықшалы роторды Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабына орнатыңыз. Бекіту сақинасы (Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабымен бірге) жұмыс кезінде пробиркаларды бекіту үшін ротордың үстіне орнатылғанына көз жеткізіңіз.

13. RotorGeneQ бағдарламалық жасақтамасын іске қосу үшін, Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабына қосылған ноутбуктің жұмыс үстеліндегі **Therascreen KRASQCLockedTemplate** белгішесін екі рет сырт еткізіңіз (1-сурет).



1-сурет. Therascreen KRAS QC Locked Template шаблының белгішесі.

Setup (баптау) қойындысы әдепкі бойынша көрсетіледі (2-сурет).



2-сурет. "Setup және Locking Ring Attached (Қысқаш сақинаны баптау және орнату)" қойындысы. 1 = "Баптау" қойындысы, 2 = "Қысқаш сақинаны орнату".

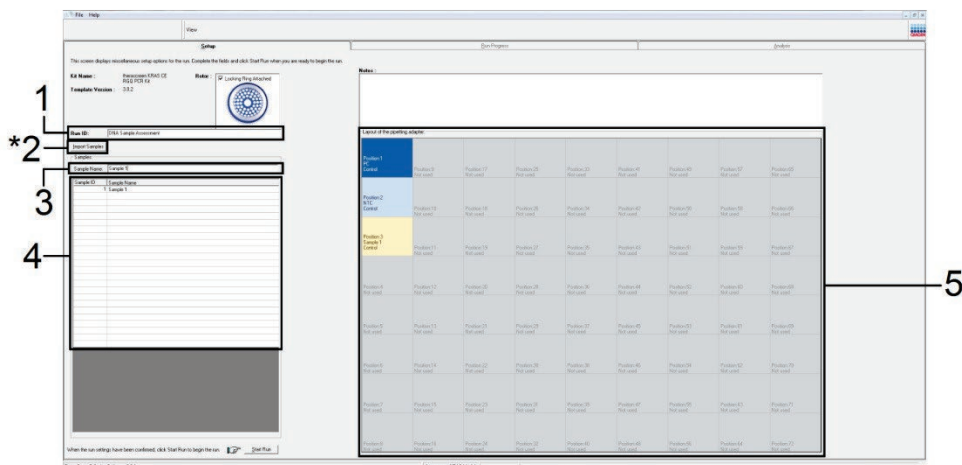
14. Қысқыш сақинаның дұрыс орнатылғанына көз жеткізіп, "**LockingRingAttached/Қысқыш сақина орнатылған**" терезесін тексеріңіз. Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабының қақпағын жабыңыз.

15. Атаулар туралы жергілікті келісімге сәйкес **"RunID/өткізу идентификаторы"** өрісіне өткізу идентификаторын енгізіңіз. Атаулар туралы жергілікті келісімге сәйкес **"SampleName /Үлгі атауы /"** өрісіне үлгі атауын енгізіп, **"Return/енгізу"** пернесін басыңыз. Бұл төмендегі үлгілер тізіміне үлгі атауын қосады және үлгіге үлгі идентификаторын тағайындайды (1, 2, 3 және т.б.). Сонымен қатар, оң жақтағы пипеткалау адаптері панелінің макеті жаңартылады және үлгі атауын қамтиды (3-сурет).

Сондай-ақ *.smp (Rotor-GeneQ үлгісі файлы) немесе *.csv (үтірмен бөлінген мәндер) форматында сақталған үлгілер атаулары **"ImportSamples//Үлгілерді импорттау"** түймесі арқылы импортталуы мүмкін. Үлгі атаулары осы әдісті қолдана отырып автоматты түрде енгізіледі.

Ескертпе. Пипеткалау адаптері панелінің макетінде үлгі атауын қосу түс өзгерісімен ерекшеленгеніне және үлгі атауы үлгі орнында екеніне көз жеткізіңіз (3-сурет).

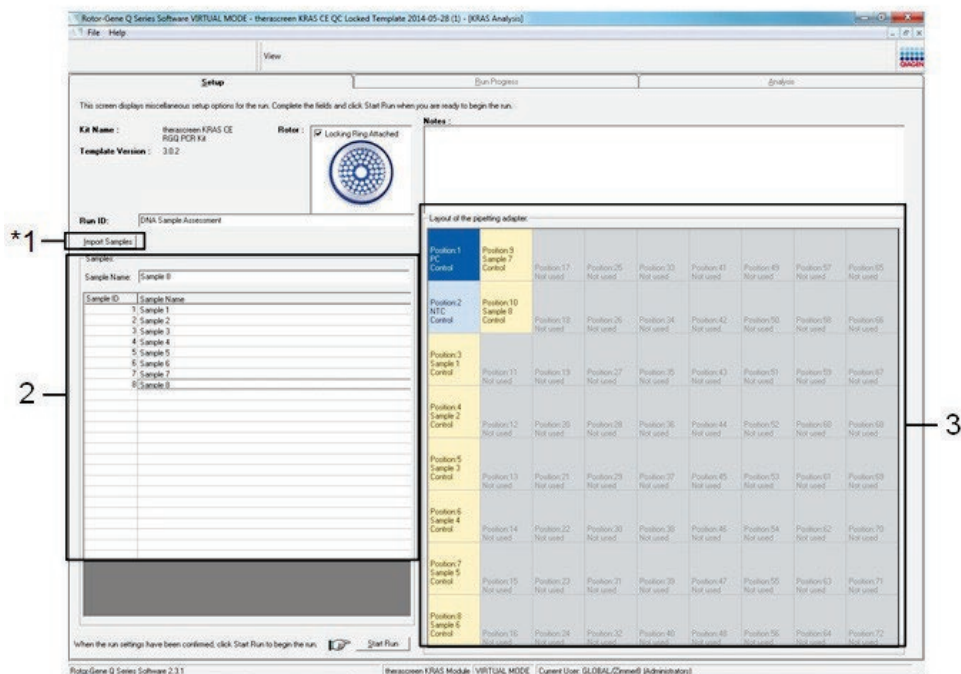
Ескертпе. 8-ден астам символдан тұратын үлгілердің атаулары пипеткалау адаптері панелінің макетінде толық көрсетілмеуі мүмкін.



3-сурет. Өткізу идентификаторы мен үлгі атауын енгізу. 1 – өткізу идентификаторының диалогтық өрісі, 2 – үлгіні импорттау түймесі 3 – үлгі атауы диалогтық өрісі, 4 – үлгілер тізімі, 5 – пипеткалау адаптері панелінің орналасуы.

16. Барлық қосымша үлгілердің атауларын енгізу үшін 16-қадамды қайталаңыз (4-сурет).

Ескертпе. Үлгі атауын редакциялау үшін **үлгілер тізіміндегі** Sample Name (Үлгі атауы) басыңыз және таңдалған **үлгі жоғарыдағы** Sample Name(Үлгі атауы) өрісінде пайда болады. Атаулар туралы жергілікті келісімге сәйкес үлгі атауын редакциялаңыз және атауын жаңарту үшін **Енгізу** пернесін басыңыз.

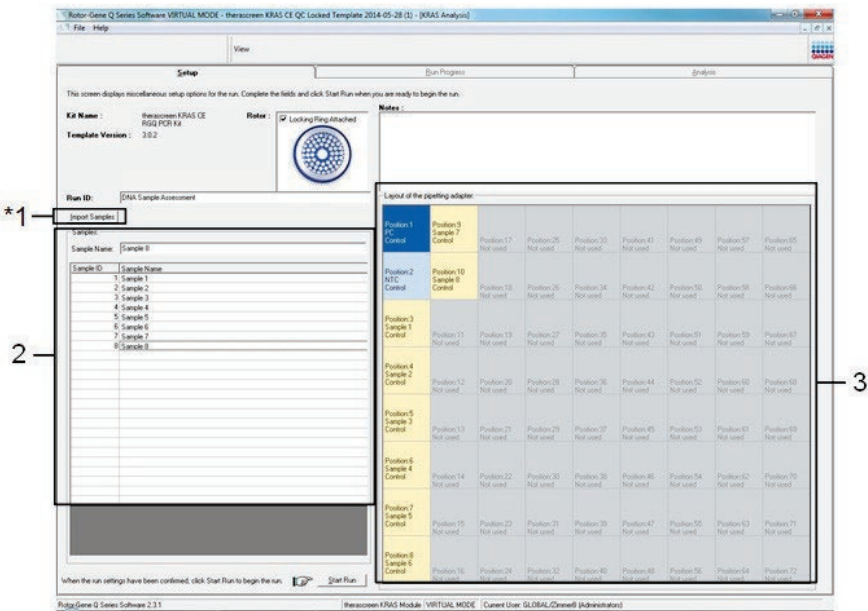


4-сурет. Үлгі атауы диалогтық терезесінде үлгілердің қосымша атауларын енгізу. *1 = үлгіні импорттау түймесі, 2 = Үлгі атауы диалогтық өрісі және үлгілер тізімі, 3 = қосымша үлгі атауы бар пипеткалау адаптері панелінің орналасуы.

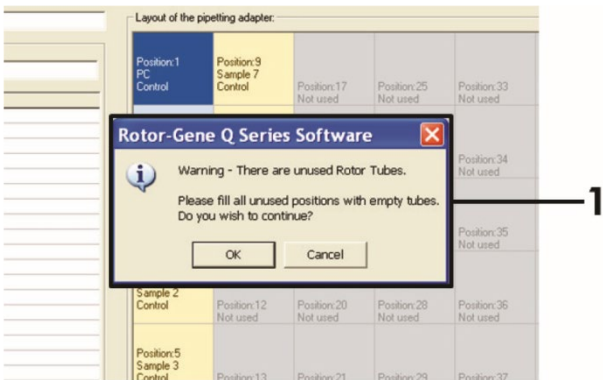
17. Барлық үлгі атауларын енгізгеннен кейін олардың дұрыстығын тексеріңіз. Қажет болса, ескертпе өрісіне кез келген қосымша ақпаратты қосыңыз, содан кейін **Start Run (өткізуды бастау)** түймесін басыңыз (5-сурет).

Ескертпе. Егер ротордың кез-келген позициясы қолданылмаса, ескерту хабарламасы пайда болады (5-сурет және 6-сурет), бұл пайдаланушыға ротордағы барлық пайдаланылмаған позициялар қақпағы бар бос пробиркамен толтырылуы керек екенін

еске салу үшін қажет. Барлық пайдаланылмаған ротор позициялары қақпағы бар бос пробиркамен толтырылғанына көз жеткізіп, жалғастыру үшін ОК түймесін басыңыз.

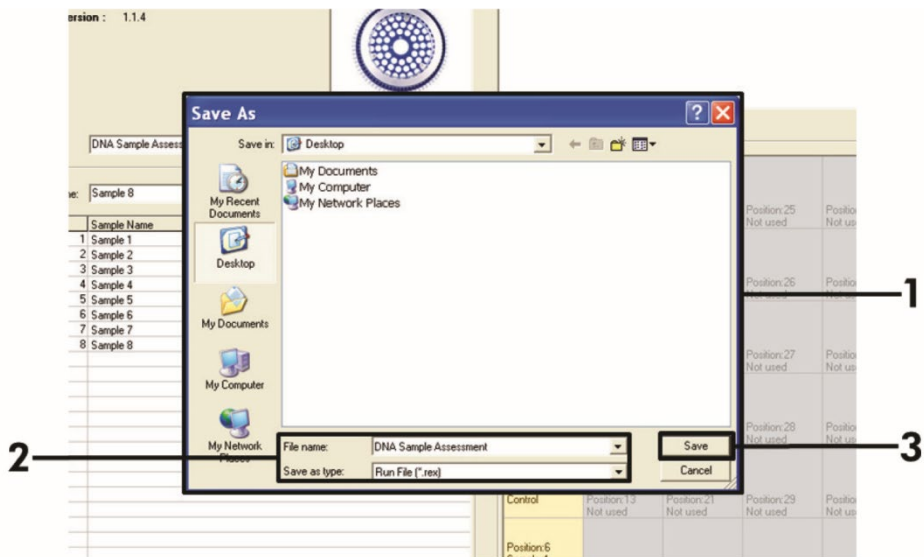


5-сурет. Ескертулер диалогтық өрісі, Өткізуды бастау және пайдаланылмаған ротор позициялары туралы ескерту.



6-сурет. 1 = Пайдаланылмаған ротор позициялары туралы ескерту.

18. Save as (Қалай сақтау) диалогтық терезесі пайда болады. Сәйкес файл атауын таңдап, таңдалған жерде ПТР өткізу *.gex өткізу файлы ретінде сақтаңыз. **Save (Сақтау)** түймесін шертіңіз (7-сурет).

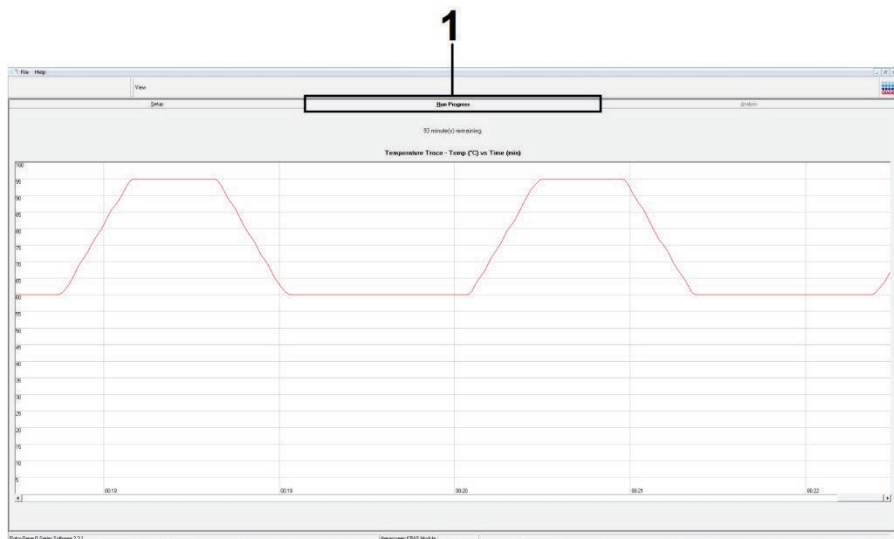


сурет. Өткізу файлын сақтау.1 Қалай сақтау диалогтық терезесі, 2 =Файл атауы және сақтау типі *.gexfile, 3 = Сақтау.

7-

ПТР өткізу басталады.

Ескертпе. Өткізу басталған кезде температура қисығы мен қалған орындау уақыты көрсетілген Өткізуды орындау қойындысы автоматты түрде ашылады (8-сурет).



8-сурет. Өткізуді орындау қойындысы.

Өткізу аяқталғаннан кейін **Analysis (Талдау)** қойындысы автоматты түрде ашылады.

Ескертпе. Егер **Analysis (талдау)** қойындысы ашылмаса, **Analysis (Талдау)** қойындысын шертңіз (9-сурет).

Ескертпе. Есептеу әдісін **түсіндіру Нәтижелерді** түсіндіру бөлімінде берілген.

The screenshot shows the 'Analysis' tab of the Therascreen KRAS RQV PCR software. A 'Sample QC Result Table' is displayed, listing 26 samples. The table has four columns: Tube ID, Sample Name, Control Assay C_t (Flagged/Warnings), and Status. Samples 1-10 are NTC controls, and samples 11-26 are DNA samples. All samples show 'Valid' status. A red box labeled '1' highlights the 'Analysis' tab, and a red box labeled '2' highlights the 'Status' column.

Tube ID	Sample Name	Control Assay C _t (Flagged/Warnings)	Status
1	PC Control	26.50	Valid
2	NTC Control	-	Valid
3	037710708	29.39	Valid
4	037710710	27.38	Valid
5	037710728	30.07	Valid
6	037710739	26.53	Valid
7	037710749	29.55	Valid
8	037710759	29.45	Valid
9	037710769	29.95	Valid
10	037710779	29.02	Valid
11	037710789	31.42	Valid
12	037710799	29.93	Valid
13	037710819	29.60	Valid
14	037710829	31.44	Valid
15	037710839	31.02	Valid
16	037710849	28.09	Valid
17	037710859	29.91	Valid
18	037710869	30.33	Valid
19	037710889	30.22	Valid
20	037710899	27.17	Valid
21	037710909	29.67	Valid
22	037710919	29.32	Valid
23	037710929	28.22	Valid
24	037710939	28.57	Valid
25	037710949	29.00	Valid
26	037710959	30.41	Valid

9-сурет. "Талдау" қойындысы және нәтижелер туралы есеп беру. 1 = Талдау қойындысы, 2 = Үлгілер сапасын бақылау нәтижелерінің кестесі.

Ескертпе. Бақылау нәтижелері үлгілердің сапасын бақылау нәтижелерінің кестесінде келесідегідей ұсынылады (9-суретте 2).

- **Run controls (бақылауды талдау)** (PC және NTC, сәйкесінше 1 және 2 пробирка күйлері): егер нәтижелер рұқсат етілген шектерде болса, **Valid (Жарамды)** көрсетіледі. Әйтпесе, Invalid нәтижесі (жарамсыз) пайда болады.
- **СТ>32,00:** үлгісінің бақылау реакциясы **"Жарамсыз" ретінде көрсетіледі**. ДНҚ мөлшері мутацияны талдау үшін жеткіліксіз. Үлгіні қайта тестілеңіз. Егер ДНҚ мөлшері әлі де жеткіліксіз болса, бар болса, ісік тінін көбірек шығарып алыңыз (Нәтижелерді түсіндіру ("қолмен"әдісі) қараңыз).

Нәтижелерді түсіндіру (Қолмен)

Үлгіні талдау немесе мутацияны талдау аяқталғаннан кейін келесі процедураға сәйкес деректерді талдаңыз.

Бағдарламалық жасақтаманы талдау баптамалары

1. Rotor-GeneQ 2.3 сериялы бағдарламалық жасақтаманы пайдаланып тиісті файлды ашыңыз.
2. Егер сіз іске қосу алдында өз үлгілеріңізді әлі атамаған болсаңыз, **EditSamples (Үлгілерді редакциялау)** басыңыз.
3. өз үлгілеріңіздің атауларын Name (Атауы) бағанына енгізіңіз.
4. **Analysis (Талдау) белгішесін шертңіз.** Талдау бетінде HEX каналын көру үшін **Cycling A. Yellow Yellow (А циклдеуі. Сары)** түймесін басыңыз.
5. **Named On (Аталған) түймесін басыңыз.**
Ескертпе. Бұл бос пробиркалардың талдауға қосылмауына кепілдік береді.
6. **Dynamic Tube (Динамикалық түтікті)** таңдаңыз.
7. **Linear Scale (Сызықтық шкала)** таңдаңыз.
8. **Outlier Removal (Ауытқыған мәндерді жою) түймесін басып, NTC Threshold (NTC шектік мәні) өрісіне 10% енгізіңіз.**
9. **0.05** шекті мәнін орнатыңыз және HEXCT мәндерін тексеріңіз.
10. Талдау бетінде AM каналын көру үшін **Cycling A. Green (А циклдеуі. Жасыл)** түймесін шертңіз.
11. **Dynamic Tube (Динамикалық түтіктің ерекшеленгеніне көз жеткізіңіз. Linear Scale (Сызықтық шкала) түймесін басыңыз.**
12. **Outlier Removal (Ауытқыған мәндерді жою) түймесін басып, NTC Threshold (NTC шектік мәні) өрісіне 10% енгізіңіз.**
13. **0.05** шекті мәнін орнатыңыз және FAMCT мәндерін тексеріңіз.

Үлгілерді бағалау деректерін талдау

Бақылап, өткізуды талдау

42-суреттегі Бақылап, өткізуды талдау блок-сызбасын қараңыз.

- **Теріс бақылау:** реакциялық қоспаның ластанбағанына көз жеткізу үшін матрицасыз бақылау жасыл каналда 40-тан төмен СТ мәнін тудырмауы керек. Планшеттің дұрыс орнатылғанына көз жеткізу үшін NTC сары каналда 31,91. -35,16 амплификацияны көрсетуі керек. Көрсетілген мәндер диапазон шектерінде болады және осы мәндерді қамтиды.
- **Оң бақылау:** KRAS (PC) оң бақылауы 8 талдаудың әрқайсысында жасыл каналда СТ 23,5–29,5 мәнін беруі керек. Көрсетілген мәндер шектерде болады және осы мәндерді қамтиды. Бұл диапазоннан тыс мән талдауды баптау мәселесін және осылайша циклдың жаңылысуын көрсетеді.

Ескертпе. Егер бақылаудың осы екі мәнінің біреуі дұрыс емес нәтиже алса, үлгі бойынша деректерді пайдалануға болмайды.

Бақылаудың екі өткізуі бойынша нәтиже "Жарамды" болған жағдайда, әрбір үлгінің C_T мәні жасыл каналда 21,92–32,00 диапазонында болуы керек. Егер үлгі осы диапазон шегінен шығып тұрса, келесі ұсынымдарды қараңыз.

Үлгіні талдау - бақылауды талдау

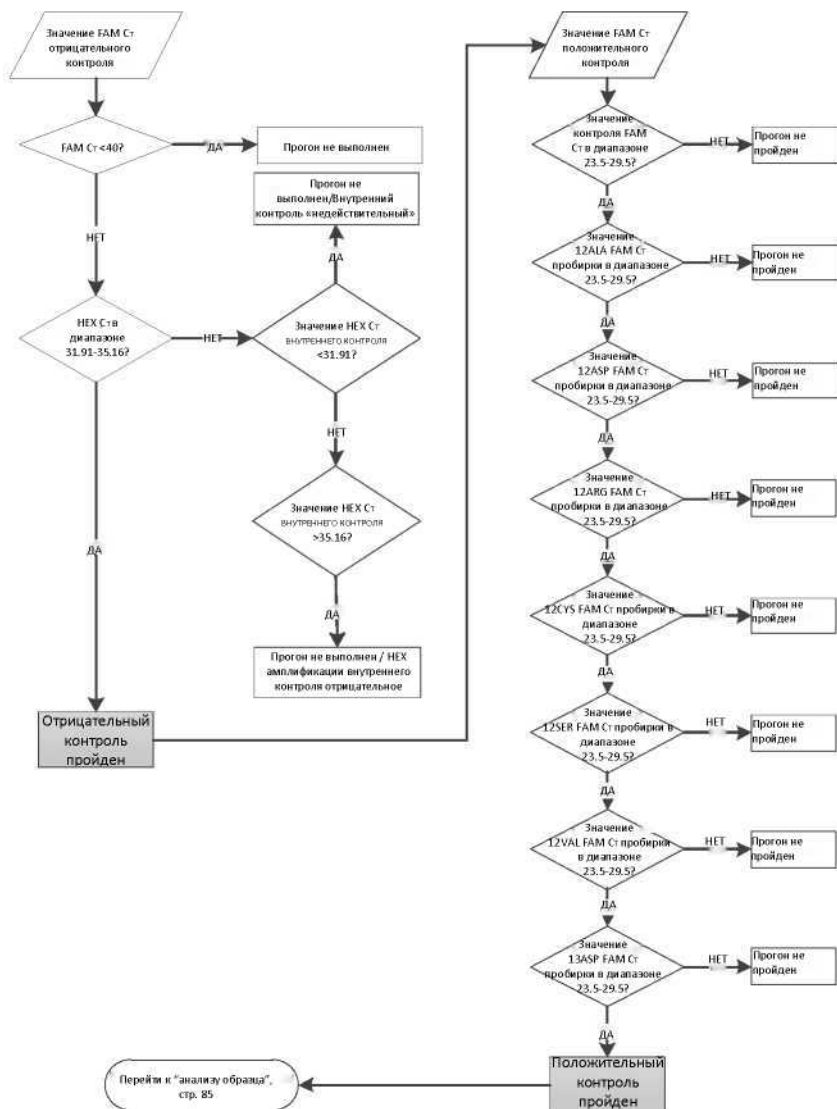
- Бақылау үлгісінің $C_{T\text{ мәні}} < 21,92$: $C_T < 21,92$ бақылау мәні бар үлгілерді сұйылту керек, өйткені бұл валидацияланған талдау диапазонының төменгі шекарасын білдіреді. Әрбір мутацияны төмен деңгейде анықтау үшін, аса концентрацияланған үлгілерді жоғарыда көрсетілген диапазонға түсіру үшін сұйылту қажет, себебі сұйылту C_T мәнін 1-ге жартылай арттырады. Егер үлгі 21,92-ге жақын болса, үлгіні талдау нәтижесі (KRAS мутациясын анықтау) алынғанына көз жеткізу үшін сұйылту ұсынылады. Үлгілерді жинақтағы сумен сұйылту керек (нуклеазасыз сұйылтылған су [Dil.]).
- Бақылау үлгісінің $C_{T\text{ мәні}} > 32$: үлгіні қайта экстракциялау ұсынылады, өйткені бастапқы ДНҚ матрицасы талдау үшін белгіленген шектік мәндерде барлық мутацияларды анықтау үшін жеткіліксіз болады.

KRAS мутациясын анықтауды талдау

Бақылау үлгісінің өткізуін талдау

Өткізуді бақылауды талдау блок-сызбаны қараңыз (10-сурет).

- **Теріс бақылау:** реакциялық қоспаның ластанбағанына көз жеткізу үшін матрицасыз бақылау жасыл каналда 40-тан төмен C_T мәнін тудырмауы керек. Планшеттің дұрыс орнатылғанына көз жеткізу үшін NTC сары каналда 31,91. -35,16 амплификацияны көрсетуі керек. Көрсетілген мәндер осы мәндердің шегінде болады және оларды қамтиды.
- **Оң бақылау:** KRAS (PC) оң бақылауы 8 талдаудың әрқайсысында жасыл каналда C_T 23,5–29,5 мәнін беруі керек. Көрсетілген мәндер осы мәндердің шегінде болады және оларды қамтиды. Бұл диапазоннан тыс мән талдауды баптау мәселесін және осылайша циклдың жаңылысуын көрсетеді.
- **Ескертпе.** Егер осы екі бақылау мәнінің кез келгені қажетті диапазонда болмаса, үлгі деректерін пайдалануға болмайды.



10-сурет. Бақылау өткізуын талдау блок-сызбасы.

Талдау үлгісі

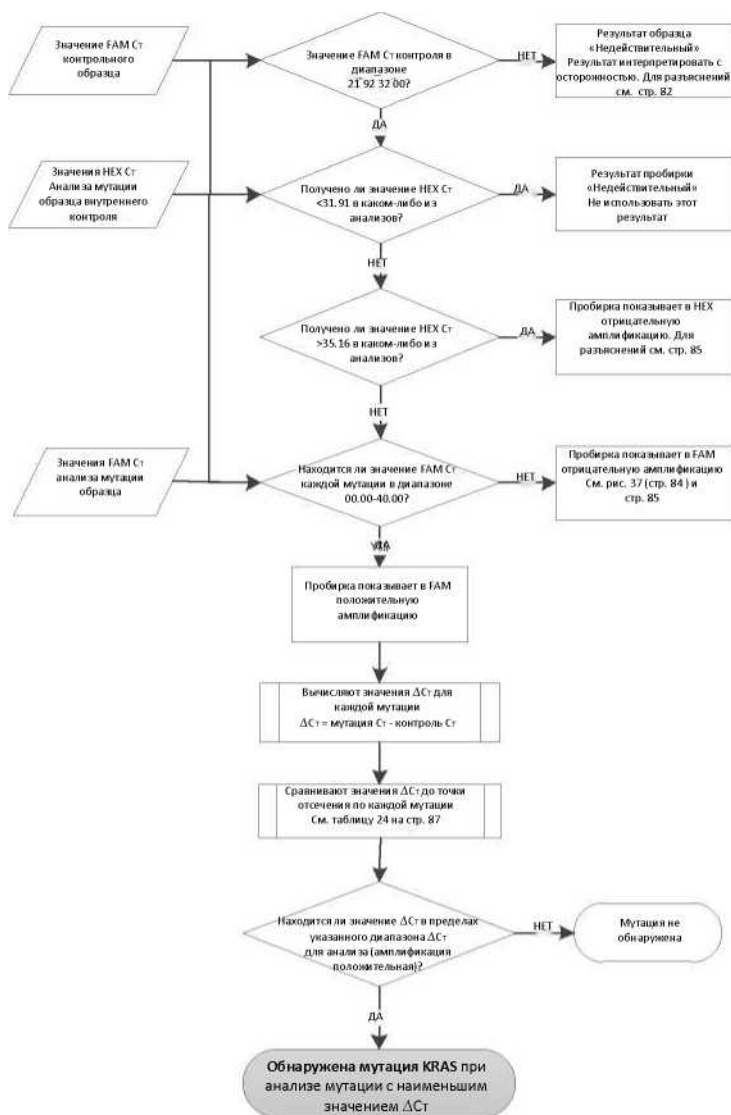
11-суреттегі үлгіні талдау сызбасын қараңыз.

Бақылау үлгісінің FAMC_T мәні

Бақылау үлгілерінің екеуі де бақылап талдау үшін жарамды болған жағдайда, әрбір бақылау үлгісі үшін C_T мәні жасыл каналда 21,92–32,00 диапазонында болуы керек.

Егер үлгі осы диапазон шегінен шығып тұрса, келесі ұсынымдарды қараңыз.

- **C_T < 21.92 бақылау үлгісін талдау:** c **T_{<21.92}** бақылау мәні бар үлгілер мутацияға талдауларды шамадан тыс жүктейді және оларды сұйылту керек. Әрбір мутацияны төмен деңгейде анықтау үшін аса концентрацияланған үлгілерді сұйылту C_T-ны 1-ге жартылай арттыратындығына сүйене отырып, жоғарыда аталған диапазонға түсетіндей етіп сұйылту керек. Үлгілерді жиынтыққа кіретін сүмен сұйылту керек (нуклеазасыз сұйылтылған су [Dil.]).
- **C_T > 32 бақылау үлгісін талдау:** Сақтықпен түсіндіріңіз, өйткені өте төмен деңгейдегі мутациялар анықталмауы мүмкін.



