

***therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kiti**

El Kitabı

Sürüm 1

Σ 24

IVD

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM cihazı ile kullanım içindir.

CE

REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4 **MAT** 1063321TR



QIAGEN rnek ve Test Teknolojileri

QIAGEN herhangi bir biyolojik örneğin içeriğinin izolasyonunu ve tespitini sağlayan yenilikçi örnek ve test teknolojilerinin nc sağlayıcısıdır. Gelişmiş yüksek kaliteli ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca başarı sağlar.

QIAGEN řu standartları belirler:

- DNA, RNA ve proteinlerin saflaştırılması
- Nükleik asit ve protein ölçümleri
- mikroRNA araştırması ve RNAi
- rnek ve test teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz, stn başarı ve önemli buluşlar elde etmenizi sağlamaktır. Daha fazla bilgi için, www.qiagen.com adresini ziyaret edin.

İçindekiler

Kullanım Amacı	5
Özet ve Açıklama	5
Prosedür Prensipleri	6
Sağlanan Malzemeler	9
Kit içeriği	9
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler	10
Uyarılar ve Önlemler	11
Güvenlik Bilgileri	11
Genel önlemler	11
Reaktif Saklama ve Kullanma	12
Numune Kullanımı ve Saklanması	13
Prosedür	13
EGFR analizi için gerekli olan tümör hücrelerinin seviyesinin belirlenmesi	13
DNA izolasyonu	14
Protokoller	
■ Örnek değerlendirme	14
■ EGFR mutasyonlarının tespiti	17
■ Rotor-Gene Q EGFR ayarları	19
Sonuçların Yorumlanması	29
Örnek değerlendirme veri analizi	29
EGFR mutasyonu veri analizi	32
Sorun giderme kılavuzu	42
Kalite Kontrol	43
Sınırlamalar	43
Performans Özellikleri	44
Eşik değerleri	44
Tespit Sınırı (LOD)	44
Hassasiyet	45
Tekrarlanabilirlik	45
Giren DNA konsantrasyonunun etkisi	45
Engelleyici maddeler	46

Referanslar	46
Semboller	47
İletişim Bilgileri	47
Ek: Mutasyon Ayrıntıları	48
Sipariş Bilgileri	50

Kullanım Amacı

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti, kanserle ilişkili EGFR genindeki 29 somatik mutasyonun tespiti için in vitro tanı amaçlı bir testtir ve mutasyon durumunun nitel değerlendirmesini sağlar.

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti, formalin ile fikse edilmiş, parafine gömülmüş küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (NSCLC) dokudan elde edilen DNA örnekleri ile profesyonel bir laboratuvar ortamında eğitimli personel tarafından kullanım içindir. Sonuçların tirozin kinaz inhibitörleriyle tedaviden yararlanabilecek NSCLC'li hastaların belirlenmesinde klinisyene yardımcı olması amaçlanmıştır.

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti, in vitro tanı amaçlı kullanım içindir.

Özet ve Açıklama

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti, Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak kanserle ilişkili EGFR genindeki 29 somatik mutasyonun tespiti için kullanıma hazır bir kittir.

Scorpions® ve ARMS® teknolojilerini kullanarak, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti yabancı tip genomik DNA'nın yapısındaki aşağıdaki mutasyonların tespitini sağlar.

- Ekson 19'daki 19 delesyon (19 delesyonun herhangi birinin varlığını tespit eder fakat aralarındaki farkı ayırt etmez)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (G719S, G719A veya G719C varlığını tespit eder fakat aralarındaki farkı ayırt etmez)
- S768I
- Ekson 20'deki 3 insersiyon (3 insersiyondan herhangi birinin varlığını tespit eder fakat aralarındaki farkı ayırt etmez)

Kullanılan yöntemler oldukça seçici olup mevcut DNA'nın toplam miktarına bağlı olarak yabancı tip genotip DNA'nın yapısındaki mutasyona uğramış genin düşük yüzdesinin tespitini mümkün kılar. Seçicilik ve tespit sınırları boya sonlandırmalı dizileme gibi teknolojilerden daha üstündür.

Prosedür Prensibi

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti, gerçek zamanlı PCR'da mutasyonların tespiti için iki teknoloji — ARMS ve Scorpions — kullanır.

ARMS

Allel veya mutasyona özgü amplifikasyon ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi) yöntemi kullanılarak elde edilir. *Taq* DNA polimeraz (*Taq*) PCR primerinin 3' ucundaki eşleşen ve eşleşmeyen bölgeyi ayırt etmekte etkilidir. Spesifik mutasyona uğramış diziler, dizilerin çoğunun mutasyon taşımadığı örneklerde bile seçici olarak çoğaltılır. Primer tam olarak eşleştiğinde, amplifikasyon tam verimlilikle ilerler. 3' baz eşleşmesi olmadığında, yalnızca düşük seviyeli yapı amplifikasyonu oluşur.

Scorpions

Amplifikasyonun tespiti Scorpion primerler kullanılarak gerçekleştirilir. Scorpion primerler bir proba kovalent olarak bağlı PCR primerini içeren iki işlevli moleküllerdir. Bu probdaki florofor, proba da birleştirilmiş olan floresanı engelleyen baskılayıcı molekülle etkileşir. PCR sırasında prob amplicona bağlandığında, florofor ve baskılayıcı molekül ayrılmış olur. Bu, reaksiyon tüpündeki floresanda artışa neden olur.

Kit formatı

therascreen EGFR RGQ PCR Kitinde sekiz test bulunur:

- Bir kontrol testi (Ctrl)
- Yedi mutasyon testi

Tüm reaksiyon karışımları, FAM™ ile işaretli hedefleri tespit etmek amacıyla kullanılan reaktifleri ve HEX™ ile işaretli internal kontrol testini içerir. Internal kontrol testi yanlış negatif sonuçlara yol açabilen inhibitörlerin varlığını tespit edebilir. FAM amplifikasyonu internal kontrol amplifikasyonunu geçebilir ve internal kontrolün amacı FAM amplifikasyonu olmadığında bunun doğru negatif sonuç olduğunu ve başarısız PCR reaksiyonu olmadığını basit şekilde göstermektedir.

Prosedür

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti iki adımlı bir prosedürden oluşur. İlk adımda, örnekteki total DNA'yı değerlendirmek için kontrol testi gerçekleştirilir. İkinci adımda, hem mutasyon hem de kontrol testleri mutasyona uğramış DNA'nın olup olmadığını belirlemek için gerçekleştirilir.

Testler:

Kontrol testi

FAM ile işaretli kontrol testi örnekteki total DNA'yı değerlendirmek için kullanılır. Bu test EGFR geninin ekson 2 bölgesini çoğaltır. Primer ve prob, bilenen herhangi bir EGFR polimorfizmini önlemek için tasarlanmıştır.

Örnekteki total DNA'yı değerlendirmek için *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti ile sağlanan Kontrol Reaksiyon Karışımını (Ctrl) kullanmanızı önemle öneririz. Kontrol testi EGFR geninin ekson 2 bölgesini çoğaltır. Örneklerin, pozitif kontrol olarak EGFR Pozitif Kontrol (PC) ve hedef içermeyen kontrol olarak Nükleaz içermeyen su (H₂O) kullanılarak yalnızca kontrol testi ile ayarlanmasını öneririz.

Not: DNA değerlendirmesi PCR'ye dayalı olmalıdır ve absorbans okumalarına dayalı miktar ölçümünden farklılık gösterebilir. Ek Kontrol Reaksiyon Karışımı (Ctrl), *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti ile analiz edilmeden önce örnekteki DNA'nın nitelik ve nicelik bakımından değerlendirilmesi için sağlanır.

Mutasyon testleri

Her bir mutasyon testi yabancı tip DNA'nın ve spesifik mutant DNA'nın ayırt edilmesi için FAM işaretli Scorpion probu ve ARMS primeri içerir.

Kontroller

Not: Tüm deneysel çalışmalar aşağıdaki kontrolleri içermelidir.

Pozitif kontrol

Her bir çalışma 1–8 tüplerindeki pozitif bir kontrolü içermelidir. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti pozitif kontrol reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak EGFR Pozitif Kontrolünü (PC) içerir. Pozitif kontrol sonuçları kitin belirtilen kabul edilebilirlik kriterleri içinde çalıştığından emin olmak için değerlendirilir.

Negatif kontrol

Her bir çalışma 9–16 tüplerindeki bir negatif kontrolü ("hedef içermeyen kontrol", NTC) içermelidir. NTC, hedef içermeyen kontrol için "hedef" olarak kullanılacak Nükleaz içermeyen Sudan (H₂O) oluşur. Hedef içermeyen kontrol, çalışma hazırlığı sırasında herhangi bir potansiyel kontaminasyonu belirlemek ve internal kontrol reaksiyon performansını değerlendirmek için kullanılır.

İnternal kontrol reaksiyon değerlendirmesi

Her bir reaksiyon karışımı hedef reaksiyona ek olarak internal kontrol içerir. Hata, yanlış negatif sonuçlara yol açabilecek inhibitör varlığının olabileceğini veya bu tüp için operatör çalışma hazırlığı hatasının oluşmuş olduğunu gösterir.

İnternal kontrol hatası PCR inhibisyonuna bağlıysa, örneğin seyreltilmesi inhibitörlerin etkisini azaltabilir fakat bunun hedef DNA'yı da seyrelteceği ayrıca dikkate alınmalıdır. Üretilen IC C_T (HEX) belirtilen aralığın dışında

kalabileceğinden FAM amplifikasyonu internal kontrol amplifikasyonunu geçebilir. FAM sonuçları yine de bu örnekler için geçerlidir.

Sağlanan Malzemeler

Kit içeriği

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti			(24)
Katalog no.			870111
Reaksiyon sayısı			24
Kırmızı	Control Reaction Mix (Kontrol Reaksiyon Karışımı)	Ctrl	2 x 600 µl
Mor	T790M Reaction Mix (T790M Reaksiyon Karışımı)	T790M	600 µl
Turuncu	Deletions Reaction Mix (Delesyon Bölgeleri Reaksiyon Karışımı)	Del	600 µl
Pembe	L858R Reaction Mix (L858R Reaksiyon Karışımı)	L858R	600 µl
Yeşil	L861Q Reaction Mix (L861Q Reaksiyon Karışımı)	L861Q	600 µl
Sarı	G719X Reaction Mix (G719X Reaksiyon Karışımı)	G719X	600 µl
Gri	S768I Reaction Mix (S768I Reaksiyon Karışımı)	S768I	600 µl
Mavi	Insertions Reaction Mix (İnseriyon Bölgeleri Reaksiyon Karışımı)	Ins	600 µl
Kahverengi	EGFR Positive Control (EGFR Pozitif Kontrol)	PC	300 µl
Turkuaz	Taq DNA Polymerase (Taq DNA Polimeraz)	Taq	138 µl
Beyaz	Nuclease-Free Water (Nükleaz İçermeyen Su)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook (İngilizce El Kitabı)			1

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

- DNA izolasyon kiti (bkz. "DNA izolasyonu", sayfa 14)
- Ksilen
- Etanol (%96–100)*
- 1,5 ml veya 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (parçalama adımları için)
- 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (elüsyon adımları için) (Brinkmann [Güvenli Kilit, kat. no. 022363204], Eppendorf [Güvenli Kilit, kat. no. 0030 120.086] veya Sarstedt [Güvenlik Kapağı, kat. no. 72.690] firmalarından sağlanabilir)[†]
- Örnek hazırlığı için özel pipetler[‡] (ayarlanabilir)
- PCR ana karışımı için özel pipetler[‡] (ayarlanabilir)
- Kalıp DNA'nın dağıtımı için özel pipetler[‡] (ayarlanabilir)*
- DNaz, RNaz ve DNA içermeyen filtreli pipet uçları (çapraz kontaminasyonu önlemek için aerosol bariyerli pipet uçlarını öneriyoruz)
- Termomikser, ısıtmalı orbital inkübatör, ısıtma bloğu veya 90°C'de[‡] inkübasyon sağlayabilen su banyosu
- 2 ml'lik reaksiyon tüpleri için rotora sahip masaüstü santrifüj[‡]
- Vorteks
- Yeşil ve sarı döngü (sırasıyla FAM ve HEX tespiti) için floresan kanallı Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı[§]
- Rotor-Gene Q yazılımı, sürüm 2.0.2 veya üstü
- 72 kuyulu rotor ile kullanım için 0,1 ml'lik Şerit Tüpler ve Kapakları (kat. no. 981103 veya 981106)
- Ana karışımları hazırlamak için DNaz, RNaz ve DNA içermeyen mikrosantrifüj tüpleri
- Yükleme Bloğu 72 x 0,1 ml'lik Tüp, tek kanallı pipet ile manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok (QIAGEN, kat. no. 9018901)

* Metanol veya metiletilketon gibi diğer kimyasal maddeleri içeren denatüre alkol kullanmayın.

[†] Bu sağlayıcıların tam bir listesi değildir.

[‡] Cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

[§] Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazı (varsa).

Bazı ülkelerde Rotor-Gene Q MDx olarak da bilinir.

Uyarılar ve Önlemler

İn Vitro Tanı Amaçlı Kullanım İçindir

Güvenlik Bilgileri

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

24 saat acil bilgi

Kimyasal acil durumlar veya kazalarla ilgili yardıma 24 saat boyunca şuradan ulaşılabilir:

CHEMTREC

ABD ve Kanada ■ Tel: 1-800-424-9300

ABD ve Kanada dışı ■ Tel: +1-703-527-3887 (ödemeli aramalar kabul edilir)

Genel önlemler

Kullanıcı her zaman aşağıdakilere dikkat etmelidir.

- DNaz, RNaz ve DNA içermeyen filtreli pipet uçları kullanın ve bu pipetlerin üreticinin önerilerine göre kalibre edilmiş olduğundan emin olun.
- Pozitif materyalleri (numuneler ve pozitif kontrol) diğer reaktiflerden ayrı olarak saklayın ve çıkartın, bunları reaksiyon karışımına mekansal olarak ayrı bir yerde ekleyin.
- Teste başlamadan önce tüm bileşenleri oda sıcaklığında (15–25°C) çözündürün.
- Çözündüğünde, bileşenleri 10 kez ters yüz ederek ve kısa süreli santrifüjleyerek karıştırın.

Not: PCR tüplerinin sentetik kontrol materyali ile kontaminasyonunun önlenmesine çok dikkat edin. Reaksiyon karışımının hazırlanması ve DNA hedefinin eklenmesi için ayrı, özel pipetlerin kullanılmasını tavsiye ediyoruz. Reaksiyon karışımının hazırlanması ve dağıtılması kalıbın eklendiği farklı bir alanda yapılmalıdır. Rotor-Gene Q tüpleri PCR çalışması bittikten sonra açılmamalıdır. Bu PCR sonrası ürünler ile laboratuvar kontaminasyonunu engellemek içindir.

Not: Reaktifler manuel kurulum için onaylanmıştır. Otomatik yöntem kullanılması bu cihazlardaki “ölü hacimleri” doldurmak için gerekli reaktiflere bağlı olarak olası reaksiyon sayısını azaltabilir.

Not: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitindeki tüm reaktifler belirtilen testlerde kullanılmak üzere özel olarak formüle edilmiştir. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitinde sağlanan tüm reaktifler yalnızca aynı *therascreen* EGFR RGQ PCR kitindeki diğer reaktiflerle kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Optimal performansın elde edilmesi için kitin içindeki reaktiflerde değişim yapılmamalıdır.

