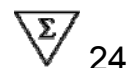


PyroMark KRAS Kit Manuál



Verze 1



CE-IVD certifikovaná diagnostická souprava PyroMark KRAS Kit umožňuje kvantitativní měření mutací v kodonech 12, 13 a 61 lidského genu KRAS. Tyto údaje pomáhají lékařům zvolit pacienty s kolorektální rakovinou, u kterých je pravděpodobnější úspěch anti-EGFR terapie.

Pro diagnostické použití in vitro



971450



1056444CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R2

MAT

1056444CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií pro přípravu vzorků a jejich rozbor, které umožňují izolaci a analýzu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí úspěšný výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů
- rozbor nukleových kyselin a proteinů
- microRNA výzkum a RNAi
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozbor

Poskytujeme Vám nejnovější technologie, abyste rychle a spolehlivě dosáhli nejlepších výsledků. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

Obsah soupravy	4
Symboly	4
Přeprava a skladování	5
Zamýšlený účel použití	5
Omezení použití	5
Technická podpora	6
Kontrola kvality	6
Bezpečnostní informace	6
Úvod	8
Princip a provedení	8
Charakteristika výkonu	9
Vybavení a reagentie nedodávané se soupravou	13
Důležité pokyny	14
Všeobecná preventivní opatření	14
Materiál vzorku	14
Izolace DNA	14
Kontroly	15
Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx	16
Protokol 2: PCR za užití souprav HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit a PyroMark KRAS Kit	18
Protokol 3: imobilizace PCR produktů na Streptavidin Sepharose High Performance kuličkách	20
Protokol 4: příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24 MDx	22
Protokol 5: spuštění běhu na PyroMark Q24 MDx	25
Protokol 6: analýza PyroMark Q24 MDx běhu	26
Řešení problémů	31
Příloha A: nastavení rozborů PyroMark KRAS	33
Příloha B: vyprázdnění vaniček a nádob na odpad	35
Literatura	36
Informace o objednání	37

Obsah soupravy

PyroMark KRAS Kit	(24)
Katalogové čís.	971450
Počet reakcí	24
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
wt KRAS Control DNA	100 µl
Mutant KRAS Control DNA	100 µl
Manuál	 1

Symboly



<N>

Obsah postačuje pro <N> testů



Použitelné do



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Komponenty



Obsahuje



Počet



Teplotní rozmezí



Přečtěte si informace uvedené v manuálu



Důležité upozornění

Přeprava a skladování

PyroMark KRAS Kit se zasílá na suchém ledě a měl by být po doručení skladován při -20°C . Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (>5 x). Je-li uskladněn za těchto podmínek, je PyroMark KRAS Kit použitelný do uplynutí doby trvanlivosti.

Zamýšlený účel použití

V Evropě se stala analýza KRAS mutací středem zájmu poté, co Evropská komise udělila podmíněčnou autorizaci pro uvedení na trh pro panitumumab a cetuximab pro léčbu metastazující rakoviny tlustého střeva u pacientů s nemutovaným (divoký typ) KRAS genem. To znamená, že panitumumab a cetuximab se smí podávat pouze pacientům, u kterých byl proveden screening na mutace KRAS.

Zamýšlený účel použití je pomoci lékařům určit pacienty s kolorektální rakovinou, u kterých je pravděpodobnější úspěch anti-EGFR terapie jako panitumumab a cetuximab. Test se zakládá na pacientově mutačním statusu v kodonech 12, 13 a 61 KRAS genu a je určen jako doplněk k ostatním prognostickým faktorům, které se v současnosti používají k výběru vhodných pacientů pro léčbu anti-EGFR terapií. Při rozhodování o terapii musí lékař posoudit pacientův mutační status s ohledem na ostatní faktory onemocnění. Status KRAS mutace nesmí být jediným základem pro rozhodnutí o léčbě pacientů s rakovinou.

Produkt slouží pro kvantitativní měření mutací v kodonech 12, 13 a 61 lidského KRAS genu. Produkt sestává ze 2 testů: jeden detekuje mutace v kodonech 12 a 13, druhý v kodonu 61. Oba testy obsahují specifické PCR primery a sekvenační primer.

Omezení použití

Výsledky získané pomocí produktu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními relevantními klinickými a laboratorními nálezy.

Produkt smí používat pouze personál speciálně poučený a vyškolený v metodice diagnostiky in vitro a v ovládání systému PyroMark Q24 MDx.

Validační studie byly provedeny za užití lidské DNA izolované z formalínem fixovaných vzorků tumoru zalitých do parafínu.

Materiál pro purifikaci DNA, amplifikaci PCR a přípravu vzorku pro Pyrosequencing[®] analýzu nejsou v tomto produktu zahrnuty. Produkt byl validován pomocí PCR

reagencií a produktů pro purifikaci DNA od firmy QIAGEN. Používejte doporučené produkty pro PCR amplifikaci a purifikaci DNA uvedené na straně 13 a 14.

Produkt je určen pouze pro použití se systémem PyroMark Q24 MDx.

Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků. Ředění reagentů jiné než popsané v tomto manuálu se nedoporučuje a může vést ke snížení výkonu.

Dbejte na dobu použitelnosti a podmínky skladování uvedené na obalech a na štítcích všech komponent. Nepoužívejte prošlé nebo špatně skladované komponenty.

Technická podpora

Společnost QIAGEN se pyšní kvalitou a dostupností technické podpory. V našich odděleních technické podpory pracují zkušení vědci s rozsáhlými praktickými a teoretickými zkušenostmi s technologiemi pro přípravu vzorků a jejich rozborů a s použitím QIAGEN produktů. Máte-li dotazy nebo potíže s PyroMark KRAS Kit nebo jiným produktem QIAGEN, neváhejte nás kontaktovat.

Zákazníci firmy QIAGEN jsou hlavním zdrojem informací pro pokročilé a specializované použití našich produktů. Tyto informace jsou velmi užitečné pro ostatní vědce i výzkumníky u společnosti QIAGEN. Proto bychom Vás rádi vyzvali k tomu, abyste nás kontaktovali, pokud máte připomínky k výkonu produktu nebo návrhy pro nové aplikace a techniky.

Pro technickou podporu a více informací navštivte náš technický servis na www.qiagen.com/Support, zavolejte nebo kontaktujte Vašeho místního distributora (viz zadní strana nebo www.qiagen.com).

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže PyroMark KRAS Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle. Více informací naleznete v příslušných bezpečnostních listech (material safety data sheets, MSDS). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na www.qiagen.com/support/msds.aspx, kde můžete nalézt, prohlédnout a vytisknout MSDS ke každé QIAGEN soupravě nebo komponentě.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

24 hodinové tísňové volání

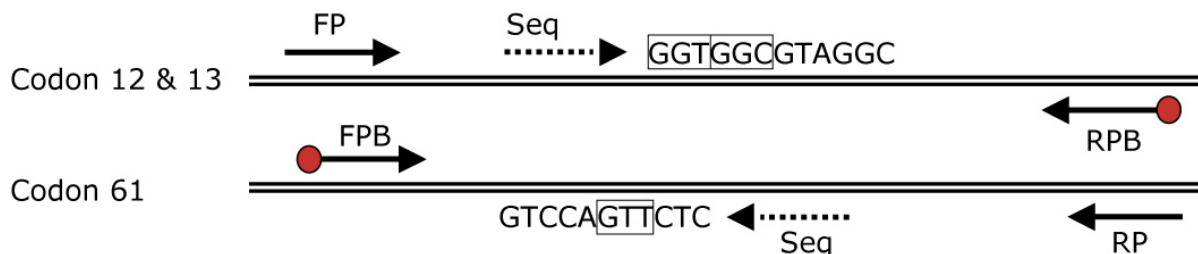
V případě nouze získáte lékařské informace 24 hodin denně (v anglickém, francouzském a německém jazyce) na:

Toxikologická informační služba v Mohuči (Giftnotruf der Beratungsstelle bei Vergiftungen in Mainz), Německo

Tel: +49-6131-19240

Úvod

CE-IVD certifikovaná souprava PyroMark KRAS Kit je určena ke kvantitativnímu měření mutací v kodonech 12, 13 a 61 lidského genu KRAS. Produkt sestává ze dvou testů: jeden detekuje mutace v kodonech 12 a 13, druhý v kodonu 61. Tyto dvě oblasti jsou prostřednictvím PCR amplifikovány odděleně a sekvenovány definovanou oblastí. Sekvence obklopující definované pozice slouží jako normalizační a referenční píky pro kvantifikaci a hodnocení kvality analýzy.



Obrázek 1. Znázornění funkčního principu testu KRAS. Zobrazená sekvence odpovídá analyzované sekvenci u normálního vzorku. **FP** a **FPB**: forwardové PCR primery (B označuje biotinylací); **RP** a **RPB**: reverzní primery (B označuje biotinylací); **Seq**: sekvenační primery.

