


„*therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit“ vadovas

1 versija

 24

IVD

Skirtas „in vitro“ diagnostikai

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM“ instrumentu



REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4 **MAT** 1063321LT



QIAGEN mėginių ir tyrimų technologijos

QIAGEN yra pirmaujanti inovacinių mėginių ir tyrimų technologijų, leidžiančių išskirti ir aptikti bet kokių biologinių mėginių turinį, tiekėja. Pažangūs, aukštos kokybės mūsų produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio iki rezultato.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų gryninimas
- Nukleino rūgščių ir baltymų tyrimai
- mikroRNR tyrimai ir RNRi
- Mėginių ir tyrimų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas – leisti Jums pasiekti sėkmę ir laimėjimus. Daugiau informacijos rasite svetainėje www.qiagen.com.

Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Suvestinė ir paaiškinimas	5
Procedūros principas	6
Pateikiamos medžiagos	9
Rinkinio turinys	9
Būtinės, bet nepateikiamos priemonės	10
Perspėjimai ir atsargumo priemonės	11
Saugos informacija	11
Bendrosios atsargumo priemonės	11
Reagentų laikymas ir naudojimas	12
Mėginių naudojimas ir laikymas	13
Procedūra	13
EGFR analizei reikalingo auglio ląstelių lygio nustatymas	13
DNR išskyrimas	14
Protokolai	
■ Mėginių įvertinimas	15
■ EGFR mutacijų aptikimas	18
■ „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas	21
Rezultatų aiškinimas	30
Mėginių įvertinimo duomenų analizė	30
EGFR mutacijų duomenų analizė	33
Trikčių šalinimo vadovas	43
Kokybės kontrolė	44
Apribojimai	44
Efektyvumo charakteristikos	45
Kritinės ribos	45
Aptikimo riba (LOD)	45
Tikslumas	46
Atkartojamumas	46
Įvesties DNR koncentracijos poveikis	46
Trukdančios medžiagos	47
Literatūra	47

Simboliai	48
Kontaktinė informacija	48
Priedas: Informacija apie mutacijas	49
Užsakymo informacija	51

Numatytoji paskirtis

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra *in vitro* diagnostinis testas, skirtas EGFR su vėžiu susijusio geno 29 somatinėms mutacijoms aptikti ir kokybiniam mutacijų būklių įvertinimui pateikti.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ turi naudoti apmokytas personalas specialioje laboratorinėje aplinkoje. Rinkinys skirtas tirti DNR mėginiams, išskirtiems iš formalinu fiksuoto ir parafine esančio nesmulkiaštelinio plaučių vėžio (NSCLC) audinio. Rezultatai skirti padėti gydytojams identifikuoti pacientus, turinčius NSCLC, kuriems gali būti naudingas gydymas tirozino kinazės inhibitoriais.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ skirtas *in-vitro* diagnostikai.

Suvestinė ir paaiškinimas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra paruoštas naudoti rinkinys, skirtas EGFR su vėžiu susijusio geno 29 somatinėms mutacijoms aptikti, naudojant polimerazinę grandininę reakciją (PGR), dirbant su „Rotor-Gene Q“ instrumentu.

Naudojant „Scorpions®“ ir ARMS® technologijas, „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ laukinio tipo genominės DNR fone galima nustatyti šias mutacijas.

- 19 delecijų 19 egzone (aptinka bet kurios iš 19 delecijų buvimą, bet jų neišskiria)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (nustato G719S, G719A arba G719C buvimą, bet jų neišskiria)
- S768I
- 3 intarpus 20 egzone (nustato bet kurio iš 3 intarpų buvimą, bet jų neišskiria).

Naudojami metodai yra didelio selektyvumo laipsnio ir, atsižvelgiant į bendrą DNR kiekį, laukinio tipo genominės DNR fone jais galima aptikti nedidelę mutacijų procentinę dalį. Šios selektyvumo ir aptikimo ribos yra didesnės nei kitų technologijų, pvz., dažų terminatoriaus sekvenavimo.

Procedūros principas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ naudoja dvi technologijas – ARMS ir „Scorpions“ – skirtas mutacijoms aptikti atliekant realiojo laiko PGR tyrimus.

ARMS

Aleliams arba mutacijoms būdingos amplifikacijos gaunamos naudojant ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNR polimerazė (*Taq*) efektyvi atskiriant sutapimą arba nesutapimą PGR pradmenis 3' gale. Konkretios mutavusios sekos gali būti selektyviai amplifikuotos net mėginiuose, kuriuose dauguma sekų nemutuoja. Kai pradmuo visiškai sutampa, amplifikacija vyksta visu greičiu. Kai 3' bazė nesutampa, amplifikacija vyksta tik fone nedideliu greičiu.

Scorpions

Amplifikacija aptinkama taikant „Scorpions“ technologiją. „Scorpions“ yra dvigubos funkcijos molekulės, turinčios PGR pradmenį, kovalentiškai sujungtą su zonda. Zonde esančiam fluoroforui reaguojant su slopinamąja medžiaga, taip pat esančia zonde, sumažinama fluorescencija. Kai PGR tyrimo metu zondas prisijungia prie stiprinamosios medžiagos, fluoroforas ir slopinamoji medžiaga atsiskiria. Dėl šios priežasties reakcijos mėgintuvėlyje padidėja fluorescencija.

„Kit“ formatas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudėtyje yra aštuoni tyrimai:

- Vienas kontrolinis tyrimas (Ctrl)
- Septyni mutacijų tyrimai

Visuose reakcijos mišiniuose yra reagentų, skirtų FAM™ pažymėtoms ieškomoms medžiagoms aptikti, ir vidinės kontrolės medžiagų, pažymėtų HEX™. Šios vidinės kontrolės medžiagos leidžia aptikti inhibitorius, kurie gali lemti klaidingai neigiamus rezultatus. FAM amplifikacija gali nukonkuruoti vidinės kontrolės amplifikaciją, nes vidinės kontrolės tikslas yra tiesiog parodyti, kad tuo atveju, jei FAM amplifikacijos nėra, tai yra teisingas neigiamas rezultatas, o ne nepavykusi PGR reakcija.

Procedūra

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudaro dviejų žingsnių procedūra. Pirmajame etape kontrolinis tyrimas naudojamas visai mėginio DNR įvertinti. Antrajame etape mutacijos ir kontroliniai tyrimai atliekami siekiant nustatyti mutavusios DNR buvimą ar nebuvimą.

Tyrimai:

Kontrolinis tyrimas

Kontrolinis tyrimas, pažymėtas FAM, naudojamas visai DNR mėginyje įvertinti. Šio tyrimo metu amplifikuojama EGFR geno egzono 2 sritis. Pradmenys ir zondai sukurti taip, kad būtų išvengta bet kokių žinomų EGFR polimorfizmų.

Visam DNR kiekiui mėginyje nustatyti primygtinai rekomenduojama naudoti kontrolinės reakcijos mišinį (Ctrl), pateikiamą su „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Kontrolinio tyrimo metu amplifikuojamas EGFR geno 2 egzono regionas. Rekomenduojama mėginius nustatyti tik atlikti kontrolinį tyrimą kaip teigiamas kontrolines medžiagas naudojant EGFR teigiamas kontrolines medžiagas (PC), o kaip nešabloninį kontrolinį medžiagą naudojant vandenį be nukleazės (H₂O).

Pastaba: DNR įvertinimas turėtų būti pagrįstas PGR ir gali skirtis nuo apskaičiavimo, pagrįsto absorbcijos rodmenimis. Papildomas kontrolinės reakcijos mišinys (Ctrl) tiekiamas, kad būtų galima įvertinti mėginiuose esančios DNR kokybę ir kiekybę prieš vykdant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ analizę.

Mutacijų tyrimai

Kiekvieno mutacijų tyrimo sudėtyje yra FAM pažymėtas „Scorpion“ zondas ir ARMS pradmuo, naudojamas norint atskirti laukinio tipo DNR ir specifinę mutavusią DNR.

Kontrolės

Pastaba: Visų eksperimentinių tyrimų serijose turi būti toliau išvardytos kontrolinės medžiagos.

Teigiama kontrolinė medžiaga

Kiekvienoje tyrimo sekoje 1–8 mėgintuvėliuose turi būti teigiama kontrolinė medžiaga. „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra EGFR teigiama kontrolinė medžiaga (PC), kuri naudojama kaip teigiamos kontrolinės medžiagos reakcijos šablonas. Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai įvertinami siekiant įsitikinti, kad rinkinys veikia pagal nurodytus priimtumo kriterijus.

Neigiamos kontrolinės medžiagos

Kiekvienoje tyrimo sekoje 9–16 mėgintuvėliuose turi būti neigiama kontrolinė medžiaga („nešabloninė kontrolinė medžiaga“, NTC). NTC sudaro vanduo be nukleazės (H₂O), naudojamas kaip nešabloninės kontrolinės medžiagos „šablonas“. Nešabloninė kontrolinė medžiaga naudojama vertinti bet kokią galimą užteršimą nustatant tyrimą ir vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos veiksmingumą.

Vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos įvertinimas

Kiekviename reakcijos mišinyje kartu su tikslinės reakcijos medžiaga yra vidinė kontrolinė medžiaga. Nepavykusi reakcija rodo, kad gali būti inhibitorių, dėl kurių gaunami klaidingai neigiami rezultatai, arba kad nustatydamas šį mėgintuvėlį operatorius padarė klaidą.

Jei vidinės kontrolinės medžiagos reakcija nepavyksta dėl PGR inhibicijos, inhibitorių poveikį galima sumažinti praskiedus mėginį, tačiau reikia atminti, kad praskiedžiama ir tikslinė DNR. FAM amplifikacija gali nukonkuruoti vidinės kontrolės amplifikaciją tiek, kad sugeneruota IC C_T (HEX) reikšmė nepateks į nurodytą diapazoną. Šių mėginių FAM rezultatai vis tiek galioja.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

„therascreen EGFR RGQ PCR Kit“			(24)
Katalogo Nr.			870111
Reakcijų skaičius			24
Raudona	Control Reaction Mix (Kontrolinės reakcijos mišinys)	Ctrl	2 x 600 µl
Violetinė	T790M Reaction Mix (T790M reakcijos mišinys)	T790M	600 µl
Oranžinė	Deletions Reaction Mix (Delecijų reakcijos mišinys)	Del	600 µl
Rožinė	L858R Reaction Mix (L858R reakcijos mišinys)	L858R	600 µl
Žalia	L861Q Reaction Mix (L861Q reakcijos mišinys)	L861Q	600 µl
Geltona	G719X Reaction Mix (G719X reakcijos mišinys)	G719X	600 µl
Pilka	S768I Reaction Mix (S768I reakcijos mišinys)	S768I	600 µl
Mėlyna	Insertions Reaction Mix (Intarpų reakcijos mišinys)	Ins	600 µl
Ruda	EGFR Positive Control (EGFR teigiama kontrolinė medžiaga)	PC	300 µl
Melsvai žalsva	Taq DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNR polimerazė)	<i>Taq</i>	138 µl
Balta	Nuclease-Free Water (Vanduo be nukleazės)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
„therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook“ (anglų k.)			1

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartines pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

- DNR išskyrimo rinkinys (žr. „DNR išskyrimas“, 14 psl.)
- Ksilenas
- Etanolis (96–100 %)*
- 1,5 ml arba 2 ml mikrocentrifugos mėgintuvėliai (lizės etapuose)
- 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėliai (išplovimo etapuose) (galima įsigyti „Brinkmann“ [„Safe-Lock“, kat. nr. 022363204], „Eppendorf“ [„Safe-Lock“, kat. nr. 0030 120.086] arba „Sarstedt“ [„Safety Cap“, kat. nr. 72.690])[†]
- Specialios pipetės[‡] (reguliuojamos), skirtos mėginiams ruošti
- Specialios pipetės[‡] (reguliuojamos), skirtos PGR pagrindiniams mišiniams ruošti
- Specialios pipetės[‡] (reguliuojamos), skirtos DNR matricai paskirstyti*
- Pipečių antgaliai su filtrais be DNR-azės, RNR-azės ir DNR (siekiant išvengti kryžminio užteršimo, rekomenduojame naudoti pipečių antgalius su aerozoliniais barjeriais)
- Termostatinis maišytuvas, šildomas žiedinis maišymo inkubatorius, kaitinimo blokas arba vandens vonelė, galinti inkubuoti esant 90 °C[‡]
- Stalinė centrifuga[‡] su rotoriumi 2 ml reakcijos mėgintuvėliams
- Sūkurinė maišyklė („vortex“)
- „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentas^{‡§} su fluorescenciniais kanalais, skirtais „Cycling Green“ ir „Cycling Yellow“ (atitinkamai FAM ir HEX aptikimui)
- „Rotor-Gene Q“ programinė įranga, 2.0.2 versija arba naujesnė
- „Strip Tubes and Caps“ (mėgintuvėlių ir dangtelių juostelės), 0,1 ml, skirtos naudoti su 72 šulinėlių rotoriumi (kat. Nr. 981103 arba 981106)

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

[†] Sąraše nurodyti ne visi tiekėjai.

[‡] Patikrinkite, ar visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

[§] „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ instrumentas, jei yra.

Kai kuriose šalyse dar vadinamas „Rotor-Gene Q MDx“.

- Mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai be DNR-azės, RNR-azės ir DNR, skirti pagrindiniams mišiniams ruošti
- Įkrovos blokas 72 x 0,1 ml mėgintuvėliams, aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete (QIAGEN, kat. nr. 9018901)

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas „in vitro“ diagnostikai

Saugos informacija

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety. Čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Skubi informacija visą parą

Pagalbą dėl cheminio pavojaus arba nelaimingų atsitikimų visą parą teikia:
CHEMTREC

JAV ir Kanadoje ■ Tel.: 1-800-424-9300

Ne JAV ir Kanadoje ■ Tel.: +1-703-527-3887 (priimami skambučiai, kai apmoka adresatas)

Bendrosios atsargumo priemonės

Naudotojas visada turi atkreipti dėmesį:

- Naudokite pipelių antgalius be DNR-azės, RNR-azės ir DNR, su filtrais ir užtikrinkite, kad pipetės būtų sukalibruotos pagal gamintojo nurodymus.
- Teigiamas medžiagas (mėginius ir teigiamas kontrolines medžiagas) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Prieš pradėdami tyrimą visus komponentus gerai atšildykite kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Atšildę, sumaišykite komponentus (vartydami kiekvieną mėgintuvėlį 10 kartų) ir trumpai centrifuguokite.

Pastaba: Būkite ypač atsargūs, kad neužterštumėte PGR reakcijų sintetine kontroline medžiaga. Reakcijos mišiniams paruošti ir DNR matricai pridėti rekomenduojama naudoti atskiras specialias pipetes. Reakcijos mišiniai turi būti ruošiami ir paskirstomi kitoje vietoje nei ta, kurioje pridedama matrica.

Pabaigus PGR tyrimų seriją „Rotor-Gene Q“ mėgintuvėlių atidaryti negalima. Taip išvengsite laboratorijos užteršimo galutiniais PGR produktais.

Pastaba: reagentai patvirtinti rankiniam nustatymui. Jei naudojamas automatizuotas metodas, galimų reakcijų skaičius gali sumažėti dėl instrumentų „nulinį tūrį“ reikalingo užpildyti reagento.