Not: Yalnızca kit içinde verilen Taq DNA polimerazı (Taq) kullanın. Aynı veya herhangi bir başka tip diğer kitlerden alınan Taq DNA polimerazla veya başka bir sağlayıcılardan alınan Taq DNA polimerazla değiştirmeyin.

Not: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti için reaktifler en uygun şekilde seyreltilmiştir. Performans kaybıyla sonuçlanabileceğinden reaktiflerin fazla seyreltilmesini önermiyoruz. Yanlış negatif riskini artıracak için 25 µl'den az reaksiyon hacmi kullanımını önermiyoruz.

Reaktifi Saklama ve Kullanma

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti kuru buzda gönderilir ve ulaştığında hala donmuş halde olması gerekir. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti teslim edildiğinde donmuş değilse, dış ambalajı taşıma sırasında açılmış veya gönderilen ürün paketleme notu, el kitabı veya reaktifleri içermemektedir, lütfen QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinin biriyle veya yerel dağıtıcılarla iletişime geçin (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti teslim alınmasından hemen sonra –15 ila –25°C arasında sabit sıcaklıklı bir dondurucuda saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. Orijinal ambalajında önerilen saklama koşullarında saklandığında, kit etiketi üzerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Tekrarlanan dondurma ve çözündürme işlemlerinden kaçınılmalıdır. Maksimum 7 dondurma-çözündürme döngüsü öneririz.

Not: Optimal etkinlik ve performansın sağlanması için Scorpions (tüm floresanla işaretlenen moleküller gibi) florışıldama bozulmasından kaçınmak için ışıktan korunmalıdır.

Not: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitindeki reaktiflerin optimal kullanımını sağlamak için, örnekler toplu çalışılmalıdır. Örnekler tek tek test edilirse, daha fazla reaktif kullanılır ve *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti ile test edilebilecek örneklerin sayısı azalır.

Numune Kullanımı ve Saklanması

Not: Tüm örnekler potansiyel enfeksiyöz madde olarak bakılmalıdır.

Örnek materyali fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) küçük hücreli olmayan akciğer tümör örneklerinden elde edilen insan genomik DNA'sı olmalıdır. Numuneler, numune kalitesini sağlamak için standart patoloji metodolojisine göre nakledilmelidir.

Tümör örnekleri homolog değildir ve tümör örneğinden elde edilen veri aynı tümörden alınan diğer kısımlarla uyumlu olmayabilir. Ayrıca, tümör örnekleri tümör olmayan doku da içerebilir. Tümör olmayan dokudan elde edilen DNA'nın *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti aracılığıyla tespit edilen EGFR mutasyonlarını içermesi beklenmez.

Prosedür

EGFR analizi için gerekli olan tümör hücrelerinin seviyesinin belirlenmesi

EGFR analizi için kullanılan doku fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri örneklerine (NSCLC) ait dokudur. Bu tümör dokusundaki hücrelerden elde edilen DNA EGFR mutasyonları bakımından yabancı tip olabilir veya bir ya da daha fazla mutasyon taşıyabilir.

Ekstraksiyon için kullanılan FFPE NSCLC dokusu EGFR mutasyonları bakımından yabancı tip olan normal, tümör olmayan doku da içerebilir. Bu dokudan elde edilen yabancı tip DNA, mutant DNA'yı potansiyel olarak artık kit aracılığıyla tespit edilemeyecek seviyeye kadar seyreltebilir. Ancak, düşük tümör seviyeli hücrelerin bile tespit edilecek yüksek seviyeli mutasyonlar ve hasta için verilecek tedavi kararı için potansiyel var gibi test edilmesi önerilir.

Mutasyonların tespit şansını en yüksek düzeye çıkarmak için aşağıdakileri yapın.

- Her bir hasta örneğine ait en az bir lamda hematoksin ve eozin (H&E) boyama.
- Patoloğun tümör varlığı için boyanmış lamı incelediğinden emin olun.
- Mümkünse patolog FFPE bloğu boyunca birkaç lamı gözden geçirmelidir.
- Tümörlü olan tüm örnekler *therascreen* EGFR RGQ PCR kiti ile test edilebilir.

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

DNA saflaştırma işlemini aşağıdaki değişikliklerle birlikte QIAamp DNA FFPE Tissue Kiti El Kitabı'ndaki (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) talimatlara göre yapın.

- Lam üzerindeki FFPE kısımları toplayın.
- Yeni, steril bir neşter kullanarak doku kısımlarının etrafındaki fazla parafini kazıyarak uzaklaştırın.
- Ekstrakte edilecek her bir örnek için yeni bir neşter kullanarak doku kısımlarını mikrosantrifüje aktarın.
- Proteinaz K sindirimi 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.
- Saflaştırılmış genomik DNA 200 µl ATE Tamponu (QIAamp DNA FFPE Tissue Kitinde sağlanmıştır) içinde ayrıştırılmalıdır.
- Saflaştırılan genomik DNA'yı –15 ila –30°C arasında saklayın.
- Bilgi olduğunda, en çok tümör içeriği olan H&E boyalı lama bitişik lamalar kullanılmalıdır.

Not: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitindeki tüm testler kısa PCR ürünleri oluşturur. Ancak, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti aşırı derecede fragmente olmuş DNA ile çalışmaz.

Protokol: Örnek değerlendirmesi

Bu protokol örneklerdeki total çoğaltılabilir DNA'yı değerlendirmek için kullanılır.

Başlamadan önce önemli noktalar

- Prosedüre başlamadan önce "Genel önlemler", sayfa 11'u okuyun.
- Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q hakkında bilgi edinin. Cihaz kullanım kılavuzuna bakın.
- *Taq* DNA polimerazı (*Taq*) veya *Taq* DNA polimeraz içeren (*Taq*) herhangi bir karışımı, enzimi etkisizleştirebileceği için vorteksle karıştırmayın.
- Ucun aşırı enzimle kaplanmasını engellemek için *Taq* DNA polimerazı (*Taq*) pipet ucunu sıvı yüzeyin hemen altına yerleştirerek pipetle çekin.

Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Her kullanımdan önce, tüm reaktiflerin oda sıcaklığında tam olarak çözündürülmesi (15–25°C), 10 kez ters yüz edilerek karıştırılması ve içeriği tüpün altında toplamak için kısa süreli santrifüj edilmesi gerekir.
- Her kullanımdan önce *Taq* DNA Polimerazı (*Taq*) oda sıcaklığına (15–25°C) getirin. Enzimi tüpün altında toplamak için tüpü kısa süre santrifüj edin.

Prosedür

1. **Kontrol Reaksiyon Karışımını (Ctrl), Hedef İçermeyen Kontrol (NTC) için Nükleaz içermeyen Suyu ve EGFR Pozitif Kontrolünü (PC) oda sıcaklığında (15–25°C) çözündürün. Reaktifler çözündüğünde, bölgesel tuz konsantrasyonlarını engellemek için reaktifleri 10 kez ters yüz ederek karıştırın ve ardından içeriği tüpün altında toplamak için kısa süreli santrifüj edin.**
2. **Tablo 1'deki hacimlere göre DNA örnekleri, bir pozitif kontrol ve bir hedef içermeyen kontrol reaksiyonu için yeterli miktarda ana karışım hazırlayın. PCR'ı kurmak için yeterli farkı sağlamak amacıyla reaktifleri 1 fazla örneğe göre ekleyin.**

Ana karışım örnek hariç PCR için gerekli bileşenlerin tümünü içerir.

Tablo 1. Kontrol testi ana karışımının hazırlanması*

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
Kontrol Reaksiyon Karışımı (Ctrl)	19,5
<i>Taq</i> DNA polimeraz (<i>Taq</i>)	0,5
Toplam hacim	20,0

* Ana karışımı hazırlarken, fazladan bir örnek için yetecek miktarda hazırlayın.

3. **Ana karışımı yavaşça 10 kez yukarı aşağı pipetleme yaparak iyice karıştırın. Hemen 20 µl ana karışımı PCR şerit tüpüne ekleyin (kitle sağlanmaz).**

Not: Örnek değerlendirmesi için, kontrol testi ana karışımı, bir pozitif kontrol kuyusuna, bir negatif kontrol kuyusuna ve her bir örnek için birer kuyuya eklenmelidir.

4. **Hemen hedef içermeyen kontrol tüpüne (PCR tüpü numarası 9) 5 µl Nükleaz İçermeyen Su (H₂O) örneğini ekleyin ve tüpü kapatın. Örnek tüplerine örnek DNA'sından 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.**

Pozitif kontrol tüpüne (PCR tüpü 1) EGFR Pozitif Kontrol (PC) 5 µl ekleyin ve tüpü kapatın.

- 5. PCR şerit tüplerini rotorda uygun konumlara yerleştirin ve tüm tüplerin eşit hacim içerip içermediğini görsel olarak kontrol edin.**

Not: Rotora aktarılırken tüplerin şeritlerinin ters çevrilmediğinden emin olun.

- 6. Rotor tam dolu değilse, kalan boşlukları kapaklı boş tüplerle doldurun.**
- 7. Hemen 72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q cihazının aksesuarı) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştirdiğinden emin olun.**
- 8. Sıcaklık profilini oluşturmak ve çalışmayı başlatmak için Rotor-Gene Q cihaz ayarlarına başvurun (bkz. "Protokol: Rotor-Gene Q EGFR ayarları", sayfa 19).**

Tablo 2. Döngü parametreleri

Döngü	Sıcaklık	Süre	Veri taraması
1	95°C	15 dakika	Yok
40	95°C	30 saniye	Yok
	60°C	60 saniye	Yeşil ve sarı

- 9. Çalışma bittikten sonra, "Örnek değerlendirme veri analizi", sayfa 29'ye göre verileri analiz edin.**

Protokol: EGFR mutasyonlarının tespiti

Bu protokol EGFR mutasyonlarının tespiti içindir. Örnek, örnek değerlendirmesini geçtikten sonra EGFR mutasyon testleri kullanılarak test edilebilir.

Başlamadan önce önemli noktalar

- Prosedüre başlamadan önce “Genel önlemler”, sayfa 11'u okuyun.
- Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q hakkında bilgi edinin. Cihaz kullanım kılavuzuna bakın.
- Taq DNA Polimerazı (Taq) veya Taq DNA polimeraz içeren herhangi bir karışımı enzimi etkisizleştirebileceği için vorteksle karıştırmayın.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitinin etkili kullanımı için örnekler 72 kuyulu rotoru doldurmak için 7'li gruplar halinde gruplandırılmalıdır. Daha küçük gruplar, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti ile daha az örneğin test edilebileceği anlamına gelir.
- Ucun aşırı enzimle kaplanmasını engellemek için Taq'i pipet ucunu sıvı yüzeyin hemen altına yerleştirerek pipetle çekin.
- Her bir DNA örneği için kontrol ve mutasyon testleri çalışmadan çalışmaya oluşan farklılıkları engellemek için aynı PCR çalışmasında analiz edilmelidir.

Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Her kullanımdan önce, tüm reaktiflerin oda sıcaklığında tam olarak çözündürülmesi (15–25°C), 10 kez ters yüz edilerek karıştırılması ve içeriği tüpün altında toplamak için kısa süreli santrifüj edilmesi gerekir.
- Her kullanımdan önce Taq'in oda sıcaklığında (15–25°C) olduğundan emin olun. Enzimi tüpün altında toplamak için tüpü kısa süre santrifüj edin.

Prosedür

1. **Reaksiyon Karışımını, Hedef İçermeyen Kontrol (NTC) için Nükleaz içermeyen Suyu ve EGFR Pozitif Kontrolünü (PC) oda sıcaklığında (15–25°C) çözündürün. Reaktifler çözündüğünde, bölgesel tuz konsantrasyonlarını engellemek için reaktifleri 10 kez ters yüz ederek karıştırın ve ardından içeriği tüpün altında toplamak için kısa süreli santrifüj edin.**
2. **Tablo 3'deki hacimlere göre DNA örnekleri, bir pozitif kontrol ve bir hedef içermeyen kontrol reaksiyonu için yeterli miktarda ana karışım hazırlayın. PCR'ı kurmak için yeterli farkı sağlamak amacıyla reaktifleri 1 fazla örneğe göre ekleyin.**

Ana karışım örnek hariç PCR için gerekli bileşenlerin tümünü içerir.

Tablo 3. Ana Karışımın hazırlanması*

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
Reaksiyon Karışımı	19,5
Taq DNA polimeraz (Taq)	0,5
Toplam hacim	20,0

* Ana karışımı hazırlarken, fazladan bir örnek için yetecek miktarda hazırlayın.

- Her bir ana karışımı yavaşça 10 kez yukarı aşağı pipetleme yaparak iyice karıştırın. Hemen 20 µl ana karışımı her bir PCR şerit tüpüne ekleyin (kitle sağlanmaz).
- Hemen hedef içermeyen kontrol PCR şerit tüplerine (PCR tüpü numarası 9–16) 5 µl Nükleaz içermeyen Su (H₂O) ekleyin ve tüpü kapatın. Örnek tüplerine (PCR tüpleri 17–72) her bir örnekten 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın. Pozitif kontrol tüplerine (PCR tüpü 1–8) EGFR Pozitif Kontrolünden 5 µl (PC) ekleyin. Her bir DNA örneği hem kontrol hem de tüm mutasyon testleri için test edilmelidir. Düzen Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Kontrol ve mutasyon testlerinin düzeni

Test	Kontroller		Örnek numarası						
	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
Delesyonlar	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
İnsersiyonlar	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- PCR şerit tüplerini rotorda uygun konumlara yerleştirin ve tüm tüplerin eşit hacim içerip içermediğini görsel olarak kontrol edin.

Not: Rotora aktarılırken tüplerin şeritlerinin ters çevrilmediğinden emin olun.

6. Rotor tam dolu değilse, kalan boşlukları kapaklı boş tüplerle doldurun.
7. Hemen rotoru Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q cihazının aksesuarı) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştigiinden emin olun.
8. Sıcaklık profilini oluşturmak ve çalışmayı başlatmak için Rotor-Gene Q cihaz ayarlarına başvurun (bkz. “Protokol: Rotor-Gene Q EGFR ayarları”, sayfa 19).

Tablo 5. Döngü parametreleri

Döngü	Sıcaklık	Süre	Veri taraması
1	95°C	15 dakika	Yok
40	95°C	30 saniye	Yok
	60°C	60 saniye	Yeşil ve sarı

9. Çalışma bittikten sonra, “EGFR mutasyonu veri analizi”, sayfa 32'a göre verileri analiz edin.■

Protokol: Rotor-Gene Q EGFR ayarları

Bu protokol “Protokol: Örnek değerlendirmesi”, sayfa 14 ve “Protokol: EGFR mutasyonlarının tespiti”, sayfa 17'da referanslıdır.

Prosedür

1. Aşağıdaki adımlara göre sıcaklık profilini oluşturun.

Genel test parametreleri ayarları	Şekil 1–3
Hot-start enziminin ilk aktivasyonu	Şekil 4
DNA amplifikasyonu	Şekil 5–7
Floresan kanallarının ayarlanması	Şekil 8–12
Çalışmanın başlatılması	Şekil 13

Özetlemek gerekirse, döngü parametreleri aşağıdaki gibidir.