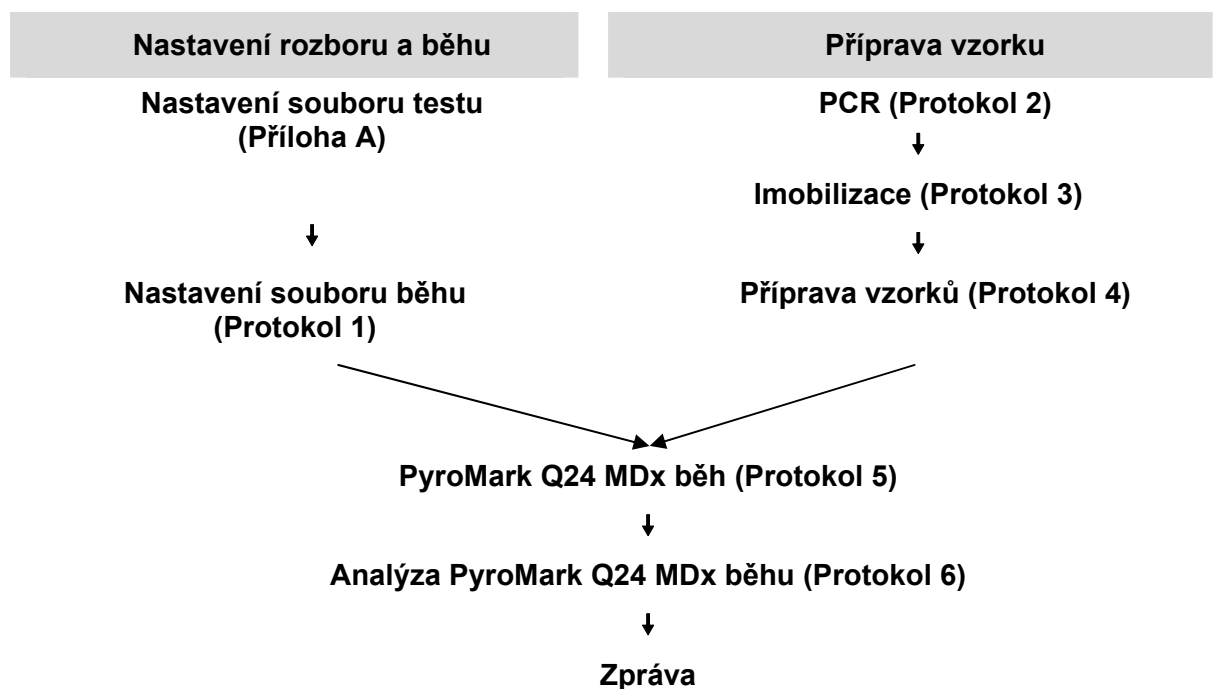
i Kodony 12 a 13 jsou sekvenovány směrem dopředu; kodon 61 v opačném směru.

Produkt obsahuje pro každý rozbor směs PCR primerů a sekvenačního primeru. Primery jsou dodávány v roztoku. Každá ampulka obsahuje 24 µl primeru nebo směsi primerů.

Princip a provedení

Pracovní schéma na straně 9 znázorňuje proceduru rozboru. Po provedení PCR za užití primerů specifických pro kodony 12/13 a 61 se amplikony imobilizují na kuličkách Streptavidin Sepharose High Performance. Jednovláknová DNA je izolována a odpovídající sekvenační primery se k ní připojí (annealing). Vzorky jsou poté analyzovány pomocí systému PyroMark Q24 MDx za užití souboru pro nastavení běhu a souboru běhu. "Sequence to Analyze" (Sekvence určená k analýze) může být po běhu nastavena pro detekci vzácných mutací (viz „Protokol 6: analýza PyroMark Q24 MDx běhu“, strana 26 a Příloha A, strana 33).

Pracovní schéma analýzy PyroMark KRAS



Charakteristika výkonu

Limit slepého pokusu a limit detekce

Limit slepého pokusu (LOB – limit of blank) a limit detekce (LOD - limit of detection) byly určeny pro několik mutací za užití směsí plasmidů podobných těm, které se dodávají se soupravou. V závislosti na typu mutace byly použity dvě metody:

- **Mutace způsobující výskyt píku v jinak slepé pozici:** LOB a LOD byly určeny podle doporučení ve směrnicih "NCCLS Guideline EP17-A" ("Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" – Protokol pro určení limitů detekce a limitů kvantifikace; schválený návod). α - a β -chyby (falešně pozitivní resp. falešně negativní) byly stanoveny na 5%.
- **Mutace GGT → GTT v kodonu 12:** tato mutace způsobuje změny zahrnující jednotlivé či dvojité píky a nevydává lineární signál u nízkých frekvencí mutace. Tato pozice vykazovala LOB, který konzistentně činil 0 % jednotek ($n = 72$). Nejnižší signál, který indikuje přítomnost mutace v této pozici, byl nastaven na 1 % jednotek, což jednoznačně leží nad konzistentní hladinou základní linie o 0 % jednotky. Pokud je analyzován vzorek se 7 % jednotek mutace, 95% výsledků ($n = 89$) generoval signál, který mohl být považován za pozitivní (≥ 1 % jednotek). LOD pro tuto mutaci byl tedy stanoven na 7 % jednotek. Všechny vzorky generující signál přes 1 % jednotek byly považovány za pozitivní na tuto mutaci.

Tabulka 1. LOB a LOD determinované pro specifické mutace

Mutace	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	n.a.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)			
GAC	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), testován v opačném směru (TTG)			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

* Převzato z katalogu somatických mutací u rakoviny “Catalogue of Somatic Mutations in Cancer” dostupného online na webových stránkách Sanger institutu na www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

n.a.: neaplikovatelné.



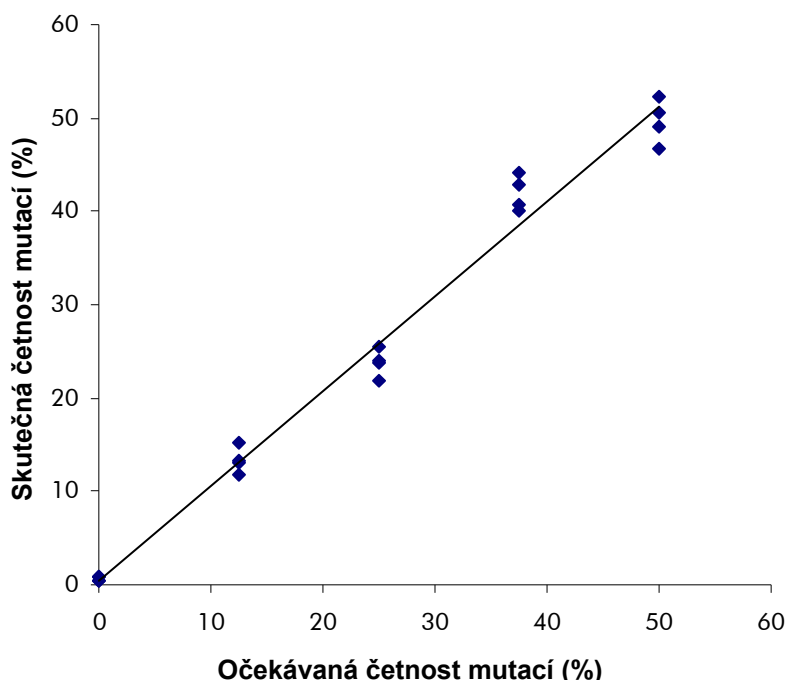
Tyto hodnoty se zakládají na běžích, u kterých ležel signál přes 60 RLU (RLU – relativní světelné jednotky), jak bylo běžně získáno z 10 ng DNA izolované z formalínem fixované tkáně zalité do parafínu. Doporučujeme potvrdit charakteristiku výkonu v laboratoři.

Linearita

Linearita byla určena podle dokumentu EP6-A vydaného institutem Clinical and Laboratory Standards (“Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline” – Hodnocení linearity procedur kvantitativního měření: statistický přístup; schválený návod).

Normální a mutované sekvence byly smíseny v takovém poměru, aby bylo dosaženo následující četnosti mutace: 0, 12,5, 25, 37,5 a 50%. Čtyři replikáty těchto směsí byly v náhodném pořadí umístěny na destičku a analyzovány. Výsledky pro mutaci

GGT → TGT v kodonu 12 byly vyhodnoceny pomocí Analyse-it® Software v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) a jsou uvedeny na obrázku 2.



Obrázek 2. Linearita mutace GGT → TGT v kodonu 12.

Celková opakovatelnost činila 1,64 % jednotek a výsledky byly lineární v rámci přípustné nelinearity činící 3%. Podobné výsledky byly získány pro mutaci GGC → GAC v kodonu 13.

Průměrná nepřesnost

Určení linearity mutace GGT → TGT v kodonu 12 bylo opakováno třemi operátory ve třech různých dnech za užití různých kombinací přístroje PyroMark Q24 MDx a reagensů PyroMark Gold Q24 Reagents. Výsledky těchto tří běhů jsou znázorněny v tabulce 2.

Tabulka 2. Průměrná nepřesnost

Očekáváno	Běh 1		Běh 2		Běh 3		Shrnutí	
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

Všechny hodnoty jsou uvedeny jako % jednotek. SD: standardní odchylka.

Hodnoty průměrné nepřesnosti (SD) činí tedy 0,6–2,0 % jednotek v měřeném rozsahu o 0–50 %.