Pastaba: Visi reagentai, esantys „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, yra pritaikyti naudoti aprašytiems tyrimams. Visi „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Norint išlaikyti optimalų rinkinio veikimą, negalima naudoti reagentų pakaitalų.

Pastaba: Naudokite tik rinkinyje pateikiamą *Taq* DNR polimerazę (*Taq*). Nepakeiskite jos kita *Taq* DNR polimeraze iš to paties ar kito tipo rinkinio, taip pat nekeiskite *Taq* DNR polimeraze, gauta iš kito tiekėjo.

Pastaba: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ reagentai yra optimaliai atskiesti. Daugiau reagentų skiesti nerekomenduojama, nes gali sumažėti jų veiksmingumas. Nerekomenduojama naudoti mažesnių negu 25 µl reakcijos tūrių, nes tai didina klaidingai neigiamų rezultatų riziką.

Reagentų laikymas ir naudojimas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ turinys turi būti pristatomas ir pristatymo metu laikomas šaldytas sausame lede. Jei pristatymo metu „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ nelaikomas šaldytas, pervežant atidaryta išorinė pakuotė, nėra pakavimo lapų, naudojimo instrukcijų arba reagentų, susiekite su vienu iš QIAGEN Techninio aptarnavimo skyrių arba vietinių platintojų (žr. viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ iš karto reikia padėti laikyti nuo –15 °C iki –25 °C temperatūroje, pastovią temperatūrą palaikančiame ir apsaugotame nuo šviesos šaldiklyje. Laikant rekomenduojamomis laikymo sąlygomis originalioje pakuotėje rinkinys yra stabilus iki ant etiketės nurodytos tinkamumo datos. Venkite pakartotinai atšildyti ir užšaldyti. Rekomenduojame ne daugiau nei 7 užšaldymo ir atšildymo ciklus.

Pastaba: norint užtikrinti optimalų aktyvumą ir eksploatacines savybes, „Scorpions“ (kaip ir visos fluorescenciškai pažymėtos molekulės) turi būti saugomi nuo šviesos, kad neišblukytų.

Pastaba: norėdami optimaliai panaudoti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ reagentus, mėginius turite apdoroti partijomis. Jei mėginiai tiriami atskirai, sunaudojama daugiau reagentų, todėl sumažėja mėginių, kuriuos galima ištirti naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, skaičius.

Mėginių naudojimas ir laikymas

Pastaba: su visais mėginiais turi būti elgiamasi kaip su potencialiai užkrečiama medžiaga.

Mėginių medžiaga turi būti žmogaus genomo DNR, gauta iš formalinu fiksuoto ir parafine esančio (FFPE) nesmulkiaštelinio plaučių vėžio auglio mėginių. Mėginius būtina transportuoti pagal standartinį patologinį metodą, kad būtų užtikrinta mėginių kokybė.

Auglio mėginiai yra nehomogeniški, o auglio mėginio duomenys gali neatitikti kitų to paties auglio dalių mėginių duomenų. Auglio mėginiuose taip pat gali būti ne auglio audinių. Ne auglio audinio DNR neturi EGFR mutacijų, aptinkamų naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“.

Procedūra

EGFR analizei reikalingo auglio ląstelių lygio nustatymas

EGFR analizei naudojamas audinys yra formalinu fiksuoto ir parafine esantis (FFPE) nesmulkiaštelinio plaučių vėžio mėginių (NSCLC) audinys. Iš šio auglio audinio ląstelių gauta DNR gali būti laukinio tipo EGFR mutacijų atžvilgiu arba turėti vieną ar daugiau mutacijų.

Ekstrahuoti naudojamame FFPE NSCLC audinyje gali būti normalaus, ne auglio audinio, kuris EGFR mutacijų atžvilgiu bus laukinio tipo. Iš šio audinio gautą laukinio tipo DNR galima skiesti mutavusia DNR, potencialiai iki tokio lygio, kuris nebeaptinkamas naudojant rinkinį. Tačiau rekomenduojama tirti ir tuos mėginius, kuriuose auglio kiekis nedidelis, nes juose galima aptikti aukštą mutacijų lygį ir priimti sprendimą dėl paciento gydymo.

Norėdami maksimaliai padidinti mutacijų aptikimo galimybes, vykdykite toliau pateiktus nurodymus.

- Dažykite hematoksilinu ir eozinu (H&E) bent vieną kiekvieno paciento mėginio objektinį stiklėlį.
- Pateikite nudažytą objektinį stiklėlį patikrinti, ar yra auglys, patologui.
- Jei įmanoma, patologas turėtų peržiūrėti keletą objektinių stiklelių iš FFPE bloko.
- Visus mėginius su augliu galima tirti naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“.

DNR išskyrimas

Išskirti DNR reikia naudojant „QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit“.

Vykdykite DNR gryninimą pagal „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ vadove pateiktus nurodymus, atsižvelgdami į šiuos pakeitimus.

- FFPE pjūvius surinkite ant stiklinių objektinių stiklelių.
- Parafino perteklių aplink audinio pjūvius pašalinkite naudodami naują sterilų skalpelį.
- Nugramdykite audinio pjūvio medžiagos į mikrocentrifugos mėgintuvėlius kiekvienam mėginiui naudodami naują skalpelį.
- Proteinazės K veikimas turi būti vykdomas 1 valandą.
- Išgryninta genominė DNR turi būti išplauta 200 µl ATE buferio (pateikiamo „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“).
- Išgrynintą genomine DNR laikykite nuo –15 °C iki –30 °C temperatūroje.
- Kai turima informacija, reikia naudoti objektinius stiklelius esančius greta H&E dažytų objektinių stiklelių, kuriuose yra didžiausias kiekis auglio.

Pastaba: visų „therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ esančių tyrimų metu sugeneruojami trumpi PGR produktai. Vis dėlto „therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ neveiks stipriai fragmentuotos DNR.

Protokolas: Mėginių įvertinimas

Šis protokolas naudojamas visam amplifikuojamam DNR kiekiui mėginiuose įvertinti.

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą paskaitykite „Bendrosios atsargumo priemonės“, 11 psl.
- Prieš pradėdami protokolą skirkite laiko susipažinti su „Rotor-Gene Q“. Peržiūrėkite instrumento naudotojo vadovą.
- Nevartykite *Taq* DNR polimerazės (*Taq*) arba bet kokio mišinio, kuriame yra *Taq* DNR polimerazės (*Taq*), nes tai gali deaktyvinti fermentą.
- Pipete įlašinkite *Taq* DNR polimerazės (*Taq*): pipetės antgalį įkiškite skysčio paviršiuje, kad antgalis nepasidengtų fermentų pertekliumi.

Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Prieš kiekvieną naudojimą visus reagentus reikia visiškai atšildyti kambario temperatūroje (15–25 °C), sumaišyti (vartant 10 kartų) ir trumpai centrifuguoti, kad turinį galima būtų surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.
- Prieš kiekvieną naudojimą leiskite *Taq* DNR polimerazei (*Taq*) pasiekti kambario temperatūrą (15–25 °C). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

Procedūra

1. **Atšildykite kontrolinės reakcijos mišinį (Ctrl), vandenį be nukleazės, skirtą nešabloninei kontrolinei medžiagai (NTC), ir EGFR teigiamą kontrolinę medžiagą (PC) kambario temperatūroje (15–25 °C). Reagentams atšilus, sumaišykite (vartydami 10 kartų), kad nesusikauptų druskos, ir trumpai centrifuguokite, kad turinį galėtumėte surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.**
2. **Paruoškite pakankamai pagrindinių mišinių DNR mėginiams, vienai teigiamos kontrolinės medžiagos reakcijai ir vienai nešabloninės kontrolinės medžiagos reakcijai pagal Lentelę 1 tūrius. Įtraukite reagentus vienam papildomam mėginiui, kad jų pakaktų PGR nustatyti.**

Pagrindiniuose mišiniuose yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

Lentelė 1. Kontrolinio tyrimo pagrindinio mišinio ruošimas*

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
Kontrolinės reakcijos mišinys (Ctrl)	19,5
<i>Taq</i> DNR polimerazė (<i>Taq</i>)	0,5
Bendrasis tūris	20,0

* Paruoškite pagrindinio mišinio tiek, kad pakaktų ir vienam papildomam mėginiui.

3. Gerai sumaišykite pagrindinį mišinį lėtai lašindami pipete į viršų ir į apačią 10 kartų. Nedelsdami pridėkite 20 μl pagrindinio mišinio į PGR mėgintuvėlių juostelę (nepateikiama).

Pastaba: Norint įvertinti mėginį, kontrolinio tyrimo pagrindinio mišinio reikia įpilti į vieną teigiamos kontrolinės medžiagos šulinėlį, į vieną neigiamos kontrolinės medžiagos šulinėlį ir į vieną kiekvieno mėginio šulinėlį.

4. Nedelsdami įpilkite 5 μl vandens be nukleazės mėginio (H₂O) į nešabloninės kontrolinės medžiagos mėgintuvėlį (PGR mėgintuvėlis nr. 9) ir uždenkite mėgintuvėlį dangteliu. Įpilkite 5 μl DNR mėginio į mėginių mėgintuvėlius ir uždenkite mėgintuvėlius dangteliais. Įpilkite 5 μl EGFR teigiamos kontrolinės medžiagos (PC) į teigiamos kontrolinės medžiagos mėgintuvėlį (PCR mėgintuvėlis nr. 1) ir uždenkite mėgintuvėlį dangteliu.
5. Įstatykite PGR mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas rotorius ir apžiūrėkite, ar visuose mėgintuvėliuose tūriai vienodi.
Pastaba: Įsitikinkite, kad perkelti mėgintuvėlių juosteles į rotorius jos nepersisuko.
6. Jei rotorius užpildytas ne visas, į likusias vietas įstatykite uždengtus tuščius mėgintuvėlius.
7. Nedelsdami įdėkite 72 šulinėlių rotorius į „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ instrumentą. Įsitikinkite, ar fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene Q“ instrumento priedas) yra uždėtas ant rotorius, kad tyrimo serijos metu mėgintuvėliai būtų pritvirtinti.
8. Kaip sukurti temperatūros profilį ir pradėti vykdymo seką, žr. „Rotor-Gene Q“ instrumento nustatymą (žr. „Protokolas: „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas“, 21 psl.).

Lentelė 2. Ciklo parametrai

Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Žalia ir geltona

- 9. Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal „Mėginių įvertinimo duomenų analizė“, 30 psl.**

Protokolas: EGFR mutacijų aptikimas

Šis protokolas skirtas EGFR mutacijoms aptikti. Atlikus mėginio įvertinimą, jį galima tirti naudojant EGFR mutacijos tyrimus.

Svarbi informacija prieš pradedant

- Prieš pradėdami procedūrą paskaitykite „Bendrosios atsargumo priemonės“, 11 psl.
- Prieš pradėdami protokolą skirkite laiko susipažinti su „Rotor-Gene Q“. Peržiūrėkite instrumento naudotojo vadovą.
- Nevartykite *Taq* DNR polimerazės (*Taq*) arba bet kokio mišinio, kuriame yra *Taq* DNR polimerazės, nes tai gali deaktyvinti fermentą.
- Norėdami efektyviai naudoti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, mėginius sugrupuokite į partijas po 7, kad būtų užpildytas 72 šulinėlių rotorius. Naudodami mažesnes partijas, „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ ištirsite mažiau mėginių.
- Pipete įlašinkite *Taq*: pipetės antgalį įkiškite skysčio paviršiuje, kad antgalis nepasidengtų fermentų pertekliumi.
- Kiekvieno DNR mėginio kontrolinius ir mutacijų tyrimus būtina išanalizuoti tos pačios PGR tyrimų serijos metu, kad būtų išvengta skirtumų, atsirandančių dėl skirtingų tyrimų serijų.

Prieš pradedant atliekami veiksmai

- Prieš kiekvieną naudojimą visus reagentus reikia visiškai atšildyti kambario temperatūroje (15–25 °C), sumaišyti (vartant 10 kartų) ir trumpai centrifuguoti, kad turinį galima būtų surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.
- Kiekvieną kartą prieš naudodami įsitikinkite, kad *Taq* yra kambario temperatūros (15–25 °C). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

Procedūra

1. Atšildykite reakcijos mišinius, vandenį be nukleazės, skirtą nešabloninei kontrolinei medžiagai (NTC), ir EGFR teigiamą kontrolinę medžiagą (PC) kambario temperatūroje (15–25 °C). Reagentams atšilus, sumaišykite (vartydami 10 kartų), kad nesusikauptų druskos, ir trumpai centrifuguokite, kad turinį galėtumėte surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.
2. Paruoškite pakankamai pagrindinių mišinių DNR mėginiams, vienai teigiamos kontrolinės medžiagos reakcijai ir vienai nešabloninės kontrolinės medžiagos reakcijai pagal Lentelę 3 tūrius. Įtraukite

reagentus vienam papildomam mėginiui, kad jų pakaktų PGR nustatyti.

Pagrindiniuose mišiniuose yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

Lentelė 3. Pagrindinių mišinių ruošimas*

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
Reakcijos mišinys	19,5
<i>Taq</i> DNR polimerazė (<i>Taq</i>)	0,5
Bendrasis tūris	20,0

* Paruoškite pagrindinio mišinio tiek, kad pakaktų ir vienam papildomam mėginiui.

- 3. Gerai sumaišykite kiekvieną pagrindinį mišinį lėtai lašindami pipete į viršų ir į apačią 10 kartų. Nedelsdami įpilkite 20 μl pagrindinio mišinio į kiekvieną PGR mėgintuvėlių juostelę (nepateikiama).**
- 4. Nedelsdami įpilkite 5 μl vandens be nukleazės (H₂O) į nešabloninės kontrolinės medžiagos PGR mėgintuvėlių juosteles (PGR mėgintuvėliai nr. 9–16) ir uždenkite mėgintuvėlį dangteliu. Įpilkite po 5 μl kiekvieno mėginio į mėginių mėgintuvėlius (PGR mėgintuvėliai nr. 17–72) ir uždenkite mėgintuvėlius dangteliais. Įpilkite 5 μl EGFR teigiamos kontrolinės medžiagos (PC) į teigiamos kontrolinės medžiagos mėgintuvėlius (PCR mėgintuvėliai nr. 1–8). Turi būti atliktas kiekvieno DNR mėginio ir kontrolinis, ir visų mutacijų tyrimai. Išsidėstymas pavaizduotas Lentelė 4.**

Lentelė 4. Kontrolinio ir mutacijų tyrimų išsidėstymas

Tyrimas	Kontrolės		Mėginio numeris						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Delecijos	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Intarpai	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Įstatykite PGR mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas rotoriaus vietas ir apžiūrėkite, ar visuose mėgintuvėliuose tūriai vienodi.

Pastaba: įsitikinkite, kad perkeliant mėgintuvėlių juosteles į rotorius jos nepersisuko.

- Jei rotorius užpildytas ne visas, į likusias vietas įstatykite uždengtus tuščius mėgintuvėlius.
- Nedelsdami įdėkite rotorį į „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ instrumentą. Įsitikinkite, ar fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene Q“ instrumento priedas) yra uždėtas ant rotoriaus, kad tyrimo serijos metu mėgintuvėliai būtų pritvirtinti.
- Kaip sukurti temperatūros profilį ir pradėti vykdymo seką, žr. „Rotor-Gene Q“ instrumento nustatymą (žr. „Protokolas: „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas“, 21 psl.).