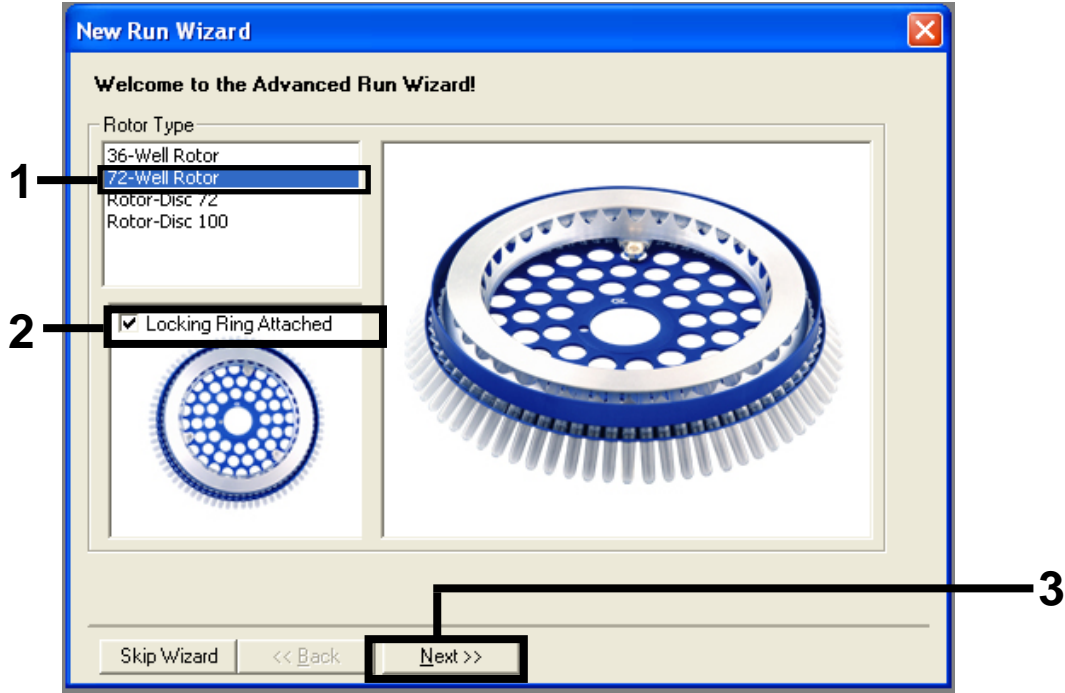
Tablo 6. Döngü parametreleri

Döngü	Sıcaklık	Süre	Veri taraması
1	95°C	15 dakika	Yok
40	95°C	30 saniye	Yok
	60°C	60 saniye	Yeşil ve sarı

Tüm özellikler Rotor-Gene Q yazılımı sürüm 2.0.2 ile ilgilidir. Cihaz kullanıcı kılavuzunda Rotor-Gene cihazlarının programlanmasıyla ilgili daha fazla bilgi bulabilirsiniz. Şekillerde, bu ayarlar kalın siyah olarak çerçevelenmiştir.

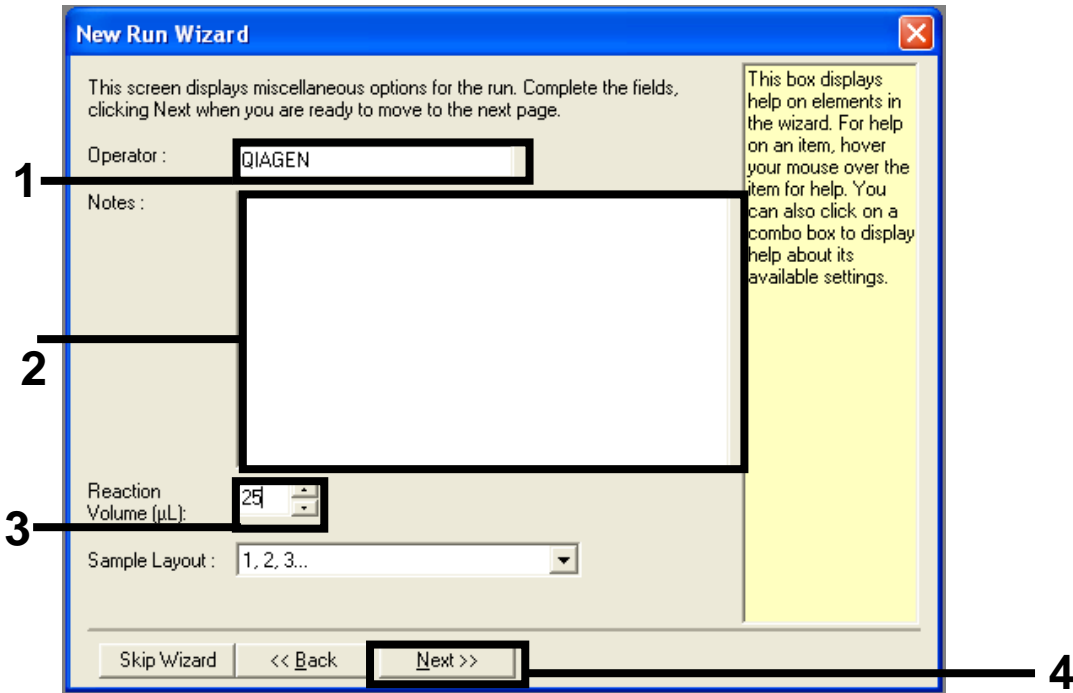
- 2. Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazına bağlı olan bilgisayarın masa üstündeki Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 software simgesine çift tıklatın. Görüntülenen “New Run” (Yeni çalışma) iletişim kutusunda “Advanced” (Gelişmiş) sekmesini seçin.**
- 3. Yeni şablon oluşturmak için “Empty Run” (Boş Çalışma) seçimini yapın ve ardından “New Run Wizard”a (Yeni Çalışma Sihirbazı) girmek için “New” (Yeni) seçeneğini tıklatın.**

4. Rotor tipi olarak **72-Well Rotor** (72 Kuyulu Rotor) seçimini yapın. Kilitleme halkasının takıldığını doğrulayın ve **“Locking Ring Attached”** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. **“Next”** (Sonraki) ögesini tıklatın (Şekil 1).



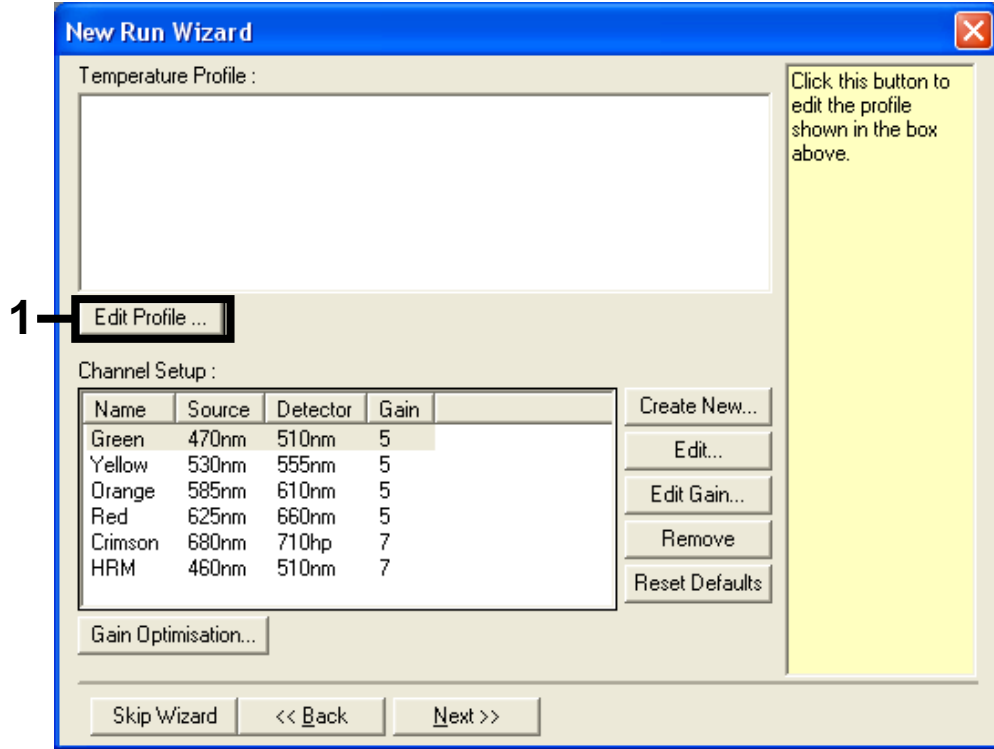
Şekil 1. “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu.

5. Operatörün adını girin. Herhangi bir not ekleyin ve reaction volume (reaksiyon hacmi) değerini 25 olarak girin. **“Sample Layout”** (Örnek Düzeni) kısmının **“1,2,3...”** olarak okunduğundan emin olun. **“Next”** (Sonraki) ögesini tıklatın (Şekil 2).



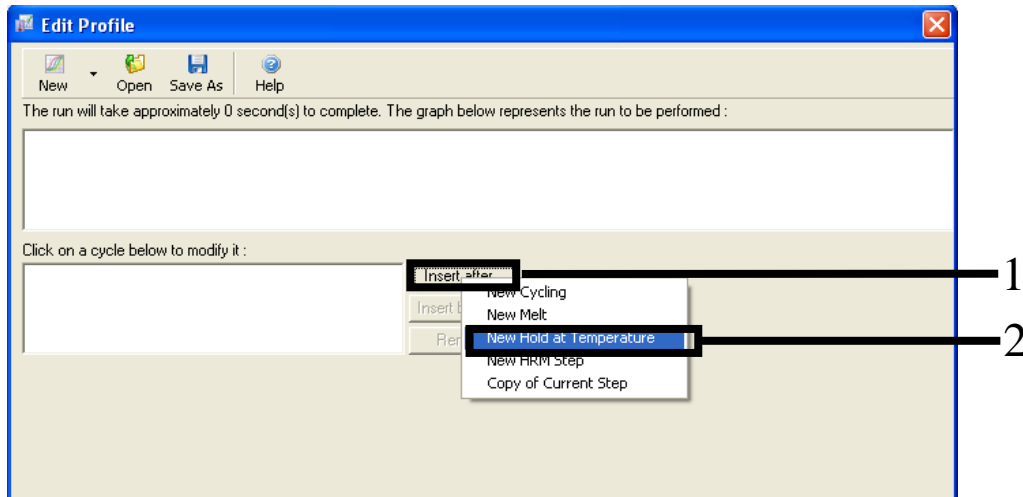
Şekil 2. Genel test parametrelerinin ayarlanması.

6. Bir sonraki “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusundaki “Edit Profile” (Profili düzenle) düğmesini tıklatın (Şekil 3) ve sıcaklık profilini aşağıdaki adımda yer alan bilgilere göre programlayın.



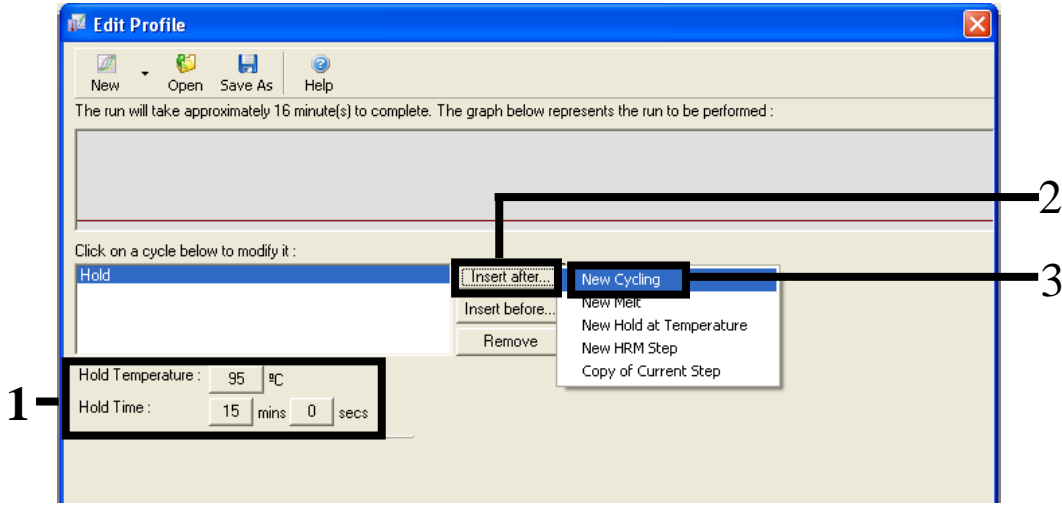
Şekil 3. Profilin düzenlenmesi.

7. “Insert after”(Sonra Ekle) düğmesini tıklatın ve *New Hold at Temperature* (Yeni Sıcaklıkta Tutma) seçimini yapın (Şekil 4).



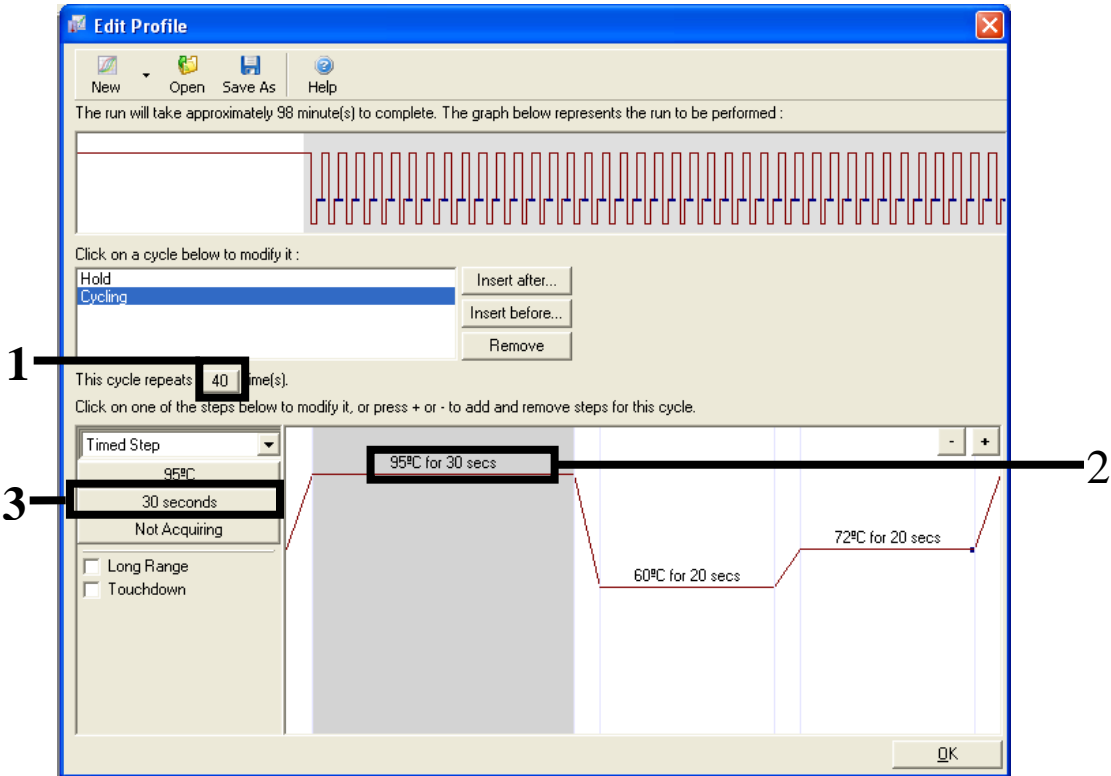
Şekil 4. 95°C'de ilk inkübasyon adımı.

8. “Hold Temperature” (Tutma Sıcaklığı) seçeneğini 95°C ve “Hold Time” (Tutma Süresi) seçeneğini 15 dak. olarak değiştirin. “Insert After” (Sonra Ekle) düğmesini tıklatın ve ardından New Cycling (Yeni Döngü) seçimini yapın (Şekil 5).



