

Håndbok for *therascreen*[®] BRAF Pyro[®]-sett



Versjon 2



Til bruk i in vitro-diagnostikk



971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R2



1074213NO



QIAGEN prøve- og analyseteknologi

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi som gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og -tjenester sikrer suksess fra prøve til resultat.

QIAGEN setter standarden når det gjelder:

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Vårt mål er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Du finner mer informasjon på www.qiagen.com.

Innhold

Tiltenkt bruk	4
Sammendrag og forklaring	4
Prosedyreprinsipp	5
Medfølgende materiale	7
Settets innhold	7
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	9
Advarsler og forholdsregler	11
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	11
Oppbevaring og håndtering av reagenser	13
Oppbevaring og håndtering av prøver	13
Prosedyre	14
Isolering av DNA	14
■ Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet	15
■ Protokoll 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med <i>therascreen</i> BRAF Pyro-settet	18
■ Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler	21
■ Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24	23
■ Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet	27
■ Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie	29
Tolkning av resultater	32
Tolkning av analyseresultater og deteksjon av mutasjoner med lavt nivå	32
Feilsøkingsveiledning	36
Kvalitetskontroll	39
Begrensninger	39
Ytelseskarakteristikker	40
Referanser	45
Symboler	45
Kontaktinformasjon	46
Vedlegg A: Oppsett av <i>therascreen</i> BRAF Pyro-analyser	47
Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar	50
Bestillingsinformasjon	51

Tiltenkt bruk

therascreen BRAF Pyro-settet er en nukleinsyretest til in vitro-diagnostisk bruk basert på sekvensdetektering og Pyrosequencing[®], til kvantitativ påvisning av mutasjoner i kodon 600 og 464–469 i humant BRAF-gen i genomisk DNA som stammer fra humane vevsprøver.

therascreen BRAF Pyro-settet skal brukes for å gi leger informasjon som skal hjelpe dem å velge hvilke kreftpasienter som sannsynligvis vil ha best utbytte av anti-EGFR-behandling. Til bruk i in vitro-diagnostikk.

Skal bare brukes sammen med PyroMark[®] Q24-systemet. PyroMark Q24-systemene omfatter:

- PyroMark Q24-instrumentet og PyroMark Q24 MDx-instrumentet.
- PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon og PyroMark Q24 MDx vakuumarbeidsstasjon.
- PyroMark Q24-programvare (versjon 2.0) og PyroMark Q24 MDx-programvare (versjon 2.0).

Dette produktet er beregnet til bruk av profesjonelle brukere, slik som teknikere og fysikere som har mottatt opplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer, molekylær-biologiske teknikker og PyroMark Q24-systemet.

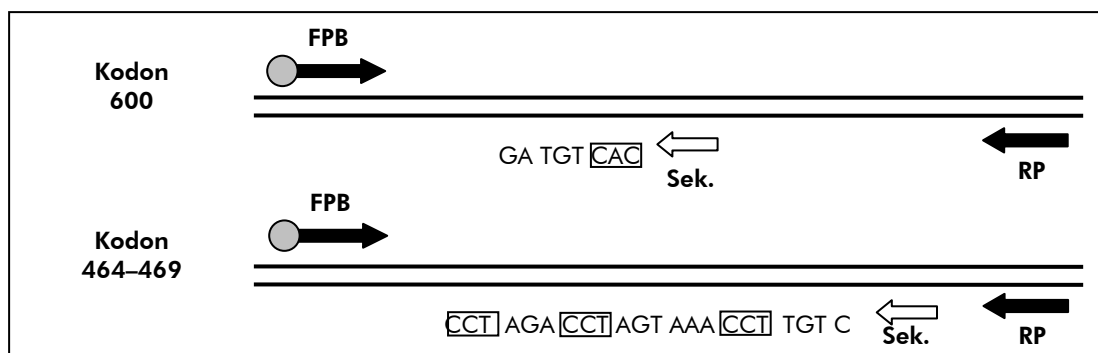
Sammendrag og forklaring

therascreen BRAF Pyro-settet brukes til kvantitative målinger av mutasjoner i kodon 600 i ekson 15 og 464–469 i ekson 11 i humant BRAF-gen (figur 1).

Ekson 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA G T G AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
Ekson 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCTGAT GGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT GGA TCT GGA TCATTT GGA ACA GTCTACAAGGGAAAGTGGCATG

Figur 1. Den genomiske konteksten til de sekvenserte områdene av det humane BRAF-genet (Ensembl ID: ENSG00000157764). Kodon 600, 464, 466 og 469 angis med firkanter.

Settet består av to analyser: én til påvisning av mutasjoner i kodon 600 og én til påvisning av mutasjoner i kodon 464–469 (figur 2). De to områdene amplifiseres separat av PCR og sekvenseres gjennom angitt område. Sekvenser som omgir de angitte posisjonene tjener som normaliserings- og referansetopper for kvantifisering og kvalitetsvurdering av analysen.



Figur 2. Illustrasjon av BRAF-analyse. Angitt sekvens er en analysert sekvens for en villtype-prøve. **FPB:** Oppstrøms PCR-primere (B indikerer biotinylering); **RP:** Nedstrøms PCR-primere; **Seq:** Sekvenseringsprimere.

Begge analyser sekvenseres nedstrøms.

Produktet består av en PCR-primerblanding og en sekvenseringsprimer for hver analyse. Primerne leveres i en løsning. Hver flaske inneholder 24 µl av hver primer eller primerblanding.

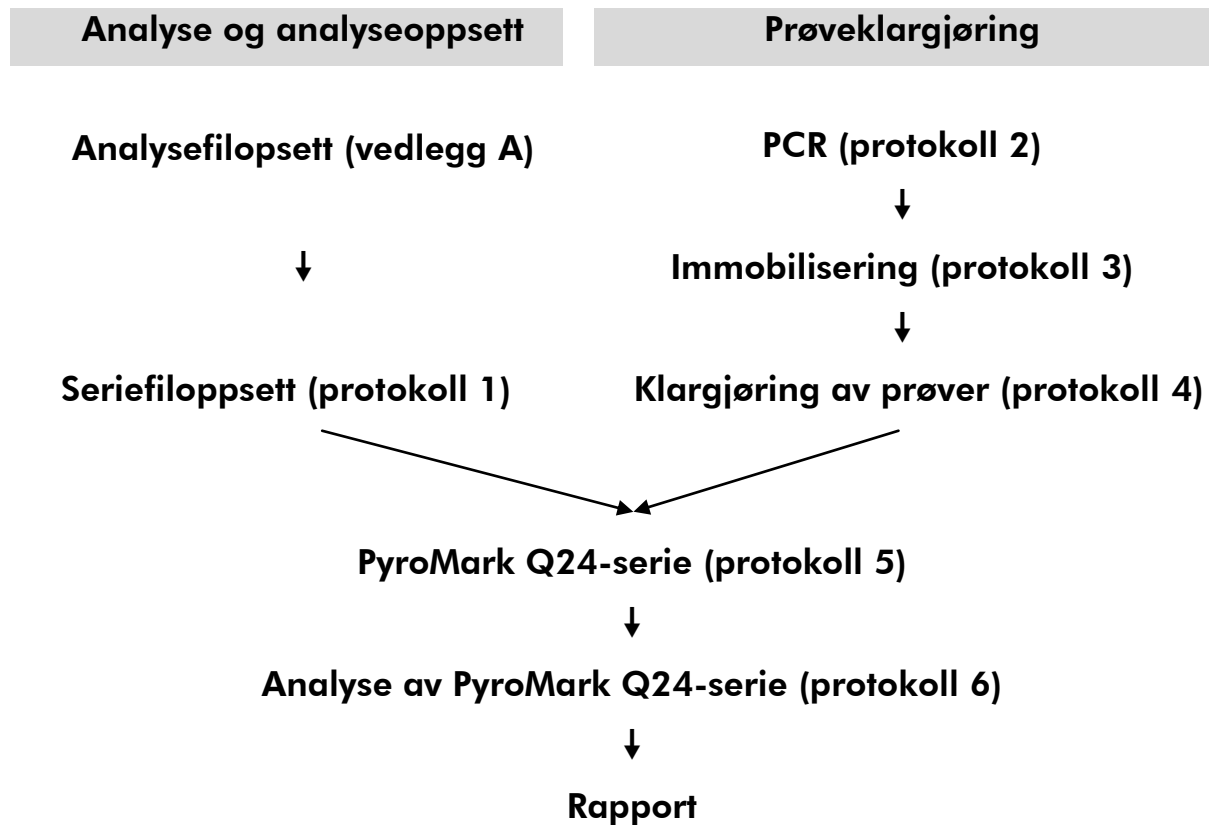
Prosedyreprinsipp

Arbeidsgangen på side 6 illustrerer analyseprosedyren. Etter PCR med primere som har kodon 600 og kodon 464–469 som mål, immobiliseres ampliconene på Streptavidin Sepharose® High Performance-mikropartikler. Enkelttrådet DNA klargjøres, og de tilhørende sekvenseringsprimerne hybridiseres til DNA-et. Prøvene analyseres deretter i PyroMark Q24 ved hjelp av en fil for å kjøre oppsettet og en fil for å kjøre analyse.

Det anbefales å bruke BRAF plug-in-rapporten til analyse av serien. Du kan be om BRAF plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com. Serien kan også analyseres ved hjelp av analyseverktøyet integrert til PyroMark Q24-systemet. "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) kan tilpasses til påvisning av sjeldne mutasjoner etter analysen (se "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie", side 29).

Merk: Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med den forrige versjonen av håndboken for *therascreen* BRAF Pyro-sett (versjon 1, juli 2011). Se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler", side 21 samt "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24", side 23 og "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie", side 29.