Diagnostická senzitivita a specifita

PyroMark KRAS Kit byl evaluován v jedné studii. V rámci srovnání s DxS Therascreen®: K-RAS Mutation Kit bylo 100 prospektivních vzorků kolorektálního tumoru analyzováno na mutace v kodonech 12 a 13.

DNA pro testování byla izolována za užití EZ1 DNA Tissue Kit. Analýza byla provedena pomocí PyroMark KRAS Kit na přístroji PyroMark Q24 MDx a pomocí Therascreen: K-RAS Mutation Kit na přístroji ABI PRISM® 7900HT SDS.

Z těchto 100 vzorků byl pomocí DxS analýzy mutační status prokázán u 91 vzorků. Za užití pyrosekvenční analýzy byl mutační status kodonů 12 a 13 prokázán u 94 vzorků.

Vyjma vzorků, které s jednou nebo oběma soupravami neprokázaly žádný výsledek, vyplynula korelace soupravy PyroMark KRAS Kit ve srovnání s Therascreen: K-RAS Mutation Kit o 100%. Diagnostická senzitivita soupravy PyroMark KRAS Kit činí 100% a diagnostická specifita 100% (tabulka 3).

Tabulka 3. Výsledky analýzy prospektivních vzorků kolorektálního tumoru na mutaci kodonu 12 a 13

		Therascreen: K-RAS Mutation Kit		
		Mutant	Divoký typ	Celkově
PyroMark KRAS Kit	Mutant	33	0	33
	Divoký typ	0	57	57

Analýza kodonu 61

Těch samých 100 vzorků bylo analyzováno na mutace v kodonu 61 za užití PyroMark KRAS Kit. Pouze u jednoho vzorku došlo k selhání hodnocení kvality rozboru kodonu 61. Tento vzorek nevykázal žádný výsledek ani u rozborů kodonů 12 a 13 provedených pomocí systému PyroMark a Therascreen, což indikuje nízkou kvalitu DNA. Vyšší úspěšnost testu kodonu 61 nasvědčuje jeho nižší závislosti na kvalitě DNA než u PyroMark a Therascreen testů kodonů 12 a 13. Protože Therascreen test neanalyzuje mutace v kodonu 61, není možné přímé srovnání testů.

Mutace v kodonu 61 byly prokázány ve 4 z 99 vzorků. Tři obsahovaly časté mutace (CAC, CAT, CTA) v kodonu 61, čtvrtý vzorek vykazoval mutace v obou kodonech 60 (GGT → GGA) a 61 (CAA → AAA).

Vybavení a reagencie nedodávané se soupravou

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (*material safety data sheets*, MSDS), které získáte u výrobce.

- DNA-izolační souprava (viz „Izolace DNA“, strana 14)
- Pipety (nastavitelné)*
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Stolní centrifuga *
- PCR reagencie (PyroMark KRAS Kit byl validován pomocí soupravy HotStarTaq® Plus Master Mix Kit, kat. čís. 203643, 203645 nebo 203646)
- Termocyklér* a vhodné PCR zkumavky
- Streptavidin Sepharose™ HighPerformance (GE Healthcare, kat. čís. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 MDx (kat. čís. 9001513)*†
- PyroMark Q24 MDx software (kat. čís. 9019063)†
- PyroMark Q24 destička (kat. čís. 979301)†
- PyroMark Q24 zásobník (kat. čís. 979302)†
- Vakuová pracovní stanice PyroMark Q24 MDx Vacuum (kat. čís. 9001515 nebo 9001517)*†
- PyroMark Gold reagencie (kat. čís. 971802)†
- PyroMark vazebný pufr (kat. čís. 979306)†
- PyroMark denaturační roztok (kat. čís. 979307)†
- PyroMark promývací pufr, koncentrát (kat. čís. 979308)†
- PyroMark Annealing-pufr (kat. čís. 979309)†
- Třepačka destičky* pro imobilizaci pomocí kuliček
- Tepelný blok* dosahující 80°C
- 24-jamková PCR destička nebo proužky
- Víčka pro proužky s jamkami
- Vysoce čistá voda (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm nebo ekvivalent)
- Ethanol (70%)

* Ujistěte se, že jsou přístroje pravidelně kontrolovány, udržovány a kalibrovány podle údajů výrobce..

† CE-IVD-certifikováno v souladu s EU směrnicí 98/79/EC. Ostatní uvedené produkty nejsou CE-IVD-certifikované podle EU směrnice 98/79/EC.

Důležité pokyny

Všeobecná preventivní opatření



Uživatel by měl vždy dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) do reakce na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15-25°C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a krátce centrifugujte.

Materiál vzorku



Se všemi vzorky se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

Materiál vzorku je lidská DNA izolovaná z krevních nebo formalínem fixovaných vzorků zalitých do parafínu.



Vzorky pacientů podstupující léčbu heparinem se nesmí používat. Krevní vzorky, které byly odebrány do zkumavek obsahující heparin jako antikoagulant, by se neměly používat. Heparin ovlivňuje PCR.

Izolace DNA

QIAGEN soupravy uvedené v tabulce 4 jsou doporučeny pro izolaci DNA z uvedeného materiálu vzorků pro použití se soupravou PyroMark KRAS Kit. Provedte izolaci DNA podle instrukcí v manuálu soupravy.

Tabulka 4. DNA-izolační kity doporučené pro použití se soupravou PyroMark KRAS Kit

Materiál vzorku	Kit pro izolaci nukleové kyseliny	Katalogové číslo (QIAGEN)
Tkáň zalitá v parafínu	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1® DNA Tissue Kit (48)*	953034
Krev	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Postupujte podle protokolu pro použití tkáně zalité v parafínu. EZ1 DNA Tissue Kit by se měl používat v kombinaci s přístrojem EZ1 Advanced (kat čí. 9001410 nebo 9001411) a kartou EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat čí. 9018298); s přístrojem EZ1 Advanced XL (kat čí. 9001492 nebo 9001493) a kartou EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat čí. 9018700) nebo s přístrojem BioRobot® EZ1 (kat čí. 9000705; již není k dostání) a kartou EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat čí. 9015862)

† CE-IVD-certifikováno v souladu s EU směrnicí 98/79/EC.

Kontroly

i V produktu jsou zahrnuty dvě pozitivní kontroly. Tyto slouží jako kontrola PCR a sekvenačních reakcí. Nádobka označená jako “wt KRAS Control DNA” obsahuje normální KRAS sekvenci, nádobka “Mutant KRAS Control DNA” obsahuje kontrolní DNA s mutacemi ve všech 3 kodonech. Obě kontroly mají vyměněné báze v kodonu 15 a 59, aby mohly být rozlišeny od genomické DNA. Kontroly lze přidat do rozboru buďto odděleně nebo smíchané v potřebném poměru. Sekvence kontrol jsou uvedeny v tabulce 5.

i Pro analýzu Mutant KRAS Control DNA nastavte “Sequence to Analyze” na **NGTGRCGTAGGYA** s první bází kodonu 12 jako cílem (viz Příloha A, strana 33).

Tabulka 5. Sekvence kontrol

Kontrola	Kodon 12	Kodon 13	Kodon 15	Kodon 59	Kodon 61
Normální	GGT	GGC	GGT	GTA	CAA
Mutovaná	TGT	GAC	GGT	GTA	CAC

i Dodatečně by se měla do reakce vždy přidávat negativní kontrola (bez templátové DNA).

Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx



Důležité pokyny před začátkem

- V případě potřeby lze LOB potvrdit pomocí normálního vzorku nebo pomocí wt KRAS Control DNA, aby byla generována celá paleta výsledků. Více podrobností naleznete v návodu NCCLS Guideline EP17-A “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (protokol pro určení limitů detekce a limitů kvantifikace; schválený návod).

Další pokyny před začátkem

- Nastavte rozbor podle údajů v Příloze A. Toto se musí provést pouze jednou, před prvním během testu PyroMark KRAS (viz Příloha A, strana 33).

Provedení

1. **Klikněte na  na liště s nástroji.**
Vytvoří se nový soubor běhu.
2. **Zadejte parametry běhu (viz „Parametry běhu” níže).**
3. **Nastavte destičku tak, že do jamek odpovídajícím analyzovaným vzorkům přidáte testy pro kodony 12/13 a pro kodon 61. Jako kontroly se doporučuje přidat negativní vzorek (bez DNA) a dodané wt KRAS Control DNA a Mutant KRAS Control DNA.**
4. **Když je běh nastaven a připraven pro spuštění na PyroMark Q24 MDX: Vytiskněte seznam požadovaných objemů směsi enzymů, směsi substrátů a nukleotidů, a také nastavení destičky. Zvolte “Pre Run Information” (Výchozí informace) v menu “Tools” (Nástroje) a po objevení zprávy stiskněte .**
Zavřete soubor běhu a skopírujte jej pomocí Windows® Explorer na USB disk (dodáván se systémem).



Vytisknuté údaje o běhu lze použít jako předlohu pro nastavení vzorků (viz „Protokol 3: imobilizace PCR produktů na kuličkách Streptavidin Sepharose High Performance”, strana 20).