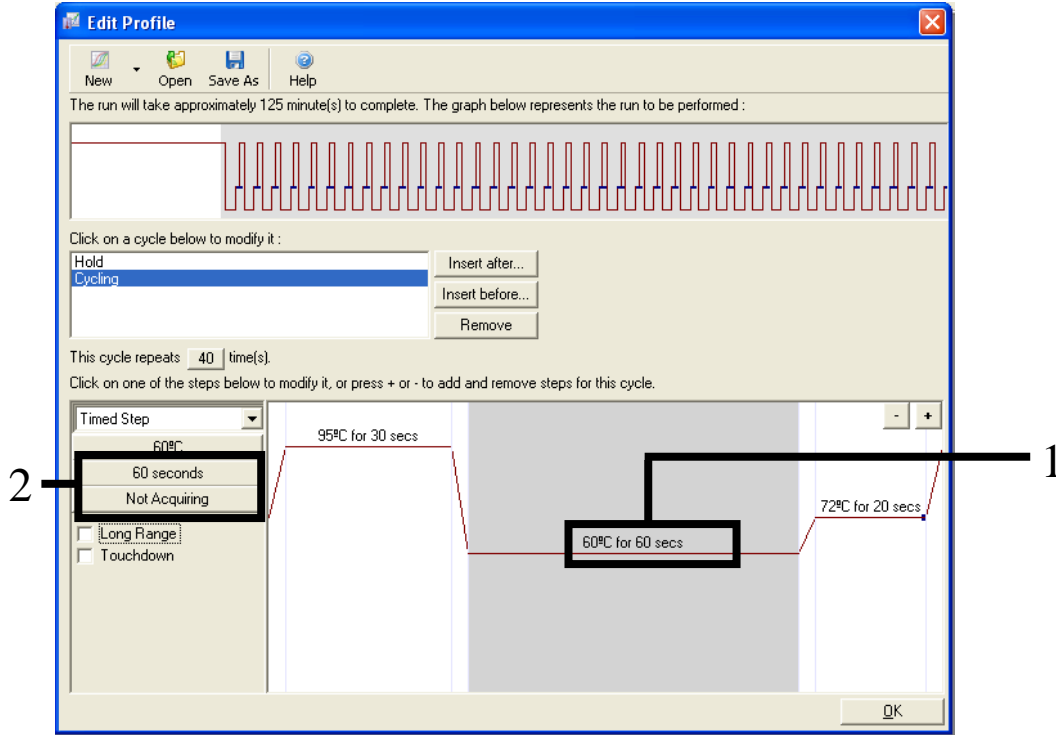
Şekil 5. 95°C'de ilk inkübasyon adımı.

9. Cycle repeats (döngü tekrarları) sayısını 40 olarak değiştirin. İlk adımı seçin ve 95°C for 30 secs (30 sn. süreyle 95°C) olarak ayarlayın (Şekil 6).



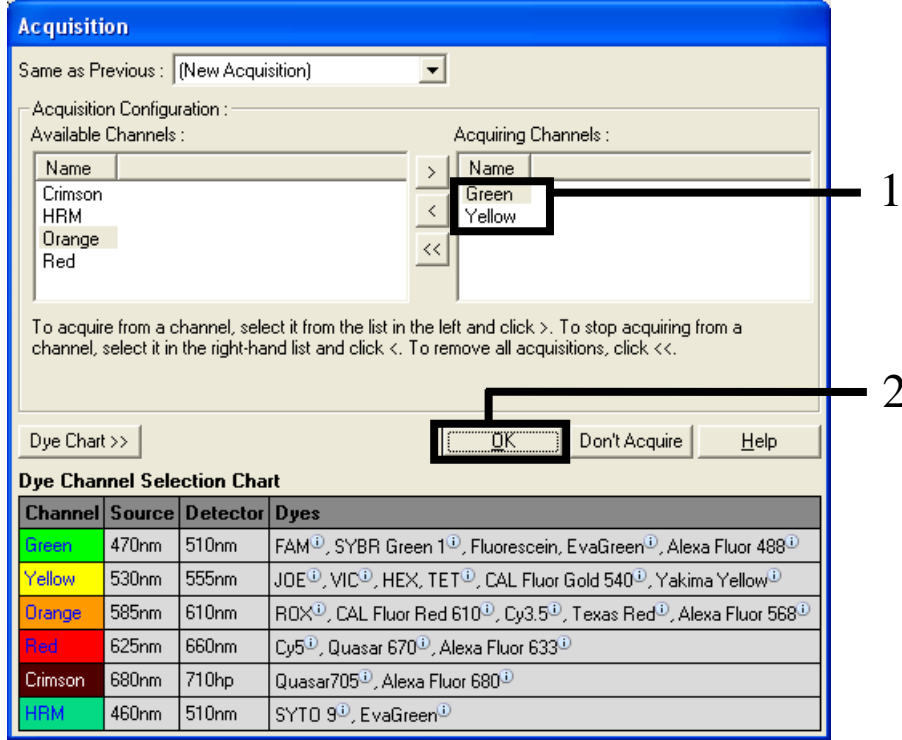
Şekil 6. 95°C'deki döngü adımı.

10. İkinci adımı vurgulayın ve 60°C for 60 secs (60 sn. süreyle 60°C) olarak ayarlayın. “Not Acquiring” (Alınmıyor) düğmesini seçerek bu adım sırasında veri alımını etkinleştirin (Şekil 7).



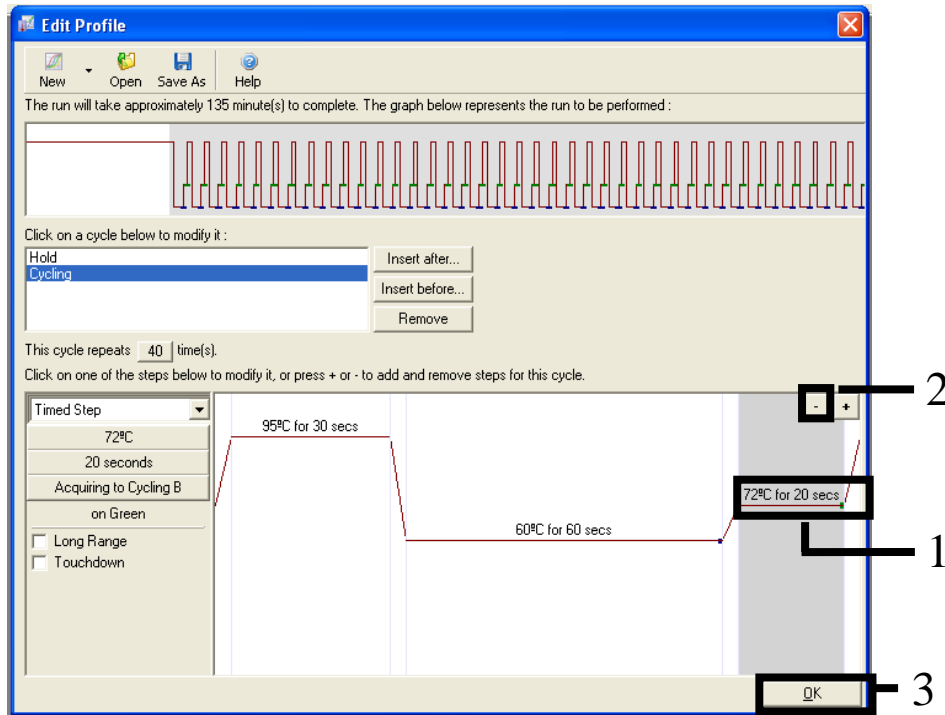
Şekil 7. 60°C'deki döngü adımı.

11. Kanalları “Available Channels” (Kullanılabilir Kanallar) listesinden aktarmak için “>” düğmesini seçerek tarama kanallarını Green (Yeşil) ve Yellow (Sarı) olarak ayarlayın. “OK” (TAMAM) düğmesini tıklayın (Şekil 8).



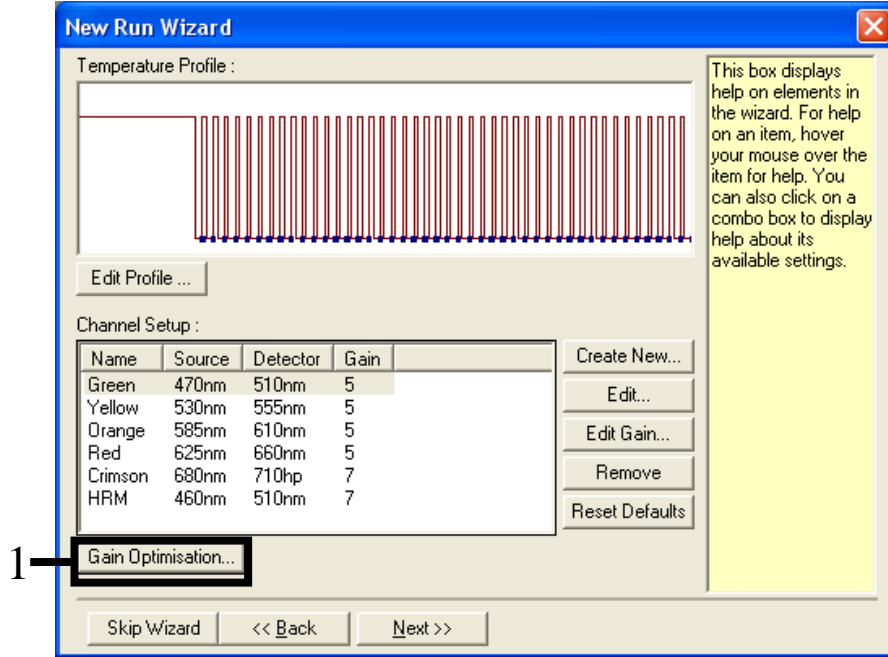
Şekil 8. 60°C döngü adımıdaki tarama.

12. Üçüncü adımı vurgulayın ve “-” düğmesini tıklayarak silin. “OK” (TAMAM) düğmesini tıklayın (Şekil 9).



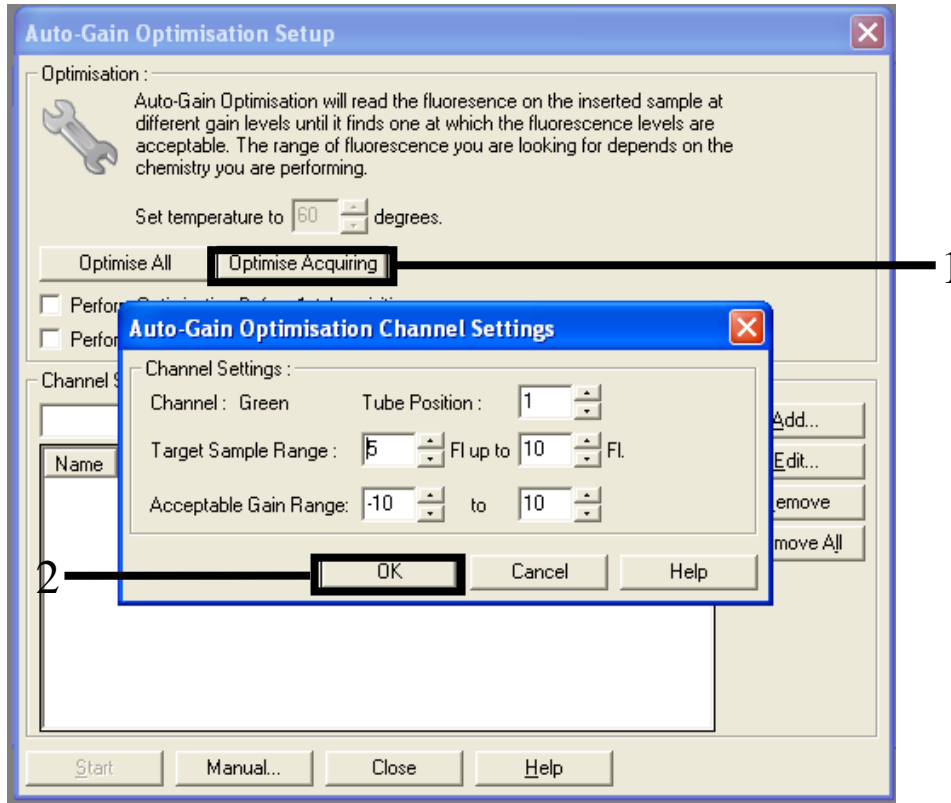
Şekil 9. Uzama adımının kaldırılması.

13. Bir sonraki iletişim kutusunda, “Gain Optimisation” (Optimizasyon Sağlama) düğmesini tıklatın (Şekil 10).



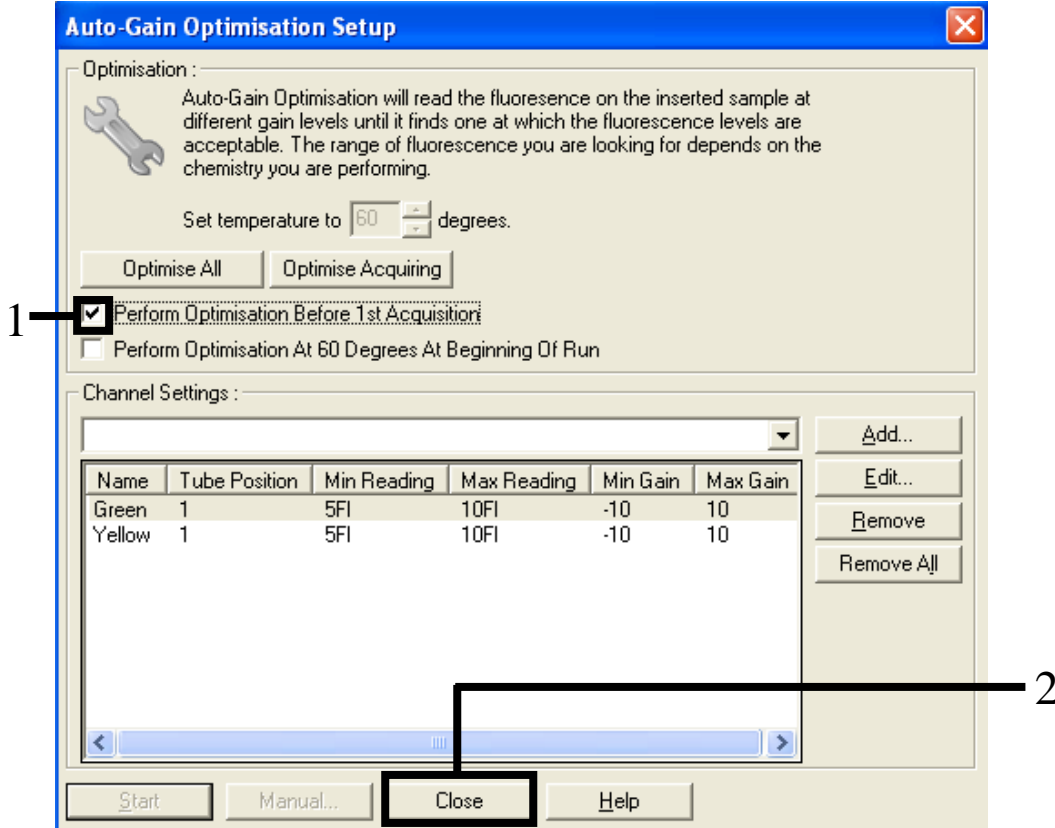
Şekil 10. Optimizasyon sağlama.

14. “Optimise Acquiring” (Taramayı Optimize Et) düğmesini tıklatın. Ardından her bir kanal için kanal ayarları görüntülenir. İki kanal için de “OK” (TAMAM) düğmesini tıklatarak varsayılan bu değerleri kabul edin (Şekil 11).



Şekil 11. Yeşil kanal için otomatik optimizasyon sağlama.