Arbeidsgang for *therascreen* BRAF Pyro-prosedyren



Kontroller

Umetylert kontroll-DNA er inkludert i settet som en positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner. Dette kontroll-DNA-et har en villtype genotype i områdene sekvensert med dette settet, og er nødvendig for tilstrekkelig tolkning av resultatene og identifisering av mutasjoner på lavt nivå (se "Tolkning av resultater" på side 32). Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie.

I tillegg bør man alltid ta med en negativ kontroll (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett for minst én analyser.

Medfølgende materiale

Settets innhold

therascreen BRAF Pyro-sett (eske 1/2)

<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (<i>therascreen</i> BRAF Pyro-sett) (24)	(24)
Katalognr.	971470
Antall reaksjoner	24
Seq Primer BRAF 600 (Sekvenseringsprimer BRAF 600)	24 µl
Seq Primer BRAF 464–469 (Sekvenseringsprimer BRAF 464–469)	24 µl
PCR Primer BRAF 600 (PCR-primer BRAF 600)	24 µl
PCR Primer BRAF 464–469 (PCR-primer BRAF 464–469)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	850 µl
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad®-konsentrat,) 10 x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA (Umetylert kontroll-DNA), 10 ng/µl	100 µl

**therascreen buffers and reagents (therascreen-buffere og -reagenser)
(eske 2/2)**

Buffere og reagenser	
PyroMark Binding Buffer (PyroMark bindingsbuffer)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark hybridiseringsbuffer)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark denatureringsløsning)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer (PyroMark vaskebuffer), 10 x	25 ml
Enzyme Mixture (Enzymblanding)	1 flaske
Substrate Mixture (Substratblanding)	1 flaske
dATP α S	1180 μ l
dCTP	1180 μ l
dGTP	1180 μ l
dTTP	1180 μ l
therascreen <i>BRAF Pyro Kit Handbook</i> (engelsk)	1

* Inneholder natriumhydroksid.

Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

- DNA-isoleringssett (se "Isolering av DNA", på side 14)
- Pipetter (justerbare)*
- Sterile pipettespisser (med filter for PCR-oppsett)
- Bordsentrifuge*
- Termosykler* og egnede PCR-rør
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (kat.nr. 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24-programvare (kat.nr. 9019063 eller 9019062)†
- PyroMark Q24-plate (kat.nr. 979301)†
- PyroMark Q24-kassett (kat.nr. 979302)†
- PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjon (kat.nr. 9001515 eller 9001517)*†
- Platemikser* for immobilisering til mikropartikler
- Varmebløkk* som kan oppnå 80 °C
- 24-brønners PCR-plate eller remser
- Korker
- Vann med høy renhetsgrad (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende).
Merk: Settet inneholder tilstrekkelig vann for PCR, DNA-immobilisering og til å løse opp enzymblandingen og substratblandingen. Det er nødvendig med ekstra vann med høy renhetsgrad for å fortynne PyroMark vaskebuffer, 10 x.
- Etanol (70 %)‡

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

† CE-IVD-merket i samsvar med EU-direktiv 98/79/EF. Alle andre angitte produkter er ikke CE-IVD-merket basert på EU-direktiv 98/79/EF.

‡ Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

Anbefalte platemiksere

Platemikserne som er vist i Tabell 1 anbefales for bruk med *therascreen* BRAF Pyro-settet.

Tabell 1. Platemiksere som anbefales for bruk med *therascreen* BRAF Pyro-sett

Produsent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Termomixer comfort (grunnleggende utstyr)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Anbefalte 24-brønners plater

24-brønners platene som er vist i Tabell 2 anbefales for bruk med *therascreen* BRAF Pyro-settet.

Tabell 2. 24-brønners plater som anbefales for bruk med *therascreen* BRAF Pyro-settet.

Produsent	Produkt	Katalognummer
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Advarsler og forholdsregler

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i *therascreen* BRAF Pyro-settet.

PyroMark Denaturation Solution



Advarsel! Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Kan være etsende for metaller. Absorber spill for å hindre materiell skade. Oppbevares bare i originalbeholder. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

PyroMark Enzyme Mixture



Inneholder: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Fare! Irriterer huden. Gir alvorlig øyeskade. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. VED eksponering eller bekymring: Ring et GIFTKONTROLLSENTER eller lege. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

PyroMark Substrate Mixture



Inneholder: acetic acid. Advarsel! Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

Generelle forholdsregler

Merk: Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Håndboken må følges nøyaktig for å få mest mulig optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.
- Arbeidsgangen er noe endret (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler" (side 21), "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" (side 23) og "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie", side 29) sammenlignet med versjon R1 av håndboken for *therascreen* BRAF Pyro-settet.
- Komponentene i dette produktet er tilstrekkelige til å utføre 24 reaksjoner i opptil 5 uavhengige serier.
- Bruk sterile pipettespisser med filter (for PCR-oppsett).
- Positivt materiell (prøver, positive kontroller og amplikoner) skal oppbevares og ekstraheres separat i forhold til alle andre reagenser, og tilsettes reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.
- Alle komponenter tines grundig opp ved romtemperatur (15–25 °C) før analysering.
- Når komponentene er tint, kan de blandes (pipetteres gjentatte ganger opp og ned, eller vortekses i pulser) og sentrifugeres en kort stund.
- Ikke godkjente resultater danner ikke grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus.

Oppbevaring og håndtering av reagenser

therascreen BRAF Pyro-settet leveres i to esker. *therascreen* BRAF Pyro-settet (eske 1/2) sendes på tørris. PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-konsentrat, umetylert kontroll-DNA og alle primere bør oppbevares ved -30 til -15 °C etter levering.

therascreen-bufferne og reagensene (eske 2/2) som inneholder buffere, enzym-blanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP og dTTP (reagenser for pyrosekvenseringsanalyse), transporteres og leveres på kuldepakninger. Disse komponentene bør oppbevares ved $2-8$ °C ved levering. Det kan være lurt å beholde enzymblandingen og substratblandingen i flaskene som følger med, for å redusere tap av aktivitet.

Rekonstituerte enzym- og substratblandinger er stabile i minst 10 dager ved $2-8$ °C. Rekonstituerte enzym- og substratblandinger kan fryses og oppbevares i flaskene ved -30 til -15 °C. Frosne reagenser bør ikke utsettes for mer enn 3 fryse/tine-sykluser.

Merk: Nukleotider må ikke fryses.

therascreen BRAF Pyro-settet er stabilt frem til settets utløpsdato dersom det oppbevares under disse betingelsene.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet er humant DNA ekstrahert fra formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) prøver.

Prosedyre

Isolering av DNA

Systemets ytelse er etablert ved hjelp av EZ1[®] DNA Tissue-sett og QIAamp[®] DNA FFPE Tissue-sett for ekstrahering av humant DNA fra formalinfikserte, parafinlagrede tumorprøver.

QIAGEN[®]-settene som er vist i tabell 3 anbefales for DNA-rensing fra de angitte humane prøvetypene som skal brukes sammen med *therascreen* BRAF Pyro-settet. Utfør DNA-rensing i henhold til instruksjonene angitt i settets håndbøker.

Tabell 3. Sett for DNA-rensing er anbefalt for bruk med *therascreen* BRAF Pyro-sett

Prøvemateriale	Nukleinsyrisoleringssett	Katalognummer (QIAGEN)
Parafinlagret vev	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

* Følg protokollen for bruk sammen med parafinlagret vev. EZ1 DNA Tissue-sett bør brukes i kombinasjon med EZ1 Advanced (kat.nr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat.nr. 9001492) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9018700) eller med BioRobot[®] EZ1 (kat.nr. 9000705; ikke lenger tilgjengelig) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9015862).

Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet

Viktige poeng før du starter

- LOB kan om nødvendig bekreftes ved hjelp av en villtypeprøve for å generere en full plate med resultater. Du finner mer informasjon ved å se i CLSI Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protokoller for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer.)

Dette må du gjøre før du starter:

- Hvis BRAF plug-in-rapporten ikke er installert, må du lage et analyseoppsett (se "Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* BRAF Pyro-analyser" på side 47). Dette skal kun gjøres én gang, før du kjører *therascreen* BRAF Pyro-analysen første gang. Hvis BRAF plug-in-rapporten er installert, er forhåndsdefinerte analyseoppsett tilgjengelige i PyroMark Q24-programvarens snarveifunksjon under banen "Example Files/PyroMark Setups/BRAF" (Eksempelfiler/PyroMark-oppsett/BRAF). Du kan be om BRAF plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com.

Prosedyre

1. Klikk på på verktøylinjen.

En ny seriefil opprettes.

2. Skriv inn analyseparameterne (se ""Run parameters" (Serieparametere)", side 16).

3. Sett opp platen ved å legge til analyser for kodon 600 og kodon 464–469 i brønner som samsvarer med prøvene som skal analyseres.

Merk: Man bør alltid ta med en negativ prøve (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett for minst én analyse.

Merk: Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie (se "Kontroller" på side 6).

4. Når serien er satt opp og klar til å kjøre på PyroMark Q24-systemet, skal du skrive ut en liste over nødvendig mengde enzymblanding, substratblanding og nukleotider, samt plateoppsettet. Velg "Pre Run Information" (Informasjon før analyse) fra menyen "Tools" (Verktøy), og klikk på når rapporten vises.

5. Velg analysefil og kopier den til en USB-enhet (leveres med systemet) ved hjelp av Windows® Utforsker.

Merk: Informasjon før analyse som er skrevet ut kan brukes som en mal for prøveoppsettet (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler" på side 21).

Hvis du ønsker å kjøre platen på PyroMark Q24-systemet, se "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 27.