11-сурет. Үлгілерді талдау блок-сызбасы.

Ішкі бақылау үлгісінің мутациялық талдауының HEXCT мәні

11-суреттегі үлгілерді талдау блок-сызбасын қараңыз.

Әр үлгінің барлық ойықшалары талдануы керек. Әрбір ойықша ішкі бақылаудан HEX сигналын шығаратынына көз жеткізіңіз. 3 нәтиже болуы мүмкін.

- Егер ішкі бақылаудың C_T мәні көрсетілген диапазонға түссе (31,91–35,16), бұл HEX оң амплификация мәні.
- Егер ішкі бақылаудың C_T мәні көрсетілген диапазоннан жоғары болса (>35,16), бұл HEX теріс амплификациясы болып табылады.
- Егер ішкі бақылаудың C_T мәні көрсетілген диапазоннан төмен болса (<31,91), нәтиже жарамсыз болып саналады.
- Егер ішкі бақылау талдамасының жаңылысуы ПТР тежелуінен туындаса, үлгіні сұйылту тежегіштердің әсерін төмендетуі мүмкін, бірақ бұл сондай-ақ ДНҚ нысанасын сұйылтуына әкелетінін ескеру қажет. Жиынтыққа үлгіні (Dil.) сұйылтуға арналған суы бар пробирка кіреді.

Үлгі мутациясының FAMCT талдауының мәні

Барлық 7 реакциялық қоспа үшін FAM мәндерін 5-кестеде көрсетілген мәндермен салыстыру керек.

5-кесте. Үлгі мутациясының (FAM) рұқсат етілген реакция мәндері*

Талдау	C_T рұқсат етілген диапазоны	Диапазон ΔC_T
12ALA	0.00–40.00	≤8.00
12ASP	0.00–40.00	≤6.60
12ARG	0.00–40.00	≤8.00
12CYS	0.00–40.00	≤8.00
12SER	0.00–40.00	≤8.00
12VAL	0.00–40.00	≤7.50
13ASP	0.00–40.00	≤7.50

* Қолайлы мәндер көрсетілген мәндер шегінде болады және оларды қамтиды.

- Егер FAMC_T көрсетілген диапазонға түссе, бұл FAM оң амплификациясы.
- Егер FAMC_T мәні көрсетілген диапазоннан асып кетсе немесе амплификация болмаса, бұл FAM теріс амплификациясы.
- Мутация мен бақылау үшін C_T мәндері бір үлгіден алынғанына көз жеткізіп, FAM бойынша оң мутациясы бар әрбір пробирка үшін DCT мәнін келесідей есептейді.

$$\Delta C_T = C_T \text{ мутациясы} - C_T \text{ бақылауы}$$

Әрбір талдау үшін дұрыс кесу нүктесі қолданылғанына көз жеткізіп, үлгінің ΔC_T мәнін қарастырылып отырған талдау үшін кесу нүктесімен салыстырыңыз (21-кесте).

Кесу нүктесі оң сигналдың жабайы типті ДНҚ-дағы ARMS праймерінің фондық сигналына әлеуетті байланысты болуы мүмкін нүкте болып табылады. Егер үлгінің ΔC_T мәні кесу нүктесінен жоғары болса, ол теріс деп жіктеледі немесе жинақты анықтау шегінен асып түседі. Әрбір мутация реакциясының әрбір үлгісі үшін анықталған мутация күйі тағайындалады, анықталмаған немесе жарамсыз мутация келесі критерийлер бойынша:

Мутация анықталды:

- FAM және DCT оң амплификациясы кесу мәнінің деңгейінде немесе одан төмен. Егер бірнеше мутация анықталса, хабарланған мутация ең төменгі DCT мәні бар мутация болуы керек.

Мутация анықталмады:

- Шекті мәннен жоғары FAM және DCT оң амплификациясы.
- FAM теріс амплификациясы және HEX оң амплификациясы (ішкі бақылау).
- Жарамсыз:
- HEX (ішкі бақылау) жарамсыз.
- FAM теріс амплификациясы және HEX теріс амплификациясы.

Егер үлгі пробиркадағы Hex амплификациясының теріс нәтижесін берсе, бірақ басқа пробиркадағы FAM амплификациясының оң нәтижесін берсе, онда басқа пробиркада анықталған нәтижені жарамды деп санауға болады, бірақ нақты анықталған мутацияны сенімді түрде белгілеуге болмайды.

- Егер үлгі HEX амплификациясына қатысты теріс болса және бір пробиркадағы FAM амплификациясына қатысты оң болса, онда мутацияны анықтау нәтижесі жарамды деп саналуы керек.

- Егер пробирка HEX (ішкі бақылау) жарамсыз нәтижесін берсе, онда бұл пробирканың нәтижесін пайдалануға болмайды.

Үлгінің мутация күйін тағайындау

Мутацияға реакция үшін барлық пробиркаларды бағалағаннан кейін үлгінің мутация күйі келесідей анықталады:

- Мутация анықталды: мутацияға 7 реакцияның біреуі немесе бірнешеуі оң. Егер бірнеше мутация анықталса, хабарланған мутация ең төменгі DCT мәні бар мутация болуы керек.
- Мутация анықталмады: мутацияға барлық 7 реакция теріс.
- Жарамсыз нәтиже: мутацияға ешқандай реакция оң болмайды және мутацияға бір немесе бірнеше реакция жарамсыз нәтиже береді.

Ескертпе.Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы ДНҚ үлгісіндегі KRAS геніндегі мутацияларды анықтауға арналған. Егер үлгіде KRAS мутациясы анықталса, тек бір нақты мутация көрсетілуі керек. Егер бірнеше мутация анықталса, хабарланған мутация ΔC_{тең} төменгі мәнімен мутация болуы керек.

Мутацияға реакциялар арасында кейбір айқаспалы реактивтілік туындауы мүмкін. Мысалы, егер жоғары деңгейлі 12ALA мутациясы байқалса, кейбір басқа реакциялар да оң нәтиже беруі мүмкін. Себебі ARMS праймерлері бір-біріне ұқсас басқа мутацияларды анықтайды. Егер мутацияның екінші талдауы оң нәтиже берсе, бұл айқаспалы реактивтілік болуы мүмкін. Қос мутация байқалды, бірақ олар сирек кездеседі.

Егер мутацияға бір немесе бірнеше реакциялар жарамсыз нәтиже берсе, бірақ біреуі немесе бірнешеуі оң жауап берсе, үлгіні әлі де мутация бар ретінде анықталған KRAS мутациясы деп атауға болады. Алайда, хабарланған нақты мутация дәл болмауы және айқаспалы реактивтіліктің нәтижесі болуы мүмкін. Сондықтан үлгіні тек анықталған KRAS мутациясы деп атаған жөн.

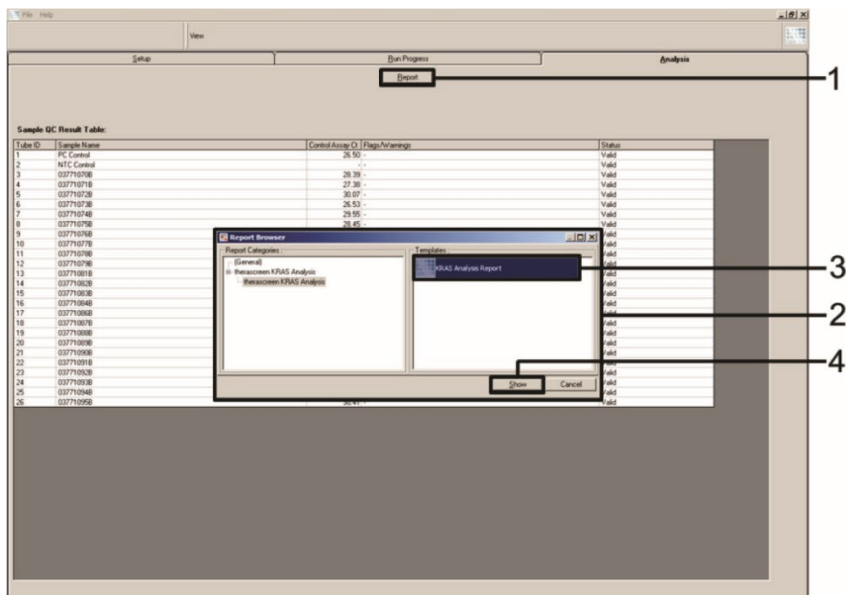
- $C_T < 21.92$ бақылау үлгісінің реакция мәні: жарамсыз нәтиже ретінде көрсетіледі. ДНҚ концентрациясы мутацияны талдау үшін тым жоғары. Нуклеазасыз сұйылту үшін сумен сұйылтыңыз (Dil.) және талдауды қайталаңыз. 21,92-32,00 C_T мәніне дейін сұйылтады. 1:1 сұйылту C_T мәнін шамамен 1,0-ге арттырады.

- Бақылау үлгісінің реакция мәні C_T 21,92–32,00 ($21,92 \leq C_T$ бақылауы $\geq 32,00$): Мутацияны талдауға жарамды ДНҚ концентрациясы көрсетілсе, нәтиже жарамды.

Ескертпе. Егер қайта экстракция немесе сұйылту қажет болса, ДНҚ концентрациясының қолдануға жарамды екеніне көз жеткізу үшін бақылау реакциясын қайталаңыз.

14. Есеп беру файлдарын жасау үшін **Report (Есеп беру) түймесін шертіңіз**. Есеп берулер браузерінің терезесі пайда болады. Templates (Шаблондар) бөлімінен **"KRAS Analysis Report (KRAS талдауы туралы есеп беру)"** тармағын таңдап, **Show (Көрсету)** түймесін басыңыз (12-сурет).

Ескертпе. Есеп берулерді веб-мұрағат форматындағы басқа жерде әр есеп берудің жоғарғы сол бұрышындағы Қалай сақтау түймесін басу арқылы **сақтауға болады**.



12-сурет. KRAS талдауы туралы есеп беруді таңдау. 1 = Есеп беру, 2 = Есеп беру браузері терезесі, 3 = KRAS талдауы туралы есеп беруді таңдау, 4 = Көрсету.

Хаттама: KRAS мутацияларын анықтау

Бұл хаттама KRAS мутацияларын анықтауға арналған.

Бастамас бұрын маңызды сәттер

- Үлгіні бағалаудан өткеннен кейін KRAS мутациясы талдауы арқылы үлгіні тестілеуге болады.
- Therascreen Kras Rgq PCR жинағын тиімді пайдалану үшін үлгілерді 7 данадан партияға топтастыру керек (72 ойықшалы роторды толтыру үшін). Партияның кішірек өлшемі thescreen KRAS RGQ PCR жинағымен аз үлгілерді тестілеуге болатынын білдіреді.
- Үлгіні Therascreen KRAS RGQ PCR Kit жинағына кіретін барлық реакциялық қоспалар арқылы тестілеу керек.
- Тақ ДНҚ полимеразасын (Тақ пробиркасы) немесе құрамында Тақ ДНҚ полимеразасы бар кез келген қоспаны сілкімеңіз, себебі бұл ферменттің белсенділігі жойылуы мүмкін.
- Тақ ДНҚ полимеразасын пипеткаға пипетканың ұштығын сұйықтықтың астына мұқият қойып, ұшты артық ферментпен жаппау үшін енгізіңіз.
- Бақылаулар мен үлгілерге арналған құсбелгілердің санын азайту үшін қатаң сәйкестік thescreen KRAS RGQ PCR жинағын қолдану жөніндегі нұсқаулық, реагенттерді дұрыс араластыруға қатысты, бұл талдауды баптау кезінде араластырудың әр кезеңінде сақталуы керек.
- Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабын бірінші рет қолданар алдында Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасының нұсқасына сәйкес келетін Therascreen KRASAssayPackage БЖ дұрыс орнатылғанына көз жеткізіңіз.

Жұмысты бастамас бұрын қажетті әрекеттер

- Әрбір қолданар алдында барлық реагенттерді бөлме температурасында (15-25°C) кемінде 1 сағат бойы толығымен жібіту, 10 рет аударып-төңкеру арқылы және пробирканың түбіне ішіндегісін жинау үшін қысқа мерзімді центрифугалау арқылы араластыру керек.
- Әр қолданар алдында Тақ ДНҚ полимеразасының (Тақ пробиркасы) бөлме температурасында (15-25°C) екеніне көз жеткізіңіз. Пробирканың түбіндегі ферментті жинау үшін пробирканы қысқа уақытқа центрифугалаңыз. Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет.

Процедура

1. Барлық реакциялық қоспасы бар пробиркаларды, матрицасыз бақылау пробиркасы (NTC) үшін нуклеазасыз суды және бөлме температурасында (15-25°C) KRAS (PC пробиркасы) оң бақылауды кемінде 1 сағат бойы толығымен жібітіңіз.

Реагенттерді жібіту, ПТР баптамасы және өткізуды бастамас бұрын сақтау уақыты төмендегі кестеде көрсетілген.

5-кесте. Реагенттердің еру уақыты

Жібіту уақыты			
Минимум	Максимум	ПТР баптағаннан кейін сақтау температурасы	ПТР тұнбалары мен сақтаудың максималды уақыты
1 сағат	4.5 сағат	Бөлме температурасы (15–25°C)	7 сағат
1 сағат	4.5 сағат	2–8°C	18 сағат

Ескертпе. ПТР баптамасы бөлме температурасында орындалуы керек. "Сақтау" термині ПТР баптауды аяқтау мен Rotor-GeneQMDx аспабында ПТР жүргізуді бастау арасындағы уақытты білдіреді.

Ескертпе. Тақ ДНҚ полимеразасын (Тақ пробиркасы) басқа реагенттермен бірегілде бөлме температурасына (15-25°C) жеткізіңіз (Реагенттерді сақтау және олармен жұмыс істеу" бөлімін қараңыз). Пробирканың түбіндегі ферментті жинау үшін пробирканы қысқа уақытқа центрифугалаңыз.

2. Реагенттерді ерігеннен кейін араластырыңыз, тұздардың жергілікті концентрациясын болдырмау үшін әр пробирканы 10 рет айналдырыңыз, содан кейін пробирканың түбіне ішіндегісін жинау үшін бірден центрифугалаңыз.

Ескертпе. Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет.

3. Төмендегі кестеде көрсетілген әрбір сәйкес реакциялық қоспаға сәйкес 8 микроцентрифуга пробиркаларын таңбалаңыз (жеткізілім жиынтығына кірмейді). ДНҚ үлгілері үшін, жеткілікті реакциялық қоспаны (бақылау немесе мутациялық реакциялық қоспа [CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL немесе 13ASP] плюс Тақ [Taq])

ДНҚ полимеразасы), бір KRAS оң бақылау (PC пробиркасы) бақылау реакциясы үшін негізгі қоспасы және бір нуклеазасыз су кестеде көрсетілген көлемдерге сәйкес матрица жоқ (NTC пробиркасы) санын дайындаңыз. ПТР баптау үшін жеткілікті артық болуын қамтамасыз ету үшін 1 қосымша үлгіге реагенттерді қосыңыз.

Ескертпе. Негізгі қоспаларда үлгіні қоспағанда, ПТР үшін қажетті барлық компоненттер бар.

6-кесте. Негізгі қоспалар және тиісті көлем

Талдау және реакциялық қоспаға арналған пробирка	Реакциялық қоспаның көлемі	Тақ ДНҚ полимеразасының көлемі
Бақылау (CTRL пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
12ALA (12ALA пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
12ASP (12ASP пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
12ARG (12ARG пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
12CYS (12CYS пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
12SER (12SER пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
12VAL (12VAL пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)
13ASP (13ASP пробиркасы)	19.76 мкл x (n + 1)	0.24 мкл x (n + 1)

* n = реакциялар саны (үлгілер плюс бақылау).

ПТР баптау үшін жеткілікті артық болуын қамтамасыз ету үшін 1 қосымша үлгіге (n + 1) жеткілікті негізгі қоспаны дайындаңыз. n мәні 7-ден аспауы керек (плюс бақылау), өйткені 7 - циклға сәйкес келетін үлгілердің максималды саны.

Ескертпе. Талдау үшін негізгі қоспаны дайындаған кезде мутацияға арналған бақылау немесе реакциялық қоспаның қажетті көлемі алдымен тиісті пробиркаға қосылады, ал Тақ ДНҚ полимеразасы (Тақ пробиркасы) соңғы кезекте қосылады.

- 4-кестеде көрсетілген орынға сәйкес тиеу блогына 4-жолақтағы ПТР пробиркаларының тиісті санын (әрбір стрипте 4 пробиркадан) салыңыз. ДНҚ үлгісін бағалау үшін планшетті жүктеу блогына салыңыз. Цифрлар жүктеу блогындағы орындарды білдіреді және ротордың соңғы орнын көрсетеді. Пробиркаларды қақпақтармен жаппаңыз.

Ескертпе. Қалпақшаларды қажет болғанша пластик контейнерде қалдырыңыз.

5. Пипетканы реакциялық қоспаның жалпы көлемінен аз көлемге қойыңыз және пипеткамен жоғары және төмен 10 рет аспирациялауды жүзеге асырып, негізгі қоспаларды мұқият араластырыңыз.
- Ескертпе.** Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет.
- KRAS мутацияларын анықтау үшін негізгі қоспаларды PC бар 8 пробиркаға, NTC бар 8 пробиркаға және әрбір ДНҚ үлгісі үшін 8 пробиркаға қосу керек.
6. Стриптегі әрбір сәйкес ПТР пробиркасына дереу 20 мкл негізгі қоспаны қосыңыз.
- Ескертпе.** Реакциялық қоспаларды дайындау кезінде пробиркалардың орналасуын 7-кестеден қараңыз. KRAS мутацияларын анықтау үшін негізгі қоспаны әрбір PC бар 8 пробиркаға, NTC бар 8 пробиркаға және ДНҚ үлгісі үшін 8 пробиркаға қосу керек.

7-кесте. KRAS мутацияларын анықтау үшін планшетті жүктеу блогына жүктеу

Талдау	Бақылаулар		Үлгі нөмірі						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68

12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* Цифрлар жүктеу блогындағы позицияларды білдіреді және ротордың соңғы орнын көрсетеді.

7. NTC пробиркаларына (9-16 пробирка позициялары) матрицасыз (NTC) бақылау үшін бірден 5 мкл нуклеазасыз су қосып, пробиркаларды қақпақтармен жабыңыз.

8. Үлгі пробиркаларына әр ДНҚ үлгісін 5 мкл-ден қосыңыз (пробирка позициялары 17-72) және пробиркаларды қақпақтармен жабыңыз.

9. PC пробиркаларына (1-8 пробирка позициялары) 5 мкл KRAS оң бақылау (PC) қосыңыз және пробиркаларды қақпақтармен жабыңыз.

10. Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабының 72 ойықшалы роторы пробиркалардың жүктелу бағдарын көрсету үшін, әр ПТР пробиркасының ең төменгі нөмірі бар позициядағы бірінші пробиркалардың қақпақтарын 4 стриппен өшірілмейтін маркермен әрбір ПТР пробиркасында ең аз нөмірі бар позицияда таңбалаңыз (мысалы, 1, 5 және 9 позициялар және т.б.)

11. Үлгі мен реакциялық қоспаны араластыру үшін қақпақтары бар пробиркаларды 4 рет аударып-төңкеріңіз.

Ескертпе. Талдауды баптау кезінде реагенттердің дұрыс араласуын қамтамасыз ету қажет.

12. Барлық ПТР пробиркаларын бағдарлау үшін таңбаларды қолданып, 4 стриппен 72 ойықшалы ротордың сәйкес позицияларына цикл сызбасына сәйкес орналастырыңыз (7-кесте).

Ескертпе. Әрбір ПТР циклына ең көбі 7 үлгіні қосуға болады. Егер ротор толығымен бос болмаса, ротордағы барлық пайдаланылмаған орындар қақпағы бар бос пробиркамен толтырылуы керек, бұл Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабының жылу тиімділігін сақтауға кепілдік береді.

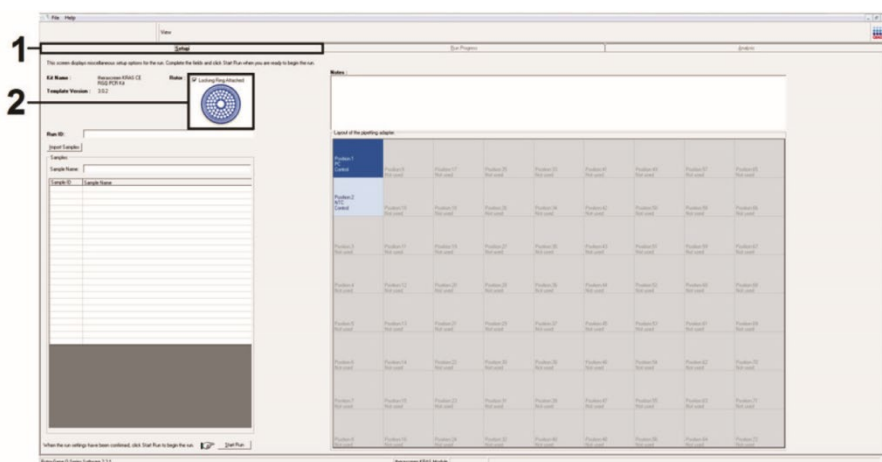
13. 72 ойықшалы роторды Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабына салыңыз. Талдау кезінде пробиркаларды бекіту үшін қысқыш сақинаның (Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабымен жеткізіледі) ротордың жоғарғы жағында екеніне көз жеткізіңіз.

14. RotorGeneQMDx 5plexHRM бағдарламалық жасақтамасын іске қосу үшін, Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабына қосылған ноутбуктің жұмыс үстеліндегі **Therascreen KRASLockedTemplate** белгішесін екі рет шертіңіз (13-сурет).



13-сурет. Therascreen KRAS Locked Template белгішесі.

Setup (Баптау) қойындысы әдепкі бойынша көрсетіледі (14-сурет).



14-сурет. 1 = "Баптау" қойындысы және 2 = "Қысқыш сақина орнатылды" квадраты.

15. Қысқыш сақинаның дұрыс орнатылғанына көз жеткізіп, **Locking Ring Attached (Қысқыш сақина орнатылған)** терезесінде құсбелгіні қойыңыз. Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабының қақпағын жабыңыз.

16. Жергілікті атау конвенциясына сәйкес **Run ID(өткізу идентификаторы)** өрісіне өткізу идентификаторын енгізіңіз.

17. Жергілікті атау ережелеріне сәйкес **Sample Name**(Үлгі атауы) **өрісіне үлгі** атауын енгізіп, **Return (Енгізу) пернесін басыңыз.**

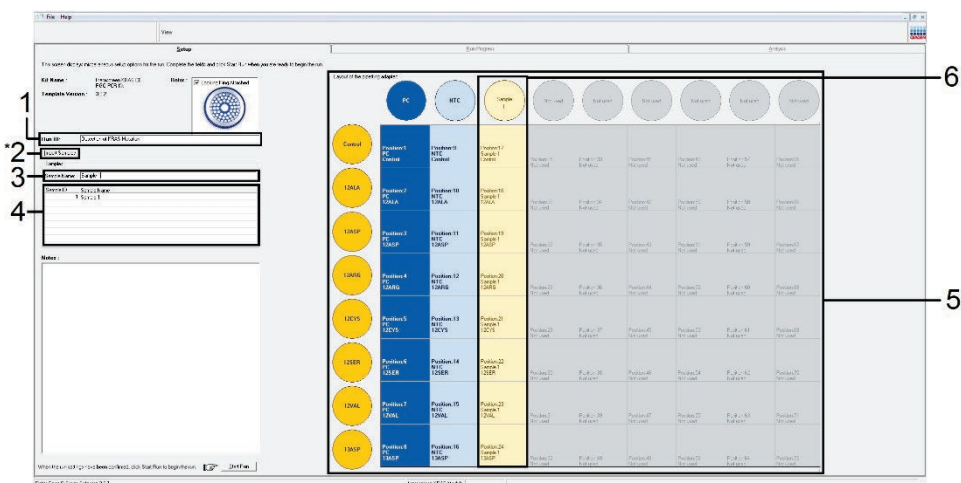
Бұл төмендегі үлгілер тізіміне үлгі атауын қосады және үлгіге үлгі идентификаторын тағайындайды (1, 2, 3 және т.б.). Сонымен қатар, оң жақтағы пипеткалау адаптері панелінің орналасу сызбасы жаңартылады және үлгі атауын қамтиды (15-сурет).

Ескертпе. Пипеткалау адаптері түс өзгерісімен ерекшеленгеніне және үлгі шеңберінің астындағы бағандағы барлық 8 талдаманың ерекшеленгеніне көз жеткізіңіз (15-сурет).

Ескертпе. Сіз 7-ден артық емес үлгіні қосуға болады. Үлгі идентификаторлары (үлгі шеңберлерінде) автоматты түрде 1-ден 7-ге дейін тағайындалады.

Ескертпе. 8-ден астам символдан тұратын үлгі атаулары пипеткалау адаптері панелінің орналасу сызбасында толық көрсетілмеуі мүмкін.

Сонымен қатар, *.smp (Rotor-GeneQ үлгісінің файлы) немесе *.csv (үтірмен бөлінген мәндер) форматында сақталған үлгілердің атауларын **Import Samples (Үлгілерді импорттау)** түймесі арқылы импортталуы мүмкін. Үлгі атаулары осы әдісті қолдана отырып автоматты түрде толтырылады.

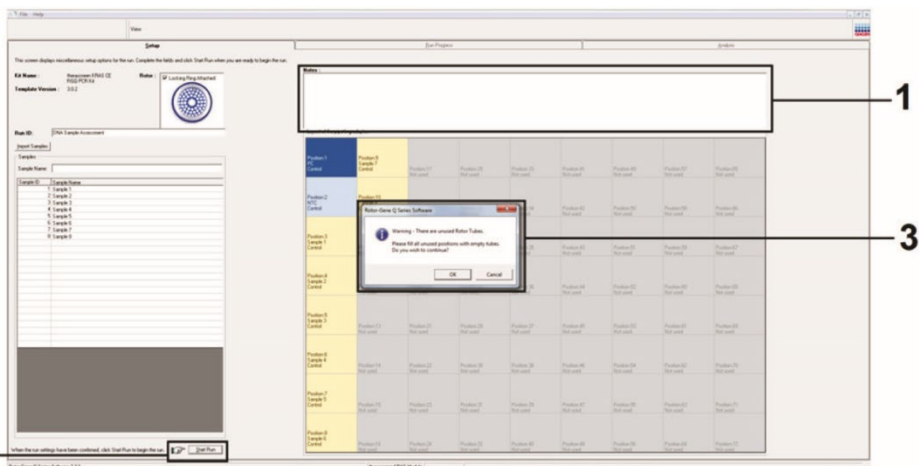


15-сурет. Өткізу идентификаторы мен үлгі атауын енгізу. 1 = "Өткізу идентификаторы/RunID" диалогтық өрісі, 2 = Үлгіні импорттау/Import Sample (2.1 бағдарламалық жасақтама нұсқасында қолжетімсіз), 3 = «Үлгі атауы/Samplename»

диалогтық өрісі, 4 = Үлгілер тізімі, 5 = Пипеткалау адаптері панелінің орналасу сызбасы, 6 = Бөлінген үлгі шеңбері және төмендегі 8 талдамадан баған.

18. Барлық қосымша үлгілердің атауларын енгізу үшін 14-қадамды қайталаңыз (16-сурет).

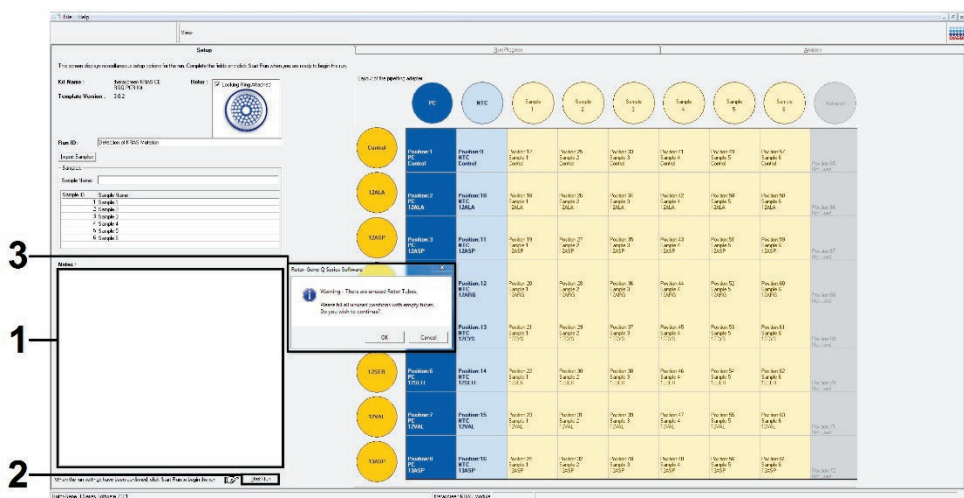
Ескертпе. Үлгі атауын редакциялау үшін үлгілер тізіміндегі үлгі атауын басыңыз және таңдалған үлгі жоғарыдағы **Sample Name (Үлгі атауы)** өрісінде пайда болады. Тақырыптар туралы жергілікті келісімге сәйкес үлгі атауын редакциялаңыз және тақырыпты жаңарту үшін **Return(Енгізу)** пернесін басыңыз.



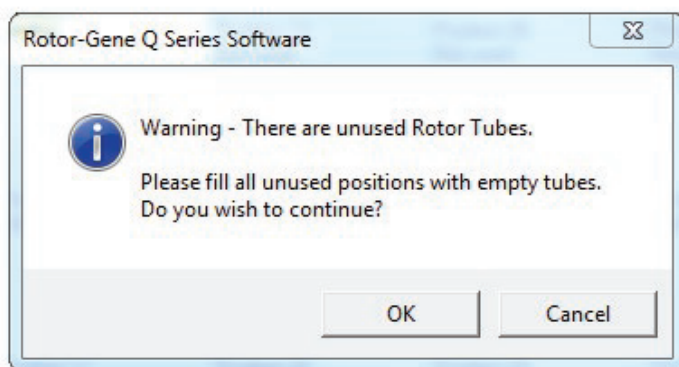
16-сурет. Үлгі атауы диалогтық терезесінде қосымша үлгі атауларын енгізу. 1 = Үлгі атауы диалогтық өрісі, 2 = Үлгілер тізімі, 3 = Қосымша үлгі атаулары бар пипеткалау адаптері панелінің орналасу сызбасы.