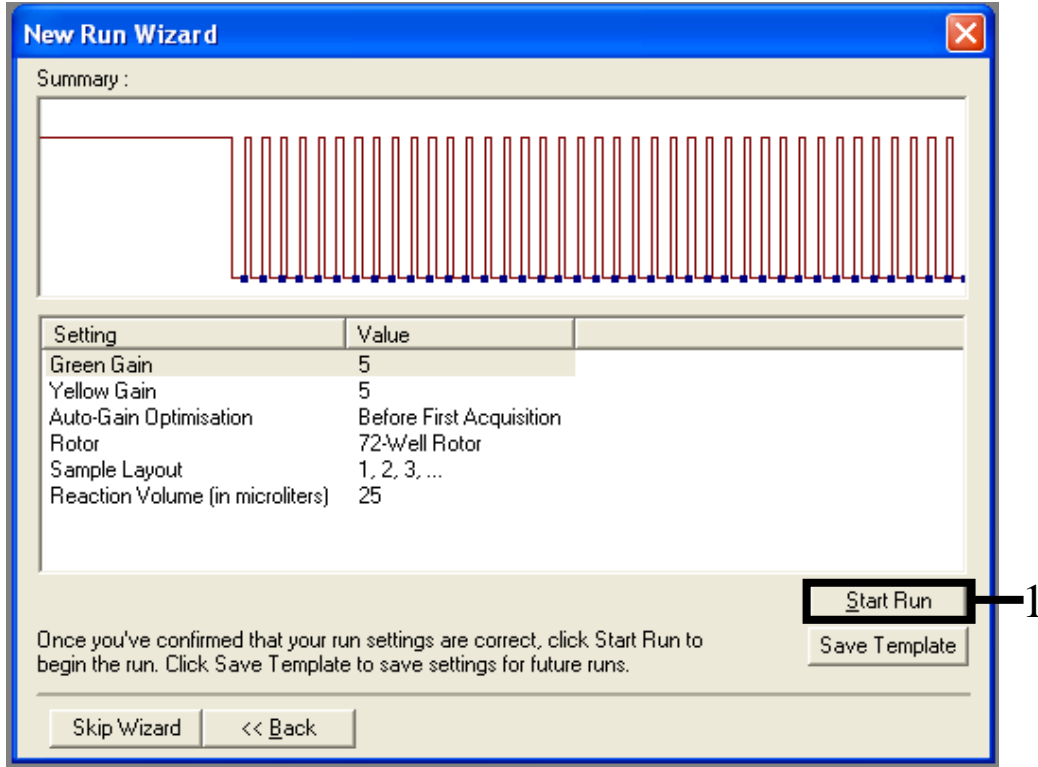
15. “Perform Optimisation before 1st Acquisition” (Optimizasyonu İlk Taramadan Önce Gerçekleştir) kutusunu işaretleyin ve ardından sihirbaza dönmek için “Close” (Kapat) düğmesini tıklatın (Şekil 12).



Şekil 12. Yeşil ve sarı kanalların seçimi.

16. “Save Template” (Şablonu Kaydet) seçimini yaparak şablonu uygun konuma kaydetmek için “Next” (Sonraki) düğmesini tıklatın.

17. Özeti kontrol edin ve çalışma dosyasını kaydederek çalışmayı başlatmak için “Start Run” (Çalışmayı Başlat) düğmesini tıkklatın (Şekil 13).



Şekil 13. Çalışmanın başlatılması.

18. Çalışma başladıktan sonra, örnek adlarını o anda girebilirsiniz ya da çalışma sırasında veya çalışma tamamlandığında “Finish” (Bitti) düğmesini tıkklatıp “Sample” (Örnek) düğmesini seçerek sonradan da girebilirsiniz.
19. Çalışma bittikten sonra, verileri uygun protokole göre analiz edin:
- Örnek değerlendirmesi için, bkz “Örnek değerlendirme veri analizi”, sayfa 29.
 - Mutasyon analizi için bkz. “EGFR mutasyonu veri analizi”, sayfa 32.

Sonuçların Yorumlanması

ΔC_T analiz yöntemi

Scorpions gerçek zamanlı testler reaksiyonun başında varolan hedef moleküllerin bir ölçüsü olarak arka plan sinyali üzerindeki floresan sinyali tespit etmek için gerekli olan birkaç PCR döngüsü kullanır. Sinyalin arka plan floresanının üzerinde saptandığı nokta döngü eşiği olarak adlandırılır (C_T).

Örnek ΔC_T değerleri aynı örnekten elde edilen mutasyon testi C_T değeri ve kontrol testi C_T değeri arasındaki fark olarak hesaplanır:

$$\Delta C_T = \text{mutasyon } C_T - \text{kontrol } C_T$$

Not: Örnekler bu teste ait eşik ΔC_T değerinden daha düşük ΔC_T değeri verirse mutasyon pozitif olarak sınıflandırılır. Bu değerinde üzerinde, örnek ya kit tarafından tespit edilebilecek mutasyon yüzdesinden (test limitinin dışında) daha az içerir veya mutasyon negatiftir.

Not: 40 veya yukarı mutation C_T değeri negatif veya bu kit sınırlarının dışında olarak değerlendirilir.

ARMS primerlerini kullanırken, mutasyon içermeyen DNA'dan elde edilen çok geç arka plan C_T değeri veren bazı yetersiz bağlanmalar oluşabilir. Arka plan amplifikasyonundan hesaplanan tüm ΔC_T değerleri eşik ΔC_T değerlerinden daha yüksektir ve örnek mutasyon negatif olarak sınıflandırılır.

Örnek değerlendirme veri analizi

Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri aşağıdaki prosedüre göre analiz edin.

Yazılım analiz ayarları

1. Rotor-Gene Q serisi yazılım sürümü (2.0.2) ve üstünü kullanarak uygun bir dosya açın.
2. Örneklerin işaretlenip işaretlenmediğini kontrol edin.
3. Her bir detektör/kanal için ham kanal sayfasındayken, "Options" (Seçenekler) seçeneğini tıklatın ve *Crop start cycles*'ı (Ürün başlangıç döngüleri) girin. "Remove data before cycle" (Döngüden önce verileri kaldır) seçeneğinin bulunduğu sayfada, 15 değerini girin ve "OK" (TAMAM) düğmesini tıklatın.
4. "Analysis" (Analiz) seçeneğini tıklatın. Analiz sayfasında, HEX kanalını kontrol etmek için "Cycling A (from 15), Yellow" (Döngü A (15'deki), Sarı) seçeneğini tıklatın.
5. "dynamic tube" (dinamik tüp) seçeneğinin vurgulanmış olup olmadığını doğrulayın. "Slope correct" (Eğim düzeltme) ve "Linear scale" (Doğrusal ölçek) seçeneklerini tıklatın.

6. **Threshold (Eşik) değerini 0.02 olarak ayarlayın ve HEX C_T değerlerini kontrol edin.**
7. **Analiz sayfasında, FAM kanalını görüntülemek için “Cycling A (from 15), Green” (Döngü A (15'deki), Yeşil) seçeneğini tıklayın.**
8. **Dynamic tube (dinamik tüp) vurgulanmalıdır. “Slope correct” (Eğim düzeltme) ve “Linear scale” (Doğrusal ölçek) seçeneklerini tıklayın.**
9. **Threshold (Eşik) değerini 0.075 olarak ayarlayın ve FAM C_T değerlerini kontrol edin.**

Çalışma bittikten sonra verileri aşağıdaki şekilde analiz edin.

- **Negatif kontrol:** Hedef kontaminasyonunun olmadığından emin olmak için NTC, yeşil (FAM) kanalda 40'ın altında C_T değeri oluşturmamalıdır. Hedef içermeyen kontrol (NTC) grafiklerinin analizi hakkında önemli bilgiler için bkz. “Verilerin yorumlanması için notlar” sayfa 37. Çalışmanın doğru olarak kurulduğundan emin olmak için NTC, sarı (HEX) kanalda 31–37 arası amplifikasyon göstermelidir.

Yeşil kanalda pozitif amplifikasyon ve/veya sarı sinyalde 31–37 aralığı dışında amplifikasyon varsa, örnek sonuçları atılmalıdır.

- **Pozitif kontrol:** EGFR Pozitif Kontrolü (PC) 26.26–30.95 arasında kontrol testi C_T değeri (FAM kanalı) vermelidir. Bu aralığın dışındaki C_T değerini içeren çalışma test kurulum sorunu olduğunu gösterir ve çalışma başarısız olarak değerlendirilmelidir. Pozitif kontrol test C_T değeri 26.26–30.95 (ekson 2, FAM) arasındaysa fakat internal kontrol C_T (HEX) değeri 31–37 aralığının dışındaysa, analizle devam edin.

Not: İki çalışma kontrolünden herhangi biri başarısız olmuşsa örnek verileri kullanılmamalıdır.

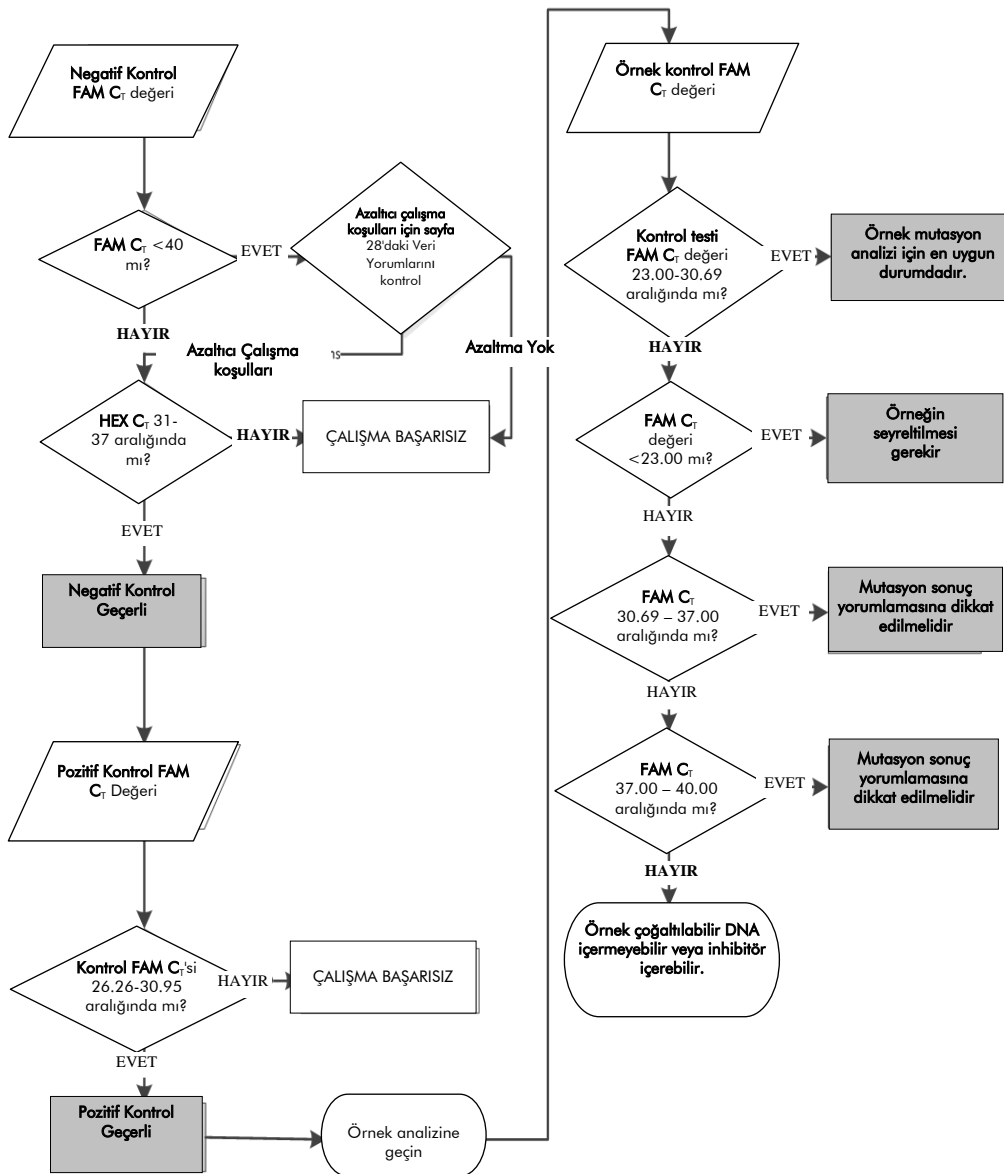
Her iki çalışma kontrolünün geçerli olması şartıyla, her bir örnek C_T değeri yeşil (FAM) kanalda 23–30.69 aralığı içinde olmalıdır. Örnek bu aralığın dışındaysa, aşağıdaki talimatlar verilmiştir.

- **Örnek kontrol testi C_T değeri <23:** Kontrol C_T değeri <23 olan örnekler mutasyon testlerine aşırı yüklenmiştir ve seyreltilmelidir. Düşük seviyedeki her bir mutasyonu saptamak için yüksek konsantrasyonlu örnekler yarım ölçek seyreltildiğinde C_T'nin 1 arttığı düşünülerek yukarıdaki aralığın içinde olacak şekilde seyreltilmelidir.
- **Örnek kontrol testi C_T değeri 30,69–37:** Çok düşük seviyeli mutasyonlar tespit edilemeyebilir bu yüzden dikkatli yorumlayın.
- **Örnek kontrol testi C_T değeri 37–40:** Yalnızca çok yüksek seviyeli mutasyonlar tespit edilir bu yüzden dikkatli yorumlayın.

- **Örnek kontrol testi C_T değeri >40 :** Örnek analiz edilebilmesi için yeterli DNA içermez.

Not: Örnek C_T değeri oluşturmuyorsa (örn., $C_T >40$), bu inhibitör varlığından, test kurulumdaki bir hatadan ve çoğaltılabilir EGFR DNA'sı olmamasından kaynaklanabilir.

- **İnternal kontrol C_T değeri 31–37:** Çoğaltılabilir EGFR DNA'sı yok.
- **İnternal kontrol C_T değeri 31–37 aralığı içinde değil:** Bu, test kurulum hatasını veya inhibitör varlığını gösterebilir. Örneği seyrelterek inhibitörün etkisini azaltmak mümkündür ancak bu DNA'yı da seyreltir.



Şekil 14. Örnek değerlendirme analizi iş akışı.

EGFR mutasyonu veri analizi

Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri aşağıdaki prosedüre göre analiz edin.

Yazılım analiz ayarları

1. Rotor-Gene Q serisi yazılım sürümü (2.0.2) ve üstünü kullanarak uygun bir dosya açın.
2. Örneklerin işaretlenip işaretlenmediğini kontrol edin.
3. Her bir detektör/kanal için ham kanal sayfasındayken, "Options" (Seçenekler) seçeneğini tıklatın ve *Crop start cycles*'ı (Ürün başlangıç döngüleri) girin. "Remove data before cycle" (Döngüden önce verileri kaldır) seçeneğinin bulunduğu sayfada, 15 değerini girin ve "OK" (TAMAM) düğmesini tıklatın.
4. "Analysis" (Analiz) seçeneğini tıklatın. Analiz sayfasında, HEX kanalını görüntülemek için "Cycling A (from 15), Yellow" (Döngü A (15'deki), Sarı) seçeneğini tıklatın.
5. "dynamic tube" (dinamik tüp) seçeneğinin vurgulanmış olup olmadığını doğrulayın. "Slope correct" (Eğim düzeltme) ve "Linear scale" (Doğrusal ölçek) seçeneklerini tıklatın.
6. Threshold (Eşik) değerini 0.02 olarak ayarlayın ve HEX C_T değerlerini kontrol edin.
7. Analiz sayfasında, FAM kanalını görüntülemek için "Cycling A (from 15), Green" (Döngü A (15'deki), Yeşil) seçeneğini tıklatın.
8. "dynamic tube" (dinamik tüp) seçeneğinin vurgulanmış olup olmadığını doğrulayın. "Slope correct" (Eğim düzeltme) ve "Linear scale" (Doğrusal ölçek) seçeneklerini tıklatın.
9. Threshold (Eşik) değerini 0.075 olarak ayarlayın ve FAM C_T değerlerini kontrol edin.