"Run parameters" (Serieparametere)

- "Run name" (Serienavn): Navnet på serien gis når filen er lagret. Hvis man gir filen et nytt navn, vil dette også endre navnet på serien.
- "Instrument method" (Instrumentmetode): Velg instrumentmetode i henhold til kassetten som vil bli brukt til serien. Se instruksjonene som følger med produktene.
- "Plate ID" (Plate-ID): **Valgfritt:** Skriv inn ID for PyroMark Q24-plate.
- "Bar code" (Strekkode): **Valgfritt:** Skriv inn en strekkode for platen. Hvis du har en skanner tilkoblet datamaskinen, kan du også sette musemarkøren i tekstboksen "Barcode" (Strekkode) (ved å klikke på boksen) og skanne strekkoden.
- "Kit and Reagent ID" (Sett og reagens-ID): **Valgfritt:** Skriv inn partinummeret for *therascreen* BRAF Pyro-settet som skal brukes. Partinummeret er angitt på produktemballasjen.
Merk: Vi anbefaler at du skriver inn både reagens-ID og settets ID, slik at eventuelle uventede problemer med reagensene kan spores.
- "Run note" (Merknad til serie): **Valgfritt:** Skriv inn en merknad om innholdet eller målet med serien.

Legge til analysefiler

Du kan legge til en analyse til en brønn ved enten å:

- høyreklikke på brønnen og velge "Load Assay" (Sett inn analyse) fra menyen
- velge analysen i snarveifunksjonen og klikke på og dra analysen inn i brønnen

En brønn er fargekodet i forhold til analysen som er satt inn i brønnen.

Legg inn prøve-ID-er og merknader

Velg celle og skriv inn tekst for å legge inn en prøve-ID eller merknad.

Du kan redigere en prøve-ID eller merknad ved enten å velge cellen (gjeldende innhold vil bli valgt) eller dobbeltklikke på cellen.

Protokoll 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med *therascreen* BRAF Pyro-settet

Denne protokollen gjelder for PCR-amplifikasjoner av et område som inneholder kodon 600 og en separat PCR-amplifikasjon av et område som inneholder kodon 464–469 ved hjelp av *therascreen* BRAF Pyro-settet.

Viktige poeng før du starter

- HotStarTaq[®] DNA-polymerase i PyroMark PCR Master Mix krever et aktiveringstrinn på **15 minutter ved 95 °C**.
- Sett opp alle reaksjonsblandinger i et område som er skilt av fra det som brukes til DNA-rensing, tilsetning av DNA-templat til PCR, PCR-produktanalyse eller klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse.
- Bruk engangsspisser som inneholder vannavstøtende filter for å minimere faren for krysskontaminering.

Dette må du gjøre før du starter:

- Før du åpner rørene med PCR-primere, må disse sentrifugeres en kort stund for at innholdet skal samles i bunnen av rørene.
- Juster konsentrasjonen av kontrollen og prøve-DNA til 0,4–2 ng/μl ved behov.

Prosedyre

1. Tin alle nødvendige komponenter (se tabell 4).

Bland godt før bruk.

2. Klargjør en reaksjonsblanding for hvert PCR-primersett i henhold til tabell 4.

Reaksjonsblandingen inneholder normalt alle komponentene som er nødvendige PCR, unntatt prøven.

Klargjør en mengde reaksjonsblanding som er større enn den som kreves for det totale antallet PCR-analyser som skal utføres.

Tabell 4. Klargjøring av reaksjonsblanding for hver PCR-primerblanding

Komponent	Volum/reaksjon (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	12,5
CoralLoad-konsentrat, 10 x	2,5
PCR-primer, BRAF-kodon 600 eller PCR-primer, BRAF-kodon 464–469	1,0
Vann (H_2O , følger med)	4,0
Totalt volum	20,0

3. Bland reaksjonsblandingen grundig, og pipetter 20 μ l i hvert PCR-rør.

Det er ikke nødvendig å ha PCR-rørene på is, fordi HotStarTaq DNA-polymerase er inaktiv ved romtemperatur.

4. Tilsett 5 μ l DNA-templat (2–10 ng av genomisk DNA) til hvert PCR-rør (se tabell 5), og bland grundig.

Merk: Man bør alltid ta med en negativ kontrollprøve (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett for minst én analyse.

Merk: Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie (se "Kontroller" på side 6).

Tabell 5. Klargjøring av PCR

Komponent	Volum/reaksjon (μl)
Reaksjonsblanding	20
Prøve-DNA	5
Totalt volum	25

5. Programmer termosykleren i henhold til produsentens anvisninger med betingelsene angitt i tabell 6.

Tabell 6. Optimalisert syklusprotokoll

			Kommentarer
Innledende aktiveringstrinn:	15 minutter	95 °C	HotStarTaq DNA-polymerase aktiveres av dette varmetrinnet.
3-trinns syklus:			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Hybridisering	30 sekunder	53 °C	
Forlengelse	20 sekunder	72 °C	
Antall sykluser	42		
Endelig forlengelse:	5 minutter	72 °C	

6. Sett inn PCR-rørene i den termiske sentrifugen og start syklusprogrammet.
7. Fortsett med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler", på side 21 etter amplifikasjonen.

Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler

Denne protokollen gjelder for immobilisering av DNA-templat til Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) før analyse på PyroMark Q24-systemet.

Dette må du gjøre før du starter:

- Alle nødvendige reagenser og løsninger må oppnå romtemperatur (15–25 °C) før start.

Viktige poeng før du starter

- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med den forrige versjonen av håndboken for *therascreen* BRAF Pyro-settet (versjon 1, juli 2011, trinn 2).

Prosedyre

1. Rist flasken som inneholder Streptavidin Sepharose High Performance forsiktig, til det er blitt en jevn løsning.
2. Klargjør Master Mix for DNA-immobilisering i henhold til tabell 7. Klargjør et volum som er 10 % større enn det som kreves for det totale antallet reaksjoner som skal utføres.

Tabell 7. Master Mix for DNA-immobilisering

Komponent	Volum/reaksjon (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	1
PyroMark bindingsbuffer	40
Vann (H ₂ O, følger med)	29
Totalt volum	70

Merk: Denne protokollen gjelder for Streptavidin Sepharose High Performance med partinummer 10057037 eller høyere. Når du bruker Streptavidin Sepharose High Performance-mikropartikler med lavere partinummer enn 10057037, må volumet av partikler per brukt prøve økes til 2 µl, samtidig som vannvolumet må reduseres passende.

3. Tilsett 70 µl Master Mix til brønnene i en PCR-plate med 24 brønner eller remser, slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).

4. **Tilsett 10 μ l biotinylerert PCR-produkt fra protokoll 2 til hver brønn som inneholder Master Mix slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).**

Merk: Det totale volumet per brønn skal være 80 μ l etter at Master Mix og PCR-produktet er tilsatt.

5. **Forsegl PCR-platen (eller remsene) ved hjelp av korker.**

Merk: Se til at det ikke kan lekke mellom brønnene.

6. **Beveg PCR-platen frem og tilbake i romtemperatur (15–25 °C) i 5–10 minutter ved 1400 opm.**

Merk: I løpet av dette trinnet kan du klargjøre PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon for prøveklargjøring, slik det er beskrevet i håndboken for PyroMark Q24.

7. **Fortsett umiddelbart med "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 23.**

Merk: Sepharose mikropartikler lager fort bunnfall. Henting av mikropartikler må skje umiddelbart etter bevegelse av platen.

Hvis det er gått mer enn ett minutt siden platen (eller remsene) ble beveget opp og ned, bør dette gjøres på nytt i ett minutt før mikropartiklene hentes.

Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24

Denne protokollen gjelder for klargjøring av enkeltrådet DNA og hybridisering av sekvenseringsprimerer til templatet før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24.

Viktige poeng før du starter

- Før du åpner rørene med sekvenseringsprimerer, må disse sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet i bunnen av rørene.
- Tilsett de 2 ulike sekvenseringsprimerne i det samme mønsteret som er angitt for platen i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15), avhengig av analyseområdet (kodon 600 eller kodon 464–469).
- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med den forrige versjonen av håndboken for *therascreen* BRAF Pyro-settet (versjon 1, juli 2011, trinn 18). Ikke kort ned tiden for nedkjøling av prøvene etter oppvarming til 80 °C.
- Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 regelmessig og bytt filterprober når dette angis.

Dette må du gjøre før du starter:

- Sett én PyroMark Q24-plateholder på en forvarmet varmeblokk som holder 80 °C til bruk i trinn 17. Hold en andre PyroMark Q24-plateholder ved romtemperatur (15–25 °C) for bruk i trinn 18.
- PyroMark vaskebuffer tilsettes som et 10 x-konsentrat. Før den brukes første gang skal den fortynnes til en 1 x aktiv løsning ved å tilsette 225 ml vann med høy renhetsgrad til 25 ml 10 x PyroMark vaskebuffer (endelig volum på 250 ml).

Merk: 1 x PyroMark vaskebuffer aktiv løsning er stabil ved 2–8 °C til den angitte utløpsdatoen.

Prosedyre

1. **Fortynn en tilstrekkelig stor mengde av hver sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer BRAF 600 eller sekvenseringsprimer BRAF 464-469, i PyroMark hybridiseringsbuffer som vist i tabell 8.**

Klargjør et volum med fortynnet sekvenseringsprimer som er større enn det som kreves for det totale antallet prøver som skal sekvenseres (for antall prøver + en ekstra).

Ikke fortynn og oppbevar mer sekvenseringsprimer.