Lentelė 5. Ciklo parametrai

Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Žalia ir geltona

- Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal „EGFR mutacijų duomenų analizė“, 33 psl.■

Protokolas: „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas

Šis protokolas nurodytas „Protokolas: Mėginių įvertinimas“, 15 psl., ir „Protokolas: EGFR mutacijų aptikimas“, 18 psl.

Procedūra

1. Sukurkite temperatūros profilį atlikdami toliau nurodytus veiksmus.

Bendrų tyrimo parametrų nustatymas	1–3 pav.
Pradinis „hot-start“ (karštojo paleidimo) fermento aktyvinimas	4
DNR amplifikacija	5–7 pav.
Fluorescencinių kanalų koregavimas	8–12 pav.
Tyrimo serijos pradžia	13

Toliau pateikti apibendrinti ciklo parametrai.

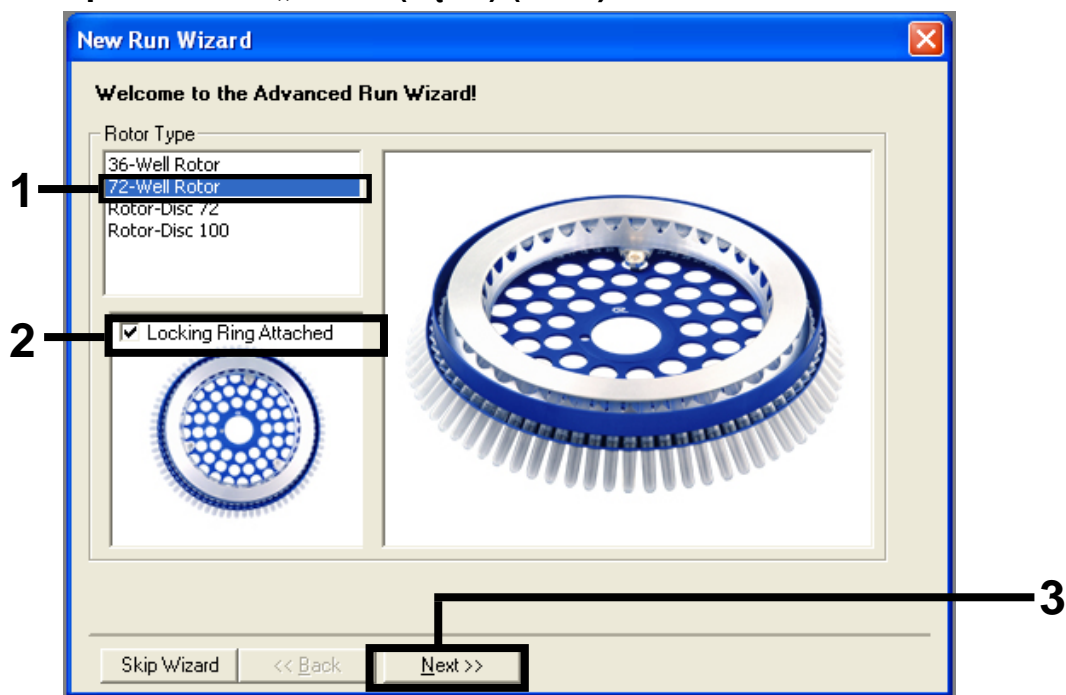
Lentelė 6. Ciklo parametrai

Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Žalia ir geltona

Visų specifikacijų ieškokite „Rotor-Gene Q“ 2.0.2 versijos programinėje įrangoje. Daugiau informacijos apie „Rotor-Gene“ instrumentų programavimą ieškokite instrumento naudotojo vadove. Iliustracijose šie nustatymai pateikiami paryškintame juodame rėmelyje.

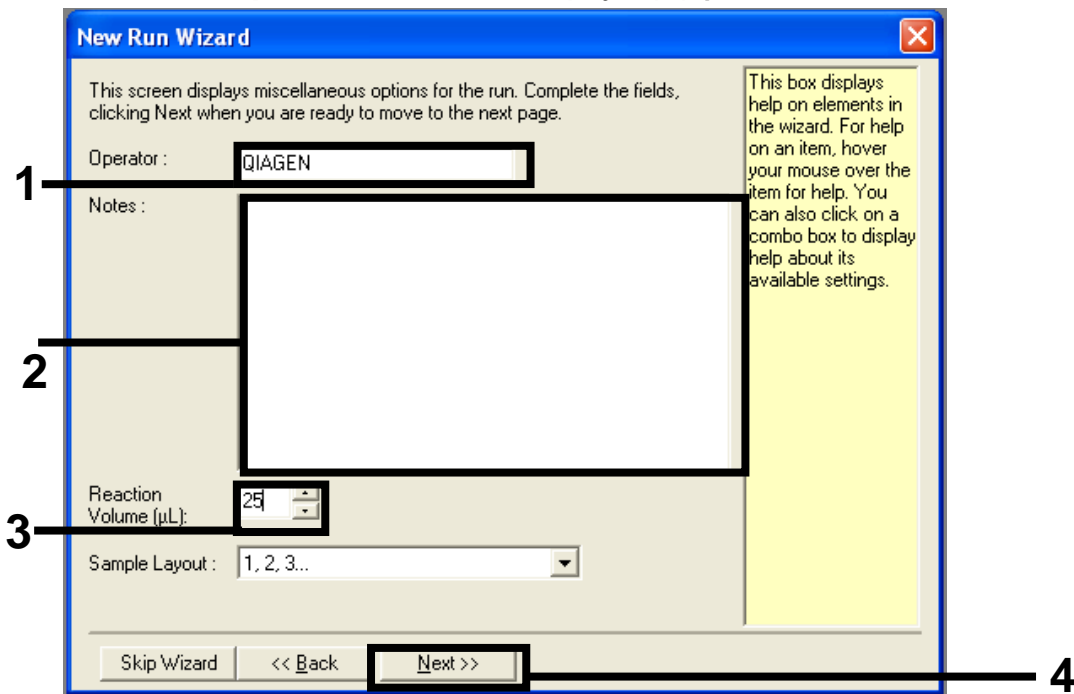
- Dukart spustelėkite „Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2“ programinės įrangos piktogramą kompiuterio, sujungto su „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ instrumentu, darbalaukyje. Pasirodžiusiame dialogo lange „New Run“ (Nauja tyrimų serija) pasirinkite skirtuką „Advanced“ (Išplėstinis).**
- Norėdami sukurti naują šabloną, pasirinkite „Empty Run“ (Tuščia tyrimų serija), tada spustelėkite „New“ (Nauja) ir įveskite „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys).**
- Pasirinkite rotoriaus tipą *72-Well Rotor* (72 šulinėlių rotorius). Patvirtinkite, kad fiksuojamasis žiedas uždėtas, ir pažymėkite langelį**

„Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas).
Spustelėkite „Next“ (Tęsti) (1).



1 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys).

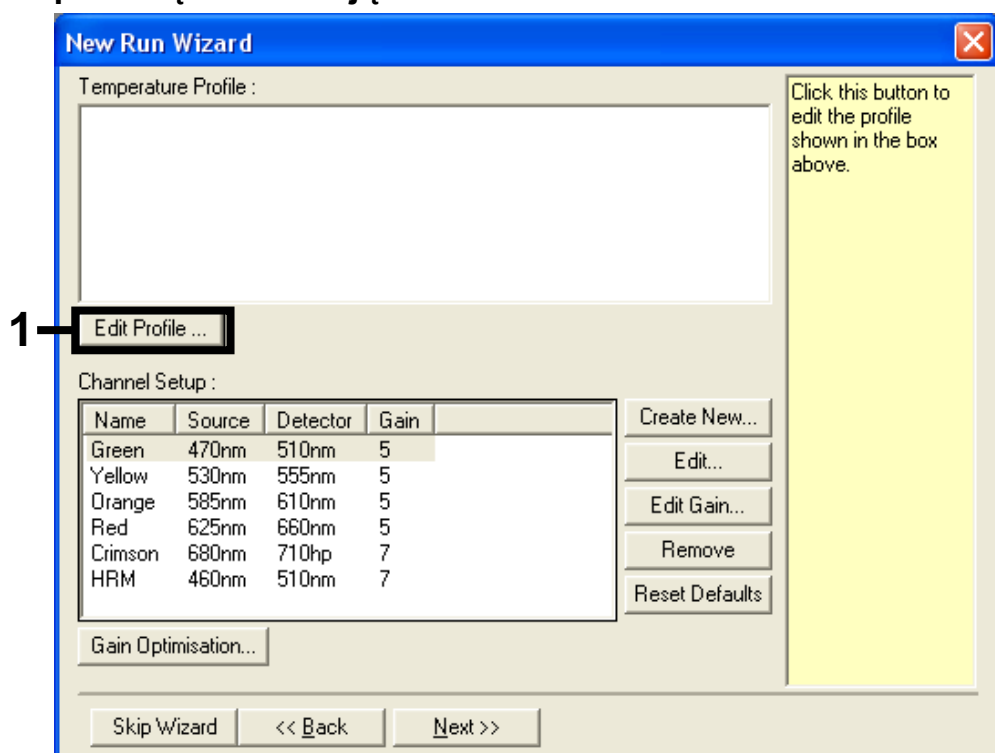
5. Įveskite operatoriaus vardą. Įtraukite pastabas ir įveskite reakcijos tūrį 25. Patikrinkite, ar „Sample Layout“ (Mėginio išdėstymas) yra „1,2,3...“. Spustelėkite „Next“ (Tęsti) (2).



2 pav. Bendrų tyrimo parametrų nustatymas.

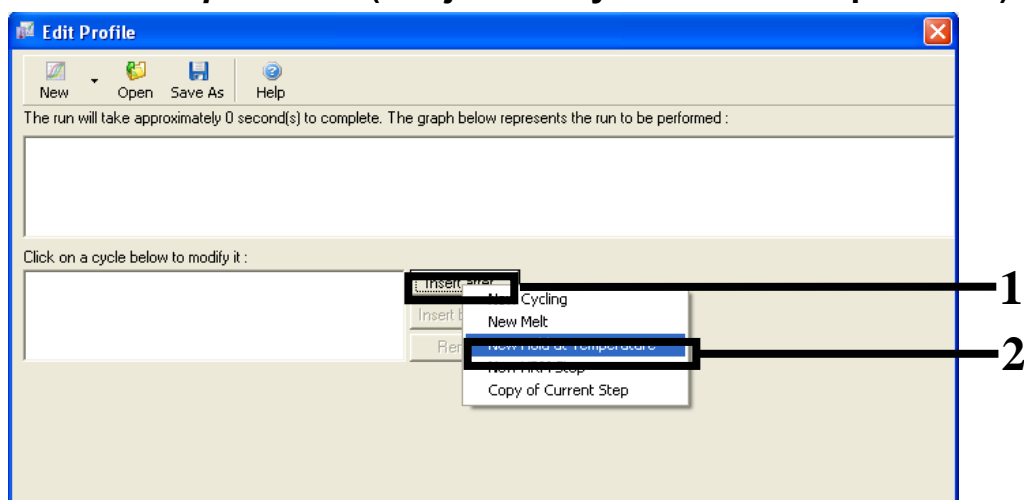
6. Kitame dialogo lange „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys) spustelėkite mygtuką „Edit Profile“ (Redaguoti profilį) (3) ir

programuokite temperatūros profilį pagal paskesniuose veiksmuose pateiktą informaciją.



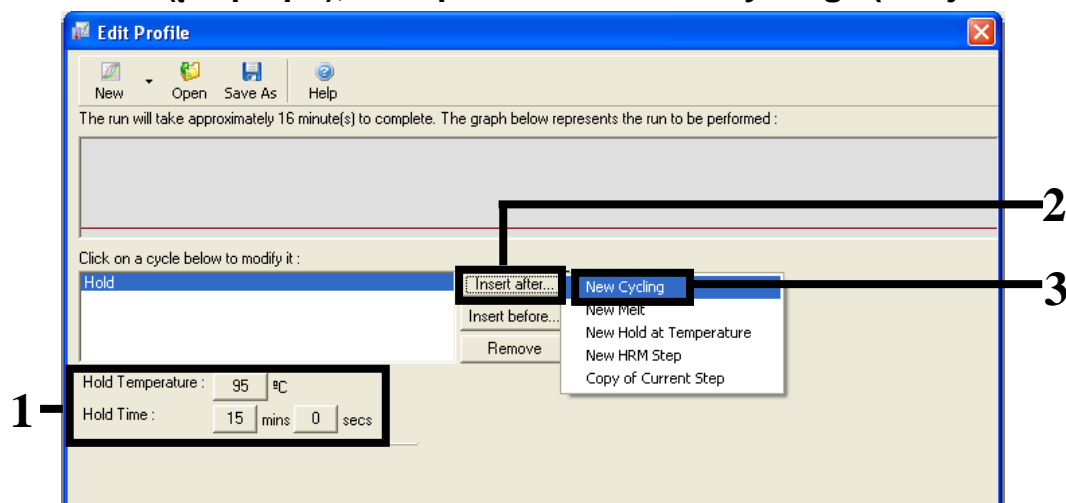
3 pav. Profilio redagavimas.

7. Spustelėkite mygtuką „Insert after“ (Įterpti po) ir pasirinkite „New Hold at Temperature“ (Naujas išlaikymas esant temperatūrai) (4).



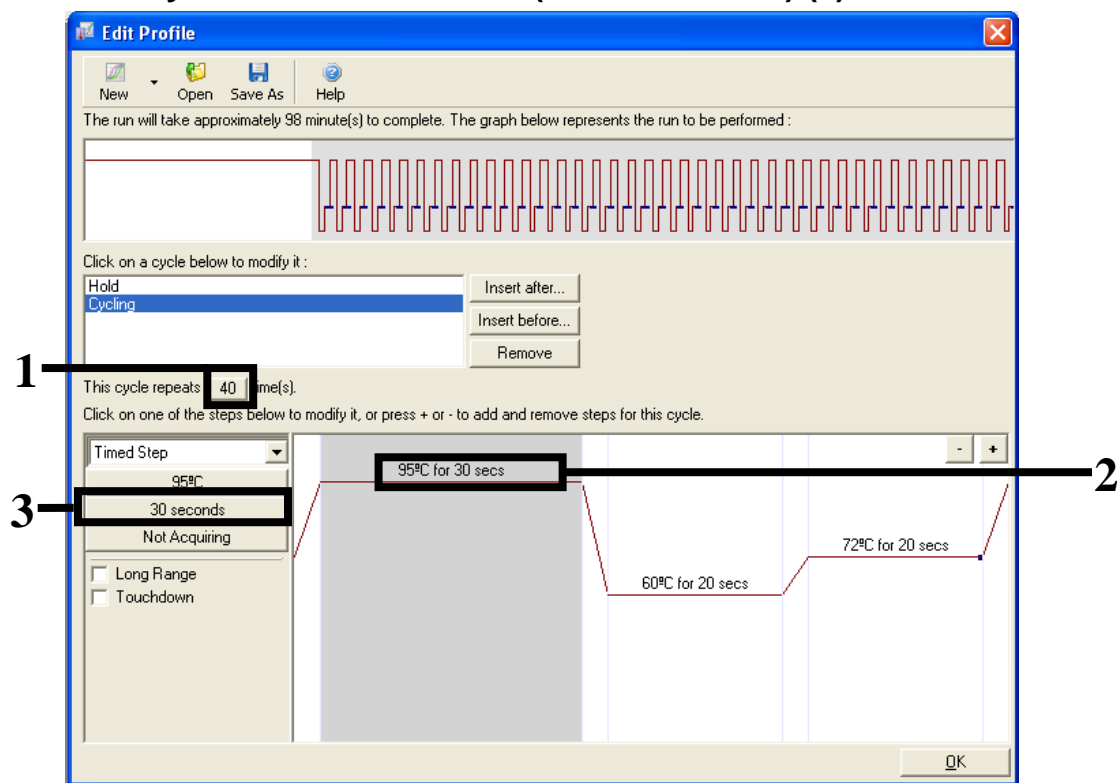
4 pav. Pradinis inkubacijos žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

8. Pakeiskite „Hold Temperature“ (Išlaikymo temperatūrą) į 95 °C ir „Hold Time“ (Išlaikymo laiką) į 15 min. Spustelėkite mygtuką „Insert After“ (Įterpti po), tada pasirinkite „New Cycling“ (Naujas ciklas) (5).