Çalışma kontrol analizi:

Şekil 15'deki "Çalışma Kontrol Analizi" akış şemasına bakın.

- **Negatif kontrol:** Hedef kontaminasyonunun olmadığından emin olmak için NTC, yeşil (FAM) kanalda 40'ın altında C_T değeri oluşturmamalıdır. Hedef içermeyen kontrol (NTC) grafiklerinin analizi hakkında önemli bilgiler için bkz. "Verilerin yorumlanması için notlar" sayfa 37. Çalışmanın doğru olarak kurulduğundan emin olmak için NTC, sarı (HEX) kanalda C_T 31–37 arası amplifikasyon göstermelidir.

Yeşil kanalda pozitif amplifikasyon ve/veya sarı sinyalde 31–37 aralığı dışında amplifikasyon varsa, örnek sonuçları atılmalıdır.

- **Pozitif kontrol:** EGFR Pozitif Kontrolü (PC) yeşil kanalda 26.26–30.95 arasında kontrol testi C_T değeri vermelidir. Bu aralığın dışındaki C_T

değerini içeren çalışma test kurulum sorunu olduğunu gösterir ve çalışma başarısız olarak değerlendirilmelidir. Pozitif kontrol test C_T değeri 26.26–30.95 (ekson 2, FAM) arasındaysa fakat internal kontrol C_T (HEX) değeri 31–37 aralığının dışındaysa, analizle devam edin.

Mutasyon ve kontrol C_T değerlerinin pozitif kontrolden alınmasını sağlayarak her bir mutasyon testi için ΔC_T değerini aşağıdaki şekilde hesaplayın.

$$\Delta C_T = \text{mutasyon } C_T - \text{kontrol } C_T$$

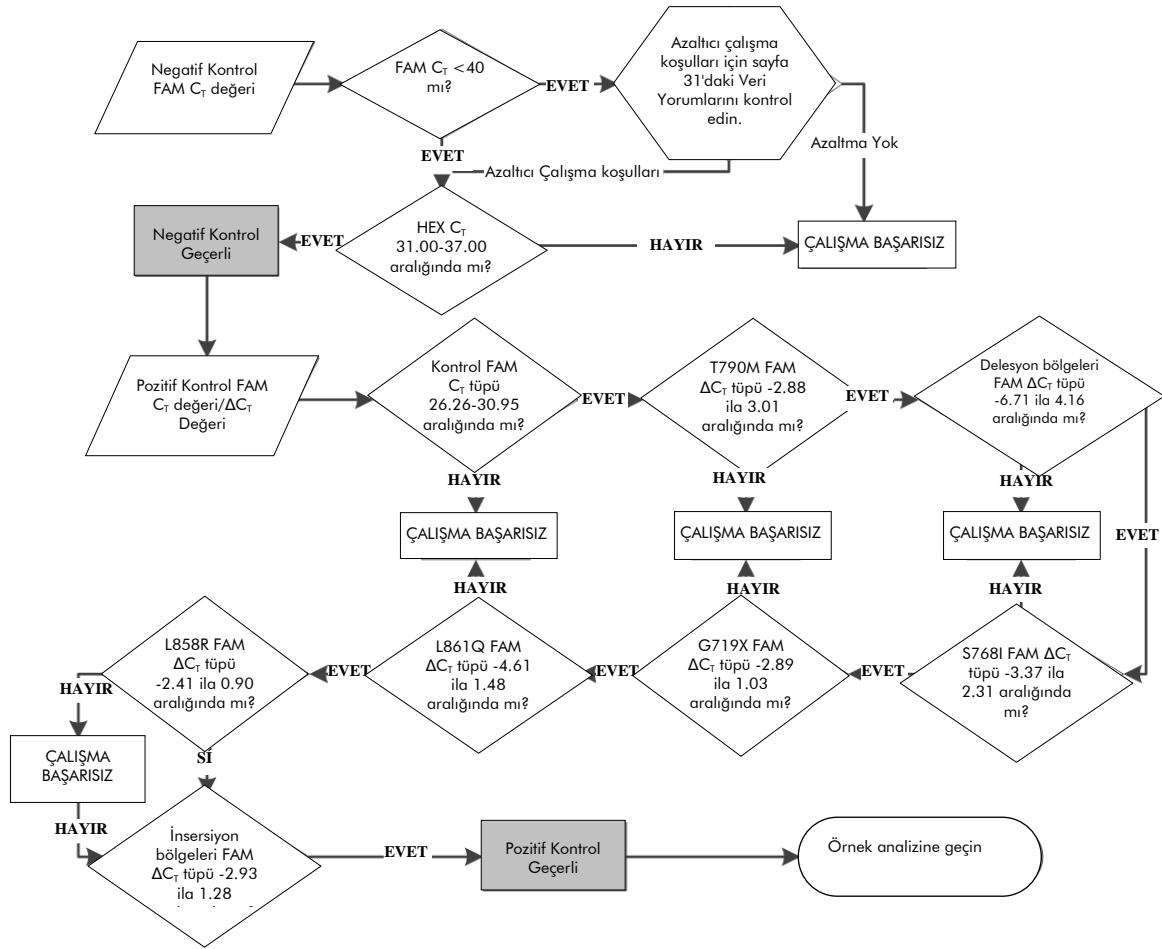
EGFR Pozitif Kontrol (PC) ΔC_T değerleri Tablo 7'de verilen değerler içerisinde olmalıdır.

Tablo 7. Beklenen pozitif kontrol ΔC_T değerleri*

Test	Pozitif kontrol ΔC_T değeri
T790M	–2.88 ila 3.01
Delesyonlar	–6.71 ila 4.16
L858R	–2.41 ila 0.90
L861Q	–4.61 ila 1.48
G719X	–2.89 ila 1.03
S768I	–3.37 ila 2.31
İnversiyonlar	–2.93 ila 1.28

* Rotor-Gene Q yazılımı (2.0.2)

Not: Negatif veya pozitif çalışma kontrollerinden herhangi biri başarısız olmuşsa örnek verileri kullanılmamalıdır.



Şekil 15. Çalışma kontrol analizi iş akışı.

Örnek analizi:

Örnek kontrol FAM C_T değeri

Her iki çalışma kontrolünün geçerli olması şartıyla, her bir örnek C_T değeri yeşil kanalda 23–30.69 aralığı içinde olmalıdır. Şekil 16'daki "Örnek Analizi" akış şemasına bakın.

- **Örnek kontrol testi C_T < 23:** Kontrol C_T değeri < 23 olan örnekler mutasyon testlerine aşırı yüklenmiştir ve seyreltilmelidir. Düşük seviyedeki her bir mutasyonu saptamak için yüksek konsantrasyonlu örnekler yarım ölçek seyreltildiğinde C_T'nin 1 arttığı düşünülerek yukarıdaki aralığın içinde olacak şekilde seyreltilmelidir.
- **Örnek kontrol testi CT değeri 30.69–37 aralığında:** Çok düşük seviyeli mutasyonlar tespit edilemeyebilir bu yüzden dikkatli yorumlayın.
- **Örnek kontrol testi CT değeri 37–40 aralığında:** Yalnızca çok yüksek seviyeli mutasyonlar tespit edilir bu yüzden dikkatli yorumlayın.
- **Örnek kontrol testi CT değeri > 40:** Örnek analiz edilebilmesi için yeterli DNA içermez.

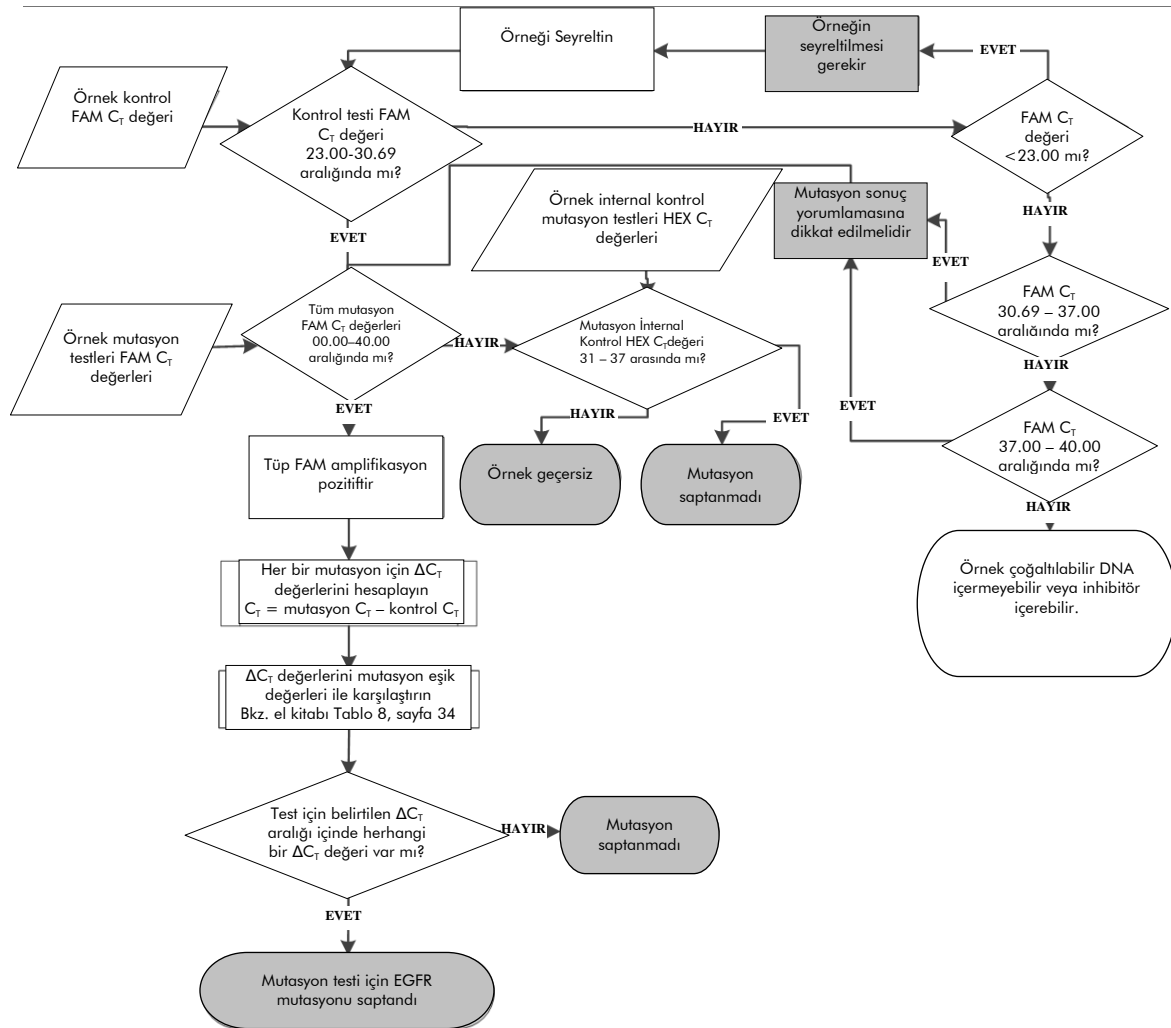
Not: Örnek FAM C_T değeri 23 ve <37 arasındaysa, internal kontrolü değerlendirmeye gerek yoktur.

Not: Örnek C_T değeri oluşturmuyorsa (örn., $C_T > 40$), bu inhibitör varlığından, test kurulumdaki bir hatadan ve çoğaltılabilir EGFR DNA'sı olmamasından kaynaklanabilir.

■ **İnternal kontrol C_T değeri 31–37:** Test düzgün şekilde işliyor fakat çoğaltılabilir EGFR DNA'sı yok.

■ **İnternal kontrol C_T değeri 31–37 aralığı içinde değil:** Bu, test kurulum hatasını veya inhibitör varlığını gösterebilir. Örneği seyrelterek inhibitörün etkisini azaltmak mümkündür ancak bu DNA'yı da seyreltir.

Not: Mutasyon testi FAM reaksiyonu C_T değeri oluşturmazsa ve internal kontrol reaksiyonları 31–37 aralığının dışında C_T değeri oluşturursa, yanlış negatif sonuçlara yol açabilecek inhibitörler olabileceği için veriler atılmalıdır. Örneğin seyreltilmesi inhibitörlerin etkisini azaltabilir fakat bunun DNA'yı da seyrelteceği ayrıca dikkate alınmalıdır.



Şekil 16. Mutasyon analizi akış şeması.

Örnek mutasyon testleri FAM C_T değeri

Tüm yedi mutasyon reaksiyon karışımı için FAM değeri Tablo 8'de listelenen değerlerle karşılaştırılmalıdır.

Tablo 8. Kabul edilebilir örnek mutasyon reaksiyon değerleri (FAM)*

Test	Kabul edilebilir C _T aralığı	Eşik ΔC _T değeri
T790M	15,00–40,00	6,38
Delesyonlar	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
İnsersiyonlar	15,00–40,00	7,91

*Kabul edilebilir değerler gösterilen değerlerin arasında ve kapsamındadır.

- FAM C_T değeri belirtilen 15.00–40.00 aralığı içerisine giriyorsa, bu FAM amplifikasyon pozitifdir.
- FAM C_T değeri belirtilen aralığın üzerindeyse veya hiç amplifikasyon yoksa, bu FAM amplifikasyon negatiftir.

Mutasyon ve kontrol C_T değerlerinin aynı örnekten alındığından emin olarak pozitif amplifikasyon gösteren her bir mutasyon örneği için ΔC_T değerini aşağıdaki şekilde hesaplayın.

$$\Delta C_T = \text{mutasyon } C_T - \text{kontrol } C_T$$

Her bir teste doğru kesim noktasının uygulandığından emin olarak söz konusu test için kesim noktalı örneklerle ait ΔC_T değerini hesaplayın (Tablo 8).

Kesim noktası, üzerindeki noktalarda pozitif sinyalin potansiyel olarak yabancı tip DNA'daki ARMS primerinin arkaplan sinyalinden kaynaklandığı noktadır. Örnek ΔC_T değeri kesim noktasından daha yüksekse, "mutasyon saptanmadı" olarak sınıflandırılır veya kit tespit limitlerinin altındadır. Örnek değeri kesim noktasında veya kesim noktasının altındaysa, örnek bu test aracılığıyla tespit edilen mutasyon için pozitif olarak kabul edilir.

Not: FAM mutasyon C_T değeri göstermeyen örnekler için internal kontrol (HEX) C_T değerinin değerlendirilmesi mutasyonun saptanıp saptanmadığının veya

testin geçersiz olup olmadığının belirlenmesi için gereklidir. HEX C_T değeri 31–37 arasındaysa, mutasyon saptanmaz. HEX C_T değeri 31–37 aralığının dışındaysa, örnek geçersizdir.

Özet olarak, her örnek için, her bir mutasyon reaksiyonu aşağıdaki kriterleri kullanarak mutasyon saptandı, mutasyon saptanmadı veya geçersiz durumunu belirtecektir.