Tabell 8. Eksempel på fortytning av sekvenseringsprimerne

Komponent	Volum/ reaksjon (μ l)	Volum til 9 + 1 reaksjoner (μ l)
Sekvenseringsprimer BRAF 600 eller Sekvenseringsprimer BRAF 464–469	0,8	8
PyroMark hybridiseringsbuffer	24,2	242
Totalt volum	25	250

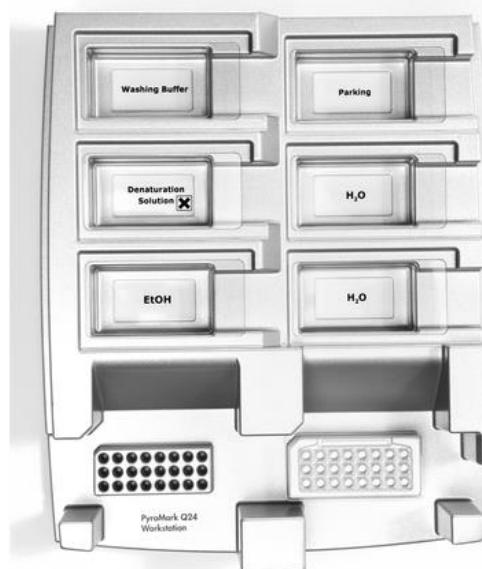
2. Tilsett 25 μ l fortytnet sekvenseringsprimer til hver brønn i PyroMark Q24-platen i henhold til analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).

Merk: En av PyroMark Q24 plateholderne (leveres med PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon) må holde romtemperatur (15–25 °C) og brukes som støtte ved klargjøring og flytting av platen.

3. Sett PCR-platen (eller remsene) fra protokoll 3 og PyroMark Q24-platen på arbeidsbenken (figur 3).

Inspiser PCR-platen og se til at Sepharose-mikropartiklene er i en løsning.

Merk: Se til at platen står i samme retning som da prøvene ble satt inn.



Figur 3. Plassering av PCR-plate (eller remser) og PyroMark Q24-plate på vakuumarbeidsstasjonen

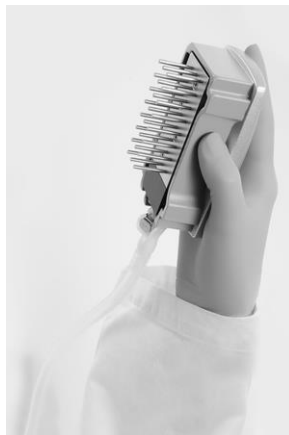
4. Sett vakuum på verktøyet ved å slå på vakuuet.

5. **Senk filterprobene til vakuumverktøyet forsiktig ned i PCR-platen (eller remsene) for å fange opp mikropartiklene som inneholder immobilisert templat. Hold probene på plass i 15 sekunder. Vær forsiktig når du henter opp vakuumverktøyet.**

Merk: Sepharose mikropartikler lager fort bunnfall. Hvis det er gått mer enn ett minutt siden platen (eller remsene) ble beveget opp og ned, bør dette gjøres på nytt i ett minutt før mikropartiklene hentes.

Inspiser PCR-platen for å kontrollere at vakuumverktøyet foretok fullstendig opptak av alle prøver.

6. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml med 70 % etanol (figur 3). Skyll filterprobene i 5 sekunder.**
7. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml med denatureringsløsning (figur 3). Skyll filterprobene i 5 sekunder.**
8. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 50 ml med vaskebuffer (figur 3). Skyll filterprobene i 10 sekunder.**
9. **Løft vakuumverktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 4).**



Figur 4. Illustrasjon av vakuumverktøyet som er løftet mer enn 90° vertikalt.

10. **Mens vakuumverktøyet holdes over PyroMark Q24-platen, skal vakuumbryteren på verktøyet slås av (Off).**
11. **Frigjør mikropartiklene i PyroMark Q24-platen ved å senke filterprobene i den fortynnede sekvenseringsprimeren og bevege verktøyet forsiktig frem og tilbake.**

Merk: Vær forsiktig så du ikke skader overflaten på PyroMark Q24-platen ved å ripe den med filterprobene.
12. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder vann med høy renhetsgrad (figur 3), og beveg verktøyet frem og tilbake i 10 sekunder.**
13. **Vask filterprobene ved å senke probene ned i vann med høy renhetsgrad (figur 3) og ved å tilføye vakuum. Skyll probene med 70 ml vann med høy renhetsgrad.**

14. **Løft vakuumverktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 4).**
15. **Slå av verktøyets vakuumbrytere (Off) og sett vakuumverktøyet i posisjon P (Parking).**
16. **Slå av vakuumpumpen.**

Merk: Mot slutten av en arbeidsdag må væskeavfall og resterende løsninger kastes, og PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjonen skal kontrolleres for støv og søl (se vedlegg B, side 50).

17. **Varm opp PyroMark Q24-platen med prøvene ved 80 °C i 2 minutter med forhåndsoppvarmet PyroMark Q24-plateholder.**
18. **Fjern PyroMark Q24-platen fra den varme plateholderen og sett den på en andre PyroMark Q24-plateholder, som ble holdt ved romtemperatur (15–25 °C), for å la prøvene avkjøles til romtemperatur i 10–15 minutter.**
19. **Fortsett med "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet", side 27.**

Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet

Denne protokollen beskriver prepareringen og innlastingen av PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-kassetten, og starting og ferdigstilling av en analyseserie på PyroMark Q24. En utførlig beskrivelse om analyseoppsett finner du i håndboken for PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

Viktige poeng før du starter

- Rapporten som inneholder informasjon før analyse, i menyen "Tools" (Verktøy) i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15), gir informasjon om hvor mye nukleotider, enzym og substratbuffer som er nødvendig for en bestemt analyseserie.

Dette må du gjøre før du starter:

- Slå på PyroMark Q24. Strømbryteren er plassert bak på instrumentet.

Prosedyre

1. Frysetørret enzym- og substratblanding skal oppløses i 620 µl vann hver (H₂O, følger med).
2. Bland ved å bevege flasken forsiktig rundt.

Merk: Ikke vorteks!

Merk: Hvis du vil være sikker på at blandingen er helt løst opp, kan du la den ligge i romtemperatur (15–25 °C) i 5–10 minutter. Pass på at løsningen ikke er grumset før du fyller PyroMark Q24-kassetten. Hvis reagensene ikke skal brukes med det samme, skal reagensflaskene settes på is[§] eller i et kjøleskap.

3. La reagensene og PyroMark Q24-kassetten oppnå romtemperatur (20–25 °C).
4. Plasser PyroMark Q24-kassetten med etiketten vendt mot deg.
5. Fyll PyroMark Q24-kassetten med korrekt mengde nukleotider, enzym og substratblandinger i samsvar med figur 5.

Kontroller at det ikke kommer luftbobler fra pipetten og over i kassetten.

[§] Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende HMS-datablad (MSDS) som leveres av leverandøren av produktet dersom du ønsker mer informasjon.



Figur 5. Illustrasjon av PyroMark Q24-kassetten sett ovenfra. Kommentarene svarer til etiketten på reagensflaskene. Tilsett enzymblanding (E), substratblanding (S) og nukleotider (A, T, C, G) i samsvar med det volumet som er angitt i rapporten som inneholder informasjon før analyse i menyen "Tools" (Verktøy) i analyseoppsettet.

6. **Åpne kassettopningen og sett inn den fylte reagenskassetten med etiketten vendt utover. Skyv kassetten helt inn og trykk den ned.**
7. **Pass på at linjen er synlig foran på kassetten, og lukk åpningen.**
8. **Åpne rammen som holder platen på plass, og plasser platen på varmeblokken.**
9. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
10. **Sett inn USB-enheten (som inneholder analysefilen) i USB-porten foran på instrumentet.**
Merk: USB-enheten må ikke fjernes før serien er fullført.
11. **Velg "Run" (Serie) i hovedmenyen (ved hjelp av skjermknappene \blacktriangle og \blacktriangledown) og trykk på "OK".**
12. **Velg seriefil ved hjelp av skjermknappene \blacktriangle og \blacktriangledown .**
Merk: Du kan se innholdet i en mappe ved å velge mappe og trykke på "Select" (Velg). Trykk på "Back" (Tilbake) for å gå tilbake til forrige visning.
13. **Når analysefilen er valgt, trykker du på "Select" (Velg) for å starte serien.**
14. **Når serien er fullført og instrumentet bekrefter at analysefilen er lagret på USB-enheten, trykker du på "Close" (Lukk).**
15. **Ta ut USB-enheten.**
16. **Åpne instrumentlokket.**
17. **Åpne kassettopningen og ta ut reagenskassetten ved å løfte den opp og dra den ut.**
18. **Lukk åpningen.**
19. **Åpne rammen som holder platen på plass, og ta ut platen fra varmeblokken.**
20. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
21. **Kast platen og rengjør kassetten i henhold til instruksjonene i produktarket som leveres med kassetten.**
22. **Analyser serien i henhold til "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 29.**

Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie

Denne protokollen beskriver mutasjonsanalysen til en fullført BRAF-serie med PyroMark Q24-programvaren.

Prosedyre

1. **Sett USB-enheten (som inneholder den behandlede seriefilen) inn i PC-ens USB-port.**
2. **Overfør seriefilen fra USB-enheten til ønsket plassering på data-maskinen ved hjelp av Windows Utforsker.**
3. **Åpne seriefilen i AQ-modus i PyroMark Q24-programvare ved å velge "Open" (Åpne) i menyen "File" (Fil) eller ved å dobbeltklikke på filen (👉) i snarveifunksjonen.**
4. **Det finnes to metoder for analysering. Gå til trinn 5 hvis du bruker BRAF plug-in-rapporten. Gå til trinn 6 hvis du bruker AQ-analyse integralt til PyroMark Q24-systemet.**

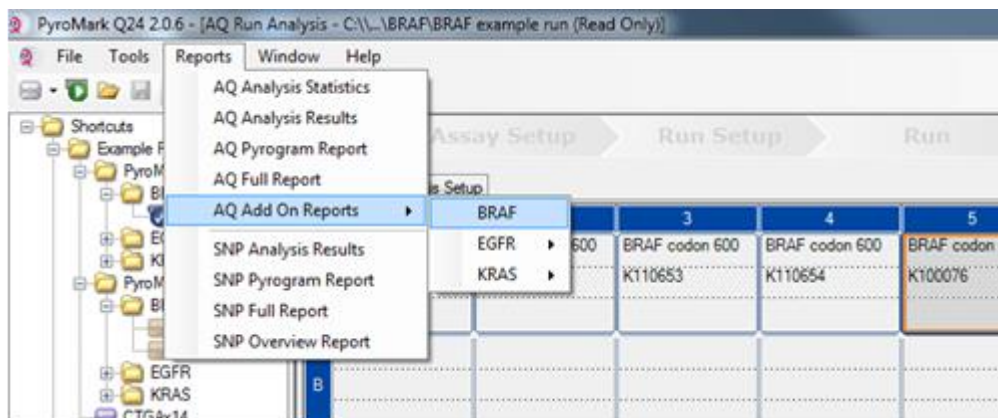
Merk: Vi anbefaler på det sterkeste at du bruker BRAF plug-in-rapporten for tolkning av resultatene. Du kan be om BRAF plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com. Denne rapporten sikrer at de respektive LOD-verdiene (Tabell 9) og ulike "Sequences to Analyze" (Analysesekvenser) brukes for å detektere alle mutasjoner automatisk.