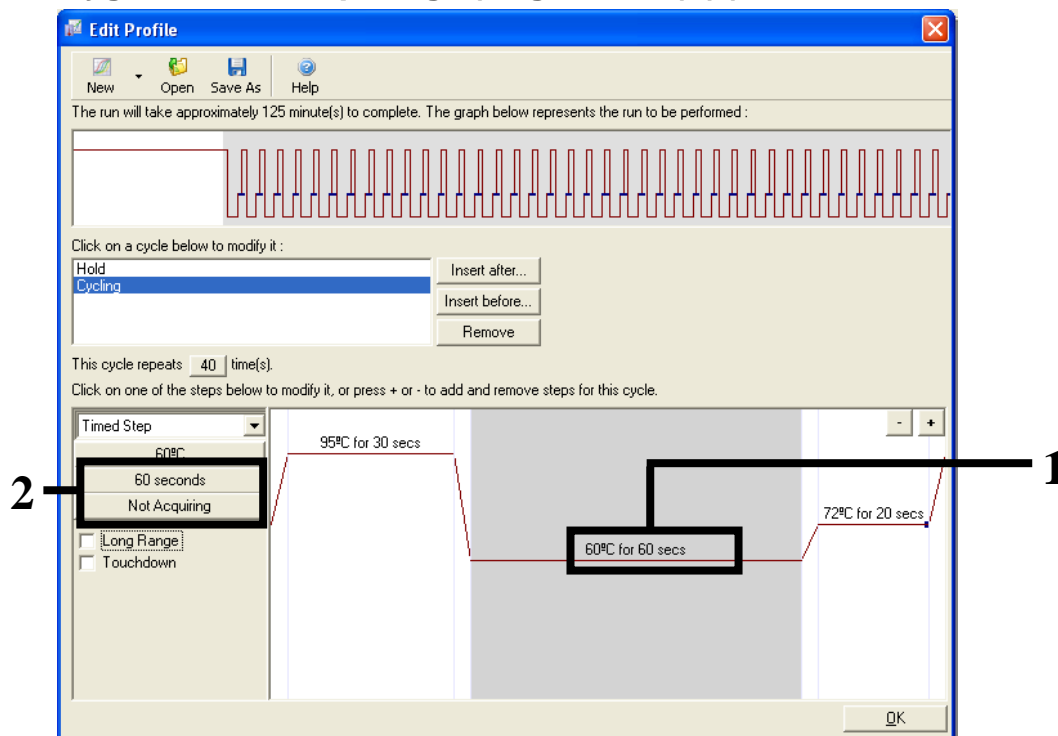
5 pav. Pradinis inkubacijos žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

9. Pakeiskite ciklo kartojimų skaičių į 40. Pasirinkite pirmą žingsnį ir nustatykite 95°C for 30 secs (95 °C – 30 sek.) (6).



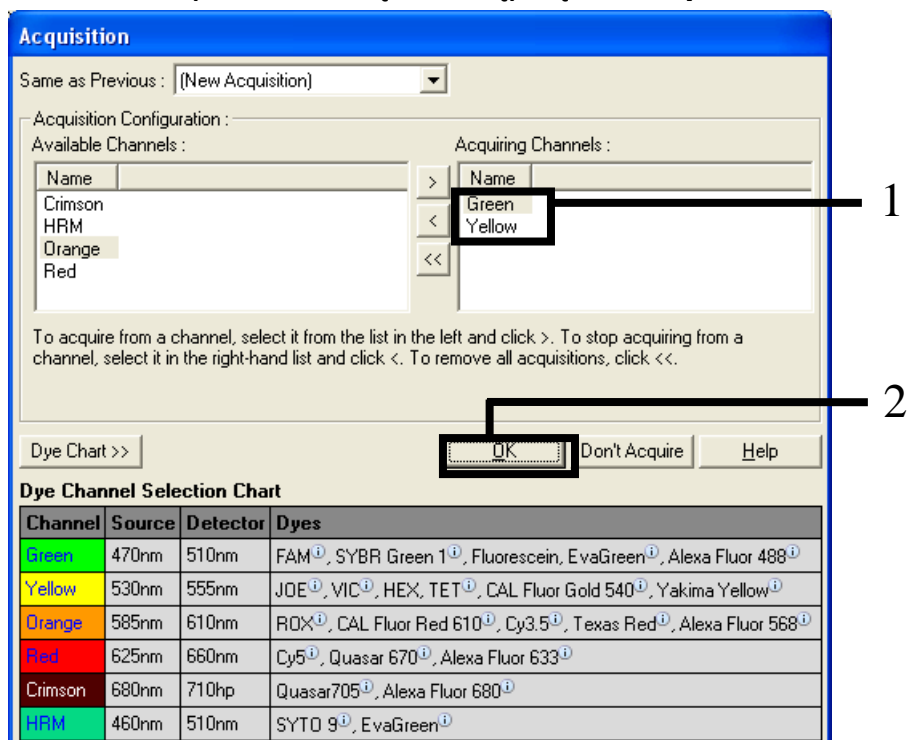
6 pav. Ciklo žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

10. Pasirinkite antrą žingsnį ir nustatykite **60 °C for 60 secs** (60 °C – 60 sek.). Šiame žingsnyje įgalinkite duomenų gavimą pasirinkdami mygtuk¹ „Not Acquiring“ (Negaunama) (7).



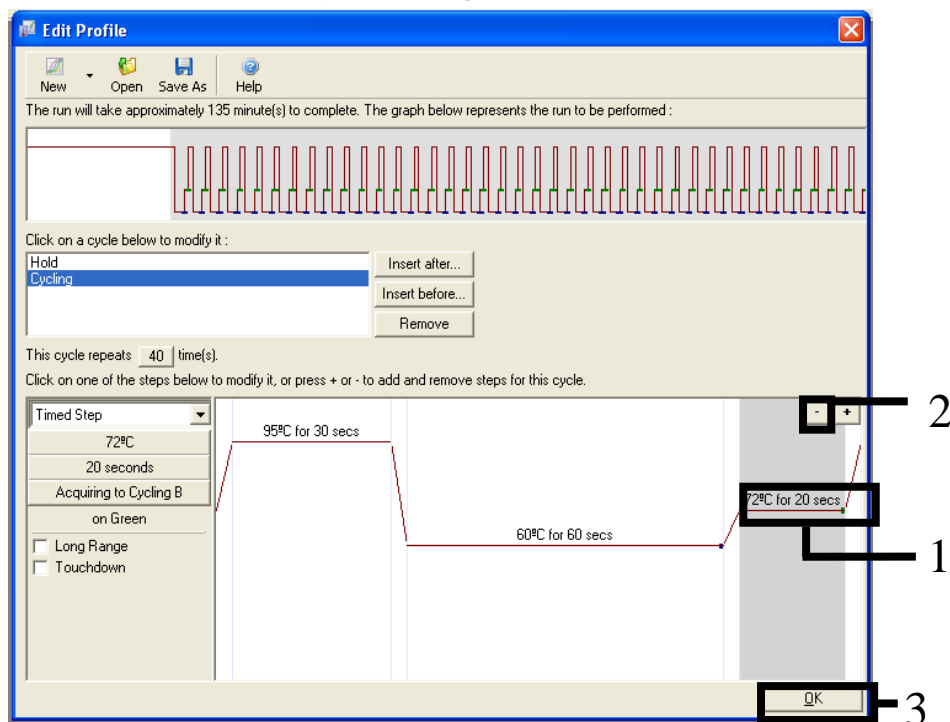
7 pav. Ciklo žingsnis esant 60 °C temperatūrai.

11. Nustatykite **Green** (Žalia) ir **Yellow** (Geltona) gavimo kanalus pasirinkdami mygtuką „>“, kad perkeltumėte juos iš „Available Channels“ (Pasiekiamų kanalų) sąrašo. Spustelėkite „OK“ (Gerai) (8).



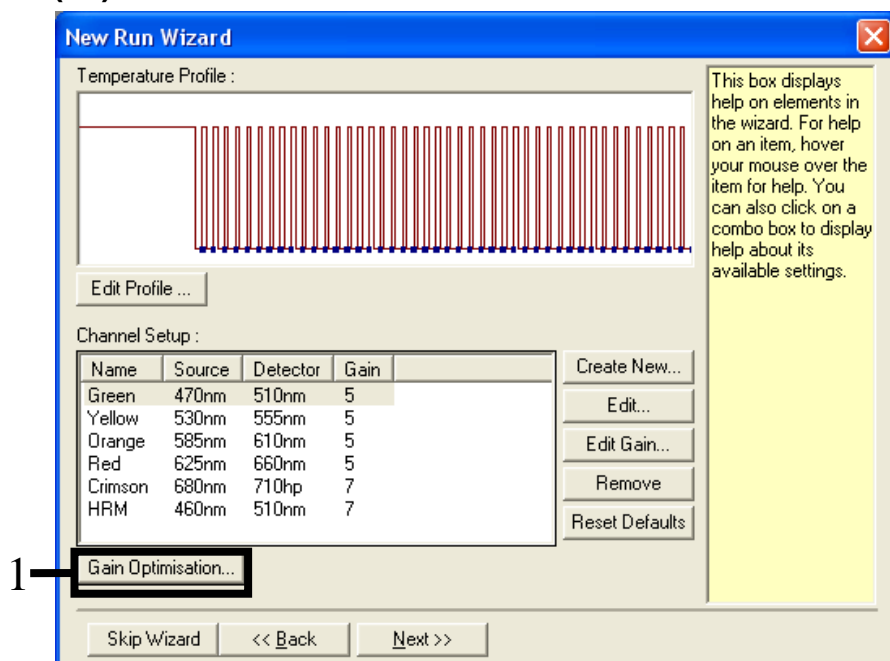
8 pav. Gavimas atliekant ciklo žingsnį esant 60 °C temperatūrai.

12. Pažymėkite trečią žingsnį ir panaikinkite spustelėdami mygtuką „-“. Spustelėkite „OK“ (Gerai) (9).



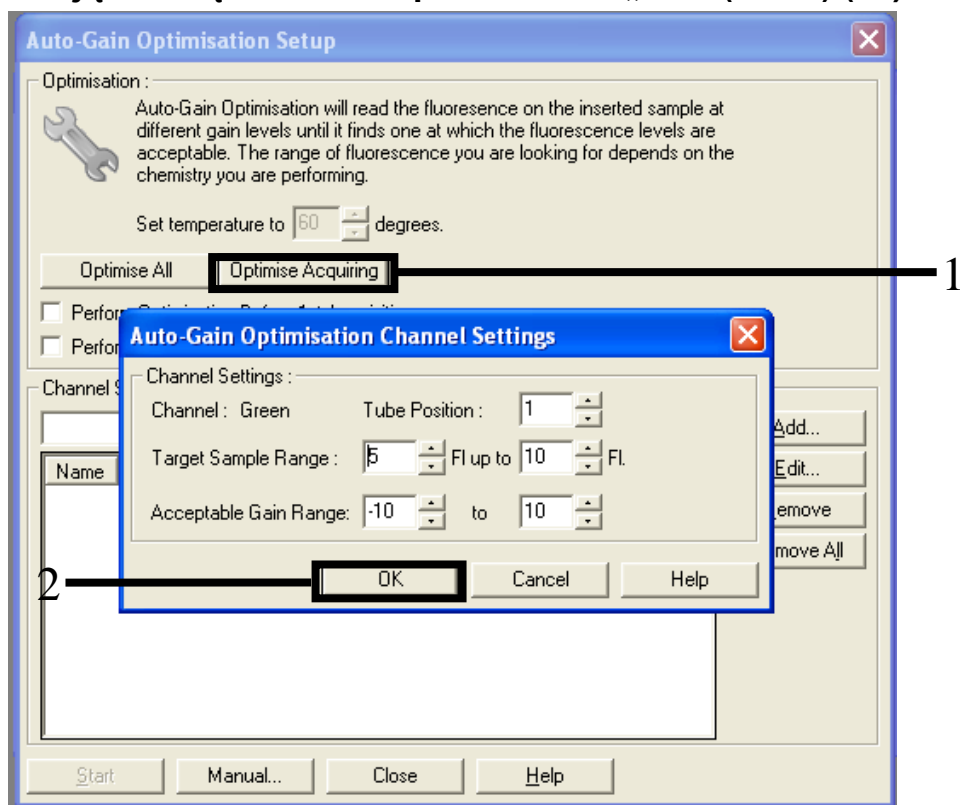
9 pav. Išplėtimo žingsnio pašalinimas.