- **Mutasyon saptandı:** FAM amplifikasyonu pozitif ve ΔC_T değerleri eşik değerinde veya eşik değerinin altındadır. Çoklu mutasyonlar saptanırsa, tümü bildirilebilir.
- **Mutasyon saptanmadı:**
FAM amplifikasyonu pozitif ve ΔC_T değerleri eşik değerinin üzerindedir.
FAM amplifikasyonu negatif ve HEX (internal kontrol) amplifikasyonu pozitif.
- **Geçersiz:**
FAM amplifikasyonu negatif ve HEX amplifikasyonu tanımlamaların dışında.

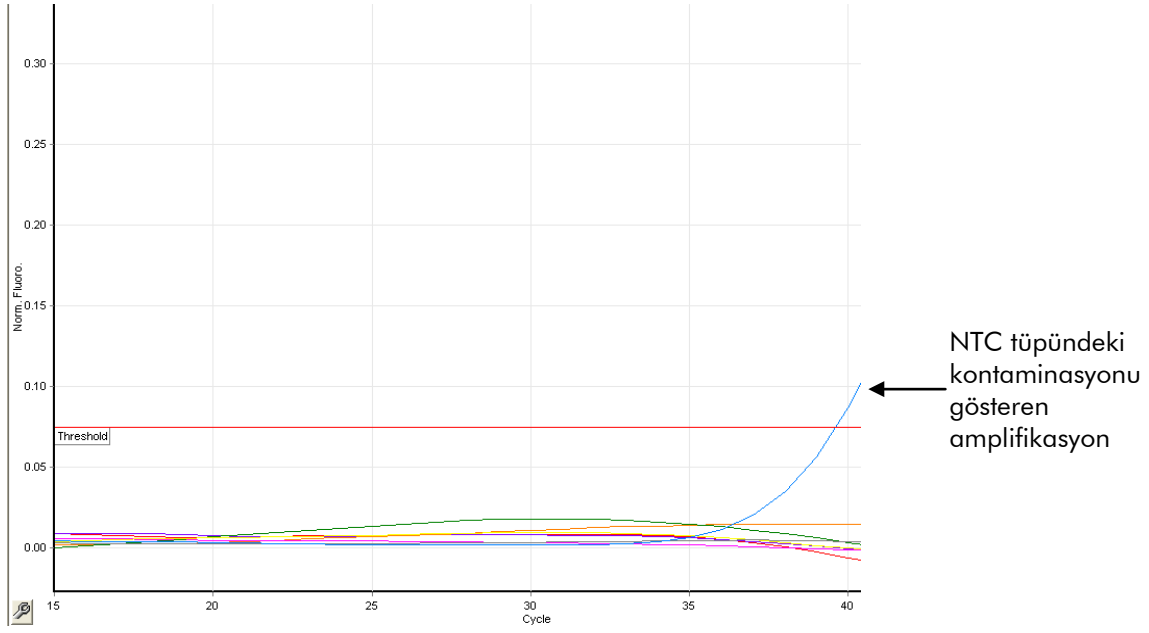
Verilerin yorumlanması için notlar

Doğrusal amplifikasyon

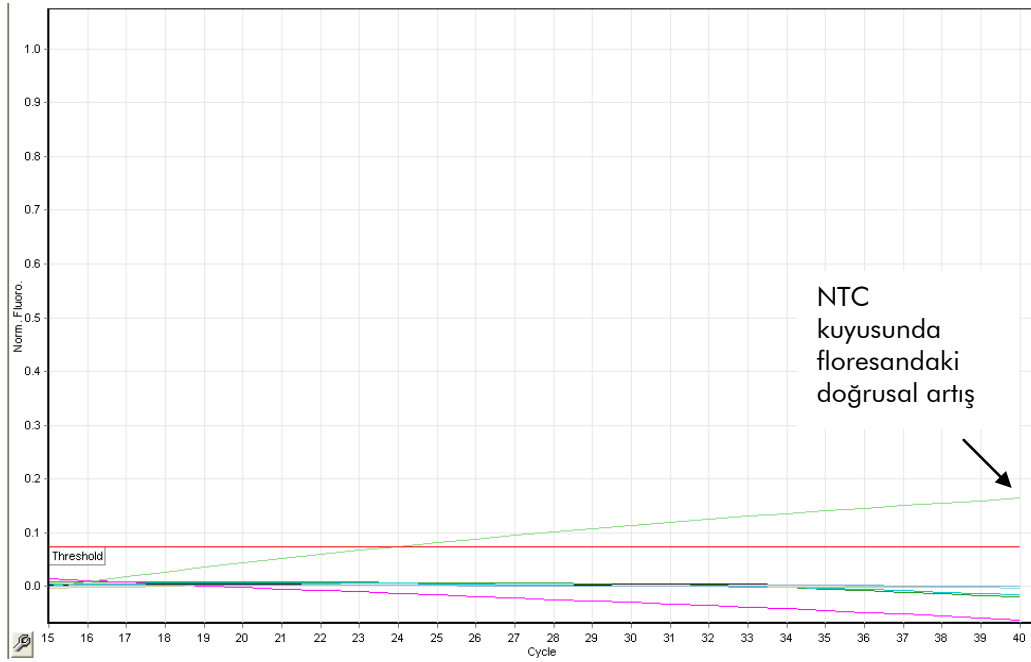
Tüm reaksiyonlardan elde edilen Rotor-Gene Q grafikleri kontrol edilmelidir. Bazen, NTC ve negatif örneklerde floresan sinyalinde bir artış görülür. Durum buysa ve C_T değeri elde edilirse kullanıcının NTC'deki kontaminasyonu gösteren gerçek amplifikasyon durumunu ve floresan artefaktından dolayı yükselmiş olabilecek floresandaki doğrusal artışı ayırt etmesi gerekir.

NTC Analizi

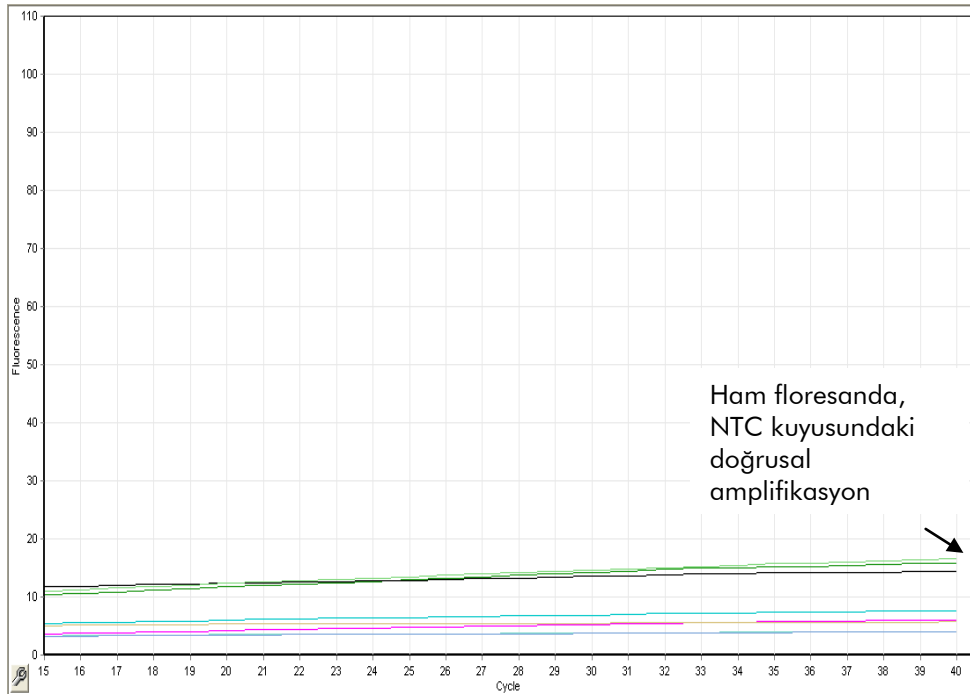
Şekil 17 ve 18'de NTC örneklerinin davranışının iki örneği gösterilmektedir. Şekil 17'de, örnek kontaminasyonundan kaynaklanan doğrusal olmayan (gerçek amplifikasyon) örnek görülmektedir. Bu çalışma atılmalı ve örnekler yeniden test edilmelidir. Şekil 18'de, NTC'deki doğrusal amplifikasyon görülmektedir. Bu koşullar altında, ham floresan incelenmelidir. Gerçek amplifikasyon durumu yerine floresanda doğrusal artış gösteren ilgili ham floresan grafiği Şekil 19'da gösterilmiştir. Pozitif ve Internal kontroller geçerli olmuşsa, bu çalışmadan elde edilen veriler kullanılabilir. Şekil 19 ile karşılaştırmak için, Şekil 20 gerçek amplifikasyonun yerini almış ham floresan verilerini gösterir. Bu koşullar altında, veriler atılmalıdır ve bu kontaminasyon varlığını gösterdiği için örnekler yeniden test edilmelidir.



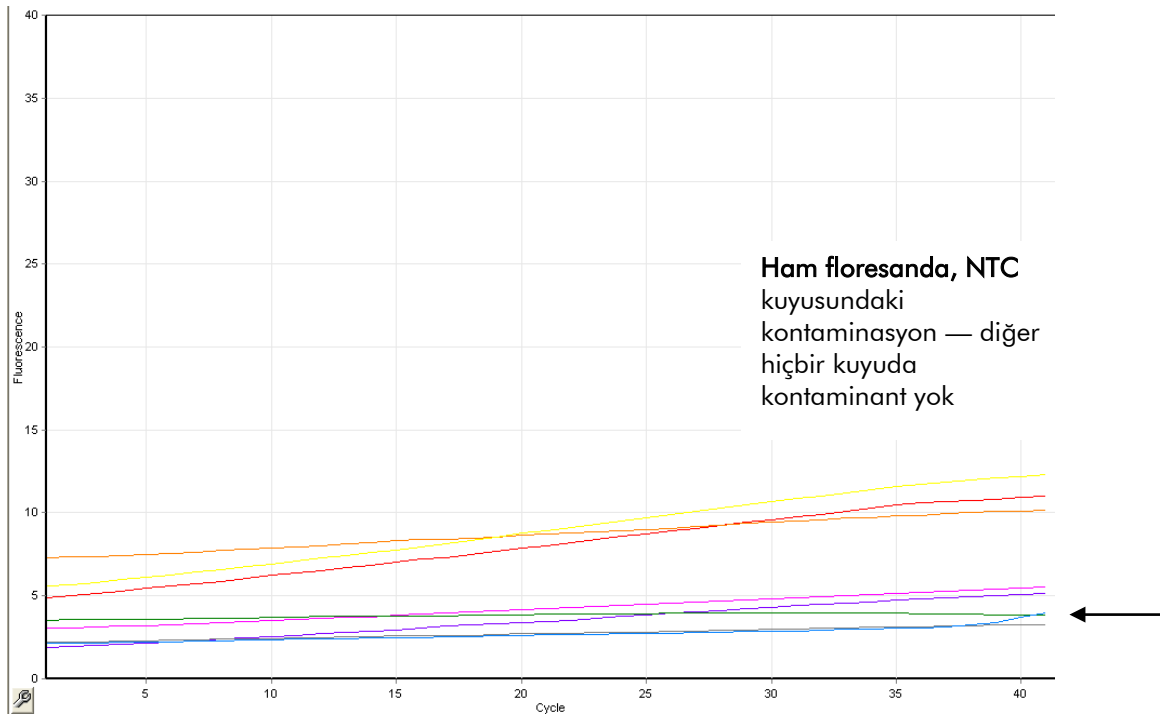
Şekil 17. Analiz edilmiş çalışmadaki bir testin NTC tüpündeki kontaminasyon.



Şekil 18. NTC kuyusunda görülen floresandaki doğrusal artışın örneği.



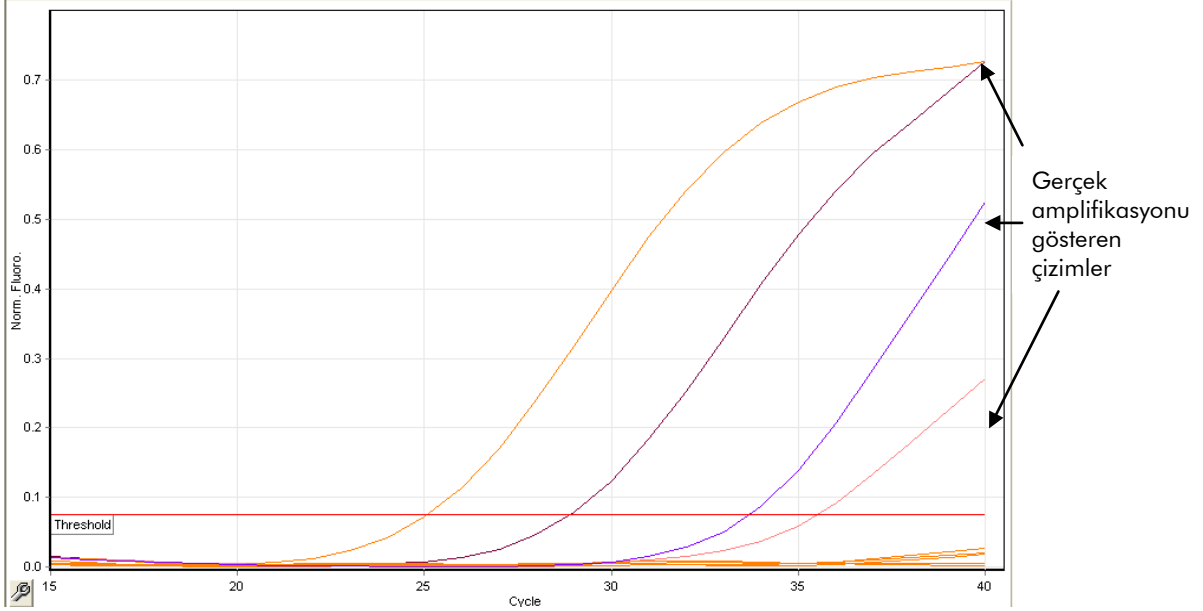
Şekil 19. Şekil 18'in ham floresanı.



Şekil 20. Gerçek amplifikasyon durumlu NTC kuyusunu gösteren ham floresan verileri.

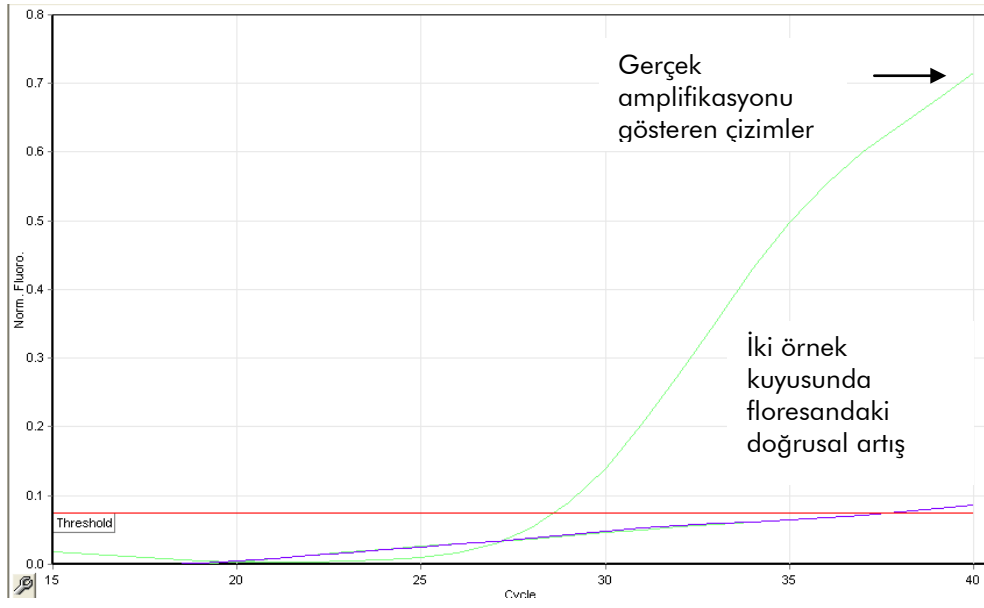
Örneklerin analizi

Şekil 21 ve 22 örnek reaksiyonlarındaki amplifikasyonun iki örneğini göstermektedir. Analiz edilmiş bir çalışmada bulunan örnek kuyusundaki gerçek amplifikasyon örneği Şekil 21'de gösterilmiştir. Çalışma bu tip sigmoidal amplifikasyon eğrisi gösterirse, bu gerçek amplifikasyondur ve pozitif ve internal kontroller geçerli olmuşsa, bu çalışmadan elde edilen veriler kullanılabilir.