Pro spuštění běhu s takto připravenou destičkou na systému PyroMark Q24 MDx viz „Protokol 5: spuštění běhu na PyroMark Q24 MDx”, strana 25.

Parametry běhu

Run name (jméno běhu):	Jméno běhu se určí uložením souboru. Přejmenování souboru změní i jméno běhu.
Instrument method (přístrojová metoda):	Zvolte přístrojovou metodu podle reagentů a zásobníků, které se v běhu používají; viz instrukce dodávané s produkty.
Plate ID (identifikace destičky):	Volitelné: zadejte ID PyroMark Q24 destičky.
Bar code (čárový kód):	Volitelné: zadejte číslo čárového kódu destičky nebo, je-li k počítači připojena čtečka čárových kódů, umístěte kurzor myši na textové pole "Barcode" (kliknutím na pole) a naskenujte čárový kód.
Reagent ID (identifikace reagentů):	Volitelné: zadejte číslo šarže používaných PyroMark Q24 Gold reagentů. Číslo šarže naleznete na štítku produktu.  Doporučujeme zadání ID reagentů, aby se daly vysledovat jakékoliv neočekávané problémy s reagenty.
Run note (poznámky k běhu):	Volitelné: zadejte poznámku k obsahu nebo účelu běhu.

Přiřazení souborů testu

Test můžete přiřadit k jamce tak, že:

- kliknete pravým tlačítkem myši na jamku a zvolíte "Load Assay" (Přidělit rozbor) z kontextového menu, nebo
- zvolte test z prohlížeče zkratk, klikněte na test a přetáhněte jej k jamce.

Jamky jsou barevně kódované podle testu určeného jamce.

Zadání ID vzorků a poznámek

ID vzorku nebo poznámku zadáte tak, že zvolíte buňku a zadáte text.

ID vzorku nebo poznámku upravíte tak, že buďto zvolíte buňku (zvolí se aktuální obsah) nebo dvakrát na buňku kliknete.

Protokol 2: PCR za užití souprav HotStarTaq *Plus* Master Mix Kit a PyroMark KRAS Kit

Toto je protokol pro PCR amplifikaci oblastí obsahující kodon 12 a kodon 13 a pro oddělenou PCR amplifikaci oblastí obsahující kodon 61 za užití soupravy PyroMark KRAS Kit.



Důležité pokyny před začátkem

- DNA polymeráza HotStarTaq *Plus* vyžaduje aktivační krok o **5 minutách při 95°C** (viz *HotStarTaq Plus PCR Handbook*).
- Připravujte všechny směsi v prostoru, který je oddělen od prostoru používaném pro purifikaci DNA, přidávání templátové DNA k PCR, analýzu PCR produktů nebo pro přípravu vzorků před pyrosekvenční analýzou.
- Používejte jednorázové špičky obsahující hydrofobní filtry, aby se minimalizovalo nebezpečí křížové kontaminace.

Další důležité pokyny před začátkem

- Zkumavky s PCR primery před otevřením krátce centrifugujte, aby se jejich obsah shromáždil na dně.
- V případě potřeby upravte koncentraci DNA vzorku na 0,4–2 ng/μl.

Provedení

- 1. Rozmrázte roztoky primerů a templátovou nukleovou kyselinu.**
Před použitím řádně promíchejte.
- 2. Připravte pro každou sadu primerů reakční směs podle tabulky 6.**
Reakční směs obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.
Připravte větší objem reakční směsi, než jaký je zapotřebí pro celkový počet prováděných PCR rozborů.

Tabulka 6. Příprava reakční směsi pro každou sadu PCR primerů

Komponenty	Objem/reakce
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, 2x	12,5 μl
PCR Primer KRAS 12/13 nebo PCR Primer KRAS 61	1 μl
Vysoce čistá voda	6,5 μl
Celkový objem	20 μl

3. **Reakční směs řádně promíchejte a pipetujte 20 µl do každé PCR zkumavky.**
Není nutné skladovat PCR zkumavky na ledu, protože DNA-polymeráza HotStarTaq *Plus* je při pokojové teplotě inaktivní.

4. **Přidejte 5 µl templátové DNA (2–10 ng genomické DNA) do jednotlivých PCR zkumavek (viz tabulka 7) a řádně promíchejte.**



Negativní kontrola (bez templátové DNA) by měla být vždy zahrnuta.



Jako pozitivní kontroly přidejte reakce s wt KRAS Control DNA a Mutant KRAS Control DNA (viz „Kontroly“, strana 15).

Tabulka 7. Příprava PCR

Komponenty	Objem/reakce
Reakční směs	20 µl
DNA vzorku	5 µl
Celkový objem	25 µl

5. **Naprogramujte termocyklér podle instrukcí výrobce za užití podmínek uvedených v tabulce 8.**

Tabulka 8. Optimalizovaný protokol cyklu

			Komentář
Počáteční aktivační krok:	5 min	95°C	DNA-polymeráza HotStarTaq <i>Plus</i> se tímto ohřívacím krokem aktivuje.
Cyklus o 3 krocích:			
Denaturace	20 s	95°C	
Připojení (Annealing)	30 s	53°C	
Extenze	20 s	72°C	
Počet cyklů	40		
Finální extenze:	5 min	72°C	

6. **Umístěte PCR zkumavky do termocykléru a spusťte program cyklu.**
7. **Po amplifikaci pokračujte s protokolem „Protokol 3: imobilizace PCR produktů na kuličkách Streptavidin Sepharose High Performance”.**

Protokol 3: imobilizace PCR produktů na kuličkách Streptavidin Sepharose High Performance

Tento protokol je určen pro imobilizaci templátové DNA na kuličkách Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) před analýzou na systému PyroMark Q24 MDx.

Pokyny před začátkem

- Ponechejte před začátkem všechny potřebné reagensie a roztoky dosáhnout pokojové teploty (15–25°C).

Provedení

1. Lahvičkou obsahující Streptavidin Sepharose High Performance jemně zatřepejte, dokud se nevytvoří homogenní roztok.
2. Připravte Master Mix pro imobilizaci DNA podle tabulky 9. Připravte objem o 10% větší než jaký je zapotřebí pro celkový počet prováděných reakcí.

Tabulka 9. Master Mix pro imobilizaci DNA

Komponenty	Objem/vzorek
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl
PyroMark vazebný pufr	40 µl
Vysoce čistá voda	28 µl
Celkový objem	70 µl

3. Přeneste 70 µl Master Mixu do jamek 24-jamkové PCR destičky nebo proužků, jak bylo předdefinováno při nastavení běhu (viz „Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx”, strana 16).
4. Přidejte 10 µl biotinylovaného PCR produktu z Protokolu 2 do každé jamky obsahující Master Mix, jak bylo předdefinováno při nastavení běhu (viz „Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx”, strana 16).
 - i Celkový objem každé jamky by měl po přidání Master Mixu a PCR produktu tvořit 80 µl.
5. Uzavřete PCR destičku (nebo proužky) pomocí víček na proužky.
 - i Ujistěte se, že nemůže dojít k prosakování mezi jamkami.
6. Třepejte PCR destičku při pokojové teplotě (15–25°C) po dobu 5–10 min při 1400 ot/min.
 - i Během tohoto kroku připravte pracovní stanici PyroMark Q24 MDx Vacuum pro zpracování vzorků, jak je popsáno v *PyroMark Q24 User Manual*.

7. Ihned pokračujte s „Protokol 4: příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24 MDx”.



Sefarózové kuličky rychle sedimentují. Příprava vzorků podle Protokolu 4 musí proběhnout ihned po třepání.

Protokol 4: příprava vzorků před pyrosequenční analýzou na systému PyroMark Q24 MDx

Tento protokol je určen k přípravě jednovláknové DNA a k připojení (annealing) sekvenčního primeru k templátu před pyrosequenční analýzou na systému PyroMark Q24 MDx.



Důležité pokyny před začátkem

- Zkumavky se sekvenčními primery před otevřením krátce centrifugujte, aby se jejich obsah shromáždil na dně.
- Přidejte dva různé sekvenční primery podle stejného vzoru, který byl předdefinován pro destičku při nastavení běhu (viz „Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx“, strana 16), v závislosti na oblasti analýzy (kodony 12 a 13 nebo kodon 61).

Další pokyny před začátkem

- Ohřejte PyroMark Q24 držák na destičky vložením do tepelného bloku při 80°C pro použití při kroku 17.

Provedení

1. Nařed'te dostatečné množství každého sekvenčního primeru Seq Primer KRAS 12/13 a Seq Primer KRAS 61 v PyroMark-Annealing pufru, jak je uvedeno v tabulce 10.

Připravte větší objem zředěných sekvenčních primerů, než jaký je potřebný pro celkový počet sekvenovaných vzorků (počet vzorků + jeden navíc).

Tabulka 10. Příklad ředění sekvenčních primerů

Komponenty	Objem/vzorek	Objem pro 9 + 1 reakcí
Seq Primer KRAS 12/13 nebo Seq Primer KRAS 61	0,8 µl	8 µl
PyroMark Annealing-pufr	24,2 µl	242 µl
Celkový objem	25 µl	250 µl

2. Pipetujte 25 µl zředěného sekvenčního primeru do každé jamky PyroMark Q24 destičky podle nastavení běhu (viz „Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx“, strana 16).