Merk: De komplekse mutasjonene i BRAF-kodon 600 og 469 kan ikke analyseres ved bruk av AQ-analyse i PyroMark Q24-programvaren. Vi anbefaler bruk av BRAF plug-in-rapport for analyse av komplekse mutasjoner i kodon 600 og 469.

Merk: Noen berørte mutasjoner i kodon 600 samt mutasjon G469A og G469S vil kanskje ikke kunne skilles fra hverandre nøyaktig ved mutasjonsnivåer på under 10 %.

5. **Bruk av BRAF plug-in-rapport:**

Hvis du ønsker å opprette en rapport, velg "AQ Add On Reports/ BRAF" (AQ legge til rapporter / BRAF) fra "Reports" (Rapporter) i menyen (se figur 6).



Figur 6. Menyen BRAF plug-in-rapport.

Brønnene vil bli analysert automatisk for alle mutasjoner der LOD er angitt i Tabell 9. Resultatene vil bli presentert i en oversiktstabell (figur 7), etterfulgt av detaljerte resultater som f.eks. inneholder pyrogrammer og analysekvalitet.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Figur 7. BRAF plug-in-rapport.

6. Bruke AQ-analyse:

Klikk på en av analyseringsknappene for å analysere en serie og for å få en oversikt over resultatene.



Analysér alle brønner.



Analysér den valgte brønneren.

Analyseresultatene (allefrekvenser) og kvalitetsvurdering vises over den variable posisjonen i Pyrogram[®]-sporet. Du finner mer informasjon om hvordan du analyserer en serie i håndboken for PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. Du kan opprette en rapport ved å velge "AQ Full Report" (AQ fullstendig rapport) eller "AQ Analysis Results" (AQ analyseresultater) i menyen "Reports" (Rapporter).

Merk: For å få pålitelige resultater anbefaler vi enkelttopphøyder over 30 RLU. Angi 30 RLU som "required peak height for passed quality" (nødvendig topp for godkjent kvalitet) i analyseoppsettet (se vedlegg A og håndboken for PyroMark Q24).

Merk: AQ-analyseresultatrapporten bør brukes som dokumentasjon på og tolkning av allelkvantifisering. Tallene som vises i pyrogrammet er avrundet og viser ikke nøyaktig kvantifisering.

Merk: Pyrogrammet må alltid sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. De målte toppene skal stemmen overens med høydene på histogramsøylene.

Ny analyse av prøver der ingen GTG → GAG -mutasjon er påvist, eller som har kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes)

Den hyppigste mutasjonen i BRAF er GTG → GAG ved nukleotid 1799 (andre base for kodon 600). Derfor vil standarden "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), som er angitt i analyseoppsettet, rette seg mot denne mutasjonen (se "Vedlegg A: Oppsett av theascreen BRAF Pyro-analyser" på side 47).

Vi anbefaler på det sterkeste at du analyserer alle prøver der det ikke er påvist mutasjon, med standarden "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), i tillegg til prøver med kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) eller prøver med topper som ikke stemmer overens med høydene på histogramsøylene. Kvalitetsvurderingene "Check" (Kontroller) og "Failed" (Mislyktes) kan indikere en mutasjon som ikke berøres av standarden "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), noe som fører til avvik i topphøyde.

Mutasjoner ved nukleotid 1798 eller 1799 for kodon 600 kan analyseres på nytt eller spores ved å gå til "Analysis Setup" (Analyseoppsett) og endre "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) til en av de ytterligere "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) oppført i "Vedlegg A: Oppsett av theascreen BRAF Pyro-analyser" på side 47. Klikk på "Apply" (Bruk) og deretter på "To All" (på alle) når vinduet "Apply Analysis Setup" (Bruk analyseoppsett) vises.

Oppdaterte mutasjonsfrekvenser i humant BRAF-gen i kodon 600 og kodon 464-469 er tilgjengelig elektronisk fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Merk: Etter at du har endret "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), må du se til at terskelen for enkelttopphøyder er angitt til 30 RLU.

Merk: Flere sjeldne eller uventede mutasjoner kan være til stede i det sekvenserte området og kan analyseres ved bruk av alternativet "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) med vurdering av uventede mutasjoner.

Merk: Hvis de målte toppene ikke stemmer overens med høydene på histogram søylene og ikke kan forklares av sjeldne eller uventede mutasjoner, er det anbefalt å kjøre prøven på nytt.

Tolkning av resultater

Tolkning av analyseresultater og deteksjon av mutasjoner med lavt nivå

Det anbefales på det sterkeste å ta med umetylert kontroll-DNA i hver analyse-serie av sammenligningsårsaker og som en kontroll av bakgrunnsnivåer. Kontrollprøvenes målte frekvens skal være mindre enn eller lik blank grense (LOB).

Alle prøver skal undersøkes i forhold til deteksjonsgrensen (LOD, Tabell 9) og tolkes på følgende måte:

- Mutasjonsfrekvens $< \text{LOD}$: Ingen mutasjon Ikke påvist
- Mutasjonsfrekvens $\geq \text{LOD}$ og $\leq \text{LOD} + 3\%$ enheter: Potensiell mutasjon med lavt nivå

Merk: Hvis du bruker BRAF plug-in-rapporten (se trinn 5 i "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 27) og dette skjer, vil et varsel bli vist.

Prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå skal bare betraktes som positive for mutasjonen hvis dette bekrefte ved å kjøre dem på nytt i duplikat sammen med en prøve med umetylert kontroll-DNA. Resultatet for begge duplikatene skal være $\geq \text{LOD}$ og forskjellig fra kontrollprøven. Hvis ikke, skal prøven anses som "No mutation detected" (Ingen mutasjon påvist).

- Mutasjonsfrekvens $> \text{LOD} + 3\%$ enheter: Mutasjon

Hvis du bruker BRAF plug-in-rapporten, blir dette gjort automatisk.

Merk: Det anbefales å bruke BRAF plug-in-rapporten for tolkning av resultatene. For en nærmere undersøkelse av prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå, anbefaler vi å tillegg analysere prøven manuelt i den bruker-orienterte programvaren (f.eks. for å sammenligne med kontrollprøvens mutasjonsfrekvens).

Merk: Noen berørte mutasjoner i kodon 600 samt mutasjon G469A og G469S vil kanskje ikke kunne skilles fra hverandre nøyaktig ved mutasjonsnivåer på under 10 %.

Merk: En målt frekvens over LOB i kontrollprøven indikerer et høyere bakgrunnsnivå enn vanlig i den respektive serien, som kan påvirke allelkvantifisering, særlig for lave mutasjonsnivåer. I dette tilfellet danner ikke målte frekvenser i området fra LOD (Tabell 9) til LOD + 3 % enheter grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus. Det anbefales å kjøre prøver med en potensiell mutasjon med lavt nivå på nytt.

Merk: En behandlingsbeslutning for kreftpasienter må ikke bare baseres på BRAF mutasjonsstatus.

Tabell 9. LOB og LOD bestemt for spesifikke mutasjoner

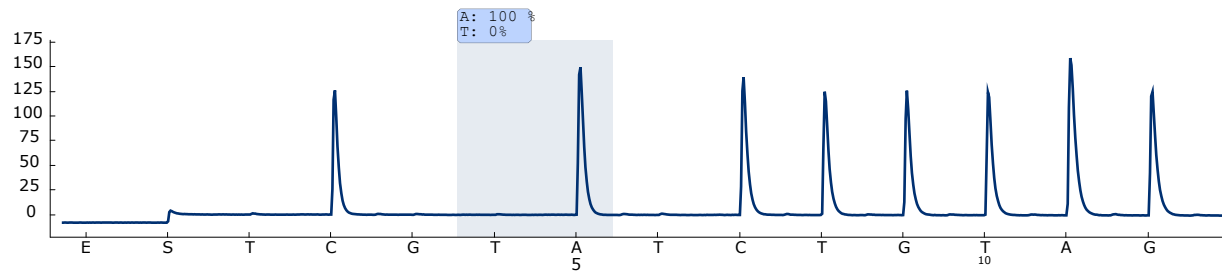
Nukleinsyre- substitusjon	Aminosyre- substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V46)
Kodon 600 (GTG), analysert i nedstrøms retning (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600E- kompleks	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Kodon 469 (GGA), analysert i nedstrøms retning (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Kodon 466 (GGA), analysert i nedstrøms retning (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Kodon 464 (GGA), analysert i nedstrøms retning (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

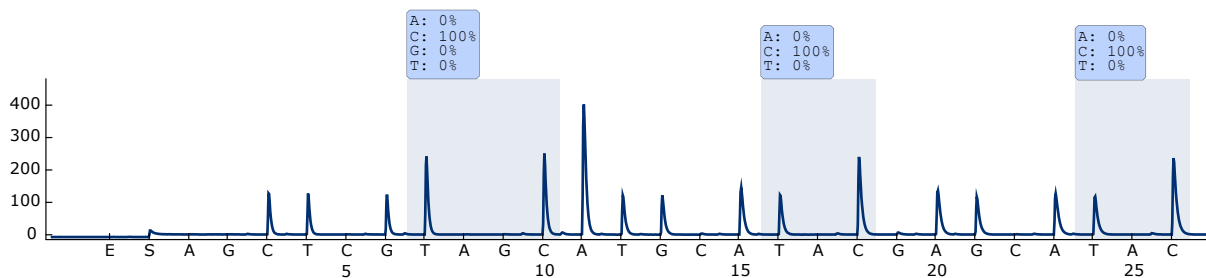
[†] Laveste mutasjonsnivå i en prøve som fører til en målt frekvens \geq LOD.