19. Барлық үлгі атауларын енгізгеннен кейін олардың дұрыстығын тексеріңіз. Қажет болса, **Notes(Ескертпелер)** өрісіне кез келген қосымша ақпаратты қосыңыз, содан кейін **Start Run(Өткізуді бастау)** түймесін басыңыз (17-сурет).

Ескертпе. Егер ротордың кез-келген позициясы қолданылмаса, ескерту хабарламасы пайда болады (17-сурет және 18-сурет) пайдаланушыға ротордағы барлық пайдаланылмаған позициялар қақпағы бар бос пробиркамен толтырылуы керек екенін еске салады. Барлық пайдаланылмаған ротор позициялары қақпағы бар бос пробиркамен толтырылғанына көз жеткізіп, жалғастыру үшін OK түймесін басыңыз.

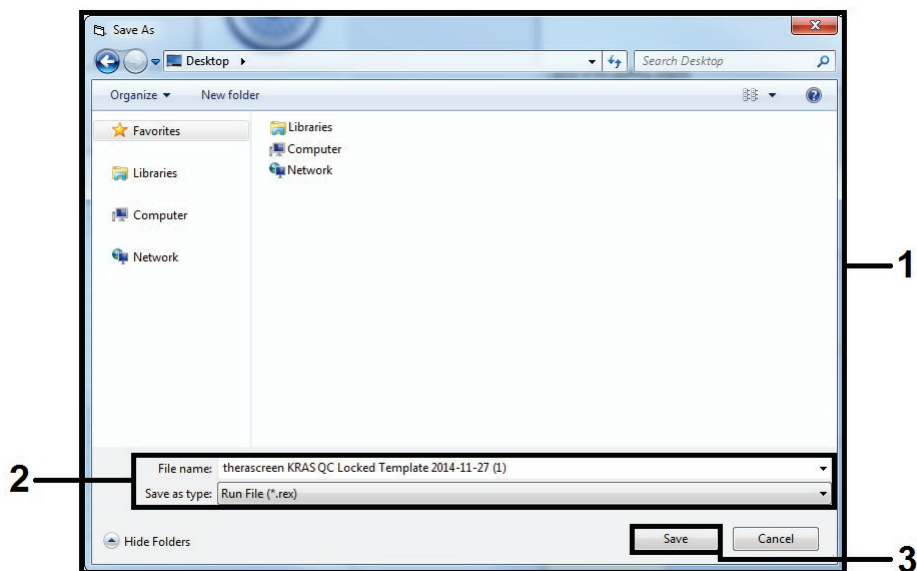


17-сурет. 1 = Ескертпелер диалогтық өрісі, 2 = Өткізуді бастау және 3 = Пайдаланылмаған ротор позициялары туралы ескерту.



18-сурет. Пайдаланылмаған ротор позициялары туралы ескерту.

20. Сәйкес файл атауын таңдап, таңдалған жерде ПТР өткізу *.rex өткізу файлы ретінде сақтаңыз.

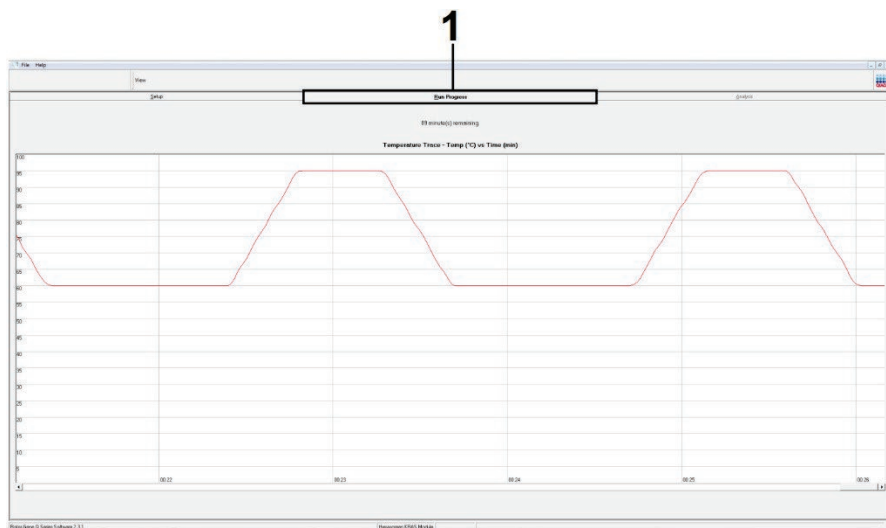


19-

сурет. Өткізу файлын сақтау.

ПТР өткізу басталады.

Ескертпе. Өткізу басталған кезде температура қисығы мен қалған орындау уақыты көрсетілген Run Progress (Өткізуді орындау) қойындысы автоматты түрде ашылады (20-сурет).

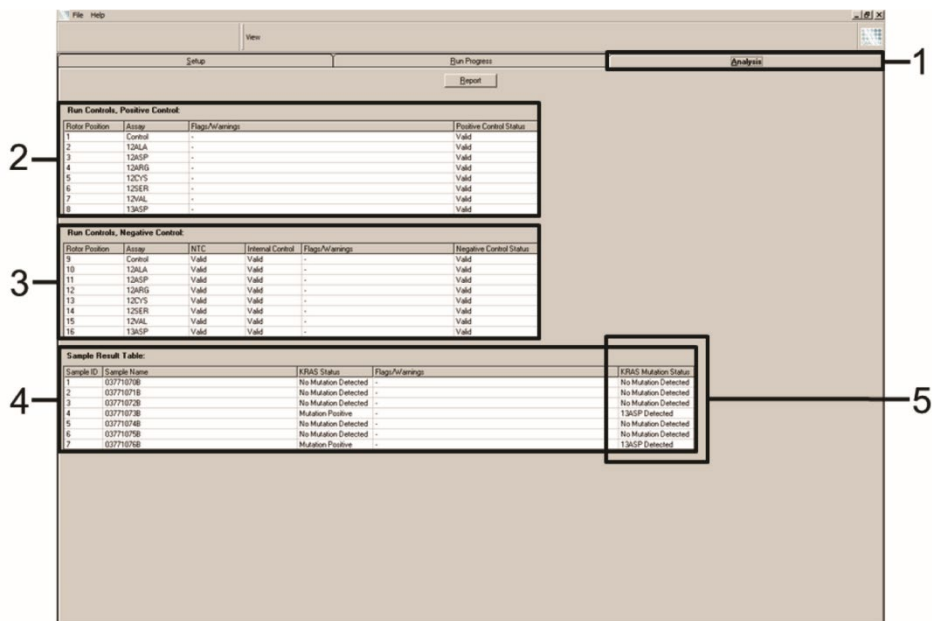


20-сурет. Өткізуді орындау қойындысы.

Өткізу аяқталғаннан кейін Analysis (Талдау) қойындысы автоматты түрде ашылады.

Ескертпе. Егер Analysis (Талдау) қойындысы ашылмаса, Analysis (талдау) қойындысын шертіңіз (21-сурет).

Ескертпе. Есептеу әдісін түсіндіру Нәтижелерді түсіндіру бөлімінде берілген.



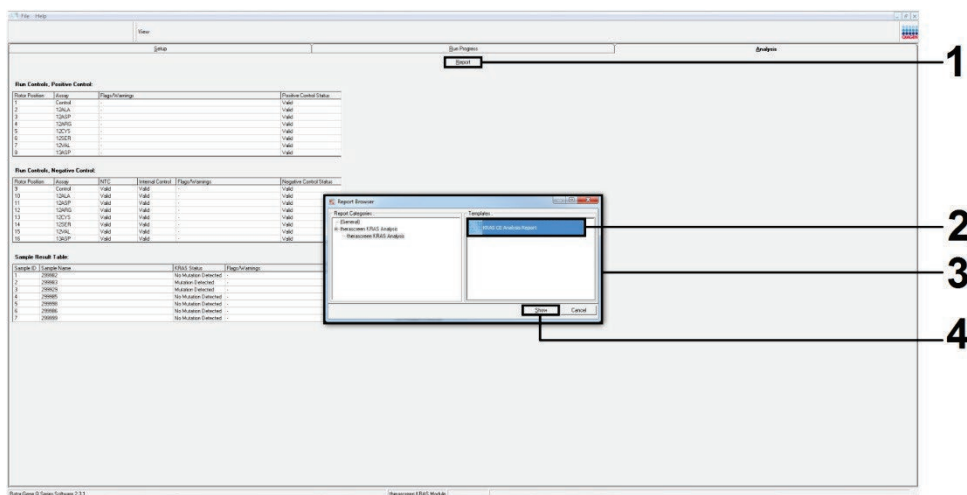
21-сурет. «Талдау» қойындысы және нәтижелер туралы есеп беру.1 = Талдау қойындысы, 2 = Бақылаулар кестесі, оң бақылау, 3 = Бақылау кестесі, теріс бақылау, 5 = KRAS мутациясы күйінің бағаны.

Талдау нәтижелері келесідей болады (21-сурет).

- Бақылаулар өткізу кестесі, Оң бақылау: егер нәтижелер рұқсат етілген шектерде болса, оң бақылау күйінде Valid (жарамды) көрсетіледі, әйтпесе Invalid (жарамсыз) нәтижесі пайда болады.
- Бақылаулар өткізу кестесі, Теріс бақылау: егер NTC және ішкі бақылау нәтижелері рұқсат етілген шектерде болса, теріс бақылау күйі Valid (жарамды) ретінде көрсетіледі, әйтпесе Invalid (жарамсыз) нәтижесі пайда болады.
- Үлгілер нәтижелері кестесі: KRAS мутация күйі бағанында оң мутация үлгілері үшін нақты мутациялар көрсетіледі.

21.Есеп беру файлдарын жасау үшін **Report (Есеп беру)** түймесін шертіңіз. Есеп берулер браузерінің терезесі пайда болады. **Шаблондар** бөлімінен **KRAS Analysis Report (KRAS талдауы туралы есеп беру)** таңдаңыз, содан кейін **Show (Көрсету)** түймесін басыңыз (22-сурет).

Ескертпе. Есеп берулерді әр есеп берудің жоғарғы сол бұрышындағы Save As (Қалай сақтау) түймесін басу арқылы веб-мұрағат форматында басқа жерде сақтауға болады



12-сурет. KRAS талдауы туралы есеп беруді таңдау. 1 = Есеп беру, 2 = Есеп беру браузері терезесі, 3 = KRAS талдауы туралы есеп беруді таңдау, 4 = Көрсету.

Тек ҰЕӨО үлгілері үшін ескертпе: G12C (12CYS) мутациясының жалған нәтижесін алмау үшін төменде келтірілген құсбелгілері бар үлгілер жарамсыз деп түсіндірілуі керек.

- SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT
- SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID
- SAMPLE_INT_CTRL_FAIL
- MUTATION_EARLY_CT
- SAMPLE_INVALID_DATA

Нәтижелерді түсіндіру

Мутацияларды талдау және анықтау өткізу аяқталғаннан кейін Rotor-GeneQTherascreen KRASAssayPackage пакетінің көмегімен автоматты түрде орындалады. Төменде RotorGeneQTherascreen KRASAssayPackage қалай талдау жасайтыны және мутацияларды анықтайтыны туралы ақпарат берілген.

Мутацияны талдау және анықтау

Белгілі бір реакция нәтижесінде флуоресценция шекті мәннен асатын ПТР циклы C_T мәні ретінде анықталады. C_T мәндері нақты кіріс ДНҚ мөлшерін көрсетеді. Төмен C_T мәндері кіріс ДНҚ-ның жоғары деңгейлерін, ал жоғары C_T мәндері кіріс ДНҚ-ның төмен деңгейлерін көрсетеді. C_T мәні бар реакциялар оң амплификация ретінде жіктеледі.

Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасы кез-келген жазылған екі мән арасындағы флуоресценция сигналдарын интерполяциялайды. Осылайша, C_T мәндері 0-ден 40-қа дейінгі диапазондағы кез-келген нақты сан болуы мүмкін (бүтін сандармен шектелмейді).

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы үшін шекті мән 0,05 салыстырмалы флуоресценция бірлігі деңгейінде орнатылған. Бұл мән флуоресценцияның екі каналы - жасыл және сары үшін Therascreen KRAS пакетінде бапталған. Шекті мән Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын әзірлеу кезінде анықталды.

Есептеу мына теңдеуді қолдана отырып, ΔC_T мәнін анықтау үшін орындалады:

$$\Delta C_T = [C_T \text{ мәні мутация талдауы үшін}] - C_T \text{ мәні бақылауды талдау үшін}]$$

Бақылауларды өткізу (оң бақылау, NTC және ішкі бақылау) қолайлы C_T мәндерінің сақталуын және реакциялардың дұрыс орындалуын қамтамасыз ету үшін бағаланады.

Үлгінің ΔC_T мәндері мутация талдауының C_T мен сол үлгідегі бақылауды талдаудың C_T мәні арасындағы айырмашылық ретінде есептеледі. Егер үлгілер осы талдау үшін ΔC_T шекті мәнінен кіші немесе оған тең ΔC_T шекті мәнін берсе, олар мутацияға оң ретінде жіктеледі. Бұл мәннен асып кетсе, үлгіде theerascreen KRAS RGQ PCR жинағымен анықталатын мутацияның аз пайызы болуы мүмкін (анықтау шегінен жоғары) немесе үлгі мутация бойынша теріс болып табылады, ол анықталған мутацияның болмауы ретінде көрсетіледі.

Мутацияға реакцияларда амплификацияның болмауы есептелмейді, өйткені мутация анықталмайды. Фондық амплификация негізінде есептелген ΔC_T мәндері ΔC_T шекті мәндерінен көп болады деп күтілуде және үлгі ретінде жіктеледі – мутация анықталмады.

Талдау нәтижелері "мутация анықталды [мутация атауы], Мутация анықталмады, жарамсыз нәтиже" немесе егер бақылауды өткізу қатемен аяқталса, бақылауды өткізу өтпеді. Оң мутациялары бар үлгілер үшін нақты мутациялар хабарланады.

Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау пакетімен жасаған құсбелгілерді түсіндіру үшін, Therascreen KRAS талдау пакетімен жасаған құсбелгілерді қараңыз.

Ескерте. сирек жағдайларда ісікте бірнеше мутация болуы мүмкін. Мұндай жағдайларда ΔC_{Teq} аз мәнін беретін мутация анықталады.

Шектеулер

Тест KRAS генінің 12 және 13 кодондарындағы 7 мутацияны анықтауға арналған. Нәтижелері "мутациялар анықталмады" деп көрсетілген үлгілерде талдау анықталмаған KRAS мутациялары болуы мүмкін (мысалы, 13CYS).

Мутацияларды анықтау үлгінің тұтастығына және үлгідегі амплификацияланатын ДНҚ мөлшеріне байланысты. Егер үлгідегі ДНҚ-ны бастапқы бағалау оның мөлшері мутацияны талдау үшін жеткіліксіз немесе тым көп екенін көрсетсе, процедураны қайталау керек.

Therascreen kras rgq PCR жинағы полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) процедурасында қолданылады. Барлық ПТР процедуралары сияқты, үлгілер тестіленген сыналған ортадағы

сыртқы ДНҚ көздерімен және оң бақылаудағы ДНҚ-мен ластануы мүмкін. Үлгілер мен реактивті қоспаны реагенттермен ластамау үшін абай болыңыз.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы кез келген ауруды диагностикалауға арналмаған.

КРО үлгілері үшін theerascreen KRAS RGQ PCR жинағы тек жабайы типті үлгілер мен мутация үлгілері арасындағы айырмашылықты жасауға арналған. Тест мутацияға әрбір реакция нақты өлшенетін мутацияға ең сезімтал болатындай етіп әзірленген. Алайда, мутация анықталған үлгілерде басқа реакциялармен айқаспалы реактивтілік байқалуы мүмкін. Егер мутацияға біреуден артық реакция оң болса, онда нәтиже ΔC тең төменгі мәні болып табылады.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы тек формалинмен бекітілген, парафин құйылған колоректальді және ұсақ жасушалы емес өкпе обыры тіндеріне арналған.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы тек QIAampDNAFFPETissueKit талдау жинағымен пайдалануға рұқсат етілген. theerascreen KRAS RGQ PCR жинағымен тек Rotor-GeneQMDx 5plexHRM пайдалануға рұқсат етілді.

Пайдалану сипаттамалары

Аналитикалық көрсеткіштер

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының белгілі бір пайдалану сипаттамалары КРО және ҰӨӨ бар пациенттерден жиналған тіндердің үлгілерін пайдалана отырып, зерттеу нәтижелері бойынша анықталды. ҰӨӨ үлгілерін алу әдістеріне өзекшелік инемен биопсия (ӨИБ), жіңішке инемен аспирация (ЖИА) және резекция кірді. Үлгінің әр түрі үшін 8 FFPE адам жасушаларының желілері пайдаланылды, олардың 7-сінде талдау арқылы анықталған белгілі KRAS мутациялары және бір жабайы типті KRAS мутациясы бар (яғни 12 және 13 кодондарда мутацияларсыз). Үлгілердің мутациялық күйі екі бағытты Сэнгер секвенциясы арқылы расталды.

Шекті мәні

CLSI EP17-A (2004) (8) ұсынымдарына сәйкес әдісті қолдана отырып, талдау үшін шекті мәндерді белгілеу үшін 225 FFPE үлгілері тестіленді. Бақылау реакциясының C_T диапазоны 21,92-ден 32,00-ге дейін белгіленді. Мутациялар реакцияларының C_T-ден (ΔC_T) алынған C_T бақылау реакциясына негізделген шекті мәндер 8-кестеде көрсетілген.

8-кесте. Әрбір мутация талдауы үшін белгіленген шекті мәндер.

Мутацияны талдау							
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Шекті мәні (≤DCT)	8.0	6.6	8.0	8.0	8.0	7.5	7.5

Бланк шегі

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының мутацияға оң матрица болмаған кезде тиімділігін бағалау үшін және бос сынама мутацияның төмен концентрациясын көрсете алатын аналитикалық сигнал тудырмайтынына көз жеткізу үшін матрицасыз үлгілер талданды. Нәтижелер мутация пробиркаларының немесе бақылау реакцияларының ешқайсысында бақылау үлгілері немесе мутация үлгілері үшін анықталатын C_T мәндерін көрсетпеді (ішкі бақылау үшін барлық C_T мәндері сенімді болды).

Аналитикалық эталондық әдіспен салыстыру: KPO

Екі бағытты секвенирлеумен салыстырғанда, theascreen KRAS RGQ PCR жинағымен тестіленген үлгілердің мутация күйінің сәйкестігін көрсету үшін екі зерттеу жүргізілді. Барлығы 137 FFPE үлгілері theascreen KRAS RGQ PCR жинағы үшін де, екі бағытты секвенирлеу үшін де сенімді нәтижелер берді.

Жалпы нәтижелер 9-кестеде келтірілген. 10-кестеде theascreen KRAS RGQ PCR жинағымен сәйкестігін талдау және екі бағытты секвенирлеу көрсетілген.

9-кесте. Therascreen kras rgq PCR жинағы екі бағытты Сэнгер секвенирлеумен салыстырғанда.

Результат мутации с помощью двунаправленного секвенирования									
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total
therascreen KRAS RGQ PCR Kit call	Отрицат.	80	—	—	1	—	—	1	82
	Положит. 12ALA	—	3	—	—	—	—	—	3
	Положит. 12ARG	—	—	—	1	—	—	—	1
	Положит. 12ASP	—	—	—	20	—	—	—	20
	Положит. 12CYS	—	—	—	—	3	—	—	3
	Положит. 12SER	—	—	—	—	—	—	—	0
	Положит. 12VAL	2	—	—	—	—	14	—	16
	Положит. 13ASP	1	—	—	—	—	—	11	12
	Bcero	83	3	0	22	3	0	14	137

10-кесте. Сәйкестікті талдау

Бағалау сәйкестігі	Жиілігі (%)	95% сенімділік аралығы (CA)
Жалпы пайыздық сәйкестігі	132/137 (96.35)	92.69–98.21
... бойынша сәйкестік пайызы оң нәтижелер бойынша	52/54 (96.30)	89.41–98.77
Сәйкестік пайызы теріс нәтижелер бойынша	80/83 (96.39)	91.30–98.55

Бірінші зерттеудің деректерін толықтыратын үлгілердің екінші бірегей жинағы бағаланды. FFPE KPO 271 үлгісінің жиынтығы ұсынылды; белгісіз мутация күйі бар 250 үлгі және белгілі мутация күйі бар 21 үлгі (сирек мутациялармен байыту үшін) жоғарыда сипатталғандай екі бағытты Сэнгер секвенирлеуімен салыстырылды.

Сәйкестік талдауы Therascreen KRAS RGQ екі бағытты және ПТР жинағының нақты нәтижелері бар 247 үлгіде жүргізілді. 9 дискордантты үлгі болды. Жалпы сәйкестік 96,4% құрады. Деректер therascreen KRAS RGQ PCR жинағының дәл тиімділігін растайды (12-кесте және 13-кесте).

11-кесте. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы екі бағытты Сэнгер секвенирлеуімен салыстырғанда (екінші зерттеу)

Результат мутации с помощью двунаправленного секвенирования										
	Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total
therascreen KRAS RGQ PCR Kit call										
Отрицат.	26 1	-	-	-	-	-	-	-	1	262
Положит. 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
Положит. 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
Положит. 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
Положит. 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
Положит. 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Положит. 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
Положит. 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
Всего	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

12-кесте. Сәйкестікті талдау (екінші зерттеу)

Сәйкестікті бағалау	Жиілігі (%)	95% сенімділік аралығы (CA)
Жалпы пайыздық сәйкестігі	340/360 (94.44)	92.03–96.29
Оң нәтижелер бойынша сәйкестік пайызы	79/80 (98.75)	94.21–99.94
Теріс нәтижелер бойынша сәйкестік пайызы	261/280 (93.21)	90.20–95.51

Эталондық аналитикалық әдіспен салыстыру: ҰЕӨӨ

Therascreen KRAS RGQ PCR Kit жинағының көмегімен тестіленген, ҰЕӨӨ үлгілерінің жалпы мутация күйіне сәйкес, екі бағытты Сэнгер секвенирлеуімен салыстырғанда, сәйкестігін көрсету үшін бұл зерттеу барысында резекция, НИБ немесе ЖИА арқылы алынған FFPE ҰЕӨӨ

клиникалық үлгілерін пайдаланды. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының көмегімен тестілеу алдында ДНҚ әр үлгіден экстракцияланды. Тест нәтижелері екі бағытты Сэнгер бойынша секвенирлеу арқылы алынған нәтижелермен салыстырылды.

Барлығы 360 үлгі thelascreen KRAS RGQ PCR жинағы үшін де, екі бағытты Сэнгер бойынша секвенирлеу үшін де жарамды нәтиже берді, сонымен қатар 340 үлгі салыстырмалы нәтиже берді.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы мен екі бағытты секвенирлеу арасындағы сәйкестік 13-кестеде көрсетілген. Екі үлгі екі бағытты Сэнгер бойынша секвенирлеу кезінде қос мутация нәтижелерін берді. Бір мутация thelascreen KRAS RGQ PCR жинағының нәтижелерімен сәйкес келгендіктен, бұл үлгілер жалпы сәйкестік көрсеткіші, оң нәтиже сәйкестігі және теріс нәтиже сәйкестігі бойынша сәйкес келеді деп жіктелді (14-кесте).

13-кесте. Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы екі бағытты Сэнгер бойынша секвенирлеуімен салыстырғанда

Ответ мутации с помощью двунаправленного секвенирования										
Therascreen KRAS RGQ PCR Kit call	N e g .	12AL A	12ALA_12 CYS	12AR G	12A SP	12C YS	12CYS_12 VAL	12V AL	13A SP	Tot al
	26 6 1									
	Отрицат.	–	–	–	–	–	–	–	1	26 2
	Положит. 12ALA	4	1	–	–	–	–	–	–	6
	Положит. 12ARG	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	Положит. 12ASP	4	–	–	14	–	–	–	–	18
	Положит. 12CYS	6	–	–	–	35	–	–	–	41
	Положит. 12SER	2	–	–	–	–	–	–	–	2
	Положит. 12VAL	5	–	–	–	–	1	17	–	23
	Положит. 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	4	5
Всего		280	1	3	14	35	1	17	5	360

14-кесте. Сәйкестікті талдау

Сәйкестікті бағалау	Жиілігі (%)	95% сенімділік аралығы (CA)
Оң нәтижелер бойынша сәйкестік пайызы	340/360 (94.44)	92.03–96.29
Теріс нәтижелер бойынша сәйкестік пайызы	79/80 (98.75)	94.21–99.94
Оң нәтижелер бойынша сәйкестік пайызы	261/280 (93.21)	90.20–95.51

Анықтау шегі (LOD)

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының жұмыс диапазоны бақылау реакциясының C_T мәнімен анықталған үлгідегі амплификациялайтын ДНҚ мөлшеріне негізделген. Талдау үшін мәлімделген кіріс диапазоны бақылау үшін 21,92-ден 32,00-ге дейін алдын ала берілген C_T мәні диапазонымен анықталады. LOD мутантты ДНҚ-ның минималды пайызын білдіреді, оны жабайы типтің аясында анықтауға болады, мұнда жалпы амплификацияланатын ДНҚ белгіленген кіріс диапазоны шегінде және әлі де ΔC_T шекті мәнінен төмен болады.

КРО

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағына енгізілген мутацияға тән 7 реакцияның әрқайсысының LOD анықтау үшін зерттеу жүргізілді. Therascreen KRAS RGQ PCR Kit жинағы үшін жабайы типті ДНҚ аясында мутантты ДНҚ-ны анықтау шегі ең кіші сұйылту коэффициенті ретінде анықталады, мұнда әрбір мутацияға оң үлгі үшін тест қайталануларының 95%-ы оң деп анықталды.

Логистикалық регрессия модельдері әр талдауға төмен және жоғары кіріс деректердің деңгейімен ДНҚ деректер жинақтары үшін бөлек қолданылды. Бұл модельдерде жауап айнымалысы анықталған мутацияның (анықтау = 1) және анықталмаған мутацияның (анықтау = 0) екілік нәтижесі болды, үздіксіз түсіндірме айнымалысы $\log_2\%$ мутациясының сұйылтуы болды. LOD болжамды анықтау ықтималдығы 0,95 болатын мутацияның пайыздық сұйылтуы ретінде есептелді (16-кесте).

15-кесте. FFPE жасушалық сызықтарын пайдалана отырып, әрбір мутация талдауы үшін LOD мәндері

Талдау	LOD _{C₉₅} (жабайы типті ДНҚ-дағы мутантты ДНҚ пайызы)
12ALA	0.8
12ARG	2.6
12ASP	6.4
12CYS	1.5
12SER	5.6
12VAL	1.6
13ASP	6.4

ҰЕӨӨ

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын талдауға арналған LOD КРО тінін пайдаланып анықталды және расталды. Бұл LOD нәтижелері ҰЕӨӨ тініне қайта тексерілді.

Зерттеу 2 бөлімнен тұрды. 1-бөлімде, әрбір мутацияны білдіретін 7 мутантты FFPEҰЕӨӨ жасушалық сызықтарының 60 қайталануы тиісті талдаудың LOD-қа дейін өсірілді және тестіленді. Әрбір бағаланған үлгі үшін FFPE жасушалық сызығының барлық 60 нақты қайталануы LOD бағалауы кезінде сәйкес мутация реакциясының 100%-ы анықталғанын көрсетті.

2-бөлімде, тиісті талдаудың LOD-қа дейін сұйылтылғаннан кейін, олар әрбір мутацияны 3 алу әдісімен (резекция, BSI және АТИ) ұсынатын FFPEҰЕӨӨ клиникалық үлгілерінің 96 қайталануы тестіленді.

12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL және 13ASP үшін 96 жарамды қайталануы 100% дұрыс нәтиже көрсетті. 12CYS және 12SER талдаулары LOD кезінде 95,8% анықтауды көрсетті.

Бұл ҰЕӨӨ тінін және FFPEҰЕӨӨ клиникалық үлгілерін/FFPE жасушалық желілерін/пациентке сәйкес үлгілерді бағалау кезіндегі барлық мутация талдаулары үшін бұрын анықталған LOD мәні расталғанын көрсетеді.

ДНҚ енгізу және сызықтығы

Енгізілген ДНҚ деңгейінің ΔC_T мәндеріне әсері

Жалпы ДНҚ-ның әртүрлі деңгейлері бар үлгілерде мутантты ДНҚ-ның бірдей үлесі болған кезде, өлшенген ΔC_T мәндері тұрақты болып қалады деп күтілуде. Зерттеудің мақсаты thetascreen KRAS RGQ PCR жинағының тиімділігі талдау ДНҚ-сын бүкіл енгізу диапазонында өзгермейтінін көрсету болды (C_T бақылау мәні). FFPE 8 жасушалық желісінен бөліп алынған ДНҚ C_T ең аз қол жетімді бақылау реакциясы бар ДНҚ пулдарын дайындау үшін пайдаланылды. Кейіннен концентрацияланған ДНҚ қорлары жұмыс диапазонын қамтитын ДНҚ алу үшін сұйылтылды (барлығы 5 сұйылту, оның ішінде бастапқы концентрацияланған қор).