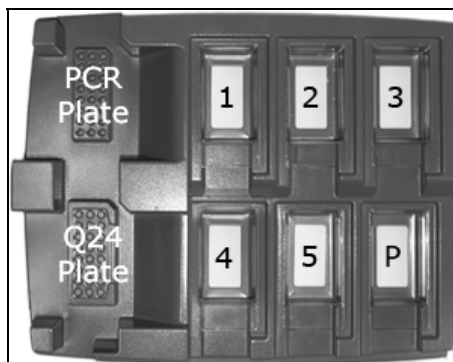


Ponechejte jeden z PyroMark Q24 držáků destiček (dodáváno s pracovní stanicí PyroMark Q24 MDx Vacuum) při pokojové teplotě (15–25°C) a použijte ho jako podporu při přípravě a přesunu destičky.

3. Umístěte PCR destičku (nebo proužky) z Protokolu 3 a PyroMark Q24 destičku na pracovní desku (viz obrázek 3).



Ujistěte se, že je destička umístěna ve stejném směru jako při vkládání vzorků.



Obrázek 3. Umístění PCR destičky (nebo proužků) a PyroMark Q24 destičky do vakuové pracovní stanice.

4. Otevřením vakuového spínače přidejte vakuovému nástroji vakuum.
5. Opatrně zasuňte filtrační jehly do PCR destičky (nebo proužků) pro zachycení kuliček obsahujících imobilizovaný templát. Podržte jehly na místě po dobu 15 s. Postupujte při zvedání nástroje opatrně.



Sefarózové kuličky rychle sedimentují. Pokud uplynula více než 1 minuta od protřepání destičky (nebo proužků), protřepejte ji před nasátím kuliček znovu po dobu 1 minuty.

6. Přemístěte nástroj nad vaničku obsahující 70% ethanol (vanička 1). Promývejte jehly po dobu 5 s.
7. Přemístěte nástroj do vaničky obsahující denaturační roztok (vanička 2). Promývejte jehly po dobu 5 s.
8. Přemístěte nástroj do vaničky obsahující promývací pufr (vanička 3). Promývejte jehly po dobu 10 s.
9. Zvedněte vakuový nástroj a nakloňte jej dozadu (o více než 90° svisle) po dobu 5 s, aby vytekla tekutina z filtračních jehel (viz obrázek 4).



Obrázek 4. Zobrazení vakuového nástroje nakloněného přes 90° svisle.

10. Zatímco je nástroj držen nad PyroMark Q24 destičkou, uzavřete vakuový spínač na nástroji (na pozici "Off").

11. Vypustíte kuličky do destičky obsahující Seq primery pomocí jemného třepání nástrojem ze strany na stranu. Ponechte filtrační jehly dosednout na dno jamek.
12. Přemístěte nástroj k vaničce obsahující vodu prostou nukleáz (vanička 4) a třepjte nástrojem po 10 s.
13. Promyjte filtrační jehly spuštěním jehel do vody prosté nukleáz (vanička 5) a zapnutím vakua. Promyjte jehly 70 ml vody prosté nukleáz.
14. Zvedněte vakuový nástroj a nakloňte jej dozadu (o více než 90° vertikálně) po dobu 5 s, aby vytekla tekutina z filtračních jehel (viz obrázek 4).
15. Uzavřete vakuový spínač na nástroji (do pozice “Off”) a umístěte nástroj do parkovací (P) pozice.
16. Vypněte vakuovou pumpu.



Na konci pracovního dne by se měly tekutý odpad a zbývající roztoky zlikvidovat a pracovní stanice PyroMark Q24 MDx Vacuum by měla být přezkoušena na přítomnost prachu a rozlité tekutiny. Viz Příloha B, strana 35.

17. Ohřejte PyroMark Q24 destičku se vzorky po dobu 2 min na 80°C pomocí předem ohřátého PyroMark Q24 držáku destiček.
18. Vyndejte PyroMark Q24 destičku z držáku a ponechte vzorky ochladit na pokojovou teplotu (15–25°C) po minimálně 5 minut.
19. Pokračujte s „Protokol 5: spuštění běhu na PyroMark Q24 MDx”.

Protokol 5: spuštění běhu na PyroMark Q24 MDx

Tento protokol popisuje vložení PyroMark Gold Q24 reagensů do PyroMark Q24 zásobníku a spuštění a dokončení běhu na PyroMark Q24 MDx. Podrobný popis jak nastavit běh naleznete v příručce *PyroMark Q24 User Manual*.



Důležitý pokyn před začátkem

- Zpráva s přehledem informací o běhu ("Pre Run information report"), kterou naleznete v menu "Tools" u nastavení běhu (viz „Protokol 1: nastavení běhu pro PyroMark Q24 MDx“, strana 16), obsahuje informace o objemu nukleotidů, enzymů a substrátového pufru potřebných pro specifický rozbor.

Provedení

1. Naplňte PyroMark Q24 zásobník správným objemem nukleotidů, enzymů a substrátových pufrů.
2. Otevřete branku pro zásobníky a vložte plný zásobník s reagensiemi štítkem ukazujícím ven. Zásobník úplně zasuňte a poté jej stlačte dolů.
3. Ujistěte se, že je linie před zásobníkem viditelná, a uzavřete branku.
4. Otevřete rámeček držící destičku a vložte destičku do tepelného bloku.
5. Zavřete rámeček držící destičku a víko přístroje.
6. Zapojte USB disk (obsahující soubor běhu) do USB portu na přední straně přístroje.



Neodpojujte USB disk z portu před dokončením běhu.

7. Zvolte "Run" (Běh) v hlavním menu (pomocí tlačítek ▲ a ▼) a stiskněte "OK".
8. Zvolte soubor běhu pomocí tlačítek ▲ a ▼.



Pro zobrazení celého obsahu složky zvolte složku a stiskněte "Select" (Zvolit). Pro návrat do předchozího okna stiskněte "Back" (Zpět).

9. Pokud je soubor běhu zvolen, stiskněte "Select" pro spuštění běhu.
10. Po skončení běhu a poté, co přístroj potvrdil uložení souboru běhu na USB disk, stiskněte "Close" (Zavřít).
11. Odpojte USB disk.
12. Otevřete víko přístroje.
13. Otevřete branku pro zásobníky a vyndejte zásobník s reagensiemi tak, že ho nadzvednete a vytáhnete.
14. Uzavřete branku.
15. Otevřete rámeček držící destičku a vyndejte destičku z tepelného bloku.
16. Zavřete rámeček držící destičku a víko přístroje.
17. Zlikvidujte destičku a vyčistěte zásobník.
18. Analyzujte běh podle kapitoly „Protokol 6: analýza PyroMark Q24 MDx běhu“.

Protokol 6: analýza PyroMark Q24 MDx běhu

Tento protokol popisuje mutační analýzu ukončeného KRAS běhu za užití PyroMark Q24 MDx Software.

Provedení

1. Vložte USB disk (obsahující soubor provedeného běhu) do USB portu počítače.
2. Přesuňte soubor běhu z USB disku na požadované místo v počítači pomocí Windows Explorer.
3. Otevřete soubor běhu v AQ režimu softwaru PyroMark Q24 MDx buďto zvolením “Open” (Otevřít) v menu “File” (Soubor) nebo dvojitým kliknutím na soubor (✓) v prohlížeči zkratk.
4. Pro analýzu běhu a získání souhrnu výsledků klikněte na jedno z “Analyze”-tlačítek.



Analyzovat všechny jamky.



Analyzovat zvolené jamky.

Výsledky analýzy (frekvence alel) a hodnocení kvality jsou zobrazeny nad variabilní polohou v pyrogramu. Pro více podrobností k tomu, jak analyzovat běh, viz příručka *PyroMark Q24 User Manual*.

5. Pro vytvoření zprávy zvolte “**Full Report**” (Kompletní zpráva) ze seznamu “**Reports for AQ runs**” (Zprávy pro AQ běhy) v menu.



Nejčastější mutace v KRAS se vyskytují u nukleotidu 35 (druhá báze kodonu 12). Proto se standard “Sequence to Analyze”, definovaný v nastavení analýzy, zaměřuje na mutace na této pozici (viz Příloha A, strana 33). Pokud vzorek obsahuje mutaci u nukleotidu 34 (první báze kodonu 12), lze “Sequence to Analyze” změnit tak, že bude analyzovat také mutační status na této pozici, jak je popsáno v Příloze A.

Aktualizované frekvence mutací v lidském KRAS genu v kodonech 12/13 a v kodonu 61 jsou poskytovány online Sanger institutem na www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.



Pro spolehlivé výsledky by měla výška jednotlivých píků ležet přes 30 RLU. 30 RLU by mělo být určeno jako “required peak height for passed quality” (požadovaná výška píku pro dostatečnou kvalitu) v nastavení rozboru (viz Příloha A a příručka *PyroMark Q24 User Manual*).