Representative resultater

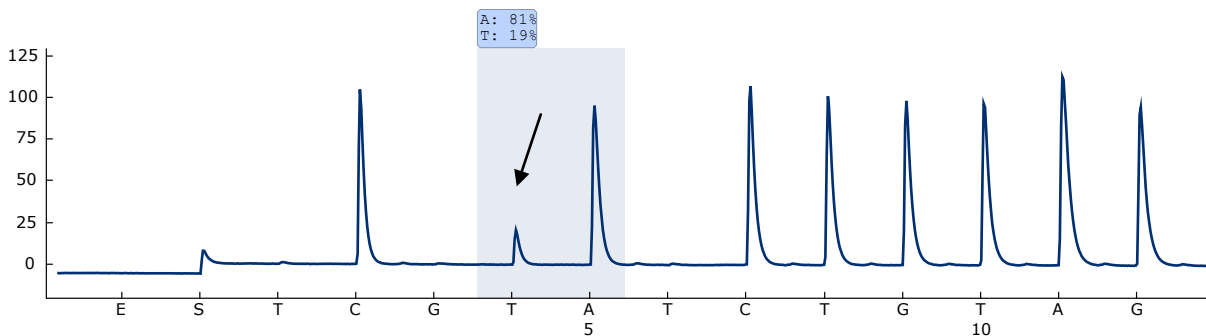
Representative Pyrogram-resultater er vist i figur 8-10.



Figur 8. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i kodon 600 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CWCTGTAGC.



Figur 9. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en normal genotype i kodon 464–469 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA.



Figur 10. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av prøver med en GTG → GAG-mutasjon (V600E) i base 2 i kodon 600 (nukleotid 1799, angitt med en pil) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CWCTGTAGC.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske avdelinger er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Merk: Se i håndboken til PyroMark Q24 for generell feilsøking i instrumentet.

Kommentarer og forslag

Signaler i ikke-templat-kontrollen (negativ kontroll)

- | | |
|-----------------------------|---|
| a) Krysstale mellom brønner | Signal fra én brønn er påvist i en brønn ved siden av. Unngå å plassere prøver med høy signalintensitet ved siden av brønner med ikke-templat-kontroll. |
| b) PCR-kontaminering | Bruk sterile pipettespisser med filter. Oppbevar og ekstraher materialer som prøver, kontroller og amplikoner separat fra PCR-reagenser. |

Dårlig eller uventet sekvens

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) Genomisk DNA med dårlig kvalitet | Genomisk DNA med dårlig kvalitet kan føre til at PCR mislykkes. Analyser PCR-prøver ved å bruke en elektroforetisk teknikk (for eksempel QIAxcel [®] Advanced-system eller agarosegelelektroforese). |
|-------------------------------------|---|

Kommentarer og forslag

Resultatet "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes)

- a) Lav topphøyde
- Håndteringsfeil i PCR-oppsettet eller prøveklargjøring før pyrosekvensering kan føre til lave topper.
- Det er viktig at prøvene fullstendig tatt opp av vakuumpverktøyet. Sørg for at vakuumpverktøyet senkes sakte ned til prøvene og at geometrien til PCR-platen eller remsene brukt til immobilisering tillater fullstendig opptak av prøvene.
- Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 regelmessig og bytt filterprober når dette angis.
- Hvis advarselen "Check" (Kontroller) kommer opp, må du sammenligne pyrogrammet nøye med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. Hvis de målte toppene stemmer overens med høydene på histogram søylene, er resultatet gyldig. Hvis ikke, anbefales det å kjøre prøven på nytt.
- b) Mutasjon ikke angitt i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens)
- Juster analysesekvensen i analyseoppsettet (se "Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* BRAF Pyro-analyser" på side 47), og analyser serien på nytt.
- c) Uventet sjelden mutasjon
- Kvalitetsvurderinger som "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) kan forårsakes med et uventet mønster av topper. Dette kan indikere en uventet mutasjon, noe som ikke analyseres av den gitte "Sequence to Analyze" (Analysesekvens). Disse prøvene bør analyseres ved hjelp av alternativet "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) med vurdering av uventede mutasjoner.
- d) Advarsel om avvik for høy topphøyde for en fordeling
- Pyrogrammet må sammenlignes nøye med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. Hvis de målte toppene ikke stemmer overens med høydene på histogram søylene og ikke kan forklares av sjeldne mutasjoner, er det anbefalt å kjøre prøven på nytt.

Kommentarer og forslag

- e) Advarselen "High peak height deviation" (Avvik for høy topphøyde) for fordeling 6 med analysen for kodon 600 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CAYCTGTAGC
Pyrogrammet må sammenlignes nøye med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. Når bakgrunnsstøy ved fordeling T6 er under forventet nivå, og de resterende målte toppene stemmer overens med høyden på histogramsøylene, kan advarselen og kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) ses bort ifra.
- f) Advarselen "High peak height deviation" (Avvik for høy topphøyde) for fordeling 3 eller 4 med analysen for kodon 600 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CVCTGTAGC
Pyrogrammet må sammenlignes nøye med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. Når bakgrunnsstøy ved fordeling G3 eller T4 er under forventet nivå, og de resterende målte toppene stemmer overens med høyden på histogramsøylene, kan advarselen og kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) ses bort ifra.
- g) Advarselen "The sequence contains less reference peaks than required" (Sekvensen inneholder færre referansetopper enn det som kreves) vises i analysen for kodon 600 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CVCTGTAGC
Hvis de målte toppene stemmer overens med høydene på histogramsøylene, kan du se bort fra advarselen og kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller).

Høy bakgrunn

- a) Feil oppbevaring av nukleotider
Nukleotider skal oppbevares ved 2–8 °C. Oppbevaring ved –15 til –25 °C kan forårsake en økning i bakgrunnen.
- b) Kort tid for nedkjøling av prøver før pyro-sekvenseringsanalyse.
Prøvene på en PyroMark Q24-plateholder må holde romtemperatur i 10–15 minutter. Ikke kort ned tiden for nedkjøling.

Kommentarer og forslag

- | | |
|----------------------------|--|
| c) Kontaminering av kasset | Rengjør kassetten grundig som beskrevet i produktarket. Beskytt kassetten mot lys og støv under oppbevaring. |
|----------------------------|--|

Ingen signaler i positive kontroller (umetylert kontroll-DNA)

- | | |
|---|--|
| a) Utilstrekkelig enzym eller substratblanding for alle brønner | Pass på å fylle PyroMark Q24-kassetten i henhold til "Pre Run Information" (Informasjon før analyse) i menyen "Tools" (Verktøy). |
| b) Feil oppbevaring eller fortynning av reagenser | Klargjør <i>therascreen</i> -reagenser i henhold til instruksjonene under "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 27. |
| c) Feil i PCR eller prøveklargjøring | Håndteringsfeil i PCR-oppsettet, programmering av PCR-syklere eller prøveklargjøring før pyrosekvenseringsanalyse kan føre til mangel på signaler. Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 og bytt filterprober ved behov. Gjenta PCR-en og pyrosekvenseringsanalysen. |

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *therascreen* BRAF Pyro-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske eller laboratoriske funn.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse til andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGEN ytelsesevalueringstudier.

Ytelseskarakteristikk

Blank grense og deteksjonsgrense

Blank grense (LOB) og deteksjonsgrense (LOD) er bestemt for et antall mutasjoner ved hjelp av plasmidblandinger (tabell 10). LOB og LOD ble bestemt i henhold til anbefalinger fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protokoller for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer). α - og β -feil (henholdsvis falske positive og falske negative) ble satt til 5 %. LOB-verdier representerer den målte frekvensen som ble oppnådd med en villtypeprøve. LOD-verdier representerer det laveste signalet (målt frekvens) som kan betraktes som positivt for den aktuelle mutasjonen.

Mutasjon (GTG \rightarrow GGG) og (GTG \rightarrow GCG) i kodon 600 og (GGA \rightarrow GAA) i kodon 464

Når det gjaldt disse mutasjonene var enten blanke målinger konsekvent nær 0 % enheter ($n = 72$), som resulterte i en fordeling som ikke fulgte Gauss-kurven, eller målinger av prøver med lave mutasjonsnivåer hadde en fordeling som ikke fulgte Gauss-kurven. LOD ble derfor bestemt ved bruk av en annen metode, i henhold til anbefalingene i CLSI Guideline EP17-A. Det laveste signalet som angir tilstedeværelse av en mutasjon (LOD) i disse posisjonene, ble satt til 2 % enheter over det aktuelle baselinenivået som var definert av 95-persentilen for blanke målinger. Ved analysing av en prøve med mutasjonsnivået angitt i parenteser i tabell 10, avga 95 % av resultatene ($n = 72$) et signal som kan regnes som positivt (\geq LOD).