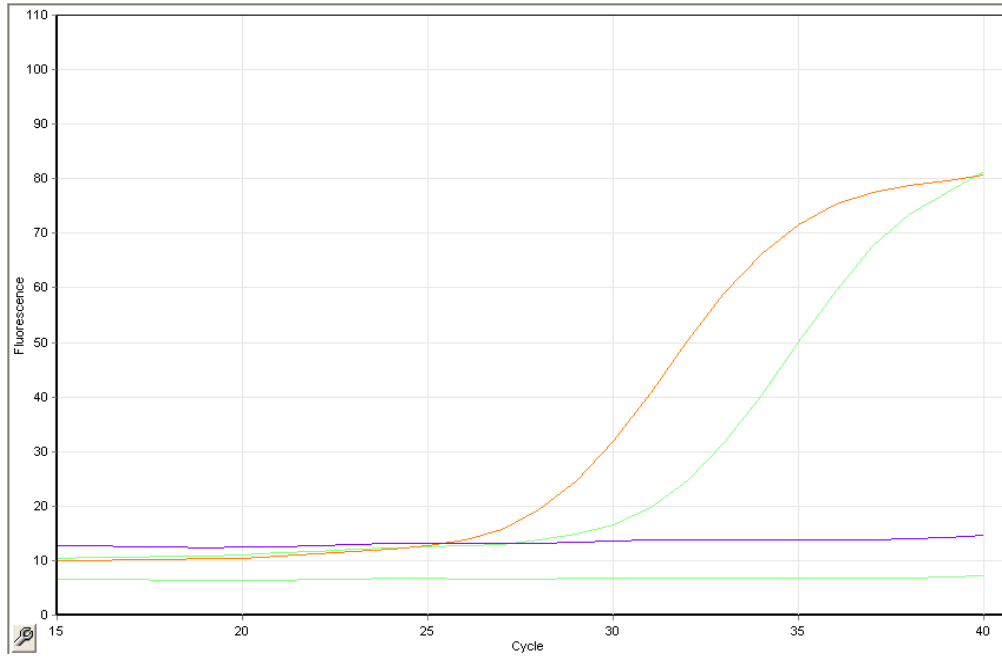


Şekil 21. Analiz edilmiş çalışmada bulunan örnek kuyusundaki gerçek amplifikasyon.

Örnek reaksiyonundaki doğrusal amplifikasyonun bir örneği Şekil 22'de gösterilmiştir. Bu koşullar altında, ham floresan verileri incelenmelidir. İlgili ham floresan grafiği (Şekil 23) Şekil 22'de gözlenen doğrusal artışın ham floresandaki artışa karşılık geldiğini ve gerçek amplifikasyon olmadığını gösterir. Pozitif ve internal kontroller geçerli olmuşsa, doğrusal amplifikasyon "C_T yok" olarak adlandırıldığından bu çalışmalardan elde edilen örnek sonuçları dikkat edilerek kullanılabilir.



Şekil 22. İki örnek kuyusunda görülen floresandaki doğrusal artışın örneği.



Şekil 23. Şekil 22'in ham floresanı.

Sorun giderme kılavuzu

Sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servislerindeki uzmanlar her zaman bul el kitabındaki bilgiler ve protokoller ya da örnek ve test teknolojileriyle ilgili tüm sorularınızı yanıtlamaktan mutluluk duyar (iletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Yorum ve öneriler

Yeşil Döngü Yapan floresan kanalında EGFR Pozitif Kontrole (PC) ait Sinyal Yok

- | | |
|---|---|
| a) PCR veri analizi için seçilen floresan kanalı protokol ile uyumlu değildir | Veri analizi için analitik EGFR PCR'ı için Yeşil Döngü Yapan floresan kanalını ve internal kontrol PCR'ı için Sarı Döngü Yapan floresan kanalını seçin. |
| b) Rotor-Gene cihazının sıcaklık profilinin yanlış programlanması | Sıcaklık profilini protokolle karşılaştırın yanlışsa, çalışmayı tekrarlayın. |
| c) PCR'ın yanlış yapılandırılması | Pipetleme şeması aracılığıyla çalışma adımlarınızı kontrol edin ve gerekirse PCR'ı tekrarlayın. |
| d) Bir veya daha fazla kit bileşenine ait saklama koşulları "Reaktif Saklama ve Kullanma" (sayfa 12) bölümünde verilen talimatlara uymadı | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kitinin süresi dolmuş | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |

Analitik PCR'ın yeşil döngü yapan floresan kanalında negatif kontrollere ait sinyaller

- | | |
|--|--|
| a) PCR hazırlığı sırasında kontaminasyon meydana geldi | Tekrarlardaki yeni reaktiflerle PCR'ı tekrarlayın.
Mümkünse, test edilecek örneğin eklenmesinden sonra PCR tüplerini doğrudan kapatın.
Çalışma alanının ve cihazların düzenli aralıklarla dezenfekte edildiğinden emin olun. |
| b) Ekstraksiyon sırasında kontaminasyon meydana geldi | Yeni reaktifler kullanarak ekstraksiyonu ve test edilecek örneğin PCR'ını tekrarlayın.
Çalışma alanının ve cihazların düzenli aralıklarla dezenfekte edildiğinden emin olun. |

Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitinin her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir.

Sınırlamalar

Üründen elde edilen sonuçlar tüm ilgili klinik ve laboratuvar bulguları çerçevesinde yorumlanmalıdır ve tanı amacıyla tek başına kullanım için değildir.

Ürün yalnızca in vitro tanısal prosedürler ve Rotor-Gene Q konusunda özel olarak bilgilendirilmiş ve eğitim almış personel tarafından kullanım içindir.

Analitik validasyon çalışmaları fikse edilmiş, parafine gömülmüş tümör örneklerinden elde edilen insan DNA'sını kapsamıştır.

Ürün yalnızca Rotor-Gene Q real-time PCR cyclyer, 5plex HRM serilerinde kullanım için tasarlanmıştır.

En iyi sonuçlar için *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti El Kitabı'na tam olarak uyulması gereklidir. Bu el kitabında açıklanan dışında reaktiflerin seyreltilmesi tavsiye edilmez ve performans kaybına neden olur.

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti kullanılarak örnek analizi gerçekleştirilmeden önce örnekteki DNA'nın miktarının ve kalitesinin değerlendirilmesi önemlidir. Bu test için C_T değerinin kabul edilebilir olduğunu belirlemek için ek Kontrol Reaksiyon Karışımı (Ctrl) sağlanır. Fragmente olmuş DNA örneklerindeki C_T değerleriyle örtüşmeyeceğinden absorbans okumaları kullanılmamalıdır.

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Süresi dolmuş ve yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.

Performans Özellikleri

Eşik değerleri

171 FFPE örneği NCCLS EP17-A (2004)'deki talimatları takip eden bir yöntem kullanılarak test edildi. 159 örnekten elde edilen veriler kit için eşik değerlerinin saptanmasında kullanıldı. Kontrol reaksiyonu C_T aralığı 23.00 – 30.69 C_T olarak saptandı. Eşik değerleri belirlenmiştir ve Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tespit Sınırı (LOD)

therascreen EGFR RGQ PCR Kitine ait LOD'u belirlemek için 29 mutasyonun her biri için mutasyon yüzdelerinin aralığını simüle etmek için yabancı tip genomik DNA ile sentetik mutant DNA karıştırılarak bir örnek seti geliştirildi. Her bir testin LOD'u *therascreen* EGFR PCR RGQ Kiti aracılığıyla tekrarların %95'inin pozitif olarak tanımlandığı yüzde mutasyonu olarak belirlendi. LOD değerleri Tablo 9'da verilmiştir. Çoklu mutasyonları tespit eden çoklu testler için (G719X, delesyonlar ve insersiyonlar), en yüksek LOD'u veren reaksiyon değeri verilmiştir.

Tablo 9. Yedi EGFR mutasyon testinin her biri için LOD değerleri

Mutasyon	Saptanabilir mutasyon yüzdesi (%)
T790M	7,02
Delesyonlar	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
İnsersiyonlar	2,03

Hassasiyet

therascreen EGFR RGQ PCR Kitinin hassasiyetini belirlemek yedi mutasyon testinin her biri için mutasyon yüzdesinin düşük seviyesini simüle etmek için yabancı tip genomik DNA ile sentetik mutant DNA karıştırılarak bir örnek seti geliştirildi. Hassasiyet bir test bölgesindeki örneklerin farklı günlerde her bir örnek için iki tekrarla, birden çok kit grubu, operatör ve çalışma kullanılarak test edilmesiyle değerlendirilmiştir. Varyans Bileşen Analizinden beklenen standart sapma olarak görülen varyasyon 1 ΔC_T 'den daha az olduğundan hassasiyet tahmini olarak kullanılabilir (Tablo 10).

Tablo 10. Laboratuvar testlerinin sonuçları*

Test	Test edilen mutasyon pozitif yüzdesi	Standart sapma tahmini (ΔC_T)
T790M	%100	0,33
Delesyonlar	%100	0,40
L858R	%100	0,45
L861Q	%100	0,49
G719X	%97,9	0,59
S768I	%97,9	0,31
İnsersiyonlar	%97,9	0,38

* Her bir mutasyon için 93 tekrar test edildi.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik üç test bölgesinde yabancı tip genomik DNA yapısındaki yüksek mutasyon seviyeli örneklerin farklı günlerde her bir örnek için iki tekrarla, birden çok kit grubu, operatör ve çalışma kullanılarak test edilmesiyle değerlendirilmiştir. Tüm yedi mutasyon testi için mutant DNA örneklerinin %96.1–%100'ü mutasyon pozitif bulundu. Yabancı tip örnekler tüm testlerin tüm bölgelerinde mutasyon negatif bulundu.

Giren DNA konsantrasyonunun etkisi

Giren DNA konsantrasyonunun değiştirilmesinin LOD'a yakın *therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti aracılığıyla üretilen sonuçlara olan etkisini belirlemek için düşük, orta ve yüksek total giren DNA seviyelerinde örnekler oluşturmak üzere sentetik

mutant DNA ile yabancı tip genomik DNA karıştırılarak tüm 29 mutasyon için örnek seti geliştirildi.

Giren DNA'nın yüksek ve düşük seviyeleri kontrol testi C_T değeri aralığını (23.50 ila 29.50) temsil etmek için hedef alındı.

Giren DNA setlerinin değerlendirmesinde (LOD'a yakın konsantrasyonlarda ve üç farklı giren DNA seviyesinde, 29 mutasyon) %95,44 mutasyon pozitif oranı görüldü.

Bu veriler çalışılan test aralığındaki giren DNA seviyesinin değiştirilmesinin ΔC_T değerini veya örneğin mutasyon aramasını etkilemediğini gösterir.

Engelleyici maddeler

FFPE örneklerinin işlenmesi sırasında QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kitinden potansiyel olarak taşınabilecek bileşenlerin kit performansı üzerine etkisi değerlendirildi.

Formol, parafin, ksilen, etanol, ATL tamponu, proteinaz K, AL tamponu, AW1 yıkama tamponu ve AW2 yıkama tamponu beklenen en yüksek ("en kötü durum") konsantrasyonda kullanıldı (ekstraksiyon kit protokolündeki her yıkama ve saflaştırma adımının konsantrasyon bileşeninde 1 log azalmaya neden olduğunu varsayarak).

Olası etkileşimin tespit edilebilmesi için daha yüksek mutasyon seviyesi yerine 3 kat daha fazla LOD örneği kullanıldı.

"Test" ve "kontrol" (örn, karışan madde yok) arasında, ΔC_T değerindeki ≥ 3 standart sapmalık (önceki çalışmadan alındı) farklar potansiyel girişim sebebi olarak kabul edildi.

Kontrolle karşılaştırıldığında değerlendirilen hiç bir potansiyel girişim maddesi ΔC_T değerinde ≥ 1 standart sapmalık değişiklik göstermedi.

Referanslar

QIAGEN, QIAGEN ürünlerini kullanan bilimsel yayınların geniş, en güncel çevrimiçi veri tabanını sağlar. Kapsamlı arama seçenekleri basit anahtar kelime aramasıyla veya uygulamayı, araştırma alanını, başlığı vb. belirterek ihtiyacınız olan makaleyi bulmanızı sağlar.

Referansların tam listesi için www.qiagen.com/RefDB/search.asp adresindeki çevrimiçi QIAGEN Referans Veritabanı'nı ziyaret edin ya da QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel dağıtıcınızla iletişime geçin.

Semboller



<N>

<N> testleri için yeterli reaktifleri içerir



Son kullanma



İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Bileşenler



İçerik



Numara



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanım talimatlarına bakın

İletişim Bilgileri

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezi'ne bakın, 00800-22-44-6000 numarasını arayın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine veya yerel dağıtıcılara başvurun (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Ek: Mutasyon Ayrıntıları

COSMIC ID'ler Kanserdeki Somatik Mutasyonların Kataloğu'ndan (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) alınabilir.

Tablo 11. Mutasyon listesi ve COSMIC ID'ler.

Mutasyon	Ekson	Baz değişimi	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
İnserisyonlar	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delesyonlar	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (kompleks)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (kompleks)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (kompleks)	12422
		2238_2252>GCA (kompleks)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

Tablo 11. Mutasyonların listesi ve COSMIC ID'ler (devamı)

Mutasyon	Ekson	Baz değişimi	COSMIC ID
Delesyonlar	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (kompleks)	12382
		2239_2258>CA (kompleks)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (kompleks)	12383

Sipariş Bilgileri

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: 1 Kontrol Testi, 7 Mutasyon Testi, Pozitif Kontrol, Taq DNA Polimeraz	870111
Rotor-Gene Q ve aksesuarları		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) artı HRM kanallı Yüksek Çözünürlüklü Erime analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) artı HRM kanallı Yüksek Çözünürlüklü Erime analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) artı HRM kanallı Yüksek Çözünürlüklü Erime analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim dahil değildir	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) artı HRM kanallı Yüksek Çözünürlüklü Erime analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0.1 ml tüplerde tek kanallı pipet ile manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüplü ve kapaklı 250 şerit	981103

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüplü ve kapaklı 10 x 250 şerit	981106

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanıcı kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri ve yerel dağıtıcınızdan istenebilir.

Bu ürünün satın alınması kullanıcının insan in vitro tanıları için tanı hizmetleri vermek üzere ürünü kullanmasını sağlar. Alımdan kazanılan bu özel kullanım hakkı dışında genel patent veya hiç bir türde başka lisans burada verilmemektedir.

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

therascreen EGFR RGQ PCR Kiti Avrupa İn Vitro Diagnostik Direktifi 98/79/EC'ye göre CE işaretli diagnostik bir kittir. Tüm ülkelerde mevcut değildir.

***therascreen* EGFR RGQ PCR Kiti için Sınırlı Lisans Sözleşmesi**

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya kiti kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN Bu Kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu Kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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