Zpráva o výsledcích AQ analýzy by měla být použita jako dokumentace o kvantifikaci alel. Číselné hodnoty uvedené v pyrogramu jsou zaokrouhlené a neukazují přesnou kvantifikaci.

i Reanalýza vzorků bez detekovaných mutací v nukleotidu 35 nebo s hodnocením kvality “Check” (Zkontrolovat) nebo “Failed” (Neúspěšné)

Důrazně doporučujeme reanalýzu všech vzorků bez detekované mutace v nukleotidu 35 a vzorků s hodnocením kvality “Check” nebo “Failed” při analýze, u které byla “Sequence to Analyze” zaměřená na mutace u nukleotidu 34. “Check” nebo “Failed” hodnocení kvality může poukazovat na přítomnost referenčního píku na pozici, která se neočekává pro mutaci nukleotidu 35. Pík v jakékoliv z prvních tří dispenzací znamená, že je přítomna mutace u nukleotidu 34.

Pro reanalýzu cílových mutací u nukleotidu 34 přejděte do menu “Analysis Setup” (Nastavení analýzy) a změňte “Sequence to Analyze” z **GNTGRCGTAGGYA** na **NGTGRCGTAGGYA**. Stiskněte “Apply” (Použít). Až se objeví okno “Apply Analysis Setup” (Použít nastavení analýzy), klikněte na “To All” (Pro všechny).

i Opakování běhu vzorků pro detekci mutací s nízkou frekvencí

Je důrazně doporučeno zahrnout do každého běhu jako srovnání normální vzorek. Každý vzorek vykazující frekvenci mutace vyšší než odpovídající pozice normálního vzorku by měl být posouzen podle tabulky s limity detekce (tabulka 11, strana 28). Vzorky mohou být také srovnány mezi sebou, aby se odhalily neobvykle vysoké frekvence mutací.

Jako pravidlo lze uvést, že vzorky s předpokládanou mutací v rozsahu od LOD až po LOD + 3 % jednotek by měly být reanalyzovány v duplikátech spolu s normálním vzorkem v duplikátech. Pokud vykazují oba duplikáty stejný výsledek jako původní analýza a výrazně se odlišují od normální kontroly, může být tento vzorek považován za pozitivní na mutace. Prosím povšimněte si, že rozhodnutí o léčbě pacientů s rakovinou se nesmí zakládat pouze na mutačním statusu KRAS.

i V případě předpokládané GGT → GTT mutace lze pokládat výsledek větší než 1% za pozitivní. Tato frekvence může mezi replikáty podstatně variovat (viz „Limit slepého pokusu a limit detekce“, strana 9).

Tabulka 11. LOB a LOD determinované pro specifické mutace

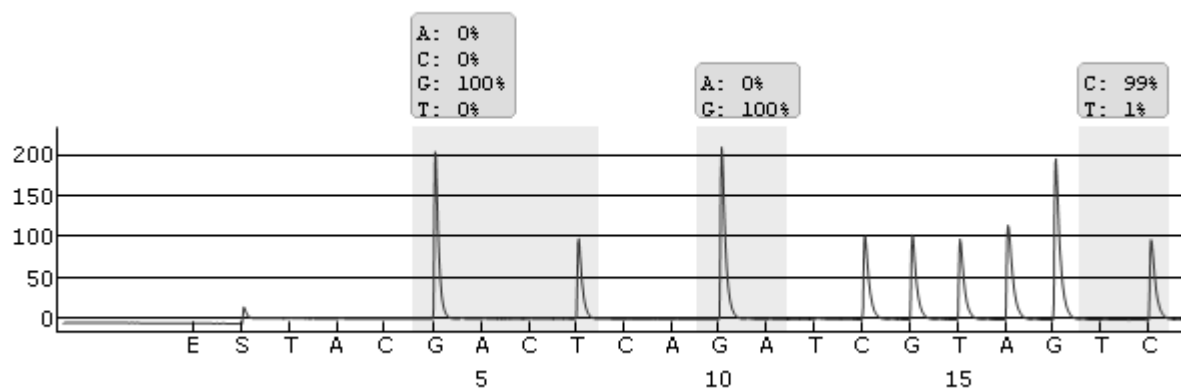
Mutace	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	n.a.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)			
GAC	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), testován v opačném směru (TTG)			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

* Převzato z katalogu somatických mutací u rakoviny “Catalogue of Somatic Mutations in Cancer” dostupného online na webových stránkách Sanger institutu na www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

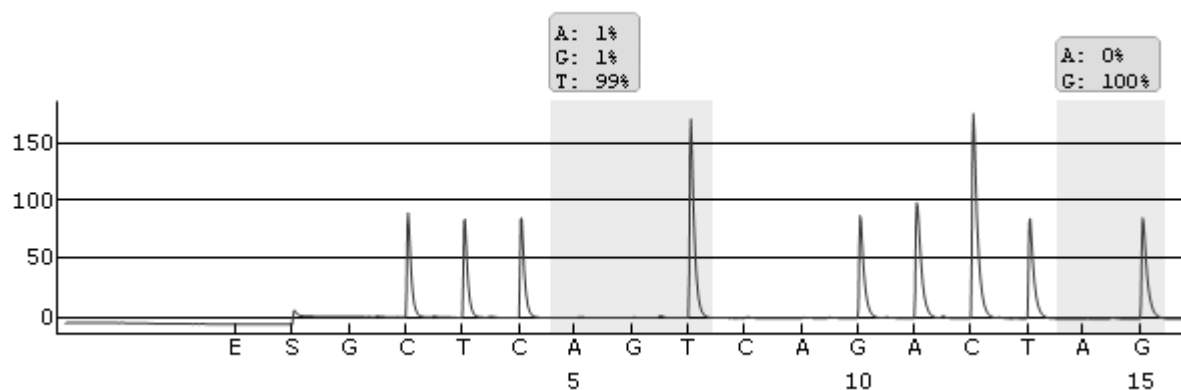
n.a.: neaplikovatelné.

Reprezentativní výsledky

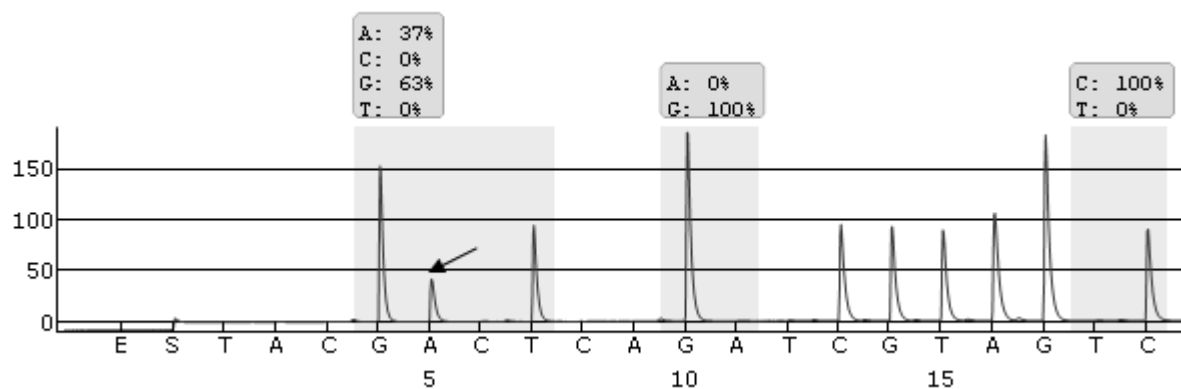
Na obrázcích 5 – 10 jsou jako pyrogramy zobrazeny reprezentativní výsledky.



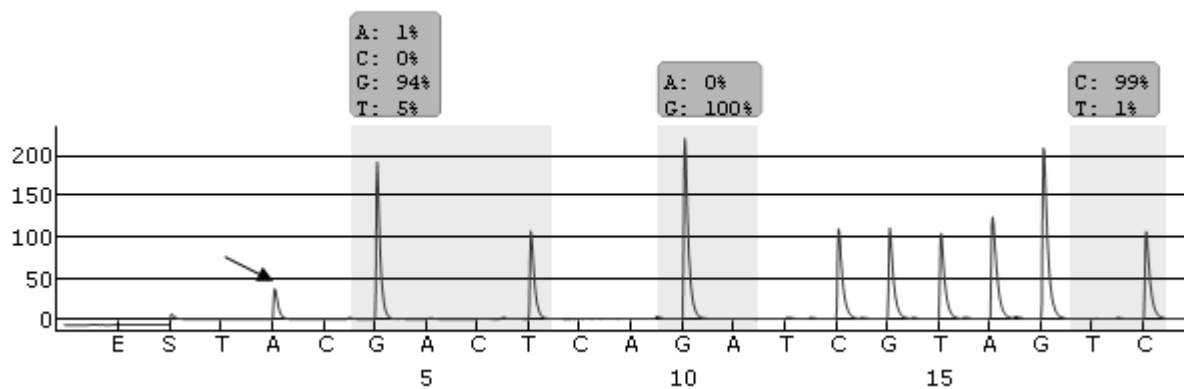
Obrázek 5. Pyrogram získaný po analýze vzorku s normálním genotypem v kodonech 12 a 13.