Tabell 10. LOB og LOD bestemt for spesifikke mutasjoner

Nukleinsyre- substitusjon	Aminosyre- substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V46)
Kodon 600 (GTG), analysert i nedstrøms retning (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600E- kompleks	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Kodon 469 (GGA), analysert i nedstrøms retning (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Kodon 466 (GGA), analysert i nedstrøms retning (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Kodon 464 (GGA), analysert i nedstrøms retning (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Laveste mutasjonsnivå i en prøve som fører til en målt frekvens \geq LOD.

Merk: Disse verdiene er basert på serier der plasmidblandinger som bærer villtypen eller respektive muterte sekvens ble brukt som templat for PCR-amplifikasjon.

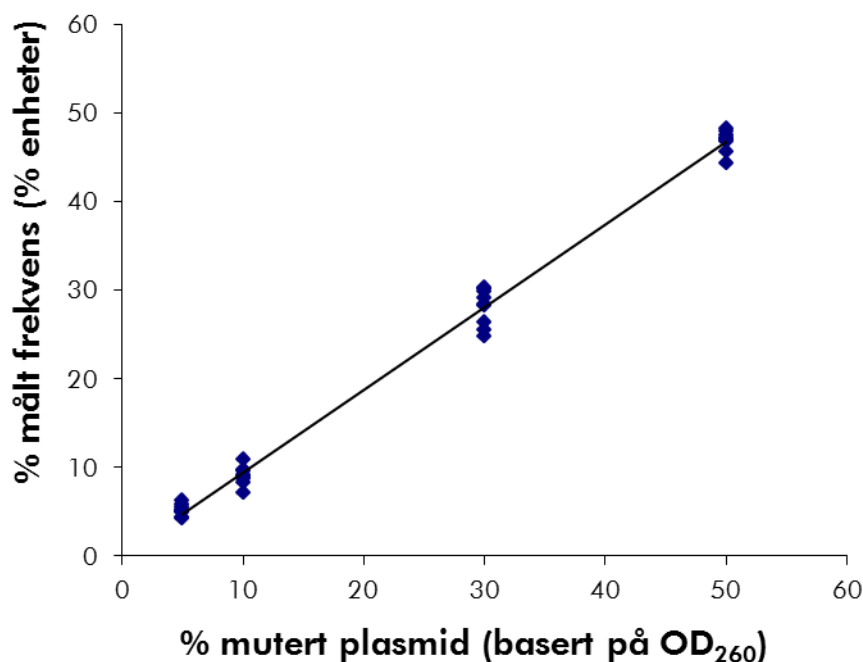
Merk: Det er anbefalt at metodeytelsen bekreftes i laboratoriet.

Linearitet

Linearitet ble bestemt ved å bruke plasmidblandinger som bar villtypen eller den muterte sekvensen for mutasjonen V600E (GTG → GAG) i kodon 600 i BRAF-genet. Plasmidene ble blandet i riktig forhold for å gi fire mutasjonsnivåer (5, 10, 30 og 50 %). Hver blanding ble analysert med tre forskjellige partier av *therascreen* BRAF Pyro-settet i tre pyrosekvenseringsserier med tre replikater hver.

Resultatene (n = 9 for hvert mutasjonsnivå) ble analysert i henhold til CLSI Guideline EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Evaluering av linearitet til kvantitative måleprosedyrer: En statistisk fremgangsmåte. Godkjente retningslinjer) ved å bruke Analyse-it[®]-programvaren v2.21 og vises i figur 11 for mutasjonen V600E (GTG → GAG) i kodon 600.

Resultatene var lineære innen en tillatt ikke-linearitet på 5 % enheter i det testede området på 5 til 50 % mutasjonsnivå.



Figur 11. Linearitet for mutasjonen V600E (GTG → GAG) i kodon 600

Presisjon

Presisjonsdataene gjør det mulig å bestemme analysenes totale variasjon og ble oppnådd på tre forskjellige nivåer ved å analysere de ovennevnte plasmidblandinger med tre replikater hver.

Repeterbarhet (variasjon for intra-analyse og mellom-batch) ble beregnet basert på dataene for bestemmelse av linearitet (tre serier på samme dag ved å bruke vekslende partier av *therascreen* BRAF Pyro-settet). Intermediær presisjon (intra-laboratoriumvariasjon) ble bestemt i tre serier i ett laboratorium på tre forskjellige dager med vekslende brukere, PyroMark Q24-systemer og partier av *therascreen* BRAF Pyro-settet. Reproduserbarhet (variasjon for mellom-laboratorium) ble beregnet fra to serier hver i et internt og eksternt laboratorium og ved å bruke vekslende partier av *therascreen* BRAF Pyro-settet.

Presisjonsestimater uttrykkes som standardavvik for de målte mutasjonsfrekvensene i % enheter (tabell 11). Repeterbarheten, den intermediære presisjonen og reproduserbarheten for mutasjonen V600E (GTG → GAG) i kodon 600 var henholdsvis 0,6–2,1, 0,7–1,8 og 0,8–2,1 % enheter i det målte området på 5 til 50 % mutasjonsnivå.

Tabell 11. Presisjon for mutasjonen V600E (GTG → GAG) i kodon 600*

% mutert plasmid [†]	Repeterbarhet		Intermediær presisjon		Reproduserbarhet	
	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA
5	5,2	0,6	4,4	0,7	5,1	0,8
10	9,1	1,0	9,6	1,0	9,6	1,3
30	28,1	2,1	27,9	1,8	28,3	2,1
50	46,9	1,2	46,3	1,5	47,9	1,7

* Alle verdier er angitt som % enheter. SA: standardavvik (n = 9).

[†] Basert på OD₂₆₀-måling.

Diagnostisk vurdering

therascreen BRAF Pyro-settet ble vurdert til sammenligning med Sanger-sekvensering. DNA ble ekstrahert fra 100 formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) tumorprøver fra hud og analysert for mutasjoner i kodon 600 og kodon 464–469.

DNA ble isolert ved å bruke QIAamp DNA FFPE Tissue-settet.

Pyrosekvenseringsanalyse ble utført med *therascreen* BRAF Pyro-settet på PyroMark Q24-systemet og Sanger-sekvensering på ABI™ 3130-genanalyseapparat.

Blant 100 prøver som ble analysert, kunne mutasjonsstatus for kodon 600 og kodon 464–469 bestemmes i alle og 99 prøver med henholdsvis Sanger-sekvensering og *therascreen* BRAF Pyro-settet (tabell 12 og tabell 13).

I fire av de 100 prøvene ble en V600E (GTG → GAG)-mutasjon påvist med Sanger-sekvensering. Tre av disse prøvene hadde identiske resultater med *therascreen* BRAF Pyro-settet, mens én prøve ikke ble godkjent i pyro-sekvenseringsanalyse for kodon 600 på grunn av lave topper. I analysen for kodon 464–469 hadde denne prøven tilstrekkelige, men betraktelig lavere topper enn andre prøver, som indikerte at DNA-et var av dårlig kvalitet. Ingen av de sjeldne mutasjonene i kodon 464–469 ble påvist av begge metodene.

Med unntak av prøven som ikke ble godkjent i én metode, viste *therascreen* BRAF Pyro-settet og Sanger-sekvenseringen 100 % overensstemmelse i resultater for både kodon 600 og kodon 464–469 (tabell 12 og 13).

Tabell 12. Resultater for de analyserte prøvene av hudtumor for kodon 600

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> BRAF Pyro- sett	Mutant	3	0	0	3
	Villtype	0	96	0	96
	Ukjent	1	0	0	1
	Totalt	4	96	0	100

Tabell 13. Resultater for de analyserte prøvene av hudtumor for kodon 464–469

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> BRAF Pyro- sett	Mutant	0	0	0	0
	Villtype	0	99	0	99
	Ukjent	0	1	0	1
	Totalt	0	99	0	100

Merk: I alle serier brukt til å bestemme ytelseskaraktistikker, ble signalet på over 30 RLU rutinemessig oppnådd fra 10 ng av DNA isolert fra formalinfiksert, parafinlagret (FFPE) vev. Pyrosekvenseringsdataene ble analysert ved å bruke BRAF plug-in-rapporten.

Referanser

QIAGEN opprettholder en stor, oppdatert elektronisk database med vitenskapelige publikasjoner som omhandler bruk av QIAGEN-produkter. Omfattende søkealternativer gjør at du kan finne de artiklene du har behov for, enten med et enkelt nøkkelordsøk eller ved å spesifisere applikasjonen, forskningsområdet, tittelen osv.

Du finner en fullstendig liste over referanser i QIAGENS referansedatabase på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller ved å ta kontakt med QIAGENS tekniske avdelinger eller den lokale distributøren.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester

<N>



Skal brukes innen



Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer (lot)



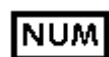
Materialnummer



Komponenter



Innhold



Nummer



Natriumhydroksyd



Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensninger



Produsent



Se informasjonen i håndboken

Kontaktinformasjon

Hvis du ønsker teknisk assistanse eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support eller ringe en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå inn på www.qiagen.com).

Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* BRAF Pyro-analyser

Hvis BRAF plug-in-rapporten er installert, er forhåndsdefinerte analyseoppsett for kodon 600 og 464–469 tilgjengelige i PyroMark Q24-programvarens snarveifunksjon under banen "Example Files/PyroMark Setups/BRAF" (Eksempelfiler/PyroMark-oppsett/BRAF). Følgende trinn trenger ikke utføres: Du kan be om BRAF plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com.

Vi anbefaler på det sterkeste å bruke BRAF plug-in-rapporten fremfor manuell analyse. Komplekse mutasjoner kan ikke legges til manuelt til en "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), men må analyseres ved hjelp av plug-in-rapporten. Etter installeringen av plug-in-rapporten eller hver gang en ny programvare installeres eller oppgraderes på datamaskinen, bør plug-in-funksjonene testes slik det er beskrevet i hurtigveiledningen for BRAF plug-in.