Жұмыс диапазонындағы әр нүкте үшін 6 қайталану сынақ жүргізу үшін жеткілікті материал дайындалды. Әрбір мутация реакциясы үшін сұйылту диапазоны және нәтижелерден алынған орташа ΔC_T 16-кестеде көрсетілген. ΔC_Tжалпы мәндері Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының барлық жұмыс диапазонында барлық талдаулар үшін бірдей, бұл ДНҚ деңгейі үлгідегі мутацияларды анықтау дәлдігіне әсер етпейтінін көрсетеді.

16-кесте. C_T кіріс бақылау реакцияларының барлық диапазонында ΔC_T мәндеріне ДНҚ енгізу әсері - ΔC_T FFPEKPO жасушалық сызықтары

Талдау	ΔC _T				
	1 сұйылту ~20-21 C _T	2 сұйылту ~23-24 C _T	3 сұйылту ~26-27 C _T	4 сұйылту ~29-30 C _T	5 сұйылту ~32-33 C _T
12ALA	1.56	1.25	1.16	1.14	1.27
12ASP*	2.46	2.18	2.11	2.11	1.75
12ARG	1.18	0.63	1.08	0.94	1.06
12VAL	0.29	0.25	0.15	0.26	-0.1
12SER	2.91	2.21	2.15	2.15	2.08
12CYS	0.98	0.71	0.58	0.81	0.67
13ASP	3.57	2.84	2.54	2.46	2.62

* 12 ASP үшін қайталанулардың жалпы саны 27 болды.

17-кесте. ΔC_T мәндеріне ДНҚ енгізу әсері барлық диапазонда кіріс бақылау реакциясы C_T - FFPEҰЕӨӨ үлгілері

Талдау	ΔC _T				
	1 сұйылту ~20-21 C _T	2 сұйылту ~23-24 C _T	3 сұйылту ~26-27 C _T	4 сұйылту ~29-30 C _T	5 сұйылту ~32-33 C _T
12ALA	3.40	3.25	3.11	2.90	3.31
12ASP	3.63	2.92	2.55	2.46	—*
12ARG	2.49	2.22	2.25	2.23	1.40
12VAL	1.34	1.23	1.18	1.13	0.97
12SER	5.34	4.50	4.30	3.92	—*
12CYS	1.70	1.71	1.70	1.77	1.01
13ASP	6.24	5.36	5.14	4.87	—*

* ДНҚ концентрациясының төмендігіне байланысты мутацияға реакцияның C_T мәні алынбады, сондықтан ΔC_T мәні есептелмеді.

ДНҚ енгізуге байланысты амплификацияның сызықтығы/тиімділігі

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының бүкіл жұмыс диапазонындағы бақылау реакциясымен салыстырғанда әрбір мутация реакциясы үшін ПТР амплификациясының сызықтылығы мен тиімділігі көрсетілді. Амплификация тиімділігі мутация реакциялары мен бақылау реакциясының әрқайсысы үшін [10(-1/көлбеу)] -1 ретінде есептелді.

Мутация реакциясымен салыстырғанда бақылау амплификациясының тиімділігі бұл ΔC_T және демек мутацияны алу талдаудың бүкіл талдау жұмыс диапазонында тұрақты екенін көрсетеді. Жиынтық деректер 18-кестеде (KPO үлгілері) және 19-кестеде (ҰЕӨӨ үлгілері) келтірілген.

18-кесте. Бақылау және мутация реакцияларындағы амплификация тиімділігі: KPO жасушалық сызықтары

Үлгі		Қиылысу	Стандарт ты қиылысу қатесі	Есептелген көлбеу	Стандартты ы қате (көлбеу)	Төменгі жағы 95% сенімділік шегі (көлбеу)	Жоғарғы жағы 95% сенімділік шегі (көлбеу)	Амплификация тиімділігі	Амплификация тиімділігінің айырмашылығы
12ALA	Ст бақылауы	21.060	0.060	-1.008	0.007	-1.023	-0.993	0.989	0.03
	12ALA Ct	22.476	0.103	-0.987	0.013	-1.013	-0.961	1.019	
12ARG	Ст бақылауы	20.825	0.083	-1.035	0.01	-1.056	-1.014	0.954	0.056
	12ARG Ct	23.237	0.083	-0.993	0.011	-1.016	-0.97	1.01	
12ASP	Ст бақылауы	20.385	0.13	-1.013	0.16	-1.046	-0.98	0.982	-0.003
	12ASP Ct	21.347	0.065	-1.015	0.008	-1.032	-0.999	0.979	
12CYS	Ст бақылауы	23.437	0.063	-0.981	0.01 0.006	-1.003	-0.96 -0.947	1.026	0.032
	1 2CYS Ct	24.289	0.039	-0.961		-0.974		1.058	
12SER	Ст бақылауы	22.568	0.050	-1.003	0.008	-1.02	-0.986	0.996	0.105
	12SER Ct	25.212	0.087	-0.934	0.014	-0.963	-0.904	1.101	
12VAL	Ст бақылауы	21.208	0.047	-0.995	0.006	-1.007	-0.983	1.007	0.033
	12VAL Ct	21.532	0.043	-0.972	0.005	-0.983	-0.961	1.04	
13ASP	Ст бақылауы	23.207	0.056	-1.001	0.009	-1.02	-0.982	0.999	0.145
	12ASP Ct	26.466	0.106	-0.909	0.017	-0.945	-0.873	1.144	

19-кесте. Бақылау және мутация реакцияларындағы амплификация тиімділігі: **ҰЕӨ0** үлгілері

Үлгі		Қиылысу	Стандарт ты қиылысу қатесі	Есептелге н көлбеу	Стандартт ы қате (көлбеу)	Төменгі жағы 95% сенімділік шегі (көлбеу)	Жоғарғы жағы 95% сенімділік шегі (көлбеу)	Амплификация тиімділігі	Амплификация тиімділігінің айырмашылығ ы
12ALA	Ст бақылауы	22.74	0.04	-0.15	0.02	-0.19	-0.11	0.94	0.069
	Ст 12ALA Ст	24.11	0.16	-1.06	0.07	-1.20	-0.93	1.01	
12ARG	Ст бақылауы	21.92	0.03	-0.07	0.01	-0.09	-0.05	0.94	0.093
	12ARG Ст	24.44	0.02	-0.98	0.01	-0.96	-0.96	1.04	
12ASP	Ст бақылауы	21.73	0.05	-0.13	-0.02	-0.17	-0.08	0.96	-0.001
	12ASP Ст	22.69	0.03	-0.97	0.01	-1.00	-0.95	0.96	
12CYS	Ст бақылауы	21.73	0.04	-0.11	0.01	-0.14	-0.08	0.98	0.019
	1 2CYS Ст	22.77	0.03	-1.01	0.01	-1.03	-0.99	1.00	
12SER	Ст бақылауы	22.03	0.05	-0.06	0.02	-0.10	-0.02	0.97	0.127
	12SER Ст	25.34	0.03	-0.97	0.01	-0.99	0.94	1.09	
12VAL	Ст бақылауы	22.13	0.04	-0.03	0.02	-0.07	0.01 -0.88	0.92	0.011
	12VAL Ст	23.34	0.08	-0.95	0.03	-1.01		0.91	
13ASP	Ст бақылауы	22.63	0.02	-0.02	0.01	0.001	-0.04	0.94	0.066
	12ASP Ст	25.14	0.07	-0.94	0.03	-1.00	-0.88	1.01	

сызықтығы/амплификация тиімділігі мутацияның пайыздық көрсеткішінің функциясы ретінде

Бұл зерттеудің мақсаты шамамен C_T 22-23C C_T кіріс деңгейлерінен бастап thetascreen KRAS RGQ PCR жинағының бүкіл жұмыс диапазонындағы амплификация тиімділігіне сериялық сұйылтылған-мутацияға оң үлгінің әсерін бағалау болды.

FFPE КРО және ҰЕӨО жасушалық сызықтарынан алынған ДНҚ экстракттері бастапқыда Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен ПТР жасамас бұрын OD көрсетілімдері бойынша бағаланды. Содан кейін ДНҚ қорлары шамамен 23 C_T сәйкес келетін C_T -бақылау реакциясы бойынша дайындалды. Бастапқы материал матрицағы мутантты ДНҚ пайыздық мазмұны өзгерген кезде тұрақты, жалпы жабайы типті ДНҚ-ны ұстап тұру үшін, жабайы типті ДНҚ-ны қолдана отырып, екі данада сериялық сұйылтады.

Бір мутацияға 6 қайталану үшін жеткілікті ДНҚ пулдары дайындалды. Әрбір сұйылту нүктесіндегі әрбір мутация үшін C_T және ΔC_T деректері есептелді. Сызықтық регрессия моделі $\log_2$ ДНҚ кіріс сұйылтуымен салыстырғанда C_T мутация реакциясына бейімделген. Зерттеу жабайы типті ДНҚ-ның тұрақты концентрациясы аясында мутациялардың көбеюі жоғарыда келтірілген сызықтық зерттеуде анықталған мәндерден айтарлықтай ерекшеленбейтін амплификация тиімділігіне әкелетінін көрсетті.

Интерференциялайтын заттар

Бұл зерттеудің мақсаты ықтимал кедергі келтіретін заттардың theascreen KRAS RGQ PCR жинағының тиімділігіне әсерін бағалау болды, ол әр заттың әр түрлі концентрацияларды қосу эксперименттері арқылы тестіленген үлгілердің ΔC_T мәніне және мутация күйіне әсерін талдау арқылы орындалды. ДНҚ бөліп алудың тестіленетін процесінде әлеуетті интерференциялайтын заттар AL буфері, ATL буфері, этанол, қатты парафин, протеиназа K, AW1 шайғыш буфері, AW2 шайғыш буфері және ксилол болды. Жинақтағы соңғы элюциялық буфер, ATE буфері, сондай-ақ бос бақылау ретінде тестіленді.

Қалыпты пайдалану кезінде күтілетін концентрацияларда ықтимал интерференциялайтын заттардың ешқайсысы theascreen KRAS RGQ PCR жинағының мутацияға оң және мутацияға теріс үлгілерін ажырату қабілетіне әсер етпейді.

Интерференциялайтын заттарды зерттеуге қосымша, ісік үлгілеріндегі некротикалық тіннің жоғары деңгейі сенімді деректерді алу қабілетіне әсер ететінін анықтау үшін клиникалық үлгілердегі некроздың ықтимал әсері бағаланды. Эталондық аналитикалық әдіспен салыстыру әдісі бойынша зерттеулер шеңберінде бағаланған 421 үлгінің жалпы санының 29 үлгі патологоанатомиялық зерттеумен анықталғандай, >50% деңгейінде некроз болды. Осы 29 үлгінің 28-і екі бағытты Сэнгер секвенирлеуге сәйкес келетін сенімді нәтижелер берді. ДНҚ жеткіліксіз саны болғандықтан бір нәтиже жарамсыз болды.

Айқаспалы ластану

Бұл зерттеудің мақсаты theascreen KRAS RGQ PCR жинағын пайдалана отырып, ДНҚ үлгілері арасындағы айқаспалы ластану дәрежесін анықтау болды, бұл жалған оң нәтижелерге әкелуі мүмкін. Айқаспалы ластанудың ықтимал көздеріне мыналар жатады:

- Сынамаларды шығарып алу (мысалы, заттық шынылардан қырынды)
- Үлгілерді пипеткалау
- Үлгілерге арналған пробиркаларды жабу
- Пайдалану кезінде реагенттердің ластануы
- Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабына талдау үшін пробиркаларды жүктеу.

Бұл зерттеу үшін келесі FFPE стандарттары қолданылды: жабайы типті стандарт және 12ALA стандарты (өйткені 12ALA реакциясы жинақтағы ең аз LOD бар реакция болып табылады).

Зерттеу Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабының ішінде де, өткізулері арасында да ластану мүмкіндігін зерделеуге арналған 10 ПТР өткізуінен тұрды. Бұл тесттік өткізулерде жабайы типті ДНҚ бар пробиркалар мутантты ДНҚ-ның ластануын тестілеу үшін пайдаланылды.

Зерттеу нәтижелері айқаспалы контаминацияны анықтауға арналған жабайы типті ДНҚ экстрактілерінің әрқайсысында анықталатын контаминацияның жоқтығын көрсетті.

Эксклюзивтілігі/айқаспалы реактивтілігі

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы 8 бөлек реакциядан тұрады, соның ішінде KRAS генінің полиморфты емес аймағын анықтайтын бір бақылау реакциясы және мутацияларға тән 7 реакция. Кодон 12 немесе 13-тегі жабайы типті KRAS тізбегін арнайы өлшейтін реакция жоқ. Мутацияны анықтаусыз KRAS нәтижесі (яғни жабайы типі) мутацияға оң нәтиже беретін 7 мутацияның ешқайсысының болмауымен анықталады.

Сондықтан жалған оң нәтижелердің болмауына кепілдік ету үшін, жабайы типті KRAS ДНҚ-ның артық мөлшерімен әрбір реакцияда пайда болатын спецификалық емес амплификация немесе айқаспалы реактивтілік мөлшерін көрсету қажет. Сол сияқты, спецификалық емес

амплификация талдау арқылы анықтауға арналмаған KRAS мутациялары үшін бағаланады. Бұл мутация реакциялары арасындағы айқаспалы реактивтілік дәрежесі мутантты ДНҚ-ның артық мөлшері болған кезде мутациялардың қате анықталуына әкелмейтінін көрсетеді. Бұл талдауға ДНҚ енгізу C_T (21,92–32,00) бақылау диапазонына негізделгендіктен, енгізілген ДНҚ-ның ең жоғары концентрациясы шамамен 22-ге тең C_T бақылау мәніне негізделген.

Спецификалық емес амплификация/айқаспалы реактивтілік: жабайы типті KRAS ДНҚ

Нақты мутацияларды амплификациялауға арналған реакциялық қоспалар арқылы жабайы типті ДНҚ-ның спецификалық емес амплификация көлемі қарастырылды. Жабайы типті FFPE жасушалық сызығының жалпы 60 ДНҚ қайталанусы және 60 ҰЕӨӨ үлгілері Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын пайдаланып, амплификацияланатын ДНҚ-ның ең жоғары концентрациясы кезінде бағаланды.

C_T бақылау мәндері шамамен 22-23 болды. Нәтижелер көрсеткендей, ΔC_T мәндері белгіленген шекті мәндерден асып түсті және жабайы типті репликалардың кемінде 95%-ы дұрыс анықталды.

Спецификалық емес амплификация/айқаспалы реактивтілігі/эксклюзивтілігі: KRAS ДНҚ мутациясына оң

Кіріс ДНҚ концентрациясы жоғары мутациялар үлгілері барлық реакциялық қоспаларға қарсы тестіленді. ДНҚ үлгілері КРО және ҰЕӨӨ FFPE жасушалық сызықтарының әрқайсысынан дайындалды, сондықтан C_T бақылау реакциясы шамамен 23-ке сәйкес келеді. Осы сұйылтулардың ішінен әрбір мутация үлгісінің 6 қайталанусы бағаланды. Үлгідегі мутация пайызы жасушалық сызығында ДНҚ-дағы мутация пайызымен реттелді.

20-кестеде және 21-кестеде келтірілген орташа C_T мәндері реакциялар арасындағы айқаспалы реактивтіліктің болуын көрсетеді. Барлық жағдайларда нәтижелер сәйкес мутация реакциясымен дұрыс мутация анықталғанын көрсетеді (яғни, ең кіші ΔC_T мәні дұрыс анықталған мутация болды).

Барлық қалған мутациялар анықталмады немесе ΔC_T шегінен тыс болды.

20-кесте. KPO FFPE жасушалық сызығының ДНҚ-сын қолданып, мутация реакциялары арасындағы айқаспалы реактивтілік (ΔC_T), кіріс сигналының жоғары мәндері диапазонында

Мутиро жуынатын бөлме		ΔC_T талдау						
		Шекті	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL 13ASP
ДНҚ мәні								
12ALA	8	1.42*	12.66	NA	5.81 [†]	2.78 [†]	6.31 [†]	13.21
12ASP	6.6	12.56	2.42*	NA	NA	13.44	11.21	13.55
12ARG	8	13.12	11.56	1.12*	11.42	NA	13.43	12.66
12CYS	8	14.2	12.48	9.23	0.98*	NA	7.96 [†]	12.88
12SER	8	NA	13.39	13.31	NA	3.02*	12.99	13.97
12VAL	7.5	6.83 [†]	NA	NA	NA	13.38	0.28*	13.74
13ASP	7.5	NA	13.29	13.89	NA	NA	14.36	4.5*

NA: айқаспалы реакция жоқ.
 * Тиісті реакциялар үшін ΔC_T мәндері.
[†] ΔC_T шекті мәннен төмен айқаспалы реактивті реакциялардан.

21-кесте. Жоғары кіріс диапазонында ҰЕӨО FFPE жасушалық сызығының ДНҚ-сын қолданатын мутация реакциялары арасындағы айқаспалы реактивтілік (ΔC_T)

Мутацияланған Шекті ДНҚ мәні		ΔC _T талдау						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1.31*	12.8	NA	5.01†	2.26†	5.57†	12.65
12ASP	6.6	12.61	1.66*	NA	NA	NA	10.3	12.60
12ARG	8	12.98	11.08	0.81*	11.24	NA	12.66	12.62
12CYS	8	NA	12.22	7.84†	0.56*	NA	13.06	11.84
12SER	8	NA	12.87	13.21	NA	1.93*	13.25	12.93
12VAL	7.5	5.93†	14.29	NA	NA	13.14	0.45*	12.39
13ASP	7.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.02*

NA: айқаспалы реакция жоқ.

* Тиісті реакциялар үшін ΔC_T мәндері.

† ΔC_T шекті мәннен төмен айқаспалы реактивті реакциялардан.

Қайталану және қайта жаңартылу

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының дәлдігі CLSIEP12-A и EP5-A2 (21, 22) аспектілерін қамтитын хаттаманы қолдану арқылы анықталды. Бағалау үшін КРО клиникалық үлгілері қолданылды. Жабайы типті бір үлгі және әрбір мутация үшін бір үлгі therascreen KRAS RGQ PCR жинағының көмегімен тестіленді, онда therascreen KRAS RGQ PCR жинақтарының 3 партиясында барлық үлгілер мен бақылауларды тестілейтін, күн сайын 5 күн бойы, күніне 2 өткізуден және әр өткізуде әр үлгінің 2 қайталанусынан, 3 орталықтың әрқайсысында 2 оператор бар. Әр үлгідегі әрбір реакция үшін алынған C_T және ΔC_T мәндері сондай-ақ дисперсия компоненттерін талдау арқылы талданды.

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының қайта жаңартылуы мутацияның төмен деңгейімен үлгілер 3xLOD) және жабайы типті үлгілер үшін көрсетілді, онда зертханалық эксперименттер шеңберінде де, олардың арасында да бірнеше партиялардағы, платформалардағы және операторлардағы барлық талдамалар үшін мутациялардың кемінде 39/40 дұрыс жауаптары бар. C50 және 3xLOD үлгілерін қолдана отырып, көрсетілген дисперсияның бағалары (1x стандартты ауытқу) 23-кестеде және 24-кестеде келтірілген.

22-кесте. Талдау нәтижелерінің дисперсиясын бағалау

Талдау	ΔC _T үшін %CV		C _T мутация мәні үшін %CV		C _T бақылау үлгісі үшін %CV		WT
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	
12ALA	13.14	8.32	1.87	2.02	0.97	1.12	1.12
12ARG	10.79	8.04	1.59	1.96	1.24	1.51	1.15
12ASP	12.86	5.87	1.11	1.00	0.90	0.90	1.04
12CYS	17.61	10.83	1.86	2.02	1.54	1.22	1.15
12SER	13.97	10.43	1.71	2.11	0.94	1.19	1.15
12VAL	9.66	15.47	1.52	1.65	1.11	3.74	1.26
13ASP	13.73	9.35	1.91	2.08	1.11	1.41	1.19

23-кесте. Қайталану дәлдігін бағалау

Талдау	ΔC _T үшін %CV		C _T мутация мәні үшін %CV		C _T бақылау үлгісі үшін %CV		WT
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	
12ALA	10.71	7.51	1.69	1.76	0.77	0.90	0.79
12ARG	9.83	8.04	1.21	1.76	0.84	1.33	0.90
12ASP	10.16	4.08	0.93	0.89	0.80	0.76	0.76
12CYS	13.15	8.80	1.31	1.76	1.40	1.01	0.76
12SER	6.76	6.18	1.10	1.48	0.80	0.90	0.90
12VAL	9.21	15.32	1.40	1.42	0.91	3.49	0.94
13ASP	8.67	7.01	1.30	1.65	0.91	1.19	0.97

Мутация үлгілері мен жабайы типті үлгілерді тестілеуге арналған 3xLOD үлгілерінің болжамды үлесі барлық учаскелер бойынша және әрбір учаске бойынша жеке ұсынылды. Барлық талдаулар мен үлгі біріктірімдері үшін 80 қайталануың кемінде 79-ы мутацияны анықтаудың дұрыс нәтижесін берді. Мутацияны дұрыс анықтаудың жалпы үлесі 99,6% (1115/1120) құрайды; 99,6% (558/560) оң мутациясы бар үлгілер үшін (3xLOD) және 99,5% (557/560) анықталған мутациялары жоқ үлгілер үшін (жабайы тип) (25-кесте).

24-кесте. Жалпы дұрыс анықталған нәтижелер

Мутация	Дұрыс анықталған нәтижелер	
	Үлгілер 3xLOD	Жабайы типті үлгілер (төмен)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

ҰЕӨӨ

Зертханалық жағдайда theascreen KRAS RGQ PCR жинағының дәлдігі (қайталану) бағаланды. Мутация нәтижелерінің дұрыстығы және ΔC_T мәндерінің дәлдігі туралы хабарланады (мутацияға реакция мен бақылау реакциясы арасындағы C_T мәндерінің айырмашылығы).

Барлығы 15 панель дайындалды; KRAS жинағымен анықталған 7 мутацияның әрқайсысы үшін біреуден (LOD және 2xLOD кезінде) және жабайы типті үлгі үшін бір панель (WT). Мутация үлгілері бар панельдер қол жетімділігіне қарай FFPE жасушалық сызығымен немесе клиникалық үлгімен ұсынылды. Барлық үлгілер 27-ге тең C_T бақылау мәніне дейін қалыпқа келтірілді, ал мутация үлгілері 1xLOD және 2xLOD мутациялардың деңгейлері бар үлгілер үшін жеткілікті материал алу үшін жабайы типті ДНҚ-да сұйылтылды.

Дұрыс анықтау нәтижелерінің үлесі әрбір тестіленген панель үшін 26-кестеде, ал дәлдіктің сандық мәндері 27-кестеде көрсетілген.

25-кесте. Мутацияны анықтаудың дұрыс нәтижелерінің үлесі

Топтық айнымалылар		Пропорция	Екі жақты 95% сенімділік аралығы		
Үлгі деңгейі	Талдау	үлесі	Пайыздық мәні төменгі жоғарғы		
2xLOD	12ALA	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12ARG*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12ASP	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12CYS	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12SER*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12VAL	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	13ASP*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
LOD	12ALA	39/40	97.50%	86.84%	99.94%
	12ARG	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12ASP	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12CYS	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12SER*	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12VAL	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	13ASP*	38/40	95.00%	83.08%	99.39%
WT	All	28/28	100.00%	87.66%	100.00%

* Үлгілер FFPE жасушалық сызығымен ұсынылған

26-кесте. Өрнектегі дисперсия компоненттері SD және %CV - қайталану

Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Күндер арасында	Өткізу арасында	RGQ аппараттары арасында	Жинақтар партиялары арасында	Операторлар арасында	Қалдық*	Барлығы
Delta C _T	2xLOD	12ALA	28	5.54	(0.0000, 0.00%)	(0.1221, 2.20%)	(0.0443, 0.80%)	(0.0385, 0.70%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1335, 2.41%)	(0.1843, 3.33%)
		12ARG	28	4.80	(0.0000, 0.00%)	(0.1891, 3.94%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3244, 6.76%)	(0.3737, 7.79%)
		12ASP	28	4.72	(0.0860, 1.82%)	(0.1446, 3.06%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1463, 3.10%)	(0.1374, 2.91%)	(0.1751, 3.71%)	(0.2797, 5.93%)
		12CYS	28	5.66	(0.0563, 0.99%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0995, 1.76%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0390, 0.69%)	(0.2306, 4.08%)	(0.2498, 4.41%)
		12SER	28	5.36	(0.1429, 2.67%)	(0.0274, 0.51%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0647, 1.21%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1753, 3.27%)	(0.2129, 3.97%)
		12VAL	28	4.26	(0.0000, 0.00%)	(0.1016, 2.39%)	(0.0593, 1.39%)	(0.1128, 2.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2095, 4.92%)	(0.2457, 5.77%)
		13ASP	28	5.23	(0.0000, 0.00%)	(0.2892, 5.53%)	(0.0157, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2171, 4.15%)	(0.3575, 6.83%)
	LOD	12ALA	40	6.36	(0.0000, 0.00%)	(0.1584, 2.49%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2346, 3.69%)	(0.2819, 4.43%)
		12ARG	40	5.45	(0.0036, 0.07%)	(0.1639, 3.01%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 1.46%)	(0.1674, 3.07%)	(0.2397, 4.40%)
		12ASP	40	4.73	(0.0000, 0.00%)	(0.2485, 5.25%)	(0.1087, 2.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0816, 1.72%)	(0.1041, 2.20%)	(0.2837, 6.00%)
		12CYS	40	6.62	(0.1688, 2.55%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2056, 3.11%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2909, 4.40%)	(0.3652, 5.52%)
		12SER	40	6.37	(0.1006, 1.58%)	(0.3153, 4.95%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0340, 0.53%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2253, 3.54%)	(0.3854, 6.05%)
		12VAL	40	5.13	(0.2874, 5.60%)	(0.0976, 1.90%)	(0.0227, 0.44%)	(0.0874, 1.71%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1629, 3.18%)	(0.2965, 5.78%)
		13ASP	38	6.26	(0.3433, 5.48%)	(0.1227, 1.96%)	(0.0778, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3459, 5.52%)	(0.4738, 7.57%)

* SD, %CV Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

26-кесте. SD және %CV өрнегіндегі дисперсия компоненттері – қайталану (жалғасы)

Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Күндер арасында	Өткізу арасында	RGQ аппараттары арасында	Жиықтар партиялары арасында	Операторлар арасында	Қалдық*	Барлығы
Жасыл С Т	2xLOD	12ALA	28	32.09	(0.0000, 0.00%)	(0.1314, 0.41%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0675, 0.21%)	(0.1073, 0.33%)	(0.1158, 0.36%)	(0.1957, 0.61%)
		12ARG	28	31.50	(0.0000, 0.00%)	(0.2598, 0.82%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3324, 1.06%)	(0.4189, 1.33%)
		12ASP	28	31.30	(0.0000, 0.00%)	(0.1891, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0920, 0.29%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1800, 0.58%)	(0.2667, 0.85%)
		12CYS	28	32.07	(0.0000, 0.00%)	(0.2523, 0.79%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1606, 0.50%)	(0.2011, 0.63%)	(0.1512, 0.47%)	(0.3388, 1.06%)
		12SER	28	32.06	(0.0000, 0.00%)	(0.2049, 0.64%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1250, 0.39%)	(0.1177, 0.37%)	(0.1263, 0.39%)	(0.2648, 0.83%)
		12VAL	28	30.65	(0.0000, 0.00%)	(0.1772, 0.58%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1198, 0.39%)	(0.1063, 0.35%)	(0.1656, 0.54%)	(0.2639, 0.86%)
		13ASP	28	31.98	(0.0000, 0.00%)	(0.3773, 1.18%)	(0.0497, 0.16%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1813, 0.57%)	(0.4138, 1.29%)
	LOD	12ALA	40	32.86	(0.0000, 0.00%)	(0.2332, 0.71%)	(0.0516, 0.16%)	(0.0840, 0.26%)	(0.1319, 0.40%)	(0.1780, 0.54%)	(0.3144, 0.96%)
		12ARG	40	31.90	(0.0000, 0.00%)	(0.2186, 0.69%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2289, 0.72%)	(0.1519, 0.48%)	(0.3106, 0.97%)
		12ASP	40	31.02	(0.0000, 0.00%)	(0.1762, 0.57%)	(0.1093, 0.35%)	(0.1296, 0.42%)	(0.2492, 0.80%)	(0.1005, 0.32%)	(0.2908, 0.94%)
		12CYS	40	33.14	(0.1216, 0.37%)	(0.0493, 0.15%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3468, 1.05%)	(0.0501, 0.15%)	(0.3155, 0.95%)	(0.4216, 1.27%)
		12SER	40	33.08	(0.0832, 25%)	(0.2591, 0.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2424, .73%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2258, 0.68%)	(0.3864, 1.17%)
		12VAL	40	31.62	(0.2858, 0.90%)	(0.0951, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2244, 0.71%)	(0.0344, 0.11%)	(0.1763, 0.56%)	(0.3432, 1.09%)
		13ASP	38	33.09	(0.3237, 0.98%)	(0.1009, 0.31%)	(0.1409, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2785, 0.84%)	0.4133,

* SD, %CV

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

26-кесте. SD және %CV өрнегіндегі дисперсия компоненттері – қайталану (жалғасы)

Талдау айнмалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Күндер арасында	Өткізу арасында	RGQ аппараттары арасында	Жинақтар партиялары арасында	Операторлар арасында	Қалдық*	Барлығы
Сары C _T	2xLOD	12ALA	28	33.20	(0.0000, 0.00%)	(0.0515, 0.16%)	(0.0330, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0607, 0.18%)	(0.2117, 0.64%)	(0.2235, 0.67%)
		12ARG	28	33.05	(0.1397, 0.42%)	(0.1321, 0.40%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2393, 0.72%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3792, 1.15%)	(0.4559, 1.38%)
		12ASP	28	33.00	(0.0597, 0.18%)	(0.2131, 0.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1313, 0.40%)	(0.1954, 0.59%)	(0.3059, 0.93%)
		12CYS	28	33.19	(0.0646, 0.19%)	(0.0971, 0.29%)	(0.0233, 0.07%)	(0.0679, 0.20%)	(0.0863, 0.26%)	(0.1943, 0.59%)	(0.2378, 0.72%)
		12SER	28	32.85	(0.0525, 0.16%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0337, 0.10%)	(0.0937, 0.29%)	(0.1320, 0.40%)	(0.1588, 0.48%)
		12VAL	28	33.11	(0.0000, 0.00%)	(0.1026, 0.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1469, 0.44%)	(0.1469, 0.44%)	(0.2912, 0.88%)	(0.3458, 1.04%)
		13ASP	28	33.03	(0.0000, 0.00%)	(0.1928, 0.58%)	(0.1015, 0.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1450, 0.44%)	(0.2493, 0.75%)
	LOD	12ALA	40	33.37	(0.0000, 0.00%)	(0.2010, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1942, 0.58%)	(0.2177, 0.65%)	(0.3257, 0.98%)
		12ARG	40	33.14	(0.0000, 0.00%)	(0.2168, 0.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3061, 0.92%)	(0.1637, 0.49%)	(0.1748, 0.53%)	(0.3717, 1.12%)
		12ASP	40	32.98	(0.0000, 0.00%)	(0.2599, 0.79%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1735, 0.53%)	(0.2228, 0.68%)	(0.3618, 1.10%)
		12CYS	40	33.31	(0.0000, 0.00%)	(0.2028, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1209, 0.36%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2132, 0.64%)	(0.3050, 0.92%)
		12SER	40	33.08	(0.1254, 0.38%)	(0.2847, 0.86%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1505, 0.46%)	(0.3263, 0.99%)
		12VAL	40	33.29	(0.3133, 0.94%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2621, 0.79%)	(0.3574, 1.07%)
		13ASP	40	33.13	(0.1101, 0.33%)	(0.1326, 0.40%)	(0.1666, 0.50%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1925, 0.58%)	(0.2804, 0.85%)

* SD, %CV

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестенің жалғасы келесі бетте

26-кесте. SD және %CV өрнегіндегі дисперсия компоненттері – қайталану (жалғасы)

Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Күндер арасында	Өткізу арасында	RGQ аппараттары арасында	Жинақтар партиялары арасында	Операторлар арасында	Қалдық*	Барлығы
Сары C _T	WT	12ALA	28	33.41	(0.1443, 0.43%)	(0.1997, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2269, 0.68%)	(0.3248, 0.97%)
		12ARG	28	33.30	(0.0875, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.4098, 1.23%)	(0.0904, 0.27%)	(0.2368, 0.71%)	(0.3983, 1.20%)
		12ASP	28	33.12	(0.1591, 0.48%)	(0.1748, 0.53%)	(0.0477, 0.14%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2131, 0.64%)	(0.3075, 0.93%)
		12CYS	28	33.42	(0.0000, 0.00%)	(0.2009, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1444, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2121, 0.63%)	(0.3077, 0.92%)
		12SER	28	33.22	(0.2485, 0.75%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0633, 0.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1497, 0.45%)	(0.2517, 0.76%)
		12VAL	28	33.35	(0.0000, 0.00%)	(0.2591, 0.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1429, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2721, 0.82%)	(0.3863, 1.16%)
		13ASP	28	33.45	(0.0000, 0.00%)	(0.1194, 0.36%)	(0.0526, 0.16%)	(0.0341, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1651, 0.49%)	(0.2078, 0.62%)

* SD, %CV

Зертханалар арасындағы Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының дәлдігі (қайта жаңартылуы) бағаланды. Үш түрлі зертхана (тест жүргізу алаңдары) пайдаланылды. Бұл зерттеу үшін қайталануды зерттеудегідей сол бір тестіленетін панель пайдаланылды. Әр алаңда зертханалық жағдайлар RGQ аспабына, операторға, KRAS жинағының партиясына және 22 күн қатарынан бір алаңға барлығы 88 өткізу алу үшін тәулігіне өткізу санына байланысты өзгерді.