13. Spustelėkite mygtuką „Gain Optimisation“ (Gavimo optimizavimas) (10).



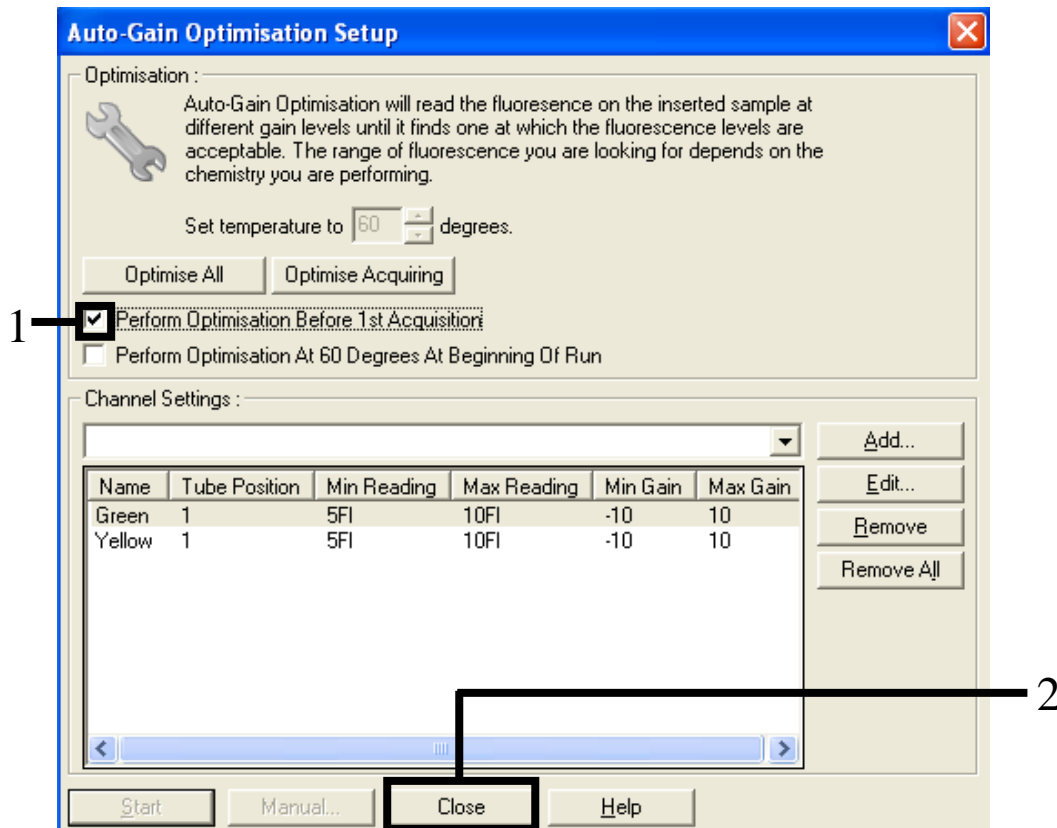
10 pav. Gavimo optimizavimas.

14. Spustelėkite mygtuką „Optimise Acquiring“ (Optimizuoti gavimą). Rodomi kiekvieno kanalo nustatymai. Priimkite šias numatytąsias abiejų kanalų reikšmes spustelėdami „OK“ (Gera) (11).



11 pav. Automatinis žalio kanalo gavimo optimizavimas.

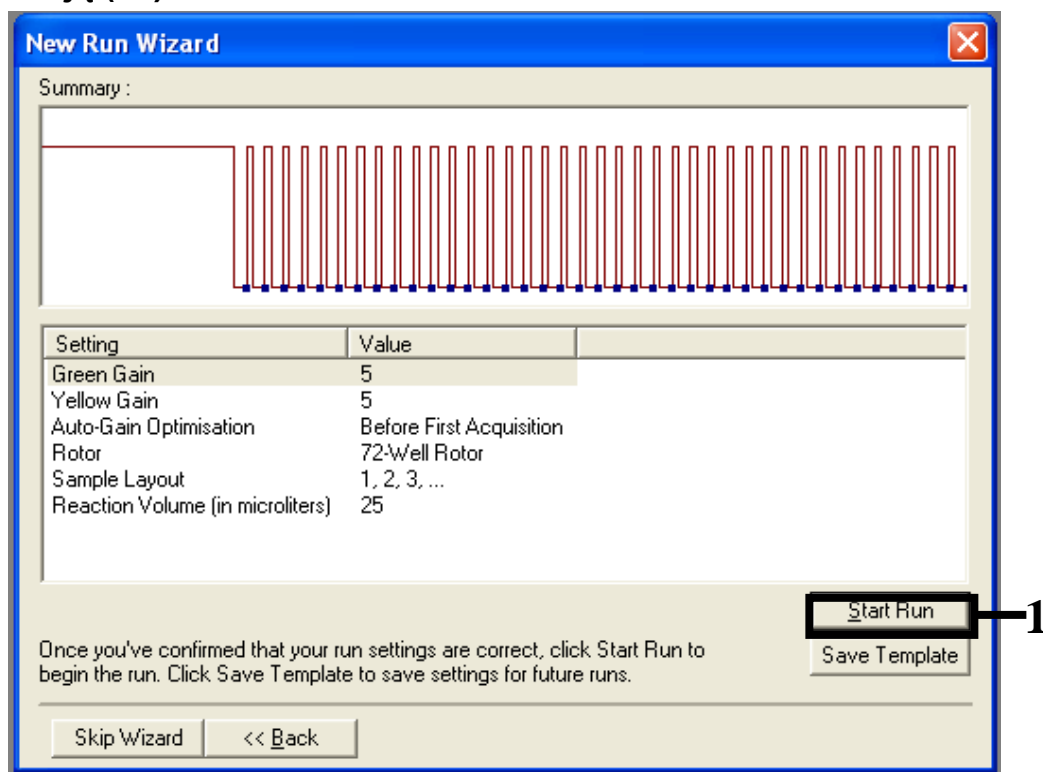
15. Pažymėkite langelį „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą), tada spustelėkite mygtuką „Close“ (Uždaryti) ir grįžkite į vedlį (12).



12 pav. Žalio ir geltono kanalų pasirinkimas.

16. Spustelėkite „Next“ (Tęsti), kad įrašytumėte šablono atitinkamoje vietoje, pasirinkdami „Save Template“ (Įrašyti šablono).

17. Patikrinkite suvestinę, tada spustelėkite „Start Run“ (Pradėti tyrimų seriją), kad įrašytumėte tyrimų serijos failą ir pradėtumėte tyrimų seriją (13).



13 pav. Tyrimo serijos pradžia.

18. Prasidėjus tyrimų serijai pasirodo naujas langas, kuriame dabar galite įvesti mėginių pavadinimus arba spustelėti „Finish“ (Baigti) ir įvesti juos vėliau, tyrimo sekos vykdymo metu arba tyrimų sekai pasibaigus pasirinkę mygtuką „Sample“ (Mėginys).
19. Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal atitinkamą protokolą.
- Mėginio įvertinimą žr. „Mėginių įvertinimo duomenų analizė“, 30 psl.
 - Mutacijų analizę žr. „EGFR mutacijų duomenų analizė“, 33 psl.

Rezultatų aiškinimas

ΔC_T analizės metodas

„Scorpions“ realiojo laiko tyrimuose naudojamas toks PGR ciklų skaičius, kiek reikia norint nustatyti, ar fluorescencinis signalas yra didesnis už foninį signalą. Tai parodo reakcijos pradžioje esančių tikslinių molekulių skaičių. Momentas, kurio metu signalas išsiskiria iš foninės fluorescencijos, vadinamas „ciklo slenksčiu“ (C_T).

Mėginio ΔC_T reikšmės apskaičiuojamos kaip skirtumas tarp mutacijos tyrimo C_T ir kontrolinio tyrimo C_T iš to paties mėginio.

$$\Delta C_T = \text{mutacijos } C_T - \text{kontrolinės medžiagos } C_T$$

Pastaba: Mėginiai klasifikuojami kaip turintys mutacijų, jei jų ΔC_T reikšmė yra mažesnė nei šio tyrimo kritinės ribos ΔC_T reikšmė. Jei reikšmė yra didesnė, mėginyje gali būti mažesnis mutacijų procentas, nei galima aptikti naudojant rinkinį (už tyrimo ribų), arba mėginyje nėra mutacijų.

Pastaba: Mutacijos C_T reikšmės, lygios 40 arba didesnės, bus laikomos neigiamomis arba esančiomis už rinkinio ribų.

Naudojant ARMS pradmenis, kai kurie pradmenys gali būti neveiksmingi, todėl DNR, kurioje nėra mutacijos, foninė C_T reikšmė gali būti nustatoma labai vėlai. Visos foninės amplifikacijos ΔC_T reikšmės bus didesnės negu kritinės ribos ΔC_T reikšmės, todėl mėginys bus laikomas kaip neturintis mutacijos.

Mėginių įvertinimo duomenų analizė

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal toliau pateiktą procedūrą.

Programinės įrangos analizės nustatymai

1. Atidarykite atitinkamą failą naudodami „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos versiją 2.0.2 arba naujesnę.
2. Patikrinkite, ar mėginiai sužymėti.
3. Kiekvieno detektoriaus / kanalo neapdorotos medžiagos kanalo puslapyje spustelėkite „Options“ (Parinktys) ir įveskite „Crop start cycles“ (Panaikinti pradinius ciklus). Puslapio skirtuke „Remove data before cycle“ (Pašalinti duomenis prieš ciklą) įveskite 15 ir spustelėkite „OK“ (Gerai).
4. Spustelėkite „Analysis“ (Analizė). Analizės puslapyje spustelėkite „Cycling A (from 15), Yellow“ (A Ciklas (iš 15), geltona) ir patikrinkite HEX kanalą.
5. Patikrinkite, ar pažymėtas „dinaminis mėgintuvėlis“. Spustelėkite „Slope correct“ (Teisingas nuolydis) ir „Linear scale“ (Linijinė skalė).
6. Nustatykite slenksčio reikšmę 0,02 ir patikrinkite HEX C_T reikšmes.
7. Analizės puslapyje spustelėkite „Cycling A (from 15), Green“ (A Ciklas (iš 15), žalia), kad peržiūrėtumėte FAM kanalą.

8. Turi būti pažymėtas dinaminis mėgintuvėlis. Spustelėkite „Slope correct“ (Teisingas nuolydis) ir „Linear scale“ (Linijinė skalė).
9. Nustatykite slenksčio reikšmę 0,075 ir patikrinkite FAM C_T reikšmes.

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis, kaip aprašyta toliau.

- **Neigiamos kontrolinės medžiagos:** norint įsitikinti, kad yra nešabloninis užteršimas, NTC žaliame (FAM) kanale neturi generuoti mažesnės nei 40 C_T reikšmės. Svarbią informaciją apie nešabloninės kontrolinės medžiagos (NTC) kreives žr. „Duomenų aiškinimo pastabos“, 38 psl. Norint užtikrinti tinkamą tyrimų serijos nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją 31–37 geltoname (HEX) kanale.

Jei amplifikacija žaliame kanale yra teigiama ir (arba) geltono signalo amplifikacija yra už 31–37 diapazono ribų, mėginio rezultatą reikia atmesti.

- **Teigiama kontrolinė medžiaga:** EGFR teigiama kontrolinė medžiaga (PC) turi pateikti kontrolinio tyrimo C_T reikšmę (FAM kanalas) 26,26–30,95 diapazone. Tyrimų serija, kurios C_T reikšmė nepatenka į šį diapazoną, rodo tyrimo nustatymo problemą, o tyrimų seką reikia laikyti nepavykusia. Jei teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimo reikšmė C_T yra 26,26–30,95 (2 egzonas, FAM), o vidinės kontrolinės medžiagos reikšmė C_T (HEX) nepatenka į 31–37 diapazoną, analizę tęskite.

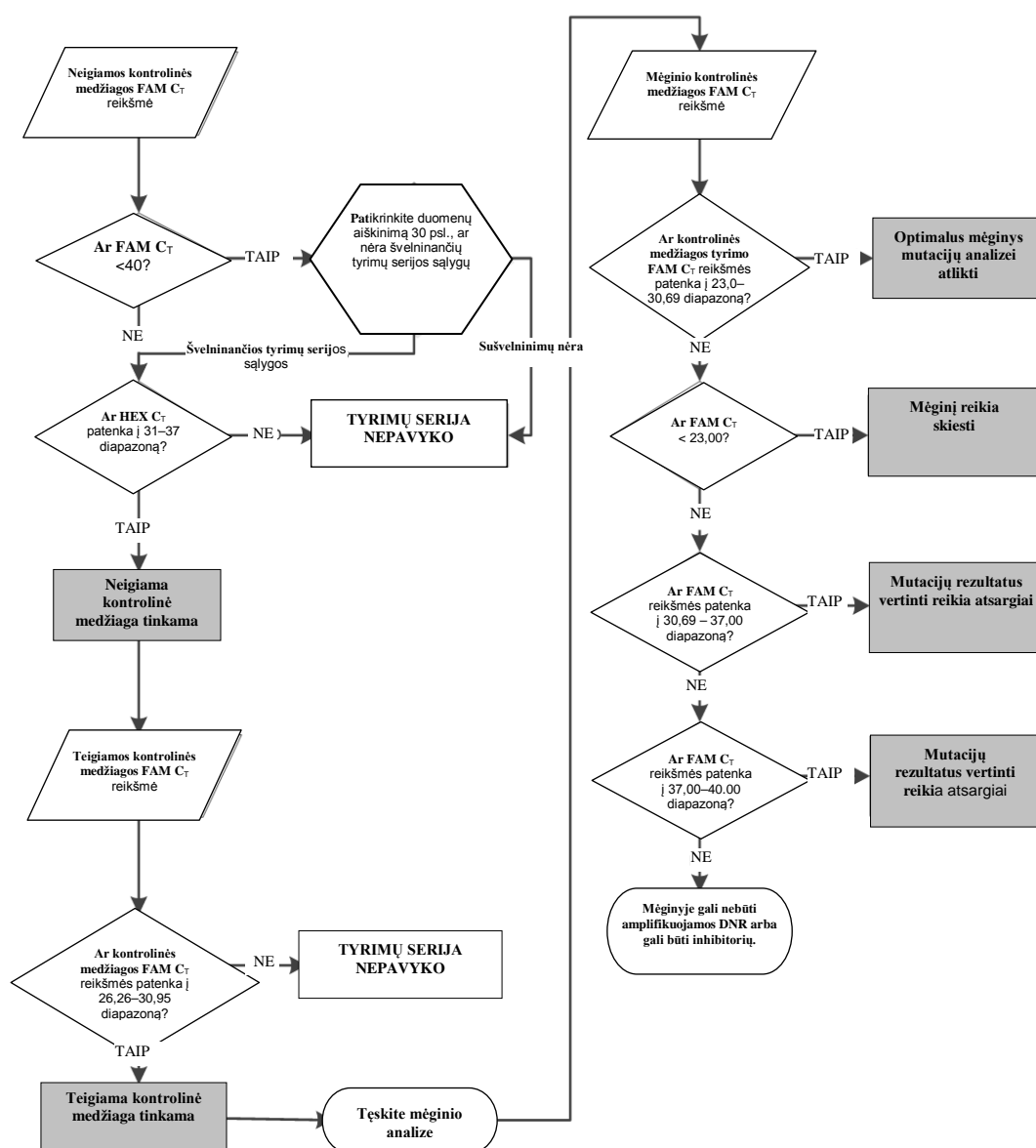
Pastaba: mėginio duomenų naudoti negalima, jei nepavyko kuri nors iš dviejų kontrolinių medžiagų tyrimų serijų.

Jei abi tyrimų sekos galioja, visos mėginio C_T reikšmės turi patekti į 23–30,69 diapazoną žaliame (FAM) kanale. Toliau pateikiamos rekomendacijos, jei mėginio reikšmė nepatenka į šį diapazoną.

- **< 23 mėginio kontrolinio tyrimo C_T:** Mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C_T reikšmė yra < 23, perkraus mutacijos tyrimus, todėl juos reikia atskiesti. Norėdami peržiūrėti kiekvieną nedidelio lygio mutaciją, per daug koncentruotus mėginius atskieskite taip, kad jų reikšmės patektų į anksčiau nurodytą diapazoną, ir praskiedus per pusę C_T padidėtų 1.
- **30,69–37 mėginio kontrolinio tyrimo C_T:** aiškinkite atsargiai, nes labai nedidelio lygio mutacijos gali būti neaptinkamos.
- **37–40 mėginio kontrolinio tyrimo C_T:** aiškinkite atsargiai, nes aptinkamos tik labai didelio lygio mutacijos.
- **> 40 mėginio kontrolinio tyrimo C_T:** mėginyje nepakankamas kiekis DNR analizei atlikti.