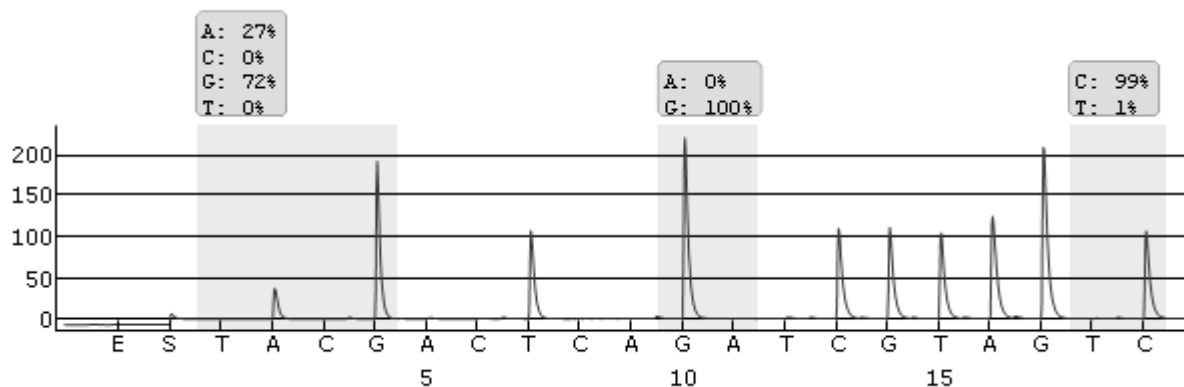
Obrázek 6. Pyrogram získaný po analýze vzorku s normálním genotypem v kodonu 61.



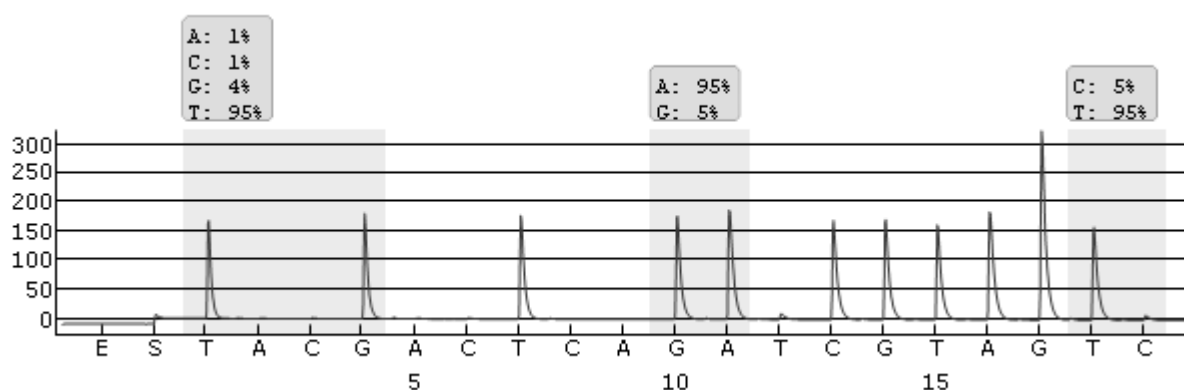
Obrázek 7. Pyrogram získaný po analýze vzorků s GGT → GAT mutací v bázi 2 kodonu 12 (nukleotid 35, indikován šipkou).



Obrázek 8. Pyrogram získaný po analýze vzorků s GGT → AGT mutací v bázi 1 kodonu 12 (nukleotid 34, indikován šipkou) se “Sequence to Analyze” GNTGRCGTAGGYA zaměřující se na bázi 2 v kodonu 12 (nukleotid 35). Žlutá barva poukazuje na to, že je tato sekvence neočekávaná a musí být přezkoušena.



Obrázek 9. Pyrogram a výsledky získané po reanalýze vzorku z obrázku 8. Mutace GGT → AGT byla reanalyzována se “Sequence to Analyze” NGTGRCGTAGGYA zaměřující se na bázi 1 v kodonu 12 (nukleotid 34).



Obrázek 10. Pyrogram získaný po analýze Mutant KRAS Control DNA se “Sequence to Analyze” NGTGRCGTAGGYA zaměřující se na první bázi kodonu 12.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z naší technické podpory vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a protokolu v tomto manuálu i obecně k molekulárně biologickým aplikacím (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo www.qiagen.com).

 Obecné řešení problémů s přístrojem naleznete v příručce *PyroMark Q24 User Manual*.

Komentáře a návrhy

Signály u kontroly bez templátu (negativní kontrola)

- a) Přeslech signálů mezi jamkami  Signál z jedné jamky je detekován v sousedící jamce. Vyhněte se umístění vzorků s vysokou signálovou intenzitou vedle jamek s kontrolou bez templátu.
- b) Kontaminace PCR  Používejte sterilní pipetovací špičky s filtry. Skladujte a extrahujte materiály jako vzorky, plasmidové kontroly a amplikony odděleně od PCR reagensů.

Špatná nebo neočekávaná sekvence

- Nízká kvalita genomické DNA  Nízká kvalita genomické DNA může způsobit selhání PCR. Analyzujte PCR vzorky za použití elektroforetické techniky (např. QIAxcel[®] System nebo elektroforéza v agarózovém gelu).

Výsledek “Check” nebo “Failed”

- Vzácná mutace nedefinovaná v nastavení rozboru  Upravte sekvenci určenou k analýze v nastavení rozboru (viz Příloha A, strana 33) a reanalyzujte běh.

Vysoké pozadí

- Nesprávné skladování nukleotidů  Skladujte nukleotidy při 2–8°C. Skladování při –20°C může způsobit zvýšení pozadí.

Žádné signály u pozitivních kontrol (wt KRAS Control DNA a Mutant KRAS Control DNA)

- a) Nedostatečné množství směsi enzymů nebo substrátů pro všechny jamky  Ujistěte se, že jste naplnili PyroMark Q24 zásobník podle “Pre Run Information” v menu “Tools”.

Komentáře a návrhy

b) Nesprávné skladování
nebo zředění reagensů



Připravte PyroMark Q24 Gold reagentie podle pokynů dodávaných s reagentiemi.

Neočekávaný pík na poslední variabilní pozici

Kontaminace kontrolní
plasmidovou DNA



Kontrolní plasmidy, wt KRAS Control DNA a Mutant KRAS Control DNA, obsahují jedinečný rozdíl sekvencí, který se používá k identifikaci signálu kontrol (viz „Kontroly“, strana 15 a „Příloha A: nastavení rozborů PyroMark KRAS“, strana 33). Používejte sterilní pipetovací špičky s filtry. Skladujte a extrahujte materiály jako vzorky, plasmidové kontroly a amplikony odděleně od PCR reagensů.

Příloha A: nastavení rozborů PyroMark KRAS

Před prvním použitím soupravy PyroMark KRAS musí být nastaven soubor testu podle pokynů níže.

Provedení

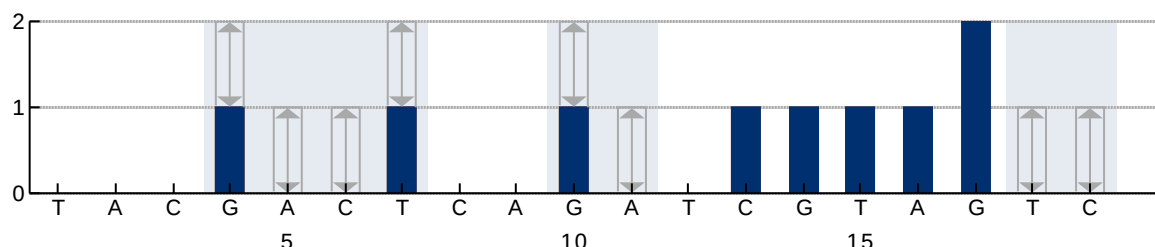
KRAS kodony 12 a 13

1. Nastavte test na KRAS kodony 12 (pozice 2) a 13 (pozice 2) pomocí PyroMark Q24 MDx softwaru.
2. Klikněte na  v panelu nástrojů a zvolte “New AQ Assay” (Nový AQ rozbor).
3. Zadejte následující sekvenci jako “Sequence to Analyze”.
GNTGRCGTAGGYA

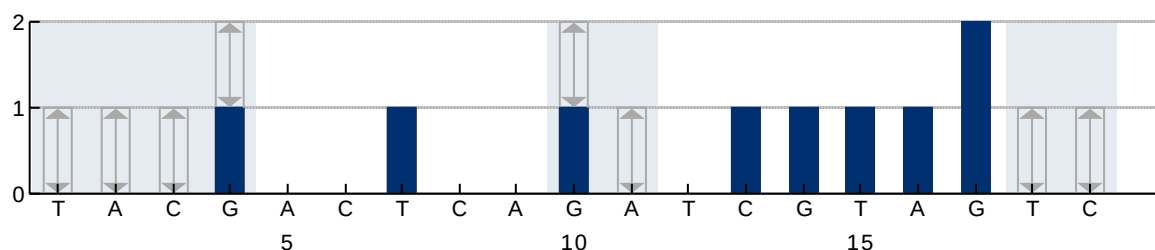
 Nejčastější mutace v kodonu 12 budou detekovány u nukleotidu 35 (druhá pozice). Pokud se vyskytly mutace u nukleotidu 34 (první pozice), změňte “Sequence to Analyze” na následující sekvenci.
NGTGRCGTAGGYA

 Variabilní pozice 3 (Y) umožňuje rozlišení signálů odvozených z plasmidových kontrol (wt KRAS Control DNA a Mutant KRAS Control DNA) od signálů genomické DNA. Zatímco genomická DNA generuje C, resultují plasmidové kontroly na variabilní pozici 3 v T.