Мутациялардың дұрыс жауаптарының үлесі 28-кестеде келтірілген. Дәлдіктің сандық мәндері 29-кестеде келтірілген. KRAS жинағының жалпы қайталануы 29-кестенің #Барлығы (SD, CV%) бағанында көрсетілген.

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

29-кесте. SD және %CV қайта жаңартылуы тұрғысынан дисперсия компоненттері (жалғасы)

27-кесте. Барлық алаңдардағы мутацияларды дұрыс анықтау үлесі

Топтық айнымалылар		Пропорционалды		Екі жақты 95% сенімділік аралығы	
Үлгі деңгейі	Талдау	фракция	Пайыз	Төменгі	Жоғарғы
2xLOD	12ALA	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12ARG*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12ASP	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12CYS	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12SER*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12VAL	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	13ASP*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
LOD	12ALA	118/120	98.33%	94.11%	99.80%
	12ARG	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12ASP	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12CYS	119/120	99.17%	95.44%	99.98%
	12SER*	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12VAL	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	13ASP*	118/120	98.33%	94.11%	99.80%
WT	All	82/84	97.62%	91.66%	99.71%

* FFPE жасушалық сызығымен ұсынылған

28-кесте. SD және %CV - қайта жаңартылуы өрнегіндегі дисперсия компоненттер

Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Уәкшелер арасында*	Уәске шегіндегі күндер арасында*	Уәске шегінде өткізу саны арасында*	RQD аспаптарының арасында уәске шегінде *	Жинақтар партиялары арасында уәске шегінде*	Операторлар арасында уәске шегінде*	Қалдық*	Барлығы
Дельта C т	2xLOD	12ALA	84	5.48	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1669, 3.05%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1287, 2.35%)	(0.1679, 3.07%)	(0.2640, 4.82%)
		12ARG	84	4.81	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1172, 2.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2729, 5.67%)	(0.2967, 6.16%)
		12ASP	84	4.57	(0.0000, 0.00%)	(0.0943, 2.06%)	(0.1457, 3.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0600, 1.31%)	(0.1718, 3.76%)	(0.1565, 3.43%)	(0.2854, 6.25%)
		12CYS	84	5.61	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2060, 3.67%)	(0.0264, 0.47%)	(0.0698, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1671, 2.98%)	(0.2728, 4.87%)
		12SER	84	5.34	(0.0000, 0.00%)	(0.1362, 2.55%)	(0.1669, 3.13%)	(0.1527, 2.86%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2020, 3.79%)	(0.2382, 4.46%)	(0.3902, 7.31%)
		12VAL	84	4.13	(0.0874, 2.11%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1677, 4.06%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0869, 2.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2711, 6.56%)	(0.3359, 8.12%)
		13ASP	84	5.22	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2161, 4.14%)	(0.2712, 5.20%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1930, 3.70%)	(0.2275, 4.36%)	(0.4279, 8.20%)
		12ALA	119	6.33	(0.0000, 0.00%)	(0.0410, 0.65%)	(0.1207, 1.91%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0247, 0.39%)	(0.2640, 4.17%)	(0.2936, 4.64%)
	LOD	12ARG	120	5.42	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1797, 3.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1872, 3.45%)	(0.2590, 4.78%)
		12ASP	120	4.66	(0.1183, 2.54%)	(0.0646, 1.38%)	(0.2121, 4.55%)	(0.0261, 0.56%)	(0.0217, 0.46%)	(0.0440, 0.94%)	(0.1455, 3.12%)	(0.2862, 6.14%)
		12CYS	120	6.54	(0.0000, 0.00%)	(0.0132, 0.20%)	(0.1775, 2.72%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1621, 2.48%)	(0.1708, 2.61%)	(0.4202, 6.43%)	(0.4981, 7.62%)
		12SER	120	6.28	(0.0000, 0.00%)	(0.0824, 1.31%)	(0.2271, 3.62%)	(0.0775, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2383, 3.80%)	(0.3164, 5.04%)	(0.4570, 7.28%)
		12VAL	120	5.05	(0.0315, 0.62%)	(0.1648, 3.26%)	(0.0955, 1.89%)	(0.0703, 1.39%)	(0.0320, 0.63%)	(0.0795, 1.57%)	(0.2120, 4.20%)	(0.2965, 5.87%)
		13ASP	118	6.17	(0.0000, 0.00%)	(0.1673, 2.71%)	(0.1987, 3.22%)	(0.2332, 3.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0843, 1.37%)	(0.3075, 4.99%)	(0.4488, 7.28%)

** SD, %CV

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

28-кесте. SD және %CV - қайта жаңартылуы өрнегіндегі дисперсия компоненттер

	Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Уәскелер арасында*	Уәске шегіндегі күндер арасында*	Уәске шегінде өткізу саны арасында *	RGQ аспаптарының арасында уәске шегінде *	Жинақтар партиялары арасында уәске шегінде*	Операторлар арасында уәске шегінде*	Қалдық*	Барлығы
Жасыл С-г	2xLOD	12ALA	84	32.13	(0.1578, 0.49%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2509, 0.78%)	(0.0745, 0.23%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1249, 0.39%)	(0.1362, 0.42%)	(0.3390, 1.06%)	
		12ARG	84	31.61	(0.0882, 0.28%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2430, 0.77%)	(0.1339, 0.42%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2604, 0.82%)	(0.3828, 1.21%)	
		12ASP	84	31.24	(0.1655, 0.53%)	(0.0391, 0.13%)	(0.2178, 0.70%)	(0.0600, 0.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2052, 0.66%)	(0.1426, 0.46%)	(0.3542, 1.13%)	
		12CYS	84	32.15	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2836, 0.88%)	(0.0852, 0.26%)	(0.0940, 0.29%)	(0.1658, 0.52%)	(0.1318, 0.41%)	(0.3636, 1.13%)	
		12SER	84	32.14	(0.1457, 0.45%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2659, 0.83%)	(0.1807, 0.56%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2715, 0.84%)	(0.1783, 0.55%)	(0.4554, 1.42%)	
		12VAL	84	30.69	(0.0646, 0.21%)	(0.0480, 0.16%)	(0.2124, 0.69%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1031, 0.34%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2000, 0.65%)	(0.3143, 1.02%)	
		13ASP	84	32.12	(0.2111, 0.66%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3218, 1.00%)	(0.2966, 0.92%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1743, 0.54%)	(0.1980, 0.62%)	(0.5184, 1.61%)	
	LOD	12ALA	119	32.93	(0.0000, 0.00%)	(0.1524, 0.46%)	(0.1821, 0.55%)	(0.1048, 0.32%)	(0.0757, 0.23%)	(0.1007, 0.31%)	(0.2526, 0.77%)	(0.3721, 1.13%)	
		12ARG	120	31.98	(0.0000, 0.00%)	(0.0743, 0.23%)	(0.1936, 0.61%)	(0.1262, 0.39%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1332, 0.42%)	(0.1619, 0.51%)	(0.3096, 0.97%)	
		12ASP	120	31.06	(0.1880, 0.61%)	(0.1184, 0.38%)	(0.1681, 0.54%)	(0.1033, 0.33%)	(0.1171, 0.38%)	(0.1481, 0.48%)	(0.1333, 0.43%)	(0.3511, 1.13%)	
		12CYS	120	33.19	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2513, 0.76%)	(0.0776, 0.23%)	(0.2128, 0.64%)	(0.1427, 0.43%)	(0.2712, 0.82%)	(0.4401, 1.33%)	
		12SER	120	33.13	(0.2194, 0.66%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2433, 0.73%)	(0.1263, 0.38%)	(0.1470, 0.44%)	(0.1973, 0.60%)	(0.2052, 0.62%)	(0.4437, 1.34%)	
		12VAL	120	31.65	(0.0000, 0.00%)	(0.1254, 0.40%)	(0.1645, 0.52%)	(0.1307, 0.41%)	(0.1271, 0.40%)	(0.0976, 0.31%)	(0.1792, 0.57%)	(0.3159, 1.00%)	
		13ASP	118	33.08	(0.0000, 0.00%)	(0.1789, 0.54%)	(0.1661, 0.50%)	(0.3569, 1.08%)	(0.0649, 0.20%)	(0.1565, 0.47%)	(0.2588, 0.78%)	(0.4894, 1.48%)	

** SD, %CV

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

28-кесте. SD және %CV - қайта жаңартылуы өрнегіндегі дисперсия компоненттер

Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Учаскелер арасында*	Учаске шегіндегі күндер арасында*	Учаске шегінде өткізу саны арасында *	RQD аспаптарының арасында учаске шегінде *	Жинақтар партиялары арасында учаске шегінде*	Операторлар арасында учаске шегінде*	Қалдық*	Барлығы
Сары С т _	2xLOD	12ALA	84	33.25	(0.0706, 0.21%)	(0.0399, 0.12%)	(0.1314, 0.40%)	(0.1303, 0.39%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1124, 0.34%)	(0.1913, 0.58%)	(0.2883, 0.87%)
		12ARG	84	33.07	(0.0000, 0.00%)	(0.1406, 0.43%)	(0.1353, 0.41%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2024, 0.61%)	(0.1262, 0.38%)	(0.2831, 0.86%)	(0.4016, 1.21%)
		12ASP	84	32.98	(0.0000, 0.00%)	(0.0480, 0.15%)	(0.1706, 0.52%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 0.24%)	(0.1795, 0.54%)	(0.2616, 0.79%)
		12CYS	84	33.20	(0.0000, 0.00%)	(0.0976, 0.29%)	(0.1781, 0.54%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1454, 0.44%)	(0.1723, 0.52%)	(0.2939, 0.89%)
		12SER	84	32.91	(0.0000, 0.00%)	(0.1101, 0.33%)	(0.0549, 0.17%)	(0.0669, 0.20%)	(0.0677, 0.21%)	(0.1186, 0.36%)	(0.2274, 0.69%)	(0.2916, 0.89%)
		12VAL	84	33.17	(0.0688, 0.21%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1896, 0.57%)	(0.0937, 0.28%)	(0.1140, 0.34%)	(0.1311, 0.40%)	(0.2605, 0.79%)	(0.3768, 1.14%)
		13ASP	84	33.10	(0.0000, 0.00%)	(0.0482, 0.15%)	(0.2035, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0466, 0.14%)	(0.1460, 0.44%)	(0.1688, 0.51%)	(0.3019, 0.91%)
	LOD	12ALA	119	33.33	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2108, 0.63%)	(0.0820, 0.25%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1443, 0.43%)	(0.2253, 0.68%)	(0.3411, 1.02%)
		12ARG	120	33.15	(0.1092, 0.33%)	(0.0537, 0.16%)	(0.1605, 0.48%)	(0.0507, 0.15%)	(0.2157, 0.65%)	(0.1276, 0.39%)	(0.2180, 0.66%)	(0.3749, 1.13%)
		12ASP	120	32.96	(0.0000, 0.00%)	(0.0832, 0.25%)	(0.2022, 0.61%)	(0.0864, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1117, 0.34%)	(0.2223, 0.67%)	(0.3343, 1.01%)
		12CYS	120	33.26	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2232, 0.67%)	(0.1691, 0.51%)	(0.0789, 0.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2097, 0.63%)	(0.3516, 1.06%)
		12SER	120	33.01	(0.1573, 0.48%)	(0.0716, 0.22%)	(0.2134, 0.65%)	(0.0951, 0.29%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0784, 0.24%)	(0.1689, 0.51%)	(0.3263, 0.99%)
		12VAL	120	33.25	(0.1519, 0.46%)	(0.1960, 0.59%)	(0.1272, 0.38%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1298, 0.39%)	(0.0553, 0.17%)	(0.2162, 0.65%)	(0.3487, 1.05%)
		13ASP	118	33.16	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1768, 0.53%)	(0.0998, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1973, 0.59%)	(0.2802, 0.84%)

** SD, %CV

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

28-кесте. SD және %CV қайталану өрнегіндегі дисперсия компоненттері

Талдау айнымалысы	Үлгі деңгейі	Талдау	Бақылаулар саны	Орташа мәні	Учаскелер арасында*	Учаске шегіндегі күндер арасында*	Учаске шегінде өткізу саны арасында *	RGQ аспаптарының арасында учаске шегінде *	Жинақтар партиялары арасында учаске шегінде*	Операторлар арасында учаске шегінде*	Қалдық*	Барлығы
WT	12ALA	84	33.44	(0.1257, 0.38%)	(0.0961, 0.29%)	(0.1845, 0.55%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2083, 0.62%)	(0.3104, 0.93%)	
	12ARG	84	33.37	(0.1191, 0.36%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1869, 0.56%)	(0.1321, 0.40%)	(0.2529, 0.76%)	(0.1205, 0.36%)	(0.2132, 0.64%)	(0.4217, 1.26%)	
	12ASP	84	33.16	(0.0574, 0.17%)	(0.0738, 0.22%)	(0.2162, 0.65%)	(0.0563, 0.17%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1844, 0.56%)	(0.2997, 0.90%)	
	12CYS	84	33.42	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1964, 0.59%)	(0.0720, 0.22%)	(0.1311, 0.39%)	(0.0262, 0.08%)	(0.2258, 0.68%)	(0.3287, 0.98%)	
	12SER	84	33.20	(0.0812, 0.24%)	(0.1331, 0.40%)	(0.1734, 0.52%)	(0.0329, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2009, 0.61%)	(0.1923, 0.58%)	(0.3535, 1.06%)	
	12VAL	84	33.41	(0.0000, 0.00%)	(0.0695, 0.21%)	(0.2046, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1708, 0.51%)	(0.1437, 0.43%)	(0.2339, 0.70%)	(0.3799, 1.14%)	
	13ASP	84	33.46	(0.0000, 0.00%)	(0.0613, 0.18%)	(0.1802, 0.54%)	(0.0744, 0.22%)	(0.0073, 0.02%)	(0.0969, 0.29%)	(0.1790, 0.53%)	(0.2816, 0.84%)	

Үлгілерді өңдеудің өзгергіштігі

Бұл зерттеудің мақсаты үлгілерді өңдеудегі өзгергіштіктің, әсіресе ДНҚ экстракциясының, Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен әсерін бағалау болды. Бұл зерттеу FFPE клиникалық кесінділері мен FFPE жасушалық сызығының кесінділері 3 орталықта өңделіп, содан кейін Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының көмегімен тестіленген кезде үлгілерді өңдеудің өзгергіштігін талдау арқылы қайталану және қайта жаңартылу зерттеуін толықтырады.

KPO

FFPE KPO 10 үлгісінің әрқайсысынан 5 мкм қатарынан отыз кесінді кесілді (3 жабайы типі және мутацияға бір 1 бойынша). Кесінділер 3 сынақ учаскесінен 1-ден рандомизацияланды, осылайша әр учаске бір үлгіге 10 FFPE кесіндісін алады (барлығы 100 кесінді). Тестіленген 300

ДНҚ экстракциясының 298 үлгісі жарамды болды. 3 учаске арасындағы KRAS мутациясының анықтамасына қатысты 99,33% сәйкестік анықталды.

Мутантты және жабайы типті үлгілер үшін учаскелер бойынша DCT орташа мәндерін салыстыру нәтижелердің өте жақын сәйкестігін көрсетті. Нәтижелер Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен бірлесе ДНҚ шығарып алу және үлгілерді өңдеу процедурасының сәйкестігін көрсетеді.

ҰЕӨО

Бұл зерттеуде 13 клиникалық үлгі (3 x 12ASP, 3 x 12CYS, 4 x 12VAL және 3 жабайы типті) және 4 жасушалық сызығының үлгісі (12ALA, 12ARG, 12SER және 13ASP) пайдаланылды. Үлгілер алудың әртүрлі әдістерін ұсынды: хирургиялық резекция, ЖИА және НИБ. Жасушалық сызықтар ҰЕӨО тініне қол жетімді емес сирек мутацияларды көрсету үшін пайдаланылды.

Содан кейін 20 кесіндіден тұратын үш партия кездейсоқ түрде 3 учаскеге бөлінді. 3 учаскенің әрқайсысында ДНҚ экстракциясы әрбір мутация мен жабайы тип үшін 20 FFPE кесіндісінің (10 жүп) партияларында жүргізілді.

3 бөлек тестілеу учаскеде алынған барлық үлгілер Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен тестіленген кезде, 7 мутация мен жабайы типті үлгілердің әрқайсысы мутацияны дұрыс анықтау арқылы анықталды. 7 мутация мен жабайы типті үлгілердің әрқайсысының жалпы талдауы 100% құрады, бұл Therascreen KRAS RGQ PCR жинағын пайдалана отырып, ДНҚ шығарып алу және мутацияларды анықтау аймақтары арасындағы сәйкестікті көрсетеді.

12ALA, 12ARG, 12SER және 13ASP мутациялары үшін репрезентативті клиникалық үлгілерді пайдалана отырып, үлгілерді өңдеу бойынша қосымша зерттеулер жүргізілді, өйткені алдыңғы зерттеу осы мутациялар үшін репрезентативті жасушалық сызығының үлгілерін пайдаланды. Қосымша зерттеу алдыңғы зерттеумен бірдей сызба бойынша жүргізілді. Барлық үш бөлек сынақ алаңында шығарып алынған 112ALA, 12ARG және 13ASP мутациялар үлгілеріне арналған барлық сынамадайындаулар KRAS жинағымен тестіленген кезде мутацияны анықтаудың дұрыс нәтижесін берді. Осы үлгілер үшін таңдаудың жалпы дұрыстығы 100% құрады. 12 SER мутациясы үшін үлгілерді дайындау барлық үш бөлек сынақ алаңында 28/30 дұрыс мутацияны

анықтау жиілігін қамтамасыз етті (дұрыс анықтау пайызы 93,33%-ға тең). Нәтижелер Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен тестілеу үшін қолданылатын ДНҚ шығарып алу процедурасы мен үлгілерді өңдеудің жұмыс процесінің дәйектілігін көрсетеді.

Сынамаларды іріктеу әдістерінің эквиваленттілігі (тек ҰЕӨӨ)

Бұл зерттеудің мақсаты үлгілерді жинау әдісі Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен анықталған ҰЕӨӨ үлгілеріндегі мутациялардың болуына әсер еткенін бағалау болды. Бұл зерттеуде үлгілерді алудың 3 әдісі бағаланды: резекция, ЖИА және НИБ.

Осы зерттеу үшін "Пациентпен салыстырылатын" НИБ және ЖИА үлгілері хирургиялық жолмен алынған ісік үлгілерінен алынды, осылайша бір ісікті үш жинау әдісімен жинауға болады. Әрбір үлгі Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен шығарып алынды және тестіленді.

Әрбір үлгі KRAS бақылау талдауы арқылы шығарып алынды және тестіленді. Сенімді нәтиже беретін әрбір үлгі (169 резекция, 169 НИБ және 164 ЖИА) барлық KRAS 8 талдауымен тестіленді.

Бастапқы талдау өндірістің әртүрлі алу типтерінде анықталатын спецификалық мутацияға негізделген. Жалпы пайыздық сәйкестік көрсеткіштері, оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші және теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші әрбір жұптық салыстыру үшін дәл екі жақты 95% сенімділік шегімен бірге есептелді.

29-кесте. Үлгілерді алу әдістері арасындағы сәйкестік

Сравнение	Соответствие	Частота	Процентаж	Нижний двусторонний доверительный интервал	Верхний двусторонний 95% доверительный интервал
НИБ эталон ретінде ЖИА мен НИБ-мен салыстырғанда	Жалпы пайыздық сәйкестігі	148/156	94.87	90.15	97.76
	Оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	29/35	82.86	66.35	93.44
	Теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	119/121			
НИБ эталон ретінде НИБ резекциясымен салыстырғанда	Жалпы пайыздық сәйкестігі	153/161	95.03	90.44	97.83
	Оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	31/37	83.78	67.99	93.81
	Теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	122/124	98.39	94.30	99.80
ЖИА эталон ретінде НИБ мен ЖИА-ны салыстырғанда	Жалпы пайыздық сәйкестігі	148/156	94.87	90.15	97.76
	Оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	29/32	90.63	74.98	98.02
	Теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	119/124	95.97	90.84	98.68
ЖИА эталон ретінде ЖИА-мен Резекциямен салыстырғанда	Жалпы пайыздық сәйкестігі	152/156	97.44	93.57	99.30
	Оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	30/32	93.75	79.19	99.23
	Теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	122/124	98.39	94.30	99.80

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен
30-кесте. Үлгілерді алу әдістері арасындағы сәйкестік

Сравнение	Соответствие	Частота	Процентаж	Нижний двусторонний доверительный интервал	Верхний двусторонний 95% доверительный интервал
Эталон ретінде Резекциясымен НИБ- мен салыстырғанда Резекция	Жалпы пайыздық сәйкестігі	153/161	95.03	90.44	97.83
	Оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	31/34	91.18	76.32 98.14	
	Теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	122/127	96.06	91.05	98.71
Эталон ретінде резекциядан ЖИА-ға қарсы Резекция	Жалпы пайыздық сәйкестігі	152/156	97.44	93.57	99.30
	Оң нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	30/32	93.75	79.19	99.23
	Теріс нәтижелер бойынша пайыздық сәйкестік көрсеткіші	122/124	98.39	94.30	99.80

Сонымен қатар, үлгілерді жинаудың әртүрлі әдістері арасындағы C_T және ΔC_T мәндерін салыстыру үшін Пассинг-Баблок пен Деминг регрессиялық талдауы жүргізілді. Регрессиялық талдау C_T немесе ΔC_T тұрғысынан Резекция, НИБ және ЖИА үлгілерін алу типтері арасында тұрақты немесе пропорционалды айырмашылық бар екендігі туралы ешқандай дәлел жоқ екенін көрсетті. Некроздық және ісік тіндерінің пайыздық мөлшерінің сәйкес ΔC_T мәндеріне әсерін зерттеу үшін сызықтық регрессиялық талдау жүргізілді. ΔC_T -мен салыстырғанда некроздық және ісіктің пайыздық үлесі үшін регрессия сызығының көлбеуі некроздық немесе ісік тінінің пайыздық үлесі мәндерінің жоғарылауы кезінде ΔC_T мәндерінде қандай да бір айтарлықтай айырмашылықтың болуын болжауға мүмкіндік беретін ешқандай дәлел жоқ екенін көрсетеді.

Клиникалық көрсеткіштер

Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы KRAS генінің 12 және 13 кодондарындағы KRAS 7 мутациясын анықтау үшін арнайы әзірленген. Бұл кодондардағы жабайы типті тізбекті

спецификалық анықтауға арналмаған. Тест нәтижелері "Мутация [мутация атауы] анықталды" және "Мутация анықталмады" деп хабарланды. Төменде келтірілген клиникалық зерттеулерде ісік тіні Therascreen KRAS RGQ PCR (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D) жинағының көмегімен анықталған 7 мутацияның біреуі немесе бірнешеуі бойынша оң болған пациенттерде KRAS мутациясы бойынша оң нәтижелері алынды. KRAS мутациясы бойынша теріс типі (жабайы типі) Therascreen KRAS RGQ PCR жинағы анықтаған 7 мутация бойынша ісік тіні теріс болған пациенттерге жатады (яғни үлгіде Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен идентификацияланған KRAS геніндегі мутациялар болуы мүмкін).

Эрбитуксті (цетуксимабты) қолдануды растайтын клиникалық зерттеу

Эрбитукспен (цетуксимабпен) емдеу үшін пациенттерді таңдауға мүмкіндік беретін диагностикалық құрал ретінде Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының клиникалық пайдалылығын растайтын деректерді алу мақсатында тиімділікке клиникалық зерттеу жүргізілді. CA225025 зерттеуінде Эрбитукстің (цетуксимаба) қауіпсіздігі мен тиімділігі көрсетілді. CA225025 бұрын емделген қайталанатын метастаздық обыр (mKPP) бар экспрессивті EGFR бар 572 пациенттің қатысуымен жүргізілген көп орталықты ашық рандомизацияланған клиникалық сынақ болды. Пациенттер Эрбитукс (цетуксимаб) алу үшін ең жақсы демеуші терапиямен (BSC) немесе тек BSC алу үшін рандомизацияланған (1:1). Эрбитукс (цетуксимаб) бастапқы дозада 400 мг/м², содан кейін аурудың өршуіне немесе қолайсыз ұйтылыққа дейін апта сайын 250 мг/м² енгізілді.

Рандомизацияланған 572 пациенттің орташа жасы 63 жасты құрады; 64%-ы ер адамдар, 89%-ы кавказдықтар және 77% ы ECOG 0-1 тиімділігінің бастапқы күйіне ие болды. Демографиялық деректер мен бастапқы сипаттамалар әртүрлі зерттеу топтарында бірдей болды. Барлық пациенттер иринотекан-құрамында режимі және оксалиплатин-құрамында емдеу режимі бар алдыңғы терапияны алуы керек еді.

KRAS мутациясы күйі пациенттердің 453/572 (79%) қол жетімді болды: пациенттердің 245 -і. (54%) KRAS мутациясында теріс ісіктер болды және пациенттердің 208-4 (46%) KRAS жинағымен бағаланған кезде KRAS мутациясында оң ісіктер болды.

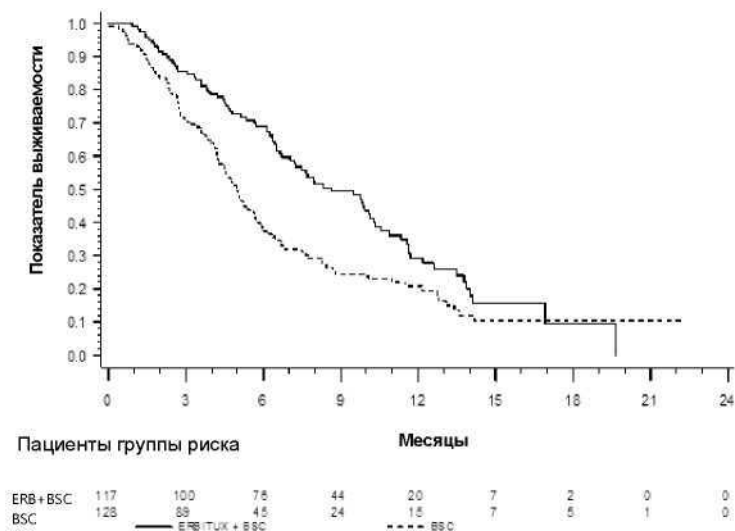
Зерттеудің негізгі қорытынды көрсеткіші жалпы өмір сүру (ЖӨС) деңгейі болды. Теріс KRAS (жабайы типті) мутациясы бар популяция үшін орташа өмір сүру деңгейі (95% СА) Эрбитукс (цетуксимаб)+BSC тобында 8,6 (7,0, 10,3) ай және BSC тобында 5,0 (4,3, 5,7) ай болды. Эрбитукс (цетуксимаб)+BCK қолдану кезіндегі ЖӨС қауіп арақатынасы BCK-мен салыстырғанда 0,63 құрады. 95% сенімділік аралығы (CA) (0,47, 0,84) құрады.