Pastaba: jei mėginys negeneruoja C_T (t. y. $C_T > 40$), tai gali būti dėl inhibitoriaus poveikio, tyrimo nustatymo klaidos arba nėra amplifikuojamos EGFR DNR.

- **31–37 vidinės kontrolinės medžiagos C_T :** nėra amplifikuojamos EGFR DNR.
- **Vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmė nepatenka į 31–37 diapazoną:** Tai gali rodyti tyrimo nustatymo klaidą arba inhibitoriaus buvimą. Inhibitoriaus efektą įmanoma sumažinti mėginį skiedžiant, tačiau tuomet praskiedžiama ir DNR.



14 pav. Mėginių įvertinimo analizės darbų eiga.

EGFR mutacijų duomenų analizė

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal toliau pateiktą procedūrą.

Programinės įrangos analizės nustatymai

1. Atidarykite atitinkamą failą naudodami „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos versiją 2.0.2 arba naujesnę.
2. Patikrinkite, ar mėginiai sužymėti.
3. Kiekvieno detektoriaus / kanalo neapdorotos medžiagos kanalo puslapyje spustelėkite „Options“ (Parinktys) ir įveskite „Crop start cycles“ (Panaikinti pradinis ciklus). Puslapio skirtuke „Remove data before cycle“ (Pašalinti duomenis prieš ciklą) įveskite 15 ir spustelėkite „OK“ (Gerai).
4. Spustelėkite „Analysis“ (Analizė). Analizės puslapyje spustelėkite „Cycling A (from 15), Yellow“ (A Ciklas (iš 15), geltona) ir peržiūrėkite HEX kanalą.
5. Patikrinkite, ar pažymėtas „dinaminis mėgintuvėlis“. Spustelėkite „Slope correct“ (Teisingas nuolydis) ir „Linear scale“ (Linijinė skalė).
6. Nustatykite slenksčio reikšmę 0,02 ir patikrinkite HEX C_T reikšmes.
7. Analizės puslapyje spustelėkite „Cycling A (from 15), Green“ (A Ciklas (iš 15), žalia), kad peržiūrėtumėte FAM kanalą.
8. Patikrinkite, ar pažymėtas „dinaminis mėgintuvėlis“. Spustelėkite „Slope correct“ (Teisingas nuolydis) ir „Linear scale“ (Linijinė skalė).
9. Nustatykite slenksčio reikšmę 0,075 ir patikrinkite FAM C_T reikšmes.

Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė:

Žr. schemą „Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė“, esančią 15.

- **Neigiamos kontrolinės medžiagos:** norint įsitikinti, kad yra nešabloninis užteršimas, NTC žaliame (FAM) kanale neturi generuoti mažesnės nei 40 C_T reikšmės. Svarbią informaciją apie nešabloninės kontrolinės medžiagos (NTC) kreives žr. „Duomenų aiškinimo pastabos“, 38 psl. Norint užtikrinti tinkamą tyrimų serijos nustatymą, NTC turi rodyti C_T amplifikaciją 31–37 geltoname (HEX) kanale.

Jei amplifikacija žaliame kanale yra teigiama ir (arba) geltono signalo amplifikacija yra už 31–37 diapazono ribų, mėginio rezultatą reikia atmesti.

- **Teigiama kontrolinė medžiaga:** EGFR teigiama kontrolinė medžiaga (PC) turi pateikti kontrolinio tyrimo C_T reikšmę 26,26–30,95 diapazone. Tyrimų serija, kurios C_T reikšmė nepatenka į šį diapazoną, rodo tyrimo nustatymo problemą, o tyrimų seką reikia laikyti nepavykusia. Jei teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimo reikšmė C_T yra 26,26–30,95 (2 egzonus, FAM), o vidinės kontrolinės medžiagos reikšmė C_T (HEX) nepatenka į 31–37 diapazoną, analizę tęskite.

Apskaičiuokite kiekvieno mutacijų tyrimo ΔC_T reikšmę, kaip parodyta, ir įsitikinkite, kad mutacijos ir kontrolinės medžiagos C_T reikšmės yra iš teigiamos kontrolinės medžiagos:

$$\Delta C_T = \text{mutacijos } C_T - \text{kontrolinės medžiagos } C_T$$

EGFR teigiamos kontrolinės medžiagos (PC) ΔC_T reikšmės turi neperžengti Lentelė 7 pateikiamų reikšmių.

Lentelė 7. Numatytosios teigiamos kontrolinės medžiagos ΔC_T reikšmės*

Tyrimas	Teigiamos kontrolinės medžiagos ΔC_T reikšmė
T790M	nuo -2,88 iki 3,01
Delecijos	nuo -6,71 iki 4,16
L858R	nuo -2,41 iki 0,90
L861Q	nuo -4,61 iki 1,48
G719X	nuo -2,89 iki 1,03
S768I	nuo -3,37 iki 2,31
Intarpai	nuo -2,93 iki 1,28

* „Rotor-Gene Q“ programinė įranga (2.0.2)

Pastaba: mėginio duomenų naudoti negalima, jei neigiamos arba teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimų seka nepavyko.



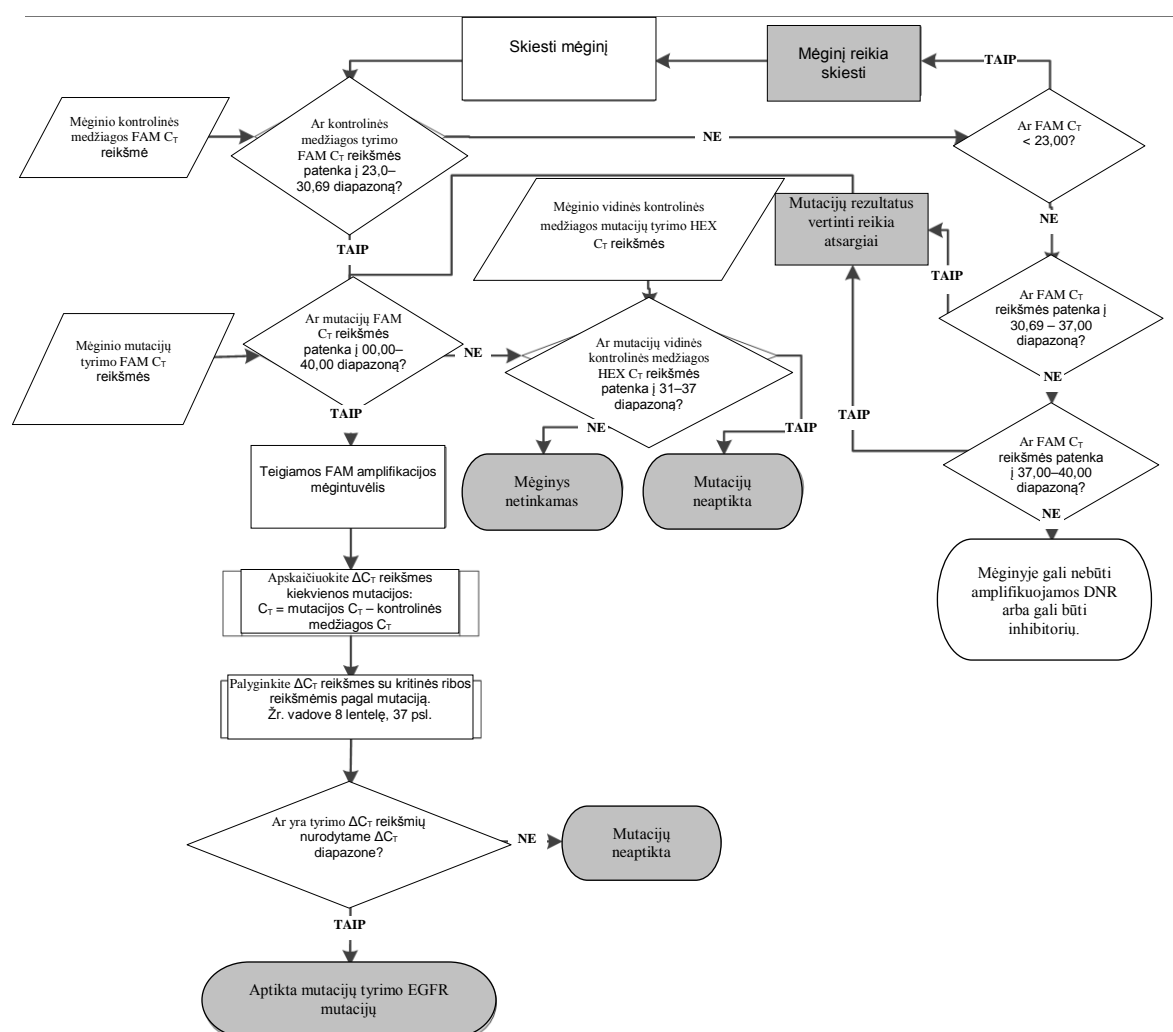
- **< 23 mėginio kontrolinio tyrimo C_T :** Mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C_T reikšmė yra < 23, perkraus mutacijos tyrimus, todėl juos reikia atskiesti. Norėdami peržiūrėti kiekvieną nedidelio lygio mutaciją, per daug koncentruotus mėginius atskieskite taip, kad jų reikšmės patektų į anksčiau nurodytą diapazoną, ir praskiedus per pusę C_T padidėtų 1.
- **30,69–37 diapazono mėginio kontrolinio tyrimo C_T :** aiškinkite atsargiai, nes labai nedidelio lygio mutacijos gali būti neaptinkamos.
- **37–40 diapazono mėginio kontrolinio tyrimo C_T :** aiškinkite atsargiai, nes aptinkamos tik labai didelio lygio mutacijos.
- **> 40 mėginio kontrolinio tyrimo C_T :** mėginyje nepakankamas kiekis DNR analizei atlikti.

Pastaba: Jei mėginio FAM C_T reikšmė yra nuo 23 iki 37, vidinės kontrolinės medžiagos vertinti nereikia.

Pastaba: jei mėginys negeneruoja C_T (t. y. $C_T > 40$), tai gali būti dėl inhibitoriaus poveikio, tyrimo nustatymo klaidos arba nėra amplifikuojamos EGFR DNR.

- **31–37 vidinės kontrolinės medžiagos C_T :** Tyrimas veikia tinkamai, tačiau nėra amplifikuojamos EGFR DNR.
- **Vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmė nepatenka į 31–37 diapazoną:** Tai gali rodyti tyrimo nustatymo klaidą arba inhibitoriaus buvimą. Inhibitoriaus efektą įmanoma sumažinti mėginį skiedžiant, tačiau tuomet praskiedžiama ir DNR.

Pastaba: Jei mutacijų tyrimo FAM reakcija negeneruoja C_T reikšmės, o vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos generuoja C_T reikšmę, kuri nepatenka į 31–37 diapazoną, duomenis reikia atmesti, nes gali būti inhibitorių, kurie rodys klaidingai neigiamus rezultatus. Atskiedus mėginį galima sumažinti inhibitorių efektą, bet DNR taip pat bus atskiesta.



16 pav. Mutacijų analizės schema.

Mėginio mutacijų tyrimo FAM C_T reikšmė

Visų septynių mutacijų reakcijų mišinių FAM reikšmes reikia patikrinti pagal Lentelę 8 pateiktas reikšmes.

Lentelė 8. Priimtinos mėginio mutacijų reakcijos reikšmės (FAM)*

Tyrimas	Priimtinas C _T diapazonas	Kritinės ribos ΔC _T reikšmė
T790M	15,00–40,00	6,38
Delecijos	15,00–40,00	9,06
L858R	15,00–40,00	8,58
L861Q	15,00–40,00	9,26
G719X	15,00–40,00	9,31
S768I	15,00–40,00	9,26
Intarpai	15,00–40,00	7,91

*Priimtinos reikšmės yra patenkančios į diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes.

- Jei FAM C_T patenka į nurodytą 15,00–40,00 diapazoną, FAM amplifikacija teigiama.
- Jei FAM C_T nepatenka į nurodytą diapazoną arba amplifikacijos nėra, FAM amplifikacija neigiama.

Apskaičiuokite kiekvieno mutacijų mėginio, rodančio teigiamą amplifikaciją, ΔC_T reikšmę, kaip parodyta, ir įsitikinkite, kad mutacijos ir kontrolinės medžiagos C_T reikšmės yra iš to paties mėginio.

$$\Delta C_T = \text{mutacijos } C_T - \text{kontrolinės medžiagos } C_T$$

Palyginkite mėginio C_T reikšmę su analizuojamo tyrimo kritinės ribos reikšme (Lentelė 8) ir įsitikinkite, kad kiekvienam tyrimui taikomas tinkamas kritinės ribos taškas.

Kritinės ribos taškas yra taškas, kurio signalas gali būti teigiamas dėl laukinio tipo DNR ARMS pradmens foninio signalo. Jei mėginio ΔC_T reikšmė yra didesnė nei kritinės ribos taško reikšmė, jis klasifikuojamas kaip „mutacija neaptikta“ arba neaptinkamas naudojant šį rinkinį. Jei mėginio reikšmė yra ties kritinės ribos taško reikšme arba mažesnė už ją, mėginys klasifikuojamas kaip teigiamas ir turintis tokiu tyrimu aptinkamų mutacijų.

Pastaba: Mėginius, kuriuose nerodomas FAM mutacijos C_T, reikia įvertinti atsižvelgiant į vidinės kontrolinės medžiagos (HEX) C_T reikšmes, kad galima būtų nustatyti, ar mutacija neaptikta, ar tyrimas negalioja. Jei HEX C_T reikšmė

yra nuo 31 iki 37, mutacija neaptikta. Jei HEX C_T reikšmė nepatenka į 31–37 diapazoną, mėginys negalioja.

Apibendrinant, pagal toliau nurodytus kriterijus bus nustatyta visų mėginių kiekvienos reakcijos būseną: mutacija aptikta, mutacija neaptikta arba negaliojanti.

- **Mutacija aptikta:** FAM amplifikacija teigiama, o ΔC_T reikšmė yra ties kritinės ribos reikšme arba mažesnė. jei aptinkamos kelios mutacijos, visas galima įtraukti į ataskaitą.
- **Mutacijų neaptikta:**
FAM amplifikacija teigiama, o ΔC_T reikšmė yra didesnė už kritinės ribos reikšmę.
FAM amplifikacija neigiama, o HEX (vidinės kontrolinės medžiagos) amplifikacija teigiama.
- **Negalioja:**
FAM amplifikacija neigiama, o HEX amplifikacija netenkina specifikacijų.