4. Ručně zadejte následující “Dispensation Order” (Pořadí dispenzací).
TACGACTCAGATCGTAGTC



Obrázek 11. Histogram pro kodony 12 (nukleotid 35) a 13 (nukleotid 38) se “Sequence to Analyze” GNTGRCGTAGGYA.



Obrázek 12. Histogram pro kodony 12 (nukleotid 34) a 13 (nukleotid 38) se “Sequence to Analyze” NGTGRCGTAGGYA.

5. Klikněte na záložku “Analysis Parameters” (Parametry analýzy) a zvyšte “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:”

(hranice výšky píků – požadovaná výška píků pro dostatečnou kvalitu) na 30.

- Klikněte na  v panelu nástrojů a uložte test jako *KRAScodon 12+13*.

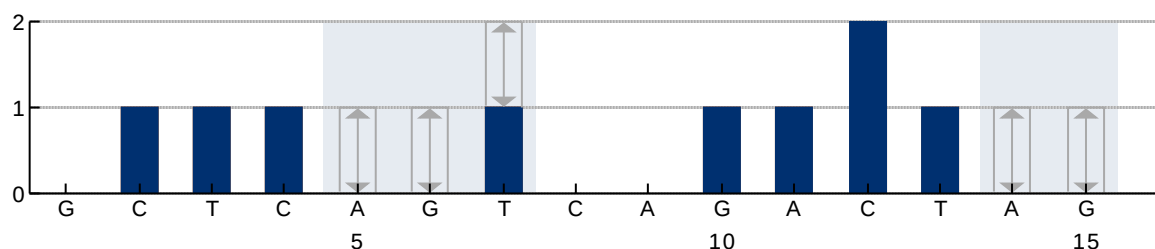
KRAS kodon 61

- Klikněte na  v panelu nástrojů a zvolte “New AQ Assay”.
- Zadejte následující sekvenci jako “Sequence to Analyze”.
CTCDTGACCTRC



Variabilní pozice 2 (R) umožňuje rozlišení signálů odvozených z plasmidových kontrol (wt KRAS Control DNA a Mutant KRAS Control DNA) od signálů genomické DNA. Zatímco genomická DNA generuje G, resultují plasmidové kontroly na variabilní pozici 2 v A.

- Ručně zadejte následující “Dispensation Order”.
GCTCAGTCAGACTAG



Obrázek 13. Histogram pro kodon 61 (nukleotid 183).

- Klikněte na záložku “Analysis Parameters” a zvýšte “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” na 30.
- Klikněte na  v panelu nástrojů a uložte test jako *KRAScodon 61*.

Příloha B: vyprázdnění vaniček a nádob na odpad

Varování 	Nebezpečné chemikálie Denaturační roztok, který se používá s vakuovou pracovní stanicí, obsahuje hydroxid sodný, který dráždí oči a kůži. Vždy noste ochranné brýle, rukavice a laboratorní plášť. Odpovědná osoba (např. vedoucí laboratoře) musí provést taková bezpečnostní opatření, aby bylo zajištěno, že je pracoviště bezpečné a že pracovníci obsluhující přístroj nejsou vystaveni nebezpečným hodnotám toxických látek (chemických nebo biologických) definovaným v příslušných bezpečnostních listech (Material Safety Data Sheets - MSDSs) nebo v OSHA*, ACGIH† či COSHH‡ dokumentech. Odvětrání výparů a likvidace odpadů musí probíhat v souladu se všemi národními, státními a místními zdravotními a bezpečnostními předpisy a zákony.
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (USA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (UK)

Ujistěte se, že jsou dodržovány státní a místní ekologické předpisy pro likvidaci laboratorního odpadu.



Důležitý pokyn před začátkem

- Tento protokol vyžaduje vysoce čistou vodu (Milli-Q 18.2 MΩ x cm, www.millipore.com, nebo ekvivalent).

Provedení

1. Ujistěte se, že není vakuovému nástroji přiděleno vakuum. Ujistěte se, že je vakuum uzavřeno (Off) a vakuová pumpa je vypnutá.
2. Zlikvidujte roztoky zbylé ve vaničkách.
3. Umyjte vaničky vysoce čistou vodou nebo je v případě potřeby vyměňte.
4. Vyprázdněte nádobu na odpad.



Víko lze odejmout bez toho, aby se musely odpojit hadičky.

5. Pokud se musí vakuová pracovní stanice vyčistit (např. kvůli prachu nebo rozlití tekutiny), postupujte podle instrukcí v příručce *PyroMark Q24 User Manual*.

Literatura

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu etc.

Úplný seznam literatury naleznete v QIAGEN Reference Database na stránce www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo kontaktujte Technický servis QIAGEN popř. Vašeho místního distributora.

Informace o objednání

Produkt	Obsah	Kat. čís.
PyroMark KRAS Kit (24)	Pro 24 reakcí na systému PyroMark Q24 MDx: Seq primery, PCR primery, wt KRAS Control DNA, Mutant KRAS Control DNA	971450
PyroMark Q24 MDx	Detekční platforma založená na sekvencích pro pyrosekvenaci 24 vzorků současně	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuová pracovní stanice (220 V) pro přípravu 24 vzorků současně, od PCR produktu po jednovláknový templát	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 MDx Software	Aplikační software	9019063
Příslušenství		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-jamková destička pro sekvenační reakce	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Zásobníky pro dispenzaci nukleotidů a reagensů	979302
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Pro 5 x 24 vzorků: směs enzymů, směs substrátů a nukleotid	971802
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Pro navázání biotinylovaného PCR produktu na sefárové kuličky	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Pro denaturaci dvouvláknového PCR produktu na jednovláknovou templátní DNA	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrate (200 ml)	Pro promývání jednovláknové DNA	979308
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Pro připojení (annealing) sekvenačních primerů na jednovláknový PCR produkt a pro pyrosekvenační reakci	979309
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Znovu použitelné filtrační jehly pro vakuovou stanici PyroMark Vacuum Q96 a Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Pro kontrolu instalace systému	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pro potvrzení výkonu systému	979304

* Pro zbytek světa (kromě UK).

† Pro UK.

Produkt	Obsah	Kat. čís.
Příbuzné produkty		
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (250)	Pro 250 x 20 µl reakcí: 3 x 0,85 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix obsahující celkově 250 jednotek HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-polymerázy, 1 x 0,55 ml CoralLoad® koncentrátu, 2 x 1,9 ml vody prosté RNáz	203643
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (1000)	Pro 1000 x 20 µl reakcí: 12 x 0,85 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix obsahující celkově 1000 jednotek HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-polymerázy, 4 x 0,55 ml CoralLoad koncentrátu, 8 x 1,9 ml vody prosté RNáz	203645
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (2500)	Pro 2500 x 20 µl reakcí: 25 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix obsahující celkově 2500 jednotek HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-polymerázy, 5,5 ml CoralLoad koncentrátu, 2 x 20 ml vody prosté RNáz	203646
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pro 50 příprav DNA: 50 QIAamp MinElute® kolonek, proteináza K, pufrý, sběrné zkumavky (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Pro 48 příprav: zásobníky s reagensy (pro vzorky tkáně), jednorázové špičky s filtrem, jednorázové držáky na špičky, zkumavky na vzorky (2 ml), eluční zkumavky (1,5 ml), pufr G2, proteináza K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Pro 50 příprav: QIAamp Mini Spin kolonky, pufrý, reagensie, zkumavky, VacConnectory	61104

Informace o aktuálních licenčních podmínkách a specifických licencích k produktům získáte v odpovídajícím manuálu k soupravě QIAGEN. Manuály k soupravám QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u Technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose™ (GE Healthcare); Therascreen® (DxS Limited); Windows® (Microsoft Corporation).

Licenční ujednání

Použitím produktu vyjadřuje kupec nebo uživatel soupravy PyroMark KRAS Kit souhlas s následujícími podmínkami:

1. PyroMark KRAS Kit smí být používán výhradně v souladu s *Manuálem PyroMark KRAS Kit* a pouze s komponenty obsaženými v soupravě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponent kitu s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v *Manuálu PyroMark KRAS Kit* a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tento kit a jeho komponenty jsou licencovány pro jedno použití a nesmí být znovu použity, obnoveny či znovu prodány.
4. QIAGEN zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupec a uživatel kitu souhlasí s tím, že nepodnikne nebo nikomu neumožní podniknout kroky, které by mohly vést nebo usnadnit zakázané skutky uvedené výše. QIAGEN může základy tohoto Licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, inkl. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tento kit a/nebo jeho komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz. www.qiagen.com.

© 2009 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