Оң KRAS мутациясы бар популяция үшін орташа өмір сүру ұзақтығы Эрбитукс (цетуксимаб)+BSC тобында 4,8 (3,9, 5,6) ай және BSC тобында 4,6 (3,6, 4,9) ай болды. Қауіптер қатынасы 95% CA(0,67, 1,24) кезінде 0,91 құрады. Нәтижелер 31-кестеде және 25-суретте көрсетілген.

30-кесте. Бұрын емделген метастаздық колоректальді обыр, экспрессиялайтын EGFR (барлық рандомизацияланған пациенттер және KRAS күйі) кезінде жалпы өмір сүру деңгейі

	Барлық рандомизацияланған пациенттер		Жабайы типі KRAS теріс мутация		KRAS оң мутация	
	Эрбитукс+BSC N=287	BSC N=285	Эрбитукс+BSC N=117	BSC N=128	Эрбитукс+BSC N=108	BSC N=100
Медиана (айлар) (95% СА)	6.1 (5.4, 6.7)	4.6 (4.2, 4.9)	8.6 (7.0, 10.3)	5.0 (4.3, 5.7)	4.8 (3.9, 5.6)	4.6 (3.6, 4.9)
Тәуекел коэффициенті (95% ci)	0.77 (0.64, 0.92)		0.63 (0.47, 0.84)		0.91 (0.67, 1.24)	
p-мәні*	0.0046		—		—	

* Стратификацияланған логарифмдік дәрежелік тестке негізделген.



23-сурет. KRAS (жабайы типі) мутациясы жоқ метастаздық колоректалды обыр бар пациенттердің жалпы өмір сүруіне арналған Каплан-Мейер қисығы.

Каплан-Мейердің 6 және 12 айдағы бағалауларына негізделген жалпы өмір сүру деңгейі эрбитукс (цетуксимаб) + BSC қабылдаған топта тек жабайы типті KRAS кіші тобы үшін BSC қабылдаған топқа қарағанда жоғары болды. Бұл артықшылық KRAS мутацияларының ішкі жиынында байқалмады.

Вектибикс (панитумумаб) препаратын қолдануды растайтын клиникалық зерттеу

Вектибикспен (панитумумаб) пациенттерді анықтауға көмектесетін диагностикалық құрал ретінде thetascreen KRAS RGQ PCR жинағының клиникалық пайдалылығын растайтын деректерді алу үшін тиімділікке клиникалық зерттеу жүргізілді. Зерттеудің мақсаты Therascreen KRAS RGQ PCR жинағымен анықталған KRAS мутация күйін Вектибикспен (панитумумаб) емдеуден пайда көретін ICDR бар пациенттерді таңдау үшін пайдалануға болатынын бағалау болды. 20050203 клиникалық зерттеу бұрын емделмеген, қайталанатын мКРО бар пациенттерде FOLFOX монотерапиясымен салыстырғанда оксалиплатинмен, 5-фторурацилмен (5-ФУ) және лейковоринмен (FOLFOX) біріктірілген панитумумабтың

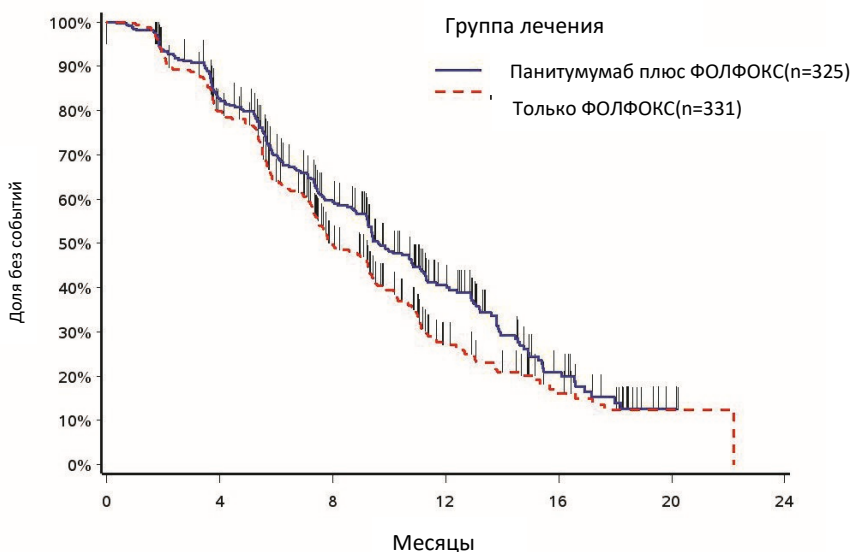
тиімділігін бағалау үшін көп орталықты, перспективалы, ашық, рандомизацияланған 3- фаза зерттеуі болды.

20050203 зерттеуіне қатысқан пациенттерден жиналған ісік үлгілері екі кіші топты идентификациялау үшін theascreeN KRAS RGQ PCR жинағының көмегімен тестіленді: KRAS геніндегі 2 экзон 12 және 13 кодондарындағы KRAS 7 мутациясының ішінен кемінде анықталған біреуі болуына немесе ешқайсысы болмауына байланысты, KRAS-мутация бойынша оң (мутантты KRAS) және KRAS-мутация бойынша теріс (жабайы типті KRAS). Ретроспективті талдау кезінде 20050203 зерттеуінен алынған тиімділік туралы деректер KRAS кіші топтары бойынша стратификацияланды. KRAS талдауының негізгі мақсаты Вектибикс (панитумумаб) плюс FOLFOX үшін жалпы PFS жақсаруы FOLFOX монотерапиясымен салыстырғанда, KRAS жабайы типті ісіктері бар субъектілер арасында KRAS мутациялары бар, ісіктері бар субъектілермен салыстырғанда айтарлықтай үлкен болғанын бағалау болды.

Тиімділіктің алдын ала анықталған бастапқы соңғы нүктесі жасырын тәуелсіз орталық суреттер арқылы бағаланған жабайы типті KRASmKPP бар пациенттер тобында (n = 656) өршімей, өмір сүру (PFS) болды. Тиімділіктің басқа негізгі соңғы нүктелерін ЖӨС және ORR қмтиды. Жабайы типті KRASmKPP бар пациенттердегі тиімділік нәтижелері 32-кестеде және 26-суретте көрсетілген.

31-кесте. Жабайы типті KRAS mKPP бар пациенттердегі тиімділік нәтижелері

Жабайы типті KRAS популяциясы		PFS			ORR (95% CA)
		Медиана (ай) (95% CA)	Қауіп коэффициенті (95% CA)	р-мәні	
Панитумумаб плюс FOLFOX	N=325	9.6 (9.2, 11.1)	0.80 (0.66, 0.97)	0.02	54% (48%, 59%)
Тек FOLFOX	N=331	8.0 (7.5, 9.3)			47% (41%, 52%)

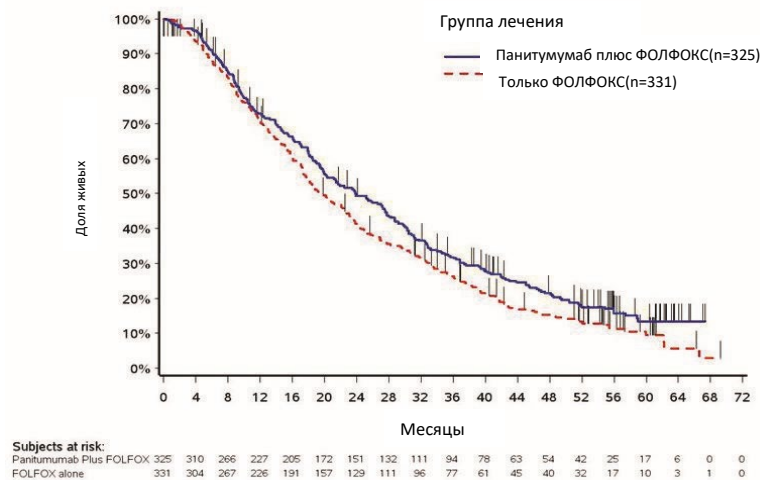


24-сурет. Жабайы типті мКРО KRAS бар пациенттерде өршүсіз өмір сүруге арналған Каплана-Мейер графигі (PFS).

KRAS мутацияларымен ісіктері бар пациенттер арасында, тек ФОЛФОКС (ЖӨС = 1,29, 95% СА: 1,04, 1,62) қабылдаған 219 пациентте PFS медианасымен (95% СА: 7,7, 9,4) 8,8 аймен салыстырғанда, Вектибикс (панитумумаб) плюс FOLFOX қабылдаған 221 пациентте PFS медианасы 7,3 айды (95% СА: 6,3, 8,0) құрады. Тек ФОЛФОКС (ОР = 1,24, 95% СА: 0,98, 1,57) қабылдаған пациенттерде 19,3 ай медианамен (95% СА: 16,5, 21,8) салыстырғанда, Вектибикс (панитумумаб) плюс ФОЛФОКС қабылдаған пациенттерде ЖӨС медианасы 15,5 айды (95% СА: 13,1, 17,6) құрады.

Жабайы типті KRAS мКРО бар пациенттердің 82%-ында оқиғаларға негізделген жаңартылған ақпараты бар ЖӨС зерттемелік талдауы тек ФОЛФОКС-ты қолданумен салыстырғанда, Вектибиксом (панитумумабом) плюс ФОЛФОКС терапиясының әсерін бағалауға бағытталған. Тек ФОЛФОКС (ЖЖЖ = 0,83, 95% СА: 0,70, 0,98) қабылдаған 331 пациенттің арасында 19,4

аймен (95% СА: 17,4, 22,6) салыстырғанда, Вектибикс (панитумумаб) плюс ФОЛФОКС қабылдаған жабайы типті KRAS мКРО бар 325 пациенттің арасында ЖӨС медианасы 23,8 айды (95% СА: 20,0, 27,7) құрады. Нәтижелер 27-суретте көрсетілген.



25-сурет. Жабайы типті KRAS мКРО бар пациенттерде жалпы өмір сүру (ЖӨС) Каплан-Мейер кестесі.

LUMYKRAS® (ЛЮМИКРАС®) (соторасиб) препаратын қолдануды растайтын клиникалық зерттеу

ЛЮМИКРАСОМ (соторасибом) емдеуге арналған KRASG12C-оң пациенттердің клиникалық жарамдылығын көрсету үшін тиімділікке клиникалық зерттеу жүргізілді. Зерттеудің мақсаты ЛЮМИКРАСПЕН (соторасибпен) емдеу пайдалы прогрессивті NSCLC бар пациенттерді іріктеу үшін ПТП-ге арналған Therascreen KRAS RGQ жинағының көмегімен анықталған G12C мутация күйін пайдалануға болатынын бағалау болды. 20170543 клиникалық зерттеуі KRASG12C мутациясы бар кең таралған қатты ісіктері бар ересек пациенттерде ЛЮМИКРАСТЫҢ (соторасибтің) тиімділігі мен қауіпсіздігін бағалауға арналған 1/2 фазаның ашық көп орталықты зерттеу болып табылады.

Осы зерттеудің екінші фазасының бастапқы талдау деректері диагностикалық құрал ретінде Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының клиникалық маңыздылығын растау үшін пайдаланылды.

Қосу KRASG12C мутациясы бар ҰЕӨО бар субъектілермен шектелді, бұл жергілікті зертхананың нәтижелері бойынша бағаланды, бұл ПТП-ге арналған Therascreen KRAS RGQ жинағын пайдалана отырып, орталық тестілеу арқылы расталды. Осы зерттеудің 2-фазасының ҰЕӨО бастапқы соңғы нүктесі KRAS бар субъектілерде монотерапия ретінде, қатты ісіктердегі жауапты бағалау критерийлері (RECIST), 1.1 нұсқасы, LUMYKRAS (соторасиб) критерийлері арқылы бағаланатын ісіктің объективті жауап жиілігін (ORR) бағалау болды. G12C мутациясы бар кең таралған ісіктер.

ҰЕӨО бар 126 субъектінің 124-і талдау үшін толық үлгіге енгізілді. Екі субъект алынып тасталды, өйткені оларда жасырын тәуелсіз орталықтандырылған шолуға (BICR) сәйкес ≥ 1 өлшенетін зақымдану болған жоқ.

Компьютерлік томография немесе магниттік-резонанстық томография арқылы өлшенген және KRASG12C мутациясы бар ҰЕӨО бар субъектілер үшін BICR зертханасымен RECIST 1.1-ге сәйкес бағаланған ORR бастапқы соңғы нүктесі (толық жауап + ішінара жауап) 37,1% құрады (124 субъектінің 46-сы; 95% СА: 28,6-46,2%); үш (3) субъект (2,4%) толық жауапқа және 43 субъект (34,7%) ішінара жауапқа қол жеткізді*.

* 2020 жылғы 01 желтоқсандағы деректер негізінде

Ақаулықтарды жою жөніндегі нұсқаулық

Ұсынылған ақаулықтарды жою жөніндегі нұсқаулық жұмыс кезінде туындауы мүмкін мәселелерді шешуде пайдалы болуы мүмкін. Техникалық көмек және қосымша ақпарат алу үшін біздің техникалық қолдау орталығына мына сілтеме арқылы кіріңіз

www.qiagen.com/Support (байланыс ақпаратын мына веб-сайттан қараңыз www.qiagen.com).

Комментарийлер мен ұсыныстар

Жарамсыз нәтижелер

a.	Бір немесе бірнеше компоненттерді сақтау шарттары "Үлгілерді іріктеу, талдауға дайындық және сақтау" бөлімінде берілген нұсқаулықтарға сәйкес келмеді, 17-бет.	Реагенттердің сақтау шарттары мен жарамдылық мерзімін тексеріңіз (заттаңбаны қараңыз) және қажет болған жағдайда жаңа жинақты пайдаланыңыз.
b.	Therascreen KRAS RGQ PCR жинағының жарамдылық мерзімі аяқталды.	Реагенттердің сақтау шарттары мен жарамдылық мерзімін тексеріңіз (жинақ заттаңбасын қараңыз) және қажет болған жағдайда жаңа theراسcreen KRAS RGQ PCR жинағын пайдаланыңыз.

NTC үлгілері FAM каналында оң нәтиже көрсетеді.

ПТР дайындау кезінде ластану болды.

ПТР-ды жаңа реагенттермен қайталануларда қайталаңыз.
Мүмкін болса, тестіленген үлгіні қосқаннан кейін бірден ПТР-ға арналған пробиркаларды жабыңыз.
Жұмыс орны мен құралдарды үнемі дезинфекциялауды қамтамасыз етіңіз.

Therascreen KRAS пакетімен жасалған құсбелгілер

33-кестеде "Therascreen KRAS талдау пакеті" бағдарламасымен жасалуы мүмкін құсбелгілер, олардың мәні және орындалуы керек әрекеттер келтірілген. Құсбелгілер ҰЕӨО үшін де, КРО үшін де маңызды.

32-кесте. Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау жинағының құсбелгілер мәндері және ұсынылған әрекеттер

Құсбелгі	Мәні	Әрекет ету
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	ПТР өткізуі жарамсыз — бақылау реакциясында оң бақылау үшін рұқсат етілген диапазоннан тыс FAM C т	Бүкіл ПТР өткізуін қайталаңыз.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	ПТР өткізуі жарамсыз — оң бақылаудағы флуоресценция деректерін (мутациялардың реакциялық қоспасы) түсіндіру мүмкін емес	Бүкіл ПТР өткізуін қайталаңыз.
NTC_INT_CTRL_FAIL	ПТР өткізуі жарамсыз — теріс бақылау үшін диапазоннан жоғары ішкі бақылау	Бүкіл ПТР өткізуін қайталаңыз.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	ПТР өткізуі жарамсыз — теріс бақылау үшін диапазоннан төмен ішкі бақылау	Бүкіл ПТР өткізуін қайталаңыз.
NTC_INVALID_CT	ПТР өткізуі жарамсыз — FAM теріс бақылау үшін жарамсыз (шектен аз)	Бүкіл ПТР өткізуін қайталаңыз.
NTC_INVALID_DATA	ПТР өткізуі жарамсыз — теріс бақылаудағы флуоресценция деректерін түсіндіру мүмкін емес	Бүкіл ПТР өткізуін қайталаңыз.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Үлгі жарамсыз — флуоресценция деректерінің бақылау үлгісін түсіндіру мүмкін емес	Тиісті үлгілерде қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз.

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

32-кесте. Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау жинағының құсбелгілер мәндері және ұсынылған әрекеттер

Құсбелгі	Мәні	Әрекет ету
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Үлгі жарамсыз — FAM C _T үлгіні бақылауда тым төмен.	C _T анықтамалық мәнін арттыру үшін үлгіні сұйылтыңыз. Бұл сұйылту жинақта жеткізілген сүмен 1:1 арақатынасында сұйылту C _T -ны 1,0-ге арттырады деген болжамға сүйене отырып есептелуі керек; үлгіні сұйылтқаннан кейін үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Үлгі жарамсыз — FAM CT үлгіні бақылау реакциясында тым жоғары.	Үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер ПТР қайталануы сәтсіз болса, үлгіні жаңа FFPE кесіндісінен шығарып алыңыз (≥4 кесінді). Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші экстракцияны қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі осы өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.

ҰЕӨО-ге тән құсбелгілер

34-кестеде Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау жинағы арқылы жасалуы мүмкін құсбелгілер, құсбелгілер мәні және ҰЕӨО үлгілері үшін қабылданатын әрекеттер тізімі берілген.

33-кесте. Rotor-GeneQTherascreen KRAS жинағының құсбелгілер мәндері және ҰЕӨО үлгілері үшін ұсынылатын әрекеттер

Құсбелгі	Мәні	Әрекет ету
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T мәні ішкі бақылау (HEX) үшін тым жоғары (немесе C _T жоқ), FAM каналының мутациясы теріс	Үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Мутациясы бар пробирканың нәтижесі жарамсыз — үлгі үшін C _T HEX мәні тым төмен (ішкі бақылау)	Үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.

Кестенің жалғасы келесі бетте

Кестені жалғастыру алдыңғы беттен

34-кесте. Rotor-GeneQTherascreen KRAS жинағының құсбелгілер мәндері және ҰЕӨО үлгілері үшін ұсынылатын әрекеттер

Құсбелгі	Мәні Әрекет	
SAMPLE_INVALID_DATA	Мутациясы бар пробирка бойынша нәтиже жарамсыз— ішкі бақылаудағы флуоресценция деректерін түсіндіру мүмкін емес.	Үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.
MUTATION_EARLY_CT	Мутация бойынша нәтиже жарамсыз— C _T FAM үлгі үшін тым төмен.	Үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Үлгідегі бір немесе бірнеше мутация жарамды және оң; сонымен бірге бір үлгі үшін бір немесе бірнеше мутация жарамсыз (ескерту, ол қате емес)	Үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.

КРО-ге тән құсбелгілер

Төмендегі кестеде Rotor-GeneQTherascreen KRAS талдау жинағы арқылы жасалуы мүмкін құсбелгілер, құсбелгілер мәні және КРО үлгілері үшін жасалуы керек әрекеттер келтірілген.

34-кесте. Rotor-GeneQTherascreen KRAS жинағының құсбелгілер мәндері және КРО үлгілері үшін ұсынылатын әрекеттер

Құсбелгі	Мәні	Әрекет ету
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T мәні ішкі бақылау (HEX) үшін тым жоғары (немесе C _T жоқ), FAM каналының мутациясы теріс	Егер үлгіге жарамды күй берілсе - ешқандай әрекет жасамау керек.Егер үлгіге Жарамсыз күйі берілсе, үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуді баптаңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуді баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Мутациясы бар пробирканың нәтижесі жарамсыз— үлгі үшін C _T HEX мәні тым төмен (ішкі бақылау)	Егер үлгіге жарамды күй берілсе - ешқандай әрекет жасамау керек. Егер үлгіге қате күй берілсе, үлгіні қайталау үшін жаңа ПТР өткізуді баптаңыз. Егер қайталану ПТР өткізуді жарамсыз болса, үлгіні ПФП жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуді баптаңыз. Егер жарамсыз болса, екінші шығарып алуды қайтадан қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.

35-кесте. Rotor-GeneQTherascreen KRAS жинағының құсбелгілер мәндері және КРО үлгілері үшін ұсынылатын әрекеттер

Құсбелгі	Мәні	Әрекет ету
----------	------	------------

SAMPLE_INVALID_DATA	Мутациясы бар пробирка бойынша нәтиже жарамсыз— ішкі бақылаудағы флуоресценция деректерін түсіндіру мүмкін емес.	Егер үлгіге жарамды күй берілсе - ешқандай әрекет жасамау керек. Егер үлгіге жарамсыз күй берілсе, үлгіні тестілеуді қайталау үшін жаңа ПТР өтізуін орнатыңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер нәтиже жарамсыз болса, үлгіні экстракциялауды тағы бір рет қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.
MUTATION_EARLY_CT	Мутация бойынша пробирканың нәтижесі жарамсыз— C _T FAM мәні үлгі үшін тым төмен.	Егер үлгіге жарамды күй берілсе - ешқандай әрекет жасамау керек. Егер үлгіге жарамсыз күй берілсе, үлгіні тестілеуді қайталау үшін жаңа ПТР өтізуін орнатыңыз. Егер ПТР-ды қайта іске қосу жарамсыз болса, үлгіні FFPE жаңа бөлімінен (бөлімдерінен) шығарып алыңыз. Жаңа экстракцияны тексеру үшін жаңа ПТР өткізуін баптаңыз. Егер нәтиже жарамсыз болса, үлгіні экстракциялауды тағы бір рет қайталаңыз. Егер үлгі өткізуден кейін сенімді нәтиже бермесе, үлгіге белгісіз мутация күйі беріледі және одан әрі тестілеу жүргізілмеуі керек.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Үлгідегі бір немесе бірнеше мутация жарамды және оң; сонымен бірге бір үлгі үшін бір немесе бірнеше мутация жарамсыз (ескерту, ол қате емес)	Ешқандай әрекет жоқ.

Сапаны бақылау

Qiagen сапаны басқару сертификатталған ISO жүйесіне сәйкес, theascreen KRAS RGQ PCR жинағының әрбір партиясы өнімнің жоғары сапасын қамтамасыз ету үшін берілген спецификацияларға сәйкестігі үшін тестіленеді.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

Келтірілген дереккөздер

1. Р.Хильгер және бірлескен автор (2002) Обыр ауруларын емдеудегі Ras-Raf-MEK-ERK жолы. *Onkologie* 25, 511.
2. П.Бачиредди және басқалар (2005) RAS арқылы MYC-ке қол жеткізу. *Clin. Cancer Res.* 11, 4278.
3. С.Хан және бірлескен автор (2006) Эндермиялық өсу факторы рецепторының мутациясын, K-ras мутациясын және АКТ фосфорлануын біріктірілген талдау арқылы өкпенің ұсақ жасушалы емес обыр кезінде гефитиниб тағайындау үшін пациенттерді іріктеуді оңтайландыру. *Clin. Cancer Res.* 12, 2538.
4. В.Пао және бірлескен автор (2005) Kras мутациялары және өкпенің аденокарциномаларының гефитинибке немесе эрлотинибке бастапқы төзімділігі. *PLoS Medicine* 2, 57.
5. К.Ньютон және бірлескен автор (1989) ДНҚ-дағы кез-келген нүктелік мутацияны талдау. Амплификацияға сезімтал емес мутациялар жүйесі (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
6. Д.Уиткомб және бірлескен автор (1999) Өзін-өзі зондтайтын ампликондар мен флуоресценцияны қолдана отырып, ПТР өнімдерін анықтау. *Nature Biotech.* 17, 804.
7. Обыр кезіндегі соматикалық мутациялар каталогы: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
8. Клиникалық және зертханалық стандарттар институты (CLSI) (2004). Анықтау және сандық анықтау шектерін анықтау хаттамалары: Бекітілген нұсқаулық. CLSI құжаты EP17-A. Уэйн, Пенсильвания: Клиникалық және зертханалық стандарттар институты (бұрынғы NCCLS).

Пайдалы дереккөздер

- Р.Амадо (2008) Жабайы типті KRAS метастаздық колоректальді обырмен ауыратын пациенттерде панитумумабтың тиімділігі үшін қажет. *J. Clin. Oncol.* 26, 1626.
- С.Бенвенути және бірлескен автор (2007) Ras/RAF сигнал беру жолының онкогендік белсендіруі метастаздық колоректальді обырдың эпидермалық өсу факторы

рецепторының антиденелер терапиясына реакциясын нашарлатады. Cancer Res.. 67, 2643.

- С.Бокемейер және бірлескен автор (2008) K-RAS күйі және метастаздық колоректальді обырмен (mKPP) ФОЛФОКС препаратымен цетуксимабпен немесе онсыз пациенттердің бірінші қатардағы емінің тиімділігі: OPUS тәжірибесі. J. Clin. Oncol. 26 (20 мамырдағы қосымша; барлығы 4000).
- Дж.Шафт және бірлескен автор (2013) резектабельді сквамозды емес ұсақ жасушалы емес өкпе обыры бар пациенттерде химиятерапиямен және адъювантты бевацизумабпен біріктірілген неоадъювантты бевацизумабтың II фазасын зерттеу. J. Thorac. Oncol. 8, 1084.
- Клиникалық және зертханалық стандарттар институты (CLSI) (2008). Сапалы тестілеудің тиімділігін бағалауға арналған пайдаланушы хаттамасы: Бекітілген нұсқаулық, 2-ші басылым. CLSI EP12-A2 құжаты. Уэйн, Пенсильвания: Клиникалық және зертханалық стандарттар институты (бұрынғы NCCLS).
- Клиникалық және зертханалық стандарттар институты (CLSI) (2004). Дәлдікті бағалау
- Сандық өлшеу әдістерінің тиімділігі: Бекітілген нұсқаулық, 2-ші басылым. CLSI EP05-A2 құжаты. Уэйн, Пенсильвания: Клиникалық және зертханалық стандарттар институты (бұрынғы NCCLS).
- В. Де Рук және бірлескен автор (2007) KRAS мутациялары етуксимаб қабылдаған колоректальді обыр кезінде ісік мөлшерінің азаюына жол бермейді. J. Clin. Oncol. 25, 4132.
- В.Де Рук және басқалар (2008) Өмір сүруді болжайтын жабайы типті KRAS жағдайы және цетуксимаб қабылдаған метастаздық колоректальді обырдың ерте рентгенологиялық реакциясымен байланысты. Ann. Oncol. 19, 508.
- Ф.Ди Фиоре және бірлескен автор (2007) Цетуксимабпен химиятерапиямен бірге алынған метастаздық колоректальді обыр кезінде KRAS мутациясын анықтаудың клиникалық маңыздылығы. Br. J. Cancer 96, 1166.
- А.Дингеманс және бірлескен автор (2013) KRAS мутациясымен платинамен емделмеген өкпенің кіші жасушалы емес обыры (IIIb немесе IV сатысы) бар пациенттерде сорафенибті қолданудың II фазасын зерттеу. Clin. Cancer Res. 3, 743.
- Г.Финокиаро және басқалар (2007) EGFR, HER2 және Kras колоректальді обыры кезінде цетуксимабқа сезімталдықтың болжамды факторлары ретінде. J. Clin. Oncol. 25, 4021.Jänne, P.A. және т.б. (2013) Селуметиниб плюс доцетаксел KRAS

мутациясы бар өкпенің кең таралған кіші жасушалы емес обыры кезінде: рандомизацияланған көп орталықты плацебо-бақыланатын 2-фазаның зерттеуі. *Lancet Oncol.* **1**, 38.

- С.Карпетис және бірлескен автор (2008) Дамыған колоректальді обырды емдеуде цетуксимаб тиімділігінің болжамды биомаркері болып табылатын KRAS мутация күйі. NCICCTGCO нәтижелері.17: Ең жақсы қолдау терапиясымен салыстырғанда цетуксимабтың III фазасын зерттеу. Асқазан-ішек обырының 10-шы Дүниежүзілік конгресі: 0-037 аннотациясы. 2008 жылғы 27 маусымда таныстырылды.
- С.Хамбата-Форд және басқалар (2007) Эпирегулин мен амфирегулиннің экспрессиясы және K-ras мутациясының күйі цетуксимаб қабылдаған, метастаздық колоректальді обырмен пациенттерде ауруды бақылауды болжайды. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.
- А.Ливр және бірлескен автор (2008) Цетуксимаб қабылдаған колоректальді обыр бар пациенттерде тәуелсіз болжамды фактор ретінде KRAS мутациясы. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.
- А.Ливр және бірлескен автор (2006) KRAS мутациясының күйі колоректальді обыр кезінде цетуксимаб терапиясына жауап берудің болжамды факторы болып табылады. *Cancer Res.* **66**, 3992.
- К.Рекамп және бірлескен автор (2014) алдыңғы химиятерапия мен эрлотиниб сәтсіз аяқталғаннан кейін өкпенің ұсақ жасушалы емес обыры бар пациенттерде рап-HER пероральді қайтымсыз тежегіші (адамның эпидермалық өсу факторының рецепторы) дакомитинибтің (PF-00299804) 2 фазалық зерттеуі. *Cancer.* **120**, 1145.
- С.Тейпар және бірлескен автор (2008) Иринотекан (q2w) және цетуксимабтың (q1w) жоғарылаған дозаларын қабылдаған иринотеканға төзімді метастаздық колоректальді обыры (mKPP) бар пациенттерде K-RAS (мутанттымен салыстырғанда жабайы тип) күйімен тиімділіктің өзара байланысы: EVEREST тәжірибесі (алдын ала деректер). *J. Clin. Oncol.* **26**, (20 мамырдағы қосымша; 4001 қалыс қалды).
- Телвелл, Н. және бірлескен автор (2000) Мутацияларды анықтау үшін Scorpion праймерлерінің әрекет ету тәсілі және қолданылуы. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
- Ван Катсем, Э.және т.б. (2008) метастаздық колоректальді обырмен (mKPP) ауыратын, цетуксимабпен немесе онсыз ФОЛФИРИ қабылдаған пациенттерді емдеудің бірінші желісіндегі K-RAS күйі мен тиімділігі: CRYSTAL тәжірибесі. *J Clin Oncol.* **26**, (20 мамырдағы қосымша; 2-абзац).