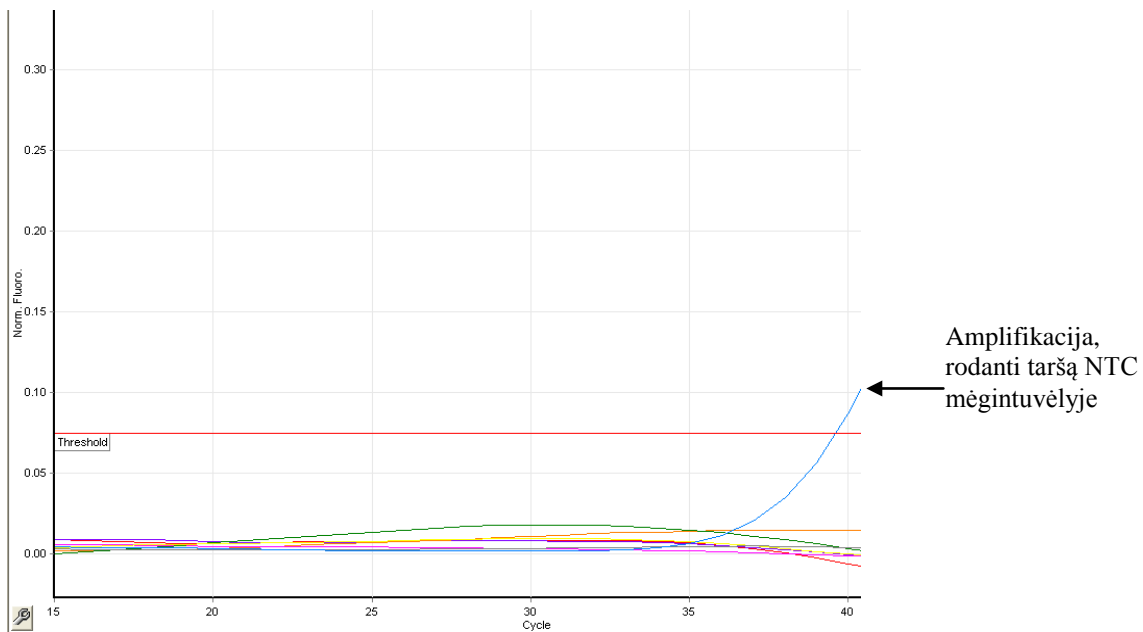
Duomenų aiškinimo pastabos

Linijinė amplifikacija

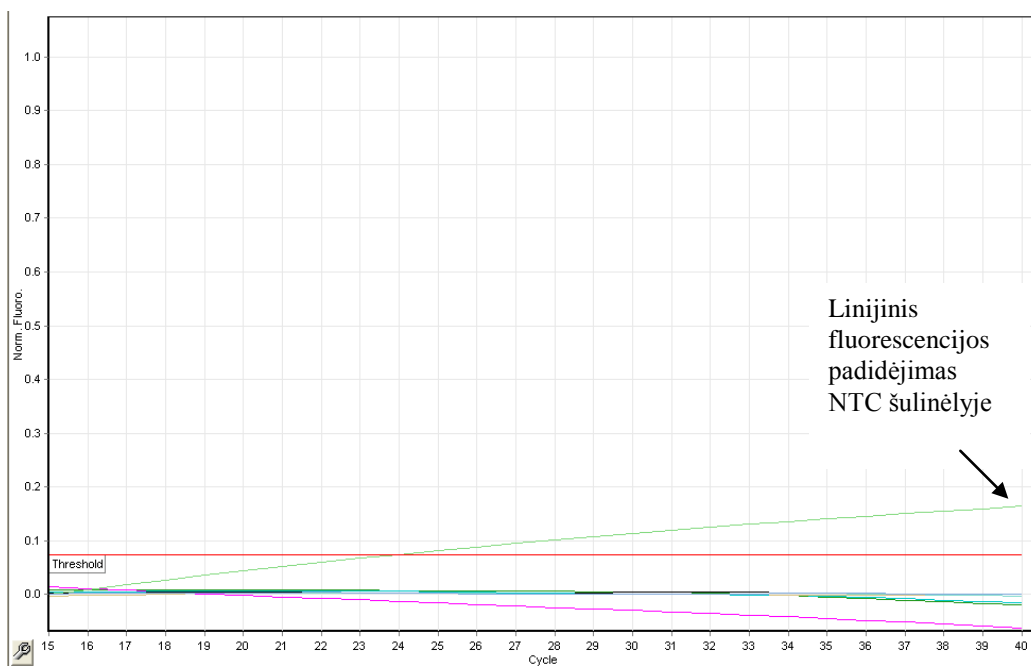
Būtina patikrinti visų reakcijų „Rotor-Gene Q“ kreives. Kartais fluorescencinio signalo padidėjimas matomas NTC ir neigiamų medžiagų mėginiuose. Jei taip atsitinka ir gaunama C_T reikšmė, naudotojui reikia atskirti tikros amplifikacijos atvejį, kuris parodo taršą NTC, ir linijinį fluorescencijos padidėjimą, kurį gali sukelti fluorescencijos artefaktas.

NTC analizė

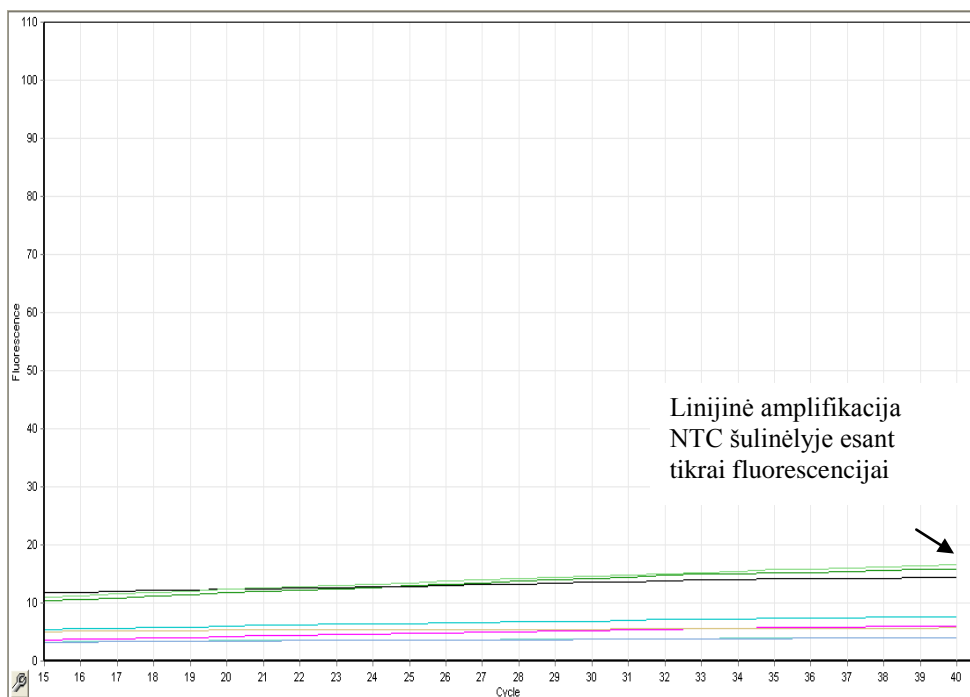
17–18 pav. pateikti du NTC mėginių veikimo pavyzdžiai. 17 matoma nelinijinė (tikra amplifikacija), sukelta mėginio taršos. Šią tyrimų seriją reikia atmesti ir mėginius tirti pakartotinai. 18 matoma linijinė amplifikacija NTC. Tokiu atveju reikia tirti tikrą fluorescenciją. Atitinkama tikros fluorescencijos kreivė matoma 19, rodančiame linijinį fluorescencijos padidėjimą, o ne tikros amplifikacijos įvykį. Šios tyrimų serijos duomenis galima naudoti, jei teigiamų ir vidinių kontrolinių medžiagų reakcijos tinkamos. 19 ir 20 palyginimas rodo tikrus fluorescencijos duomenis, įvykus tikrai amplifikacijai. Tokiu atveju duomenis reikia atmesti ir mėginius tirti pakartotinai, nes tai nurodo esant taršą.



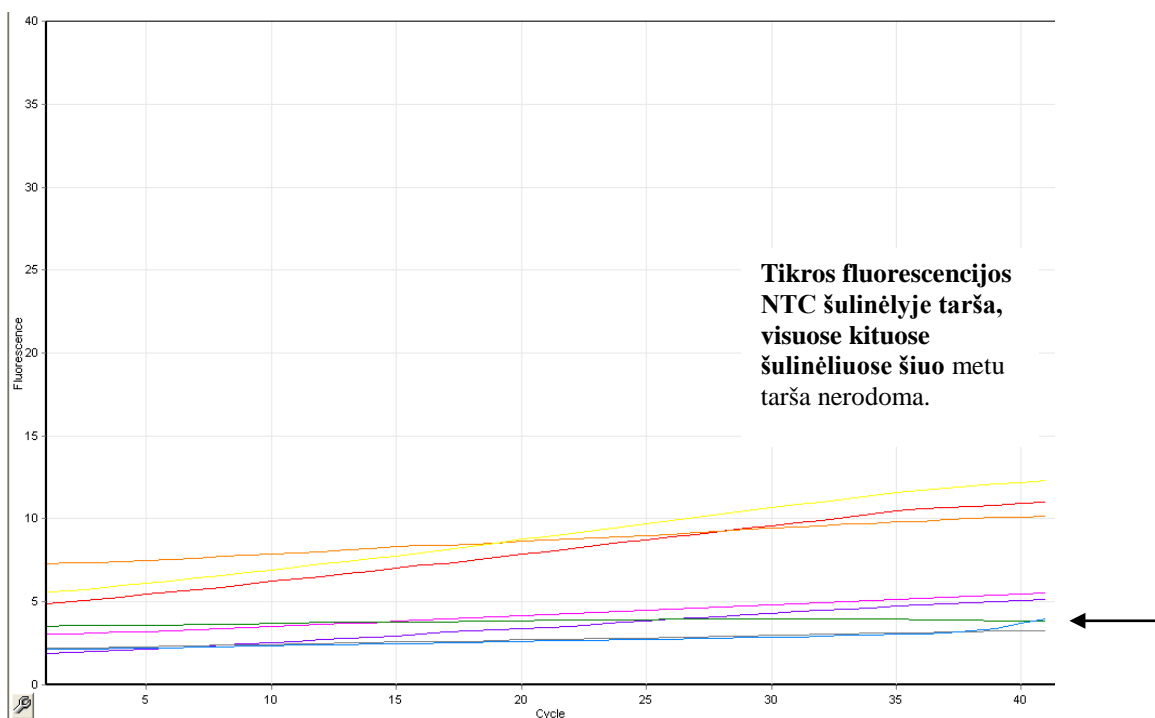
17 pav. Analizuojamos tyrimų serijos tarša tyrimo NTC.



18 pav. Linijinio fluorescencijos padidėjimo NTC šulinėlyje pavyzdys.



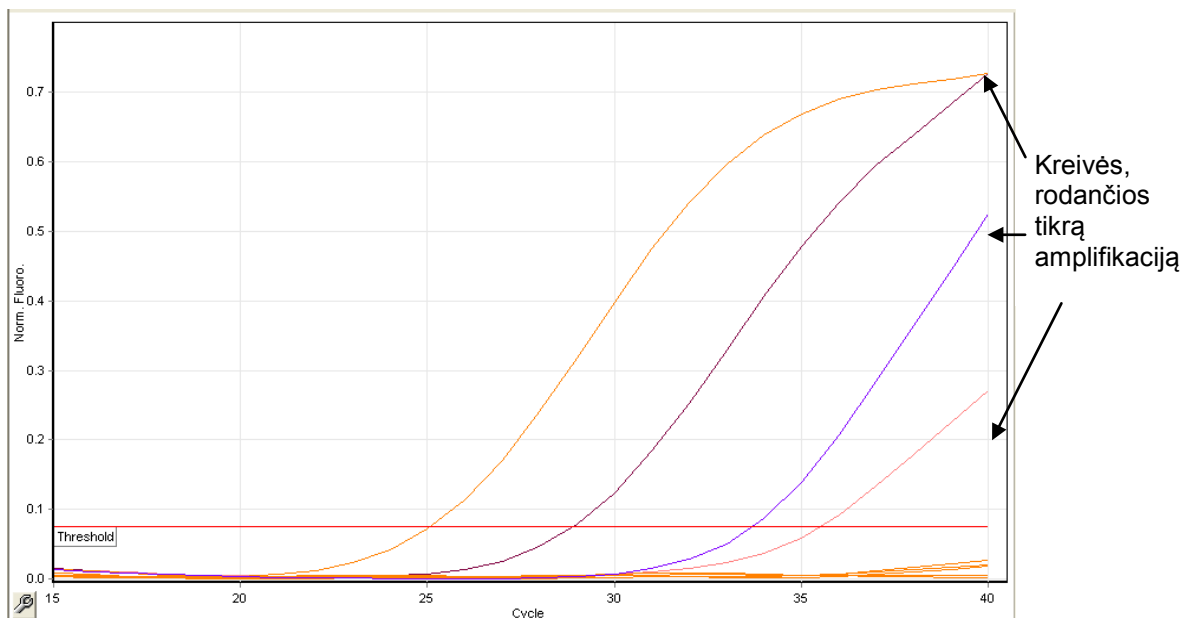
19 pav. 18 tikra fluorescencija.



20 pav. Tikros fluorescencijos duomenys, rodomi NTC šulinėlyje įvykus tikrai amplifikacijai.

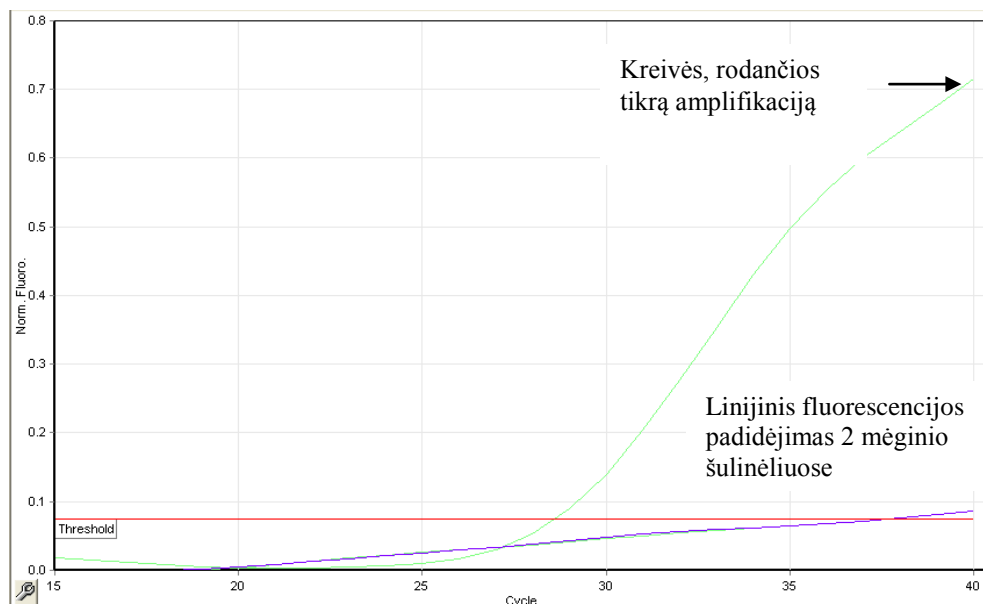
Mėginių analizė

21–22 pav. pateikti du amplifikacijos pavyzdžiai mėginių reakcijose. Tikros amplifikacijos pavyzdys tyrimų serijos mėginio šulinėlyje matomas 21. Jei tyrimų serija parodo šį riestinės amplifikacijos kreivės tipą, tai yra tikra amplifikacija. Šios tyrimų serijos duomenis galima naudoti, jei teigiamų ir vidinių kontrolinių medžiagų reakcijos tinkamos.