Hvis BRAF plug-in-rapporten ikke er installert, må analysefilen angis manuelt før *therascreen* BRAF Pyro-analysen kjøres første gang. Angi analyse for BRAF-kodon 600 og kodon 464–469 med PyroMark Q24-programvaren som beskrevet nedenfor.

Prosedyre

BRAF-kodon 600

A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).

A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze"

(Analysesekvens):

CWCTGTAGC

Merk: Den hyppigste mutasjonen i kodon 600 er en GTG → GAG-mutasjon ved nukleotid 1799 (andre posisjon).

"Sequence to Analyze" (Analysesekvens) kan også endres etter analysen for å analysere mutasjoner ved ulike posisjoner.

Hvis du vil kontrollere om mutasjoner er til stede i nukleotid 1798 (første posisjon), kan du endre "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) til følgende sekvens:

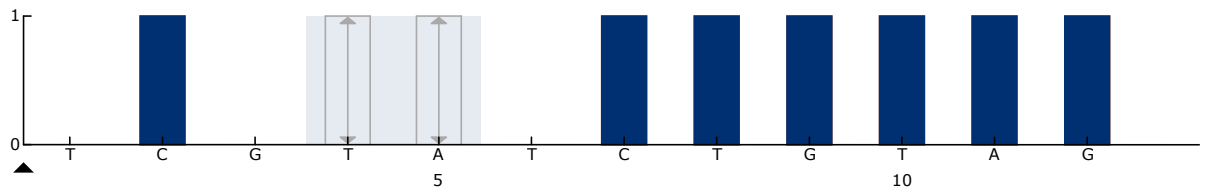
CAYTGTAGC

Dersom du ønsker å kontrollere for ytterligere sjeldne mutasjoner i nukleotid 1799, bør "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) **CVCTGTAGC** også analyseres.

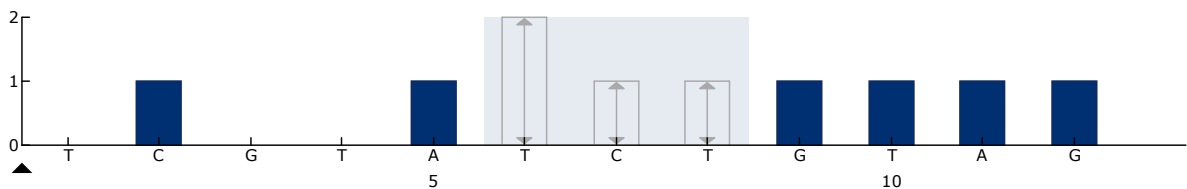
Merk: Se til at terskelen for enkelttopphøyder er angitt til 30 RLU.

Merk: De komplekse mutasjonene i BRAF-kodon 600 kan ikke analyseres med "Sequence to analyze" (Analysesekvens) ved bruk av AQ-analyse i PyroMark Q24-programvaren. Vi anbefaler bruk av BRAF plug-in-rapport for analyse av komplekse mutasjoner i kodon 600.

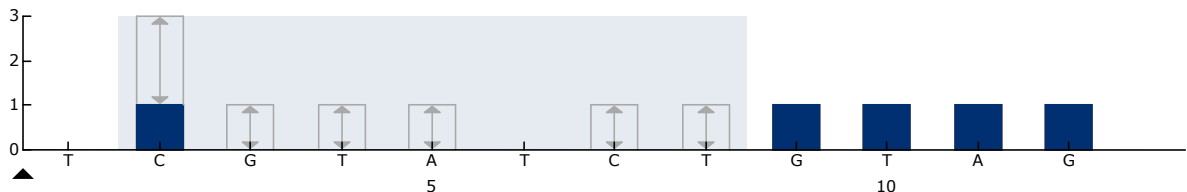
A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):
TCGTATCTGTAG



Figur 12. Histogram for kodon 600 (nukleotid 1799) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CWCTGTAGC.



Figur 13. Histogram for kodon 600 (nukleotid 1798) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CAYTGTAGC.



Figur 14. Histogram for kodon 600 (nukleotid 1799) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CVCTGTAGC.

A4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Topp høydeterskel – Nødvendig topphøyde for godkjent kvalitet) til 30.

A5. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "BRAFCodon 600" (BRAFCodon 600).

BRAF-kodon 464–469

A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).

A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze"

(Analysesekvens):

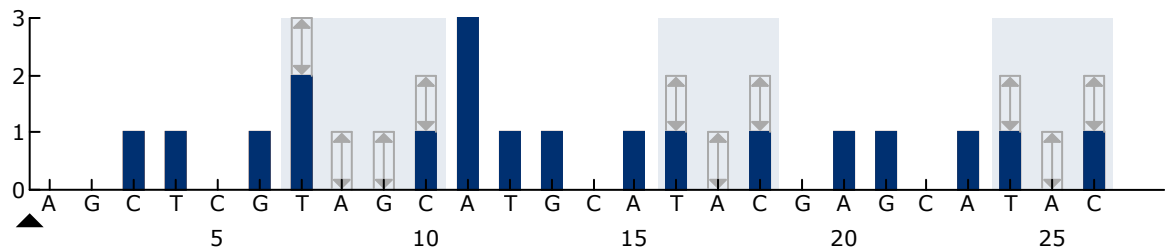
CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

Merk: Den komplekse mutasjonen i BRAF-kodon 469 kan ikke analyseres med "Sequence to analyze" (Analysesekvens). ved bruk av AQ-analyse i PyroMark Q24-programvaren. Vi anbefaler bruk av BRAF plug-in-rapport for analyse av kompleks mutasjon i kodon 469.

A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order"

(Fordelingsrekkefølge):

AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAAC




Figur 15. Histogram for kodon 464–469 (nukleotid 1391 [kodon 464], 1397 [kodon 466] og 1406 [kodon 469]).

A4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Toppghøydeterskel – Nødvendig topphøyde for godkjent kvalitet) til 30.

A5. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "BRAFCodons 464–469" (BRAF-kodon 464–469).

Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar

ADVARSEL 	Farlige kjemikalier Denatureringsløsningen som brukes med vakuumarbeidsstasjonen inneholder natriumhydroksid som kan irritere øyne og hud. Vernebriller, beskyttelseshansker og laboratoriefrakk må alltid benyttes. Ansvarshavende (f.eks. laboratoriesjef) må ta nødvendige forholdsregler for å sikre at arbeidsområdet er trygt og at brukerne av instrumentene ikke utsettes for farlige nivåer av giftige substanser (kjemiske eller biologiske) slik det er angitt i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (SDS) eller OSHA [*] -, ACGIH [†] - eller COSHH [‡] -dokumentene. Luftesystemer for avgasser og avfallssystemer må være i samsvar med alle nasjonale, regionale og lokale lover og helse- og sikkerhetsregler.
--	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

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

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

Statlige og lokale miljøkrav til håndtering av laboratorieavfall må overholdes.

Viktige poeng før du starter

- Denne protokollen krever vann med høy renhetsgrad.

Prosedyre

- B1. Se til at vakuumverktøyet ikke mottar noe vakuum. Pass på at vakuumet er stengt av (Off) og at vakuumpumpen er slått av.**
- B2. Resterende løsninger som er igjen i karene skal kastes.**
- B3. Skyll karene med vann med høy renhetsgrad, eller bytt dem ut om nødvendig.**
- B4. Tøm avfallsbeholderen.**
Merk: Korken kan fjernes uten at slangene må kobles fra.
- B5. Hvis vakuumarbeidsstasjonen må rengjøres (for eksempel pga. støv eller søl), må du følge instruksjonene angitt i håndboken for PyroMark Q24.**

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	For 24 reaksjoner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenseringsprimere, PCR-primere, umetylert kontroll-DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-konsentrat, PyroMark-bindingsbuffer, PyroMark-hybridiseringsbuffer, PyroMark-denatureringsløsning, PyroMark-vaskebuffer, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP og H ₂ O	971470
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Brukerorientert programvare	9019063
PyroMark Q24 Software	Analyseprogramvare	9019062
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-brønners reaksjonsplate til sekvensering	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter til pipettering av nukleotider og reagenser	979302

* Kun Storbritannia

† Alle andre land

Produkt	Innhold	Katalognr.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Filterprober til flergangsbruk for PyroMark vakuumarbeidsstasjon Q96 og Q24	979010
PyroMark Control Oligo	For installasjonskontroll av systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	For bekreftelse av systemytelse	979304
Tilknyttede produkter		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute [®] -kolonner, Proteinase K, buffere, prøverør (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Til 48 klargjøringer: Reagenskassetter (vev), filterspisser til engangsbruk, spissholdere til engangsbruk, prøverør (2 ml), elusjonsrør (1,5 ml), buffer G2, proteinase K	953034

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasingelser, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-settet er tilgjengelig på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

Varemerker: QIAGEN[®], QIAamp[®], QIAxcel[®], BioRobot[®], CoralLoad[®], EZ1[®], HotStarTaq[®], MinElute[®], Pyro[®], Pyrogram[®], PyroMark[®], Pyrosequencing[®], *therascreen*[®] (QIAGEN Group); ABI[™] (Life Technologies); Analyse-it[®] (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q[®] (Millipore Corporation); Sepharose[®] (GE Healthcare); Variomag (Florida Scientific Services, Inc.); Windows[®] (Microsoft Corporation).

Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet skal ikke anses som ikke-beskyttet ved lov selv når de ikke er spesielt merket som sådan.

Ansvarsfraskrivelse

Skal ikke brukes til å bestemme risiko for utvikling av endometriose.

Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av *therascreen* BRAF Pyro-settet samtykker i følgende vilkår:

1. *therascreen* BRAF Pyro-settet kan bare brukes i samsvar med *håndboken for theascreen BRAF Pyro-sett* og bare til bruk med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkluderte i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i *håndboken for theascreen BRAF Pyro-sett* og flere protokoller som nå finnes på www.qiagen.com.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN. Med enerett.

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