Символдар

Қаптамада және таңбалауда келесі символдар болуы мүмкін:



Еуропалық қоғамдастық үшін таңбалау



Құрамында <N> реакцияларды жүргізу үшін жеткілікті мөлшерде реагенттер бар
<N>



дейін жарамды



In vitro диагностикасына арналған медициналық құрылғы



Каталог бойынша нөмірі



Партия нөмірі



Материал нөмірі



Ішінде



Саны

Rn

R Нұсқаулықтың редакциясын, ал n - редакцияның нөмірін білдіреді.



Температуралық диапазоны

Өндіруші



Қолдану жөніндегі нұсқаулықты қараңыз



Абайлаңыз

Байланыс ақпараты

Техникалық көмек және қосымша ақпарат алу үшін біздің техникалық қолдау орталығына мына сілтеме бойынша кіріңіз: www.qiagen.com/Support, 00800-22-44-6000 телефон нөмірі бойынша қоңырау шалыңыз немесе QIAGEN техникалық қолдау бөлімдерінің біріне немесе жергілікті дистрибьюторларға хабарласыңыз (артқы мұқабаны қараңыз немесе мына сайтқа кіріңіз: www.qiagen.com/support).

1-қосымша. *Therascreen* KRAS RQG PCR Kit жинағы бойынша нұсқаулық хаттамасы

Бұл бөлімде *therascreen* KRAS RQG PCR Kit жинағын, 2.3 нұсқасы RQG бағдарламалық жасақтамасымен ашық режимде (яғни, KRAS талдау жинағын пайдаланбай) пайдалану жөніндегі нұсқаулықтар бар.

Негізгі ақпарат

- Қажетті материалдар туралы ақпаратты "Қажетті, бірақ жинақпен ұсынылмаған материалдар" бөлімінен қараңыз.
- Үлгілерді дайындау және орналастыру жөніндегі толық нұсқаулықтарды "Хаттама: ДНҚ үлгісін бағалау" және "Хаттама: KRAS мутациясын анықтау" бөлімдерін қараңыз.

Хаттама: температуралық профильді құру

Іске қосар алдында KRAS талдауы үшін температуралық профилін жасаңыз. Үлгілерді бағалау үшін де, мутацияларды бағалау үшін де циклдау параметрлері бірдей.

Процедура

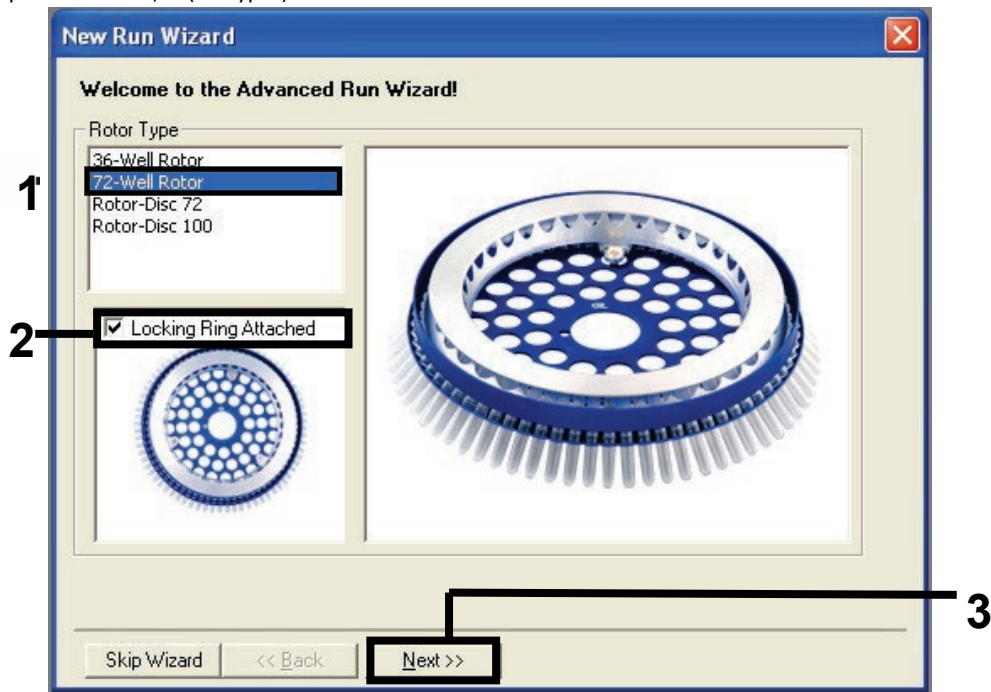
Циклдау параметрлері 36-кестеде көрсетілген.

35-кесте. Цикл параметрлері

Циклдар	Температура	Уақыт	Деректерді алу
1	95°C	15 мин	Ешқандай
40	95°C	30 сек	Ешқандай
	60°C	60 сек	Жасыл және сары

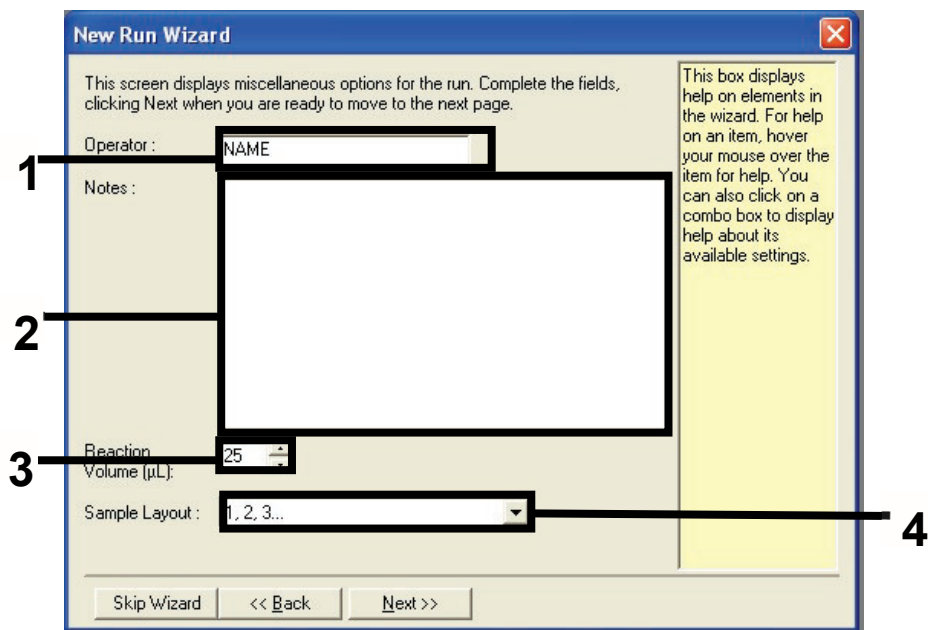
- Rotor-GeneQMDx 5plexHRM аспабына қосылған ноутбуктің жұмыс үстеліндегі Rotor-GeneQSeriesSoftware 2.3 бағдарламалық жасақтамасының белгішесін екі рет шертіңіз. New Run (Жаңа өткізу) пайда болған терезесінде Advanced (Қосымша) қойындысын таңдаңыз.
- Жаңа шаблон жасау үшін Empty Run (Бос өткізу) таңдаңыз, содан кейін жаңа өткізуді баптау шеберіне кіру үшін New (Жаңа) түймесін басыңыз.

3. Ротор типі ретінде 72 ойықшалы роторды таңдаңыз. Бекіткіш сақинаның бекітілгеніне көз жеткізіп, "Locking Ring Attached (Қысқыш сақина бекітілген)" құсбелгісін қойыңыз. Next (Бұдан әрі) түймесін басыңыз (28-сурет).



26-сурет. Жаңа өткізуді баптау шебері диалогтық терезесі. 1 = Ротор типі, 2 = "Қысқыш сақина бекітілген" құсбелгісі, 3 = Бұдан әрі.

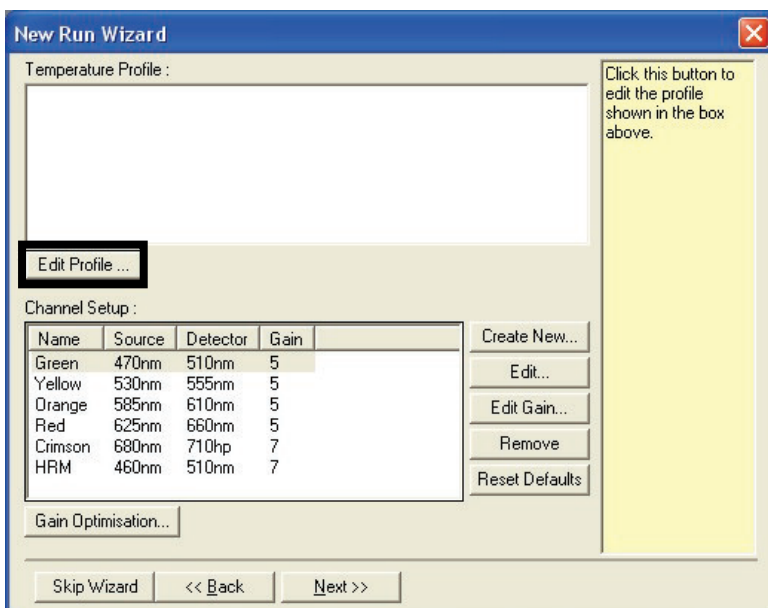
4. Оператордың атын енгізіңіз. Кез келген ескертпелерді қосып, реакция көлемін "25" деп енгізіңіз. **Sample Layout (Үлгіні орналастыру сызбасы)** өрісінде 1, 2, 3... мәні бар екеніне көз жеткізіңіз. **Next (Бұдан әрі)** түймесін басыңыз(29-сурет).



27-сурет. Оператор атауын және реакция көлемін енгізу. 1 = Оператор диалогтық өрісі, 2 = Ескертпе диалогтық терезесі, 3 = Реакция көлемі өрісі, 4 = Үлгінің орналасу сызбасы, 5 = Бұдан әрі.

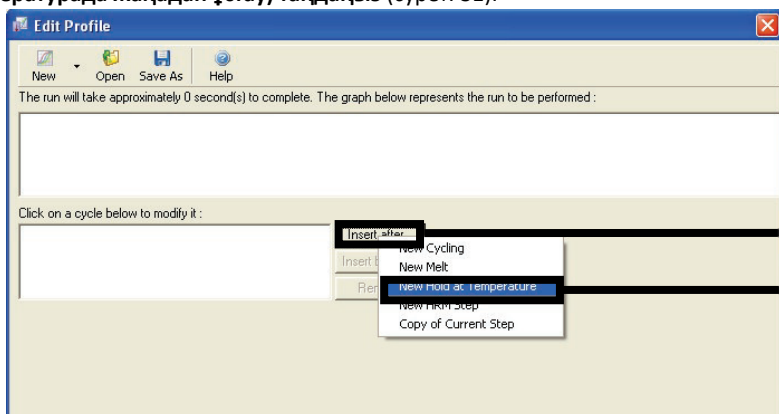
5. New Run Wizard (Жаңа өткізуді баптау шебері) терезесінде **Edit Profile (Профильді редакциялау)** түймесін басыңыз (30-сурет) және температуралық профильді келесі қадамдарда алынған ақпаратқа сәйкес бағдарламалаңыз.

1



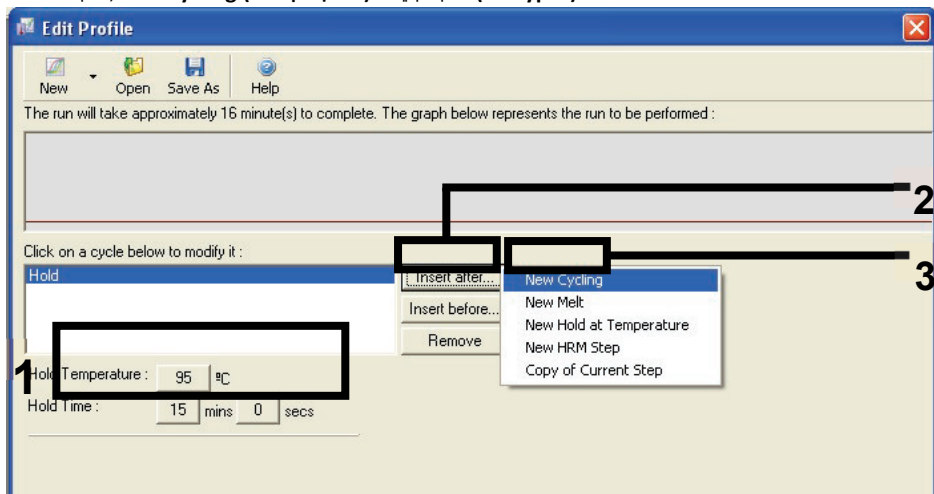
28-сурет. Профильді редакциялау.

6. Insert after (Кейін кірістіру) түймесін басып, New Hold at Temperature (температурада жаңадан ұстау) таңдаңыз (сурет. 31).



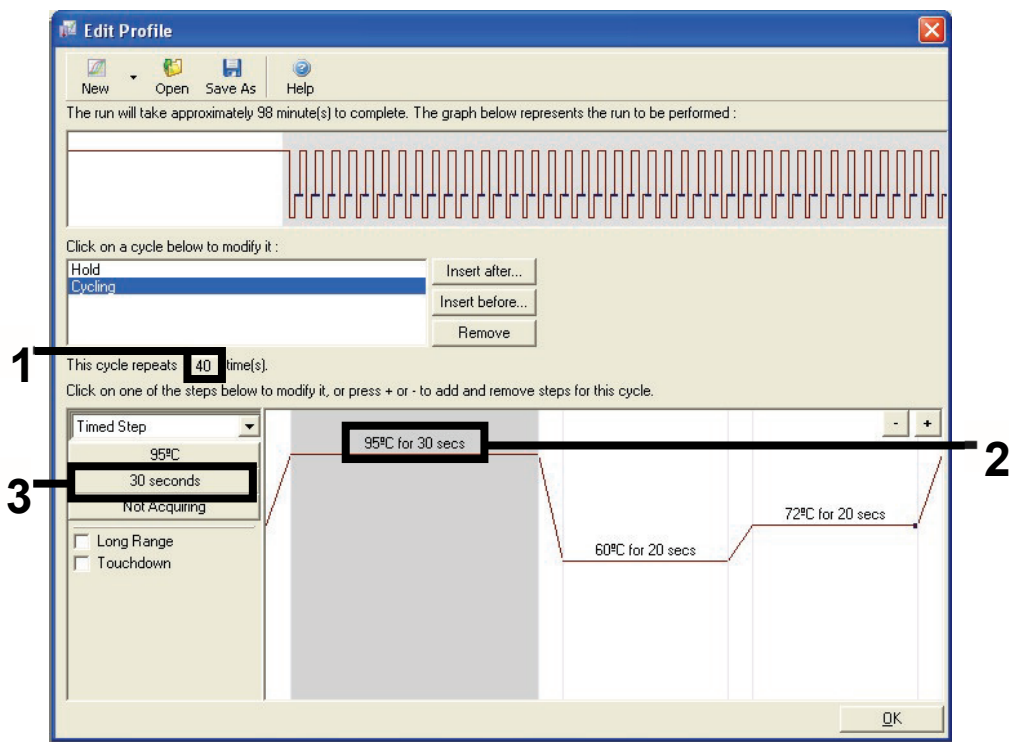
29-сурет. Инкубацияның бастапқы кезеңінде кірістіру. 1 = Кейін кірістіру, 2 = Температурада жаңадан ұстау.

7. Hold Temperature (Ұстау температурасы) **өрісін 95°C-ге, ал Hold Time (Ұстау уақыты) өрісін 15 минут 0 секундқа мәнді орнатыңыз. Insert After (Кейін кірістіру) басыңыз, New Cycling (Жаңа цикл) таңдаңыз (32-сурет).**



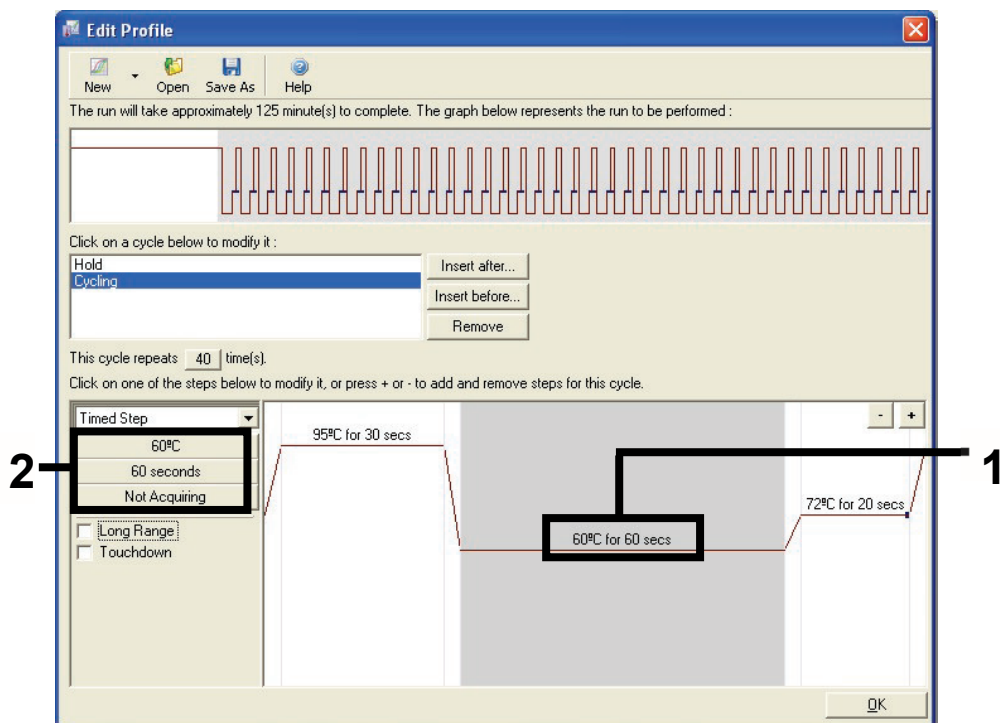
30-сурет. Инкубацияның бастапқы кезеңі 95°C. 1 = Ұстау температурасы және ұстау уақыты, 2 = Кейін кірістіру, 3 = Жаңа цикл.

8. Циклды қайталанулар санын **40-қа** қойыңыз. Бірінші қадамды таңдап, температураны **95°C-ге 30 секундқа** қойыңыз (33-сурет).



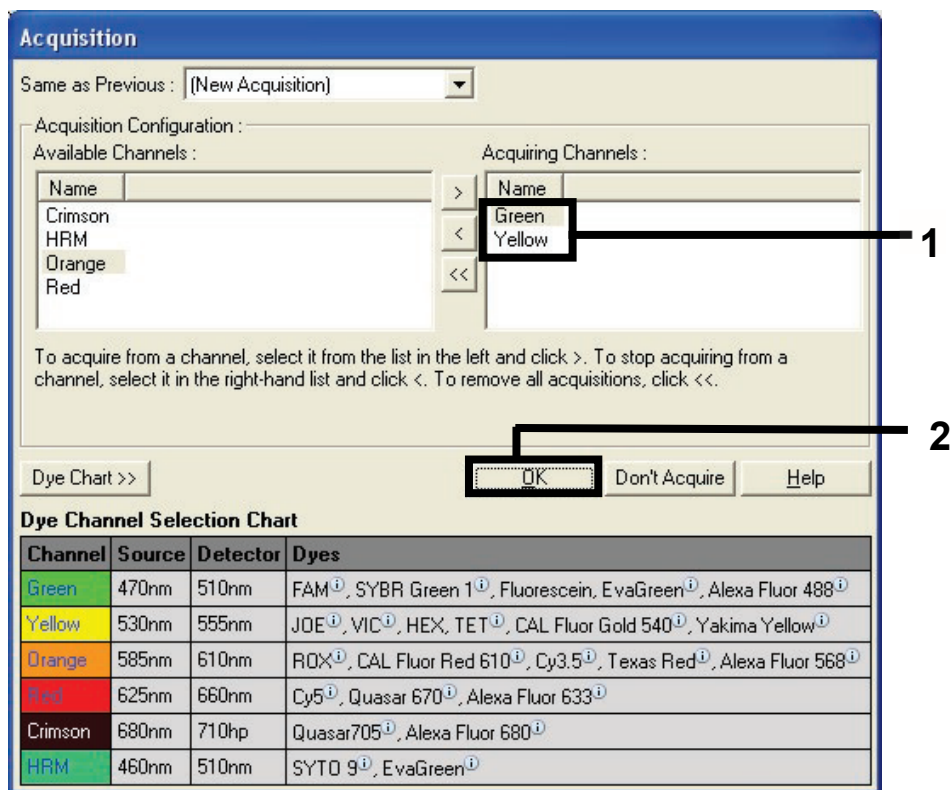
31-сурет. 95°C кезінде циклдау кезеңі. 1 = Циклды қайталау терезесі, 2 = бірінші кезең температурасын баптау, 3 = бірінші кезең уақытын орнату.

9. Екінші кезеңді бөліп, **60°C-ге 60 секундқа** қойыңыз. Осы кезде деректерді жинауды қосу үшін **Not Acquiring (Деректерді жинамай) шертіңіз** (34-сурет).



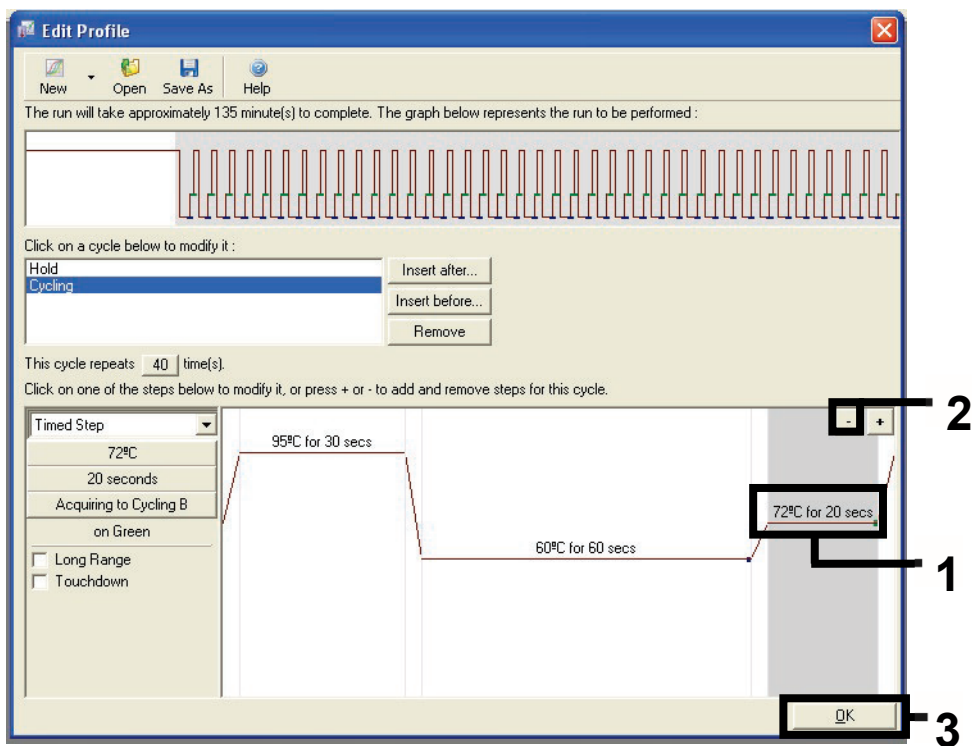
32-сурет. 60°C кезіндегі циклдық кезең. 1 = екінші кезеңнің температурасы мен уақытын орнату, 2 = деректер алмай.

10. "Available Channels (Қол жетімді каналдар)" тізімінен **Green (Жасыл)** және **Yellow (Сары)** таңдаңыз, содан кейін оларды алу каналдарының тізіміне жылжыту үшін ">" белгішесін шертіңіз. **OK** түймесін басыңыз (35-сурет).



33-сурет. 60°C кезінде циклдау кезеңінде деректерді алу.

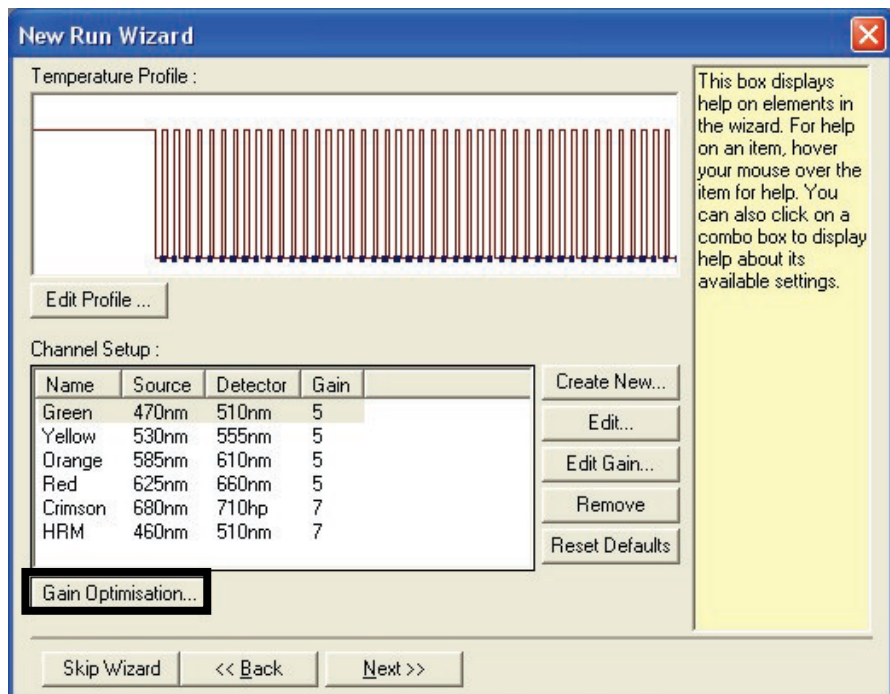
11. Үшінші кезеңді таңдап, -Жою басыңыз. **OK** түймесін басыңыз (36-сурет).



34-сурет. Кеңейту кезеңін алып тастау.

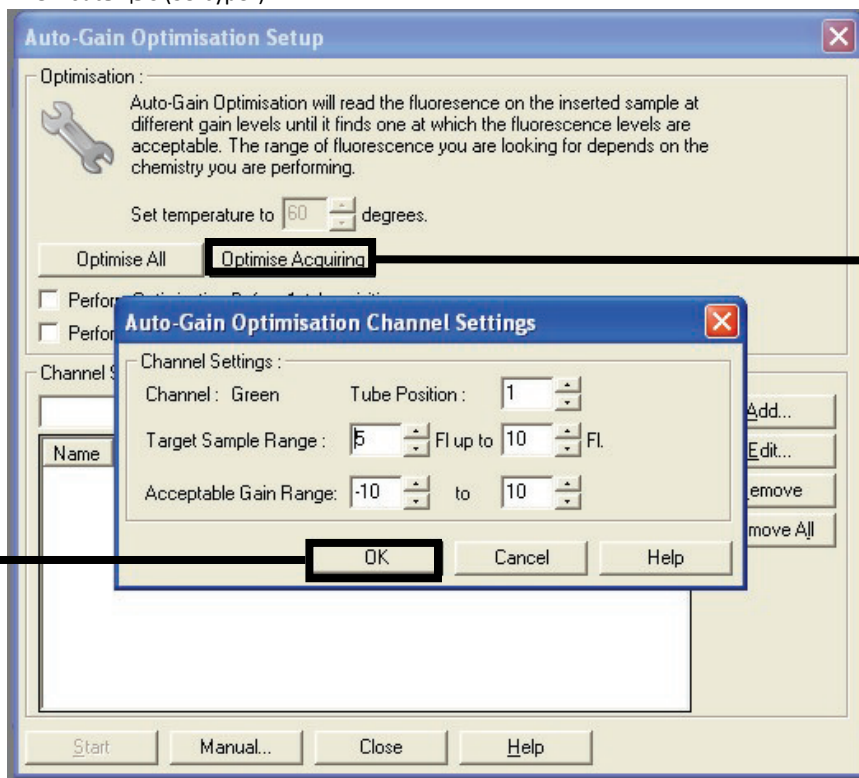
12. Келесі терезеде **Gain Optimization (Оңтайландыруды күшейту)** басыңыз (37-сурет).