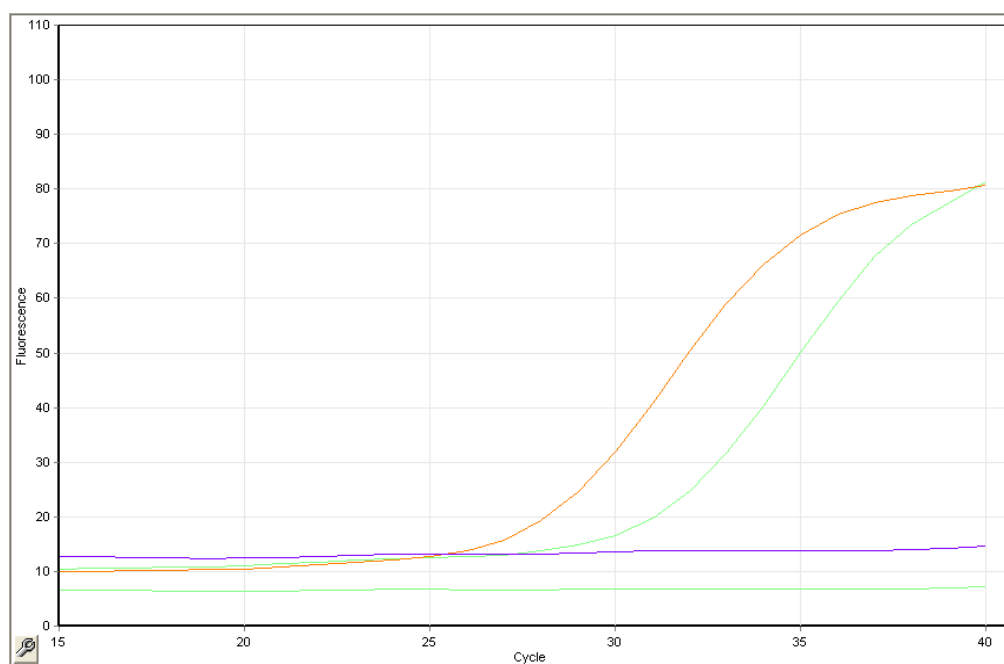


21 pav. Tikra amplifikacija analizuojamos tyrimų serijos mėginio šulinėlyje.

Linijinės amplifikacijos mėginio reakcijoje pavyzdys parodytas 22. Tokiu atveju reikia tirti tikros fluorescencijos duomenis. Atitinkama tikros fluorescencijos kreivė (23) rodo, kad 22 matomas linijinis padidėjimas atitinka linijinį tikros fluorescencijos padidėjimą ir nėra tikra amplifikacija. Sėkmingai patikrinus teigiamas ir vidines kontrolines medžiagas, šių tyrimų serijų mėginio rezultatus galima naudoti su sąlyga, kad tokia linijinė amplifikacija vadinama „ne C_T “.



22 pav. Linijinio fluorescencijos padidėjimo dviejuose mėginio šulinėliuose pavyzdys.



23 pav. 22 tikra fluorescencija.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninių tarnybų mokslininkai visada mielai atsako į klausimus apie šiame vadove pateiktą informaciją ir protokolus arba apie mėginių ir tyrimų technologijas (kontaktinė informacija pateikta viršelyje ir svetainėje adresu www.qiagen.com).

Pastabos ir pasiūlymai

Jokio signalo naudojant EGFR teigiamas kontrolines medžiagas (PC) fluorescenciniame kanale „Cycling Green“

- | | |
|---|---|
| a) PGR duomenų analizei pasirinktas fluorescencinis kanalas neatitinka protokolo | Duomenų analizei pasirinkite „Cycling Green“ fluorescencinį kanalą analitinei EGFR PGR ir „Cycling Yellow“ fluorescencinį kanalą – vidinės kontrolinės medžiagos PGR. |
| b) Neteisingas „Rotor-Gene“ instrumento temperatūros profilio programavimas | Palyginkite temperatūros profilį su protokolu ir, jei neteisingas, pakartokite tyrimų seriją. |
| c) Neteisinga PGR konfigūracija | Patikrinkite savo darbo veiksmus naudodami lašinimo pipete schemą ir, jei reikia, pakartokite PGR. |
| d) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (12 psl.). | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį. |
| e) Baigėsi „therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ tinkamumo laikas | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį. |

Pastabos ir pasiūlymai

Signalai naudojant neigiamas kontrolines medžiagas analitinės PGR fluorescenciniame kanale „Cycling Green“

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) PGR ruošimo metu atsirado tarša | Pakartokite PGR, naudodami naujus reagentus kartotiniam tyrimam.

Jei galima, įdėję reikiamą tirti mėginį, iš karto uždarykite PGR mėgintuvėlius.

Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami. |
| b) Ekstrahavimo metu atsirado tarša | Pakartokite tiriamo mėginio ekstrahavimą ir PGR, naudodami naujus reagentus.

Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami. |

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

Apribojimai

Produkto rezultatai turi būti interpretuojami susijusių klinikinių ir laboratorinių duomenų kontekste, o nustatant diagnozę nenaudojami be konteksto.

Produktą turi naudoti tik personalas, specialiai apmokytas atlikti *in vitro* diagnostines procedūras ir dirbti su „Rotor-Gene Q“ instrumentais.

Analitinio patvirtinimo tyrimai naudojant žmogaus DNR mėginius, išskirtus iš formalinu fiksuotų parafine esančių auglio mėginių.

Produktą numatyta naudoti tik su „Rotor-Gene Q“ realiojo laiko PGR ciklų valdikliu „5plex HRM Series“.

Siekiant užtikrinti optimalius rezultatus reikia griežtai laikytis „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ vadovo nurodymų. Nerekomenduojama skiesti reagentų kitaip, nei nurodyta šiame vadove, nes gali sumažėti jų veiksmingumas.

Prieš atliekant mėginio analizę su „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ svarbu įvertinti mėginio DNR kiekį ir kokybę. Papildomas kontrolinės reakcijos mišinys (Ctrl) pateikiamas siekiant nustatyti, ar C_T reikšmė yra tinkama tyrimui. Absorbcijos rodmenų negalima naudoti, nes jie nesusiję su C_T reikšmėmis fragmentuotuose DNR mėginiuose.

Reikia atkreipti dėmesį į tinkamumo datas, išspausdintas ant dėžutės ir visų komponentų etikečių. Pasibaigus tinkamumo laikui, komponentų naudoti negalima.

Efektyvumo charakteristikos

Kritinės ribos

171 FFPE mėginiai buvo tirti naudojant pagal NCCLS EP17-A (2004) rekomendacija parengtą metodą. Rinkinio kritinės ribinės reikšmės buvo nustatytos pagal 159 mėginių duomenis. Nustatytas kontrolinės reakcijos C_T diapazonas nuo 23,00 iki 30,69 C_T . Nustatytos ribinės reikšmės pateiktos 8 lentelėje.

Aptikimo riba (LOD)

Siekiant nustatyti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ LOD, sumaišius sintetinę mutavusią DNR su laukinio tipo genomine DNR buvo sudarytas mėginių rinkinys, skirtas modeliuoti kiekvienos iš 29 mutacijų procento diapazoną. Kiekvieno tyrimo LOD apibrėžiamas kaip mutacijų procentas, kai naudojant „*therascreen* EGFR PCR RGQ Kit“ buvo aptikta 95 % pakartojimų. LOD reikšmės pateiktos Lentelė 9. Sudėtiniuose tyrimuose, kai aptinkamos kelios mutacijos (G719X, delecijos ir intarpai), nurodoma didžiausios LOD reakcija.

Lentelė 9. Kiekvieno iš septynių EGFR mutacijų tyrimų LOD

Mutacija	Aptinkamų mutacijų procentas (%)
T790M	7,02
Delecijos	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Intarpai	2,03

Tikslumas

Siekiant nustatyti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ tikslumą, sumaišius sintetinę mutavusią DNR su laukinio tipo genomine DNR buvo sudarytas mėginių rinkinys, skirtas modeliuoti kiekvieno iš septynių mutacijų tyrimų žemą mutacijų procento lygį. Tikslumas buvo nustatytas tiriant mėginius vienoje laboratorijoje, naudojant kelių partijų rinkinius, tyrimą atliko keli operatoriai, tyrimų serijos buvo atliekamos kelias dienas, atliekant du kiekvieno mėginio pakartojimus. Gauta variacija, įvertinus standartinį nuokrypį nuo variacijos komponentų analizę, buvo mažesnė nei $1 \Delta C_T$ ir gali būti naudojama vertinant tikslumą (Lentelė 10).

Lentelė 10. Laboratorinių tyrimų rezultatai*

Tyrimas	Teigiamo mutacijos tyrimo procentas	Standartinio nuokrypio įvertinimas (ΔC_T)
T790M	100%	0,33
Delecijos	100%	0,40
L858R	100%	0,45
L861Q	100%	0,49
G719X	97,9%	0,59
S768I	97,9%	0,31
Intarpai	97,9%	0,38

* ištirti 93 kiekvienos mutacijos pakartojimai.

Atkartojamumas

Atkartojamumas buvo nustatytas tiriant didelio lygio mutacijų mėginius laukinio tipo genominės DNR fone trijose laboratorijose, naudojant kelių partijų rinkinius, tyrimą atliko keli operatoriai, tyrimų serijos buvo atliekamos kelias dienas, atliekant du kiekvieno mėginio pakartojimus. Visų septynių mutacijų tyrimų 96,1–100 % mutavusios DNR mėginių ištirti kaip teigiamos mutacijos. Laukinio tipo mėginiai visuose tyrimuose, atliktuose visuose laboratorijose, buvo neigiamos mutacijos.

Įvesties DNR koncentracijos poveikis

Siekiant nustatyti įvesties DNR koncentracijos kitimo poveikį naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ gautiems LOD artimiems rezultatams, visų 29 mutacijų mėginių rinkinys buvo sukurtas sumaišius sintetinę mutavusią DNR su laukinio tipo genomine DNR, kad galima būtų sukurti žemo, vidutinio ir aukšto bendros įvesties DNR lygio mėginius.

Aukštas ir žemas įvesties DNR lygio mėginiai skirti nurodyti kontrolinio tyrimo C_T reikšmių diapazoną (nuo 23,50 iki 29,50).

Įvesties DNR duomenų rinkinio (29 mutacijos, kai koncentracijos artimos LOD, trijuose skirtinguose įvesties DNR lygiuose) įvertinimas pateikė 95,44 % teigiamų mutacijų rodiklį.

Šie duomenys rodo, kad kintamas įvesties DNR lygis darbiname tyrimo diapazone neturi įtakos mėginio ΔC_T arba mutacijų įvertinimui.

Trukdančios medžiagos

Buvo tirtas komponentų, kurie apdorojant FFPE mėginius potencialiai gali būti pernešti iš „QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“, poveikis rinkinio veikimui.

Naudojamos didžiausios įmanomos („blogiausio atvejo“) formalino, parafino, ksileno, etanolio, ATL buferio, proteinazės K, AL buferio, AW1 plovimo buferio ir AW2 plovimo buferio koncentracijos (tariant, kad po ekstrakcijos rinkinio protokolo plovimo ir gryninimo žingsnių komponento koncentracija sumažėjo 1 log).

Tirti trigubos LOD mėginiai ir gerokai aukštesnis mutacijų lygis, kad būtų užtikrintas potencialaus trukdymo aptikimas.

Potencialiu trukdymu laikytas $\geq 3 \Delta C_T$ standartinių nuokrypių (paimtų iš tikslumo tyrimų) skirtumas tarp „tyrimo“ ir „kontrolinės“ medžiagos (t. y. medžiagos be trukdančių medžiagų).

Nė vienos iš įvertintų potencialiai trukdančių medžiagų ΔC_T nepakito ≥ 1 standartinį nuokrypį lyginant su kontrolinėmis medžiagomis.

Literatūra

QIAGEN palaiko didelę atnaujinamą internetinę mokslinių publikacijų apie QIAGEN produktų utilizavimą duomenų bazę. Visapusės paieškos parinktys leis Jums rasti reikiamus straipsnius, ieškant tiesiog pagal raktinį žodį arba nurodant pritaikymo sritį, mokslinių tyrimų sritį, pavadinimą ir kt.

Norėdami pamatyti visą literatūros sąrašą, apsilankykite internetinėje QIAGEN literatūros duomenų bazėje adresu www.qiagen.com/RefDB/search.asp arba kreipkitės į QIAGEN technines tarnybas ar vietinį platintoją.

Simboliai



<N>

Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> testams atlikti



Tinka iki



„In vitro“ diagnostikos medicinos prietaisas



Katalogo numeris



Serijos numeris



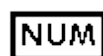
Medžiagos numeris



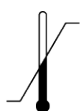
Komponentai



Sudėtyje yra



Numeris



Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Skaitykite naudojimo instrukcijas

Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support, skambinkite tel. 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN techninio aptarnavimo skyrių ar vietinių pardavėjų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Priedas: Informacija apie mutacijas

COSMIC ID paimti iš „*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Lentelė 11. Mutacijų ir COSMIC ID sąrašas.

Mutacija	Egzonas	Bazinis pokytis	COSMIC ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Intarpai	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delecijos	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (kompleksas)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (kompleksas)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (kompleksas)	12422
		2238_2252>GCA (kompleksas)	12419

Lentelė 11. Mutacijų ir COSMIC ID sąrašas (tęsinys)

Mutacija	Egzonas	Bazinis pokytis	COSMIC ID
Delecijos	19	2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (kompleksas)	12382
		2239_2258>CA (kompleksas)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (kompleksas)	12383

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 reakcijoms: 1 kontrolinis tyrimas, 7 mutacijų tyrimai, teigiama kontrolinė medžiaga, <i>Taq</i> DNR polimerazė	870111
„Rotor-Gene Q“ ir priedai		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realiojo laiko PGR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui. Diegimas ir mokymas neįtrauktas.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realiojo laiko PGR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, diegimas ir mokymas	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Realiojo laiko PGR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui. Diegimas ir mokymas neįtrauktas.	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Realiojo laiko PGR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, diegimas ir mokymas	9001580

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete 72 x 0,1 ml mėgintuvėliuose	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 1 000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 10 000 reakcijų	981106

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų produktų garantinių įsipareigojimų atsisakymai pateikti atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pateikti adresu www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Įsigijęs šį produktą pirkėjas jį gali naudoti diagnostinėms paslaugoms teikti žmogaus *in vitro* diagnostikos tikslais. Joks bendras patentas ar kita licencija, išskyrus šią konkrečią įsigijimo suteikiamą teisę, nesuteikiama.

Prekių ženklai: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® („QIAGEN Group“); ARMS® („AstraZeneca Limited“); FAM™, HEX™ („Life Technologies, Inc.“).

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ CE paženklintas diagnostikos rinkinys pagal Europos direktyvą 98/79/EB dėl *in vitro* diagnostikos medicinos prietaisų. Tiekama ne į visas šalis.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ ribotosios licencijos sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti aukščiau nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Naujausios licencijos sąlygos pateiktos adresu www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN, visos teisės saugomos.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