1



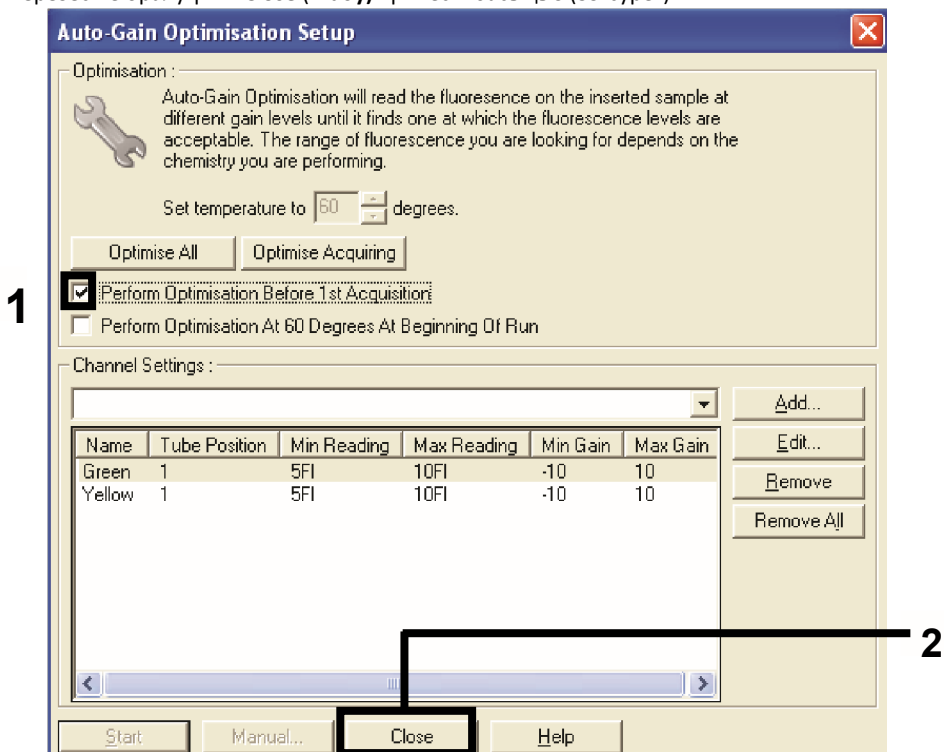
35-сурет. Оңтайландыруды күшейту.

13. **Optimize Acquiring (Алуды оңтайландыру)** түймесін басыңыз. Канал баптамалары әр канал үшін көрсетіледі. Осы мәндерді әдепкі бойынша қабылдау үшін **ОК** басыңыз (38-сурет).



36-сурет. Жасыл канал үшін оңтайландыруды автоматты түрде

14. Perform Optimization before 1st Acquisition (Деректерді бірінші жинағанға дейін оңтайландыруды орындау) **құсбелгісін қойыңыз**, содан кейін баптамалар шебері терезесіне оралу үшін **Close (Жабу)** түймесін басыңыз (39-сурет).



37-сурет. Жасыл және сары каналдарды таңдау.

15. **Next (Бұдан әрі)** түймесін басыңыз. Содан кейін шаблонды тиісті жерде сақтау үшін **Save (Сақтау)** түймесін басыңыз.

Хаттама: үлгіні бағалау (қолмен)

Бұл хаттама үлгілердегі жалпы амплификацияланатын ДНҚ-ны бағалау үшін қолданылады және KRAS мутациясын талдауға дейін орындалуы керек.

- Хаттамада сипатталғандай үлгілерді дайындаңыз: ДНҚ үлгісін бағалау.
- Хаттамада сипатталғандай rRotor-GeneQMDx 5plexHRM5plexHRM аспабында ПТР баптаңыз: *Therascreen KRASPCRRGQ* орнату.
- Өткізу аяқталғаннан кейін, Үлгілерді бағалау деректерін талдау бөлімінде берілген нұсқаулықтарға сәйкес деректерді талдаңыз.

Хаттама: KRAS мутациясын анықтау (қолмен)

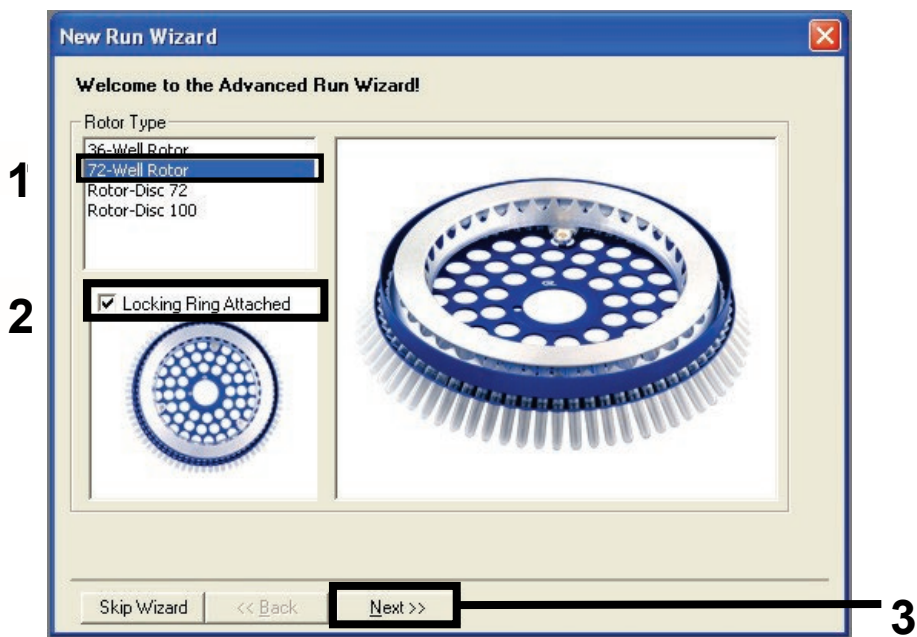
Үлгі үлгіні бағалаудан өткеннен кейін оны KRAS мутацияларын анықтау үшін тексеруге болады.

- Хаттамада сипатталғандай үлгілерді дайындаңыз: ДНҚ үлгісін бағалау.
- Хаттамада сипатталғандай rRotor-GeneQMDx 5plexHRM5plexHRM аспабында ПТР баптаңыз: *Therascreen KRASPCRRGQ* орнату.
- Өткізу аяқталғаннан кейін, Үлгілерді бағалау деректерін талдау бөлімінде берілген нұсқаулықтарға сәйкес деректерді талдаңыз.

Хаттама: *therascreen* KRASPCRRGQ орнату

1. Rotor-GeneQ 2.3 сериялы бағдарламалық жасақтамасын және тиісті температуралық профильді ашыңыз.
2. Хаттамаға сәйкес температуралық профильді жасаңыз: Температуралық профильді жасау.

Дұрыс ротордың таңдалғанына көз жеткізіп, **Locking Ring Attached** (Қысқыш сақина бекітілген) терезесінде құсбелгіні қойыңыз. **Next "Бұдан әрі"** түймесін басыңыз (40-сурет).



38-сурет. Жаңа өткізуді жасау шебері диалогтық терезесі және сәлемдесу экраны. 1 = Ротор типі, 2 = Қысқыш сақина бекітілген құсбелгісі, 3 = Бұдан әрі.

3. Оператордың атын енгізіңіз. Ескертпелерді қосып, **Reaction Volume (Реакция көлемі)** өрісі **25** мәні, ал **Sample Layout (Үлгі орналасу сызбасы)** өрісі **1, 2, 3...**мәнін көрсететініне көз жеткізіңіз. **Next (Бұдан әрі)** түймесін басыңыз (41-сурет).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (μL): 25

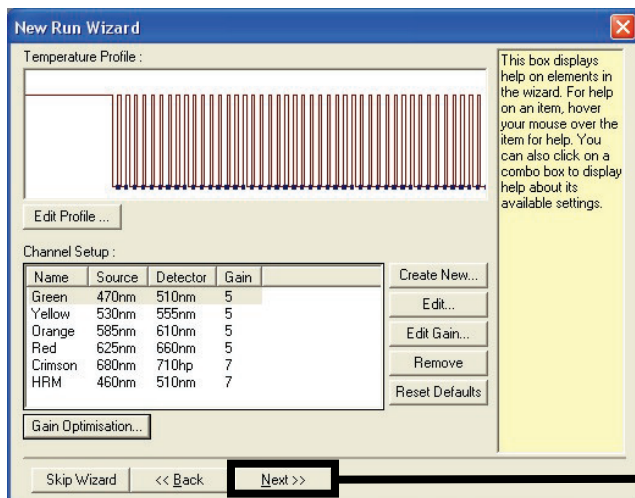
Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

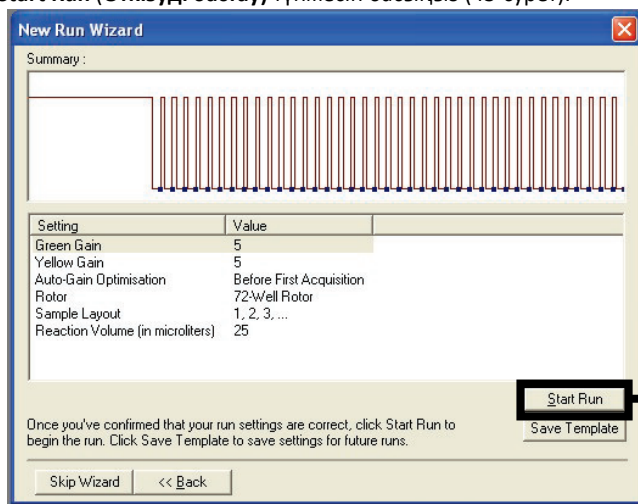
39-сурет. Жаңа өткізу шебері диалогтық терезесі. 1 = Оператор және Ескертпелер терезесі, 2 = Реакция көлемі терезесі және Үлгінің орналасу сызбасы, 3 = Бұдан әрі.

4. Барлық мәндерді солай келесі терезеде қалдырыңыз. Редакциялау қажет емес, өйткені температуралық профиль Хаттамадағы нұсқаулықтарға сәйкес жасалған: Температуралық профильді жасау. **Next (Бұдан әрі)** басыңыз (42-сурет).



40-сурет. Жаңа өткізуді жасау шебері диалогтық терезесі және температураны редакциялау экраны. 1 = Бұдан әрі.

5. Барлық параметрлерді қарап шығыңыз және цикл файлын сақтау және өткізуді бастау үшін **Start Run (Өткізуді бастау)** түймесін басыңыз (43-сурет).



41-сурет. Жаңа өткізу шебері диалогтық терезесі. 1 = өткізуді бастаңыз.

Ескертпе. Өткізуді бастағаннан кейін жаңа терезе пайда болады, онда сіз қазір үлгі атауларын енгізе аласыз немесе **Finish(Дайын)** түймесін басып, кейінірек өткізу кезінде немесе оны аяқтағаннан кейін **Sample (Үлгі)** түймесін басу арқылы енгізе аласыз.

Егер сіз **Finish and Lock Samples (Дайын және үлгілерді белгілеу)** түймесін бассаңыз, үлгі атауларын енді редакциялай алмайсыз. Үлгілерді дұрыс тестілеу мен талдауды қамтамасыз ету үшін үлгілердің атауларын енгізген кезде аса сақ болу керек.

Ескертпе. Үлгілерді атау кезінде бос пробиркаларды Name (Атауы) бағанында бос қалдыру керек.

6. Өткізуді аяқтағаннан кейін, жағдайға байланысты үлгіні бағалау деректерін талдау немесе KRAS мутациясын анықтауды талдау бөлімдеріне сәйкес деректерді талдаңыз.

7. Егер сандық есеп беру қажет болса, Rotor-GeneQ іске қосу файлындағы құралдар панеліндегі **Reports (Есеп берулер)** белгішесін шертңіз.

2-қосымша: Therascreen KRAS талдау пакетін орнату

Therascreen KRAS RGQPCR жинағы 72 ойықшалы роторы бар Rotor-GeneQMDx 5plexHRM көмегімен пайдалануға арналған. *Therascreen KRAS* талдау жинағы компакт-дискіде бөлек қолжетімді (каталог нөмірі 9023675).

Therascreen KRAS талдау пакетін мына сайттағы *Therascreen KRAS RGQ PCR Kit* өнімінің тиісті веб-бетінде жүктеп алуға қолжетімді: www.qiagen.com. Жүктеп алу туралы ақпаратты "Қосымша хаттамалар" қойындысының "Өнім ресурстары" қойындысынан табуға болады. Талдау пакеттеріне компакт-дискіде тапсырыс беруге болады.

Жиынтыққа Therascreen KRASCEQLockedTemplate шаблон және Therascreen KRASCELockedTemplate шаблон кіреді.

Ескертпе. *Therascreen KRAS* талдау пакеті *therascreen KRAS* талдау пакеті 3.0.3 нұсқасы (QIAGEN, каталог нөмірі 9023675) бар тиісті RotorGeneQ 2.3 нұсқасы бағдарламалық жасақтамасымен ғана жұмыс істейді. *Therascreen KRAS* талдау пакетін орнатуды бастамас бұрын Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасының дұрыс нұсқасы орнатылғанына көз жеткізіңіз.

Процедура (сақтау)

1. *Therascreen KRAS* RGQAssayPackage талдау жиынтығын мына сайттағы *Therascreen KRAS RGQ PCR* жинағының тиісті өнім веб-бетінен жүктеп алыңыз: **www.qiagen.com**.
2. Файлды екі рет шертіңіз және файлды мұрағаттан шығарып алыңыз.
3. Баптауды бастау үшін **Therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe** түймесін екі рет шертіңіз.

Процедура (CD)

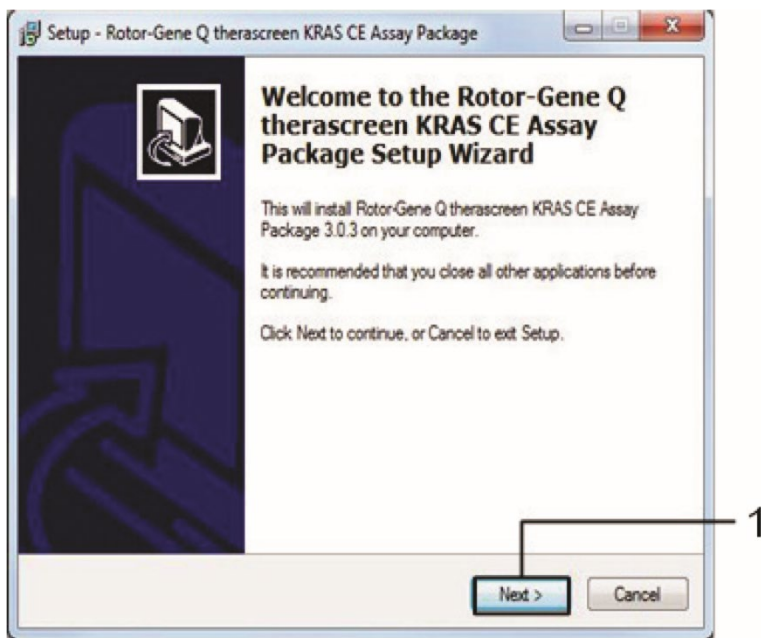
1. Орнатылған Rotor-GeneQ бағдарламалық жасақтамасымен үйлесімді *therascreen* KRAS RGQAssayPackageCE компакт-дискісіне тапсырыс беріңіз (жоғарыдан қараңыз), оны QIAGEN компаниясында бөлек сатып алуға болады.

3.0.3 нұсқасы. Санаты Нөмірі 9023675.

2. RotorGeneQMDx 5plexHRM аспабына қосылған ноутбуктің компакт-дискілерінің дискжетегіне компакт-диск салыңыз.

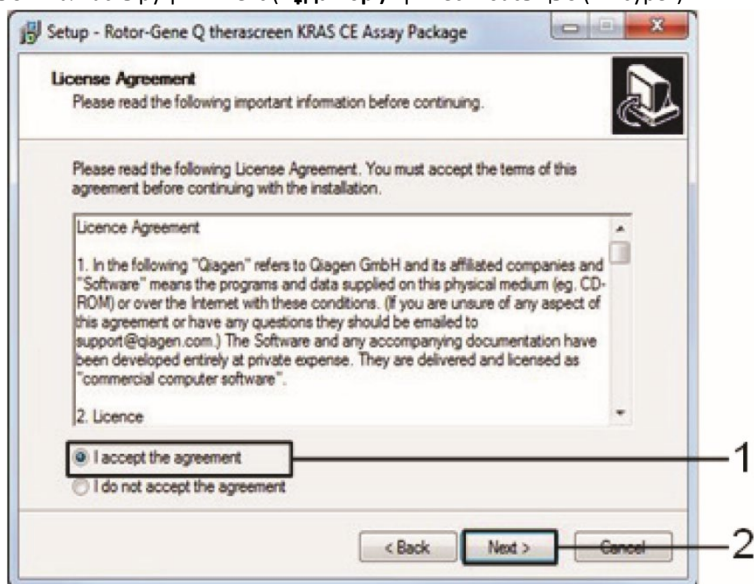
3. **Орнатуды бастау үшін**Therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe **немесе** therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe **екі рет шертіңіз**. Орнату шебері пайда болады.

4. Жалғастыру үшін **Next "Бұдан әрі"**түймесін басыңыз (46-сурет).



42-сурет. Баптау диалогтық терезесі. 1 = Бұдан әрі.

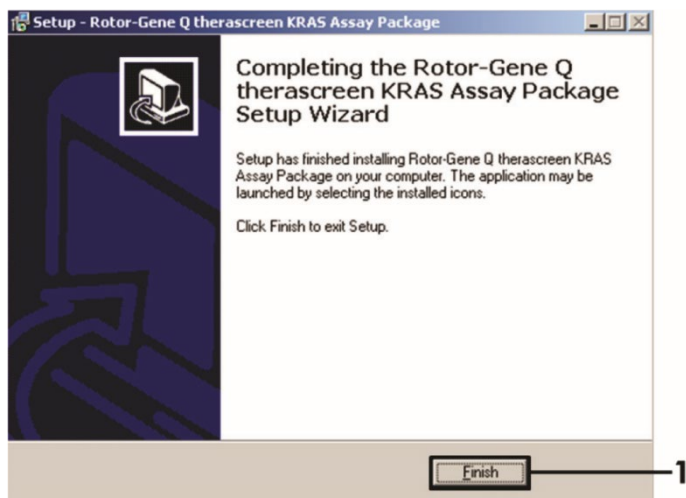
5. Лицензиялық келісім диалогтық терезесінде лицензиялық келісімді оқып, **I accept the agreement (Мен келісім шарттарын қабылдаймын)** құсбелгісін қойыңыз. Жалғастыру үшін **Next (Бұдан әрі)** түймесін басыңыз (47-сурет).



43-сурет. Лицензиялық келісім диалогтық терезесі. 1 = Мен келісім шарттарын қабылдаймын, 2 = Бұдан әрі.

Шаблонды баптау автоматты түрде басталады.

6. Соңғы орнату терезесінде орнату шеберінен шығу үшін **Finish (Дайын)** түймесін басыңыз (48-сурет).



44-

сурет. Орнату шеберінде аяқтау.

7. Компьютерді қайта іске қосыңыз. KRASQCLockedTemplate және Therascreen KRASLockedTemplate шаблоны үшін жарлықтар автоматты түрде жасалады және жұмыс үстелінде пайда болады.

Тапсырыс туралы ақпарат

Өнім	Мазмұны	Санаттық нөмірі
<i>Therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	24 реакцияға: 1 бақылау талдауы, 7 мутация талдауы, оң бақылау, Cу, Taq ДНҚ полимеразасы	874011
<i>therascreen</i> KRAS (3.0.3 нұсқасы)	<i>Therascreen KRAS RGQ PCR Kit</i> жинағымен және QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM аспабымен 72 ойықшалы роторымен пайдалануға арналған бағдарламалық хаттамалар пакеті	9023675
Rotor-GeneQ және аксессуарлар		
Ротор-Gene Q MDx 5plex HRM	Нақты уақыттағы ПТР циклы және 5 каналы жоғары рұқсат етуімен балқыма анализаторы (жасыл, сары, қызғылт сары, қызыл, алқызыл) плюс HRM каналы, портативті компьютер, бағдарламалық жасақтама, аксессуарлар, бөлшектер мен құрастыруға 1 жыл кепілдік, орнату және оқыту кірмейді	9002032
Ротор-Gene Q MDx	Нақты уақыттағы ПТР циклы және 5 каналы жоғары рұқсат етуімен балқыма анализаторы (жасыл, сары, қызғылт сары, қызыл, алқызыл) плюс HRM каналы, портативті компьютер, бағдарламалық жасақтама, аксессуарлар, бөлшектер мен жұмыстарға 1 жыл кепілдік, орнату және оқыту	9002033
Жүктеу блогы 0,1 мл-ден 72 пробирка	0,1 мл 72 пробиркада бір каналды пипеткамен реакцияны қолмен баптауға арналған алюминий блок.	9018901

Стриптердегі пробиркалар мен қалпақшалар, 0,1 мл (250)	1000 реакцияға арналған 250 стрип 4 пробиркадан және қалпақшалар	981103
Стриптердегі пробиркалар мен қалпақшалар, 0,1 мл (2500)	10,000 реакцияға арналған 10 x 250 стрип 4 пробиркадан және қалпақшалар	981106
QIAampDNAFFPETissueKit жинағы - формалинде бекітілген және парафин толтырылған тіндерден геномдық ДНҚ-ны бөліп алуға арналған.		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 ДНҚ дайындамасы үшін: QIAampMinElute® бағандары, K протеиназасы, буферлер және жинау пробиркалары (2 мл)	56404

Нақты өнімдерге арналған лицензиялау және жауапкершіліктен бас тарту туралы өзекті ақпаратты QIAGEN жинағы жөніндегі тиісті анықтамалықтан немесе пайдаланушы нұсқаулығынан қараңыз. QIAGEN жинақтары жөніндегі анықтамалықтары мен пайдаланушы нұсқаулықтары мына сайтта қолжетімді: www.qiagen.com немесе QIAGEN техникалық қызметінен немесе жергілікті дистрибьютордан сұралуы мүмкін.

Құжатты қайта қарау тарихы

Күні	Өзгерістер
R4, 2019 ж. қаңтар	Уәкілетті өкілді қосу (титул парағы) Жаңартылған символдар бөлімі Шаблонды жаңарту
R5, 2019 ж. қараша	Заңды өндірушіні өзгерту (мұқаба) ЕС + REP символы мұқабадан және Символдар бөлімінен жойылды. Аспаптың заттаңбасындағы атаумен келісу үшін Rotor-GeneQMDx-тен Rotor-GeneQMDx 5plexHRM-ге аспаптың атауын бейімдеу Негізгі қоспаларды дайындауда қосымша қадамды қосу үшін KRAS мутациясын анықтау хаттамасы жаңартылды. 9-кестедегі "Жиілік" және "95% сенімділік аралығы" бағандарындағы мәндер түзетілді. KPO сәйкестігінің жалпы пайызы 96,4%-дан 96,82%-ға дейін жаңартылды. 14 кестедегі LODC₉₅ бағанындағы мәндер түзетілді
R6, 2020 ж. қараша	3.0.3-ке дейін Therascreen KRASAssayPackage талдау пакетінің түзетілген нұсқасы. Мына веб- сайтта талдау пакетін жүктеуге қолжетімділікке қатысты осы құжат толығымен жаңартылды: www.qiagen.com. Құсбелгілермен байланысты әрекеттерге қатысты бүкіл құжатқа ескертпе қосылды Жинақтың дұрыс жұмыс істеуін қамтамасыз ету үшін ҰЕӨО индикациясы жаңартылды. Реагенттерді дұрыс араластыру туралы осы құжаттағы процедуралар туралы ескертпе қосылды. "Жалпы сақтық шаралары" бөлімі жаңартылды. Rotor-GeneQMDx 5plexHRM құралын дұрыс орналастыру үшін ескертпе қосылды Құрғақ скальпельдерді қолдануға қатысты ескертпе қосылды Жаңартылған хаттама: жұмысқа кіріспес бұрын қосымша маңызды сәттерді қосу үшін ДНҚ үлгісін бағалау. Жаңартылған хаттама: өткізуден бұрын қосымша маңызды сәттерді қосу үшін "KRAS мутацияларын анықтау" бөлімі және бірнеше құсбелгілерді "жарамсыз" ретінде түсіндіру үшін ҰЕӨО үлгілеріне ескертпелер. Құсбелгілерді көрсететін кестелерді қосу үшін Rotor-GeneQTherascreen KRASAssayPackage жинағының құсбелгілер бөлімі жаңартылды, олардың мәндері және ұсынылған әрекеттер. Құсбелгілермен байланысты әрекеттерге қатысты нәтижелерді түсіндіру жаңартылды. Құсбелгілерді көрсететін кестелерді қосу үшін "Ақаулықтарды жою жөніндегі нұсқаулық" бөлімі жаңартылды, олардың мәндері және ұсынылған әрекеттер. ҰЕӨО үлгілері туралы ақпаратты қосу үшін "Шектеулер" бөлімі жаңартылды.

Күні	Өзгерістер
	Кестелердегі Деректерді жаңарту үшін өнімділік сипаттамаларының қайта қаралған бөлімі. ДНҚ енгізу және сызықтық бөлімі жаңартылды. "Қайталану және қайта жаңартылу" бөлімі жаңартылды. Сынамаларды өңдеудің өзгергіштігі бөлімі жаңартылды. Клиникалық тиімділік бөлімі қосылды Ұсынылған $C_{t} > 32$ бақылау сынамасын талдау шешімін қайта қарау үшін "Үлгіні бағалау деректерін талдау" бөлімі жаңартылды. "Символдар" бөліміне ЕО сәйкестік таңбалануы қосылды Құсбелгілермен байланысты әрекеттерге қатысты нәтижелерді (қолмен) түсіндіру жаңартылды. Негізгі қоспаларды дайындау сатыларын қосу үшін "Хаттама: KRAS мутацияларын анықтау" бөлімі жаңартылды.

Бұл бет әдейі бос қалдырылды

Therascreen® KRAS RGQPCR Kit жинағына арналған шектеулі лицензиялық келісім

Бұл өнімді пайдалану кез келген сатып алушының немесе пайдаланушының келесі шарттармен келісуді білдіреді:

1. Өнімді тек өніммен және осы нұсқаулықпен бірге берілген хаттамаларға сәйкес және тек жиынтыққа кіретін компоненттермен пайдалануға болады. QIAGEN компаниясы өнімге қоса берілген хаттамаларда, осы нұсқаулықта және мына сайтта қолжетімді қосымша хаттамаларда сипатталған жағдайларды қоспағанда, осы жинақтың қоса берілген компоненттерін жинаққа кірмейтін кез келген компоненттермен пайдалануға немесе біріктіруге өзінің қандай да бір зияткерлік меншігіне сәйкес лицензия бермейді: www.qiagen.com. Ұсынылған кейбір қосымша хаттамаларды QIAGEN пайдаланушылары QIAGEN пайдаланушылары үшін ұсынды. Бұл хаттамалар QIAGEN компаниясымен мұқият тестіленбеген немесе оңтайландырылмаған. QIAGEN, ешқандай кепілдік бермейді және үшінші тұлғалардың құқықтарын бұзбайды деген мәлімдеме жасамайды.
2. Нақты көрсетілген лицензиялардан басқа, QIAGEN бұл жинақтың және/немесе оны пайдаланудың үшінші тұлғалардың құқықтарын бұзбайтынына кепілдік бермейді.
3. Бұл жинақ пен оның компоненттері бір рет пайдалануға лицензияланған және оларды қайта пайдалануға, қалпына келтіруге немесе қайта сатуға болмайды.
4. QIAGEN тікелей көрсетілген лицензиялардан басқа кез келген басқа лицензиялардан тікелей бас тартады.
5. Сатып алушы мен жинақты пайдаланушы жоғарыда тыйым салынған кез-келген әрекетке әкелуі немесе ықпал етуі мүмкін қандай да бір әрекетті жасамауға немесе ешкімге рұқсат бермеуге келіседі. QIAGEN кез келген сотта осы шектеулі лицензиялық келісімнің тыйымдарының орындалуын қамтамасыз ете алады және осы шектеулі лицензиялық келісімнің немесе жинаққа және/немесе оның компоненттеріне қатысты зияткерлік меншікке кез келген өз құқықтарының сақталуын қамтамасыз ету жөніндегі кез келген іс-әрекетте адвокаттардың қаламақысын қоса алғанда, өзінің барлық тергеу және сот шығындарын өтей алады.

Жаңартылған терминдер үшін лицензияларды www.qiagen.com қараңыз.

Сауда маркалары: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); LUMYKRAS®, FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Осы құжатта қолданылған тіркелген атаулар, тауарлық белгілері және т.б., егер олар арнайы белгіленбесе де, заңмен қорғалмаған деп саналмауы керек.

Нәжіс үлгілерімен бірге қолдануға болмайды.

Несеп үлгілерімен бірге қолдануға болмайды.

Қан үлгісінен жасушадан тыс нуклеин қышқылымен қолдануға болмайды.

Сүйек кемігінің жасушасыз үлгілерімен бірге қолдануға болмайды.

Сілекей үлгілерімен бірге қолдануға болмайды.

Бұл өнімді САТЫП АЛУ САТЫП АЛУШЫҒА БЕЛГІЛІ БІР РОСНЕ ПАТЕНТТЕРІНЕ СӘЙКЕС ОНЫ ТЕК INVITRO ДИАГНОСТИКАСЫ БОЙЫНША ҚЫЗМЕТТЕРДІ КӨРСЕТУҒА ПАЙДАЛАНУ ҚҰҚЫҒЫН БЕРЕДІ. ОСЫМЕН САТЫП АЛУ КЕЗІНДЕ ПАЙДАЛАНУҒА ОСЫ НАҚТЫ ҚҰҚЫҚТАН БАСҚА ҚАНДАЙ ДА БІР ЖАЛПЫ ПАТЕНТ НЕМЕСЕ КЕЗ КЕЛГЕН ТҮРДЕГІ ӨЗГЕ ЛИЦЕНЗИЯ БЕРІЛМЕЙДІ.

1127513 НВ-1861-006 04-2022 © 2022 QIAGEN, барлық құқықтар қорғалған.

Тапсырыс www.qiagen.com/shop / Техникалық қолдау support.qiagen.com / Сайт www.qiagen.com.