

Håndbok for *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]-sett



Versjon 1

IVD

Til bruk i in vitro-diagnostikk



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2 **MAT** 1075556NO



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	5
Sammendrag og forklaring	5
Prosedyreprinsipp	7
Kontroller	8
Medfølgende materiale	9
Settets innhold	9
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	10
Advarsler og forholdsregler	13
Sikkerhetsinformasjon	13
Generelle forholdsregler	13
Oppbevaring og håndtering av reagenser	14
Oppbevaring og håndtering av prøver	14
Prosedyre	14
Isolering av DNA	14
Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet	16
Protokoll 2: PCR ved bruk av PCR-reagenser som leveres sammen med <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-settet	19
Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler	22
Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24	24
Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet	28
Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie	30
Tolkning av resultater	34
Tolkning av analyseresultater og deteksjon av mutasjoner med lavt nivå	34
Feilsøkingsveiledning	38
Kvalitetskontroll	41
Begrensninger	41
Ytelseskarakteristikker	41
Blank grense og deteksjonsgrense	41

Linearitet	43
Presisjon	44
Diagnostisk vurdering	45
Referanser	47
Symboler	48
Kontaktinformasjon	48
Vedlegg A: Oppsett av <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-analyser	49
Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar	52
Bestillingsinformasjon	53

Tiltenkt bruk

therascreen GIST RapidScreen Pyro-settet er en nukleinsyretest til in vitro-diagnostisk bruk basert på sekvensdetektering og Pyrosequencing®-teknologi for kvantitativ påvisning av mutasjoner i ekson 9 i humant *KIT*-gen og ekson 18 i humant *PDGFRA*-gen i genomisk DNA som stammer fra human vevsprøve.

therascreen GIST RapidScreen Pyro-settet brukes for å gi leger informasjon som skal hjelpe dem med å håndtere pasienter diagnostisert med gastrointestinal stromal tumor (GIST) som har best utbytte av legemidler rettet mot signalveiene, for eksempel imatinib. 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-vakuumarbeidsstasjonen og PyroMark Q24 MDx-vakuumarbeidsstasjonen.
- PyroMark Q24-programvaren (versjon 2.0) og PyroMark Q24 MDx-programvaren (versjon 2.0).

Dette produktet skal brukes av fagpersoner, for eksempel teknikere og fysikere som har fått opplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer, molekylær-biologiske teknikker og PyroMark Q24-systemet.

Dette produktet skal ikke brukes til prøver fra lungevev.

Sammendrag og forklaring

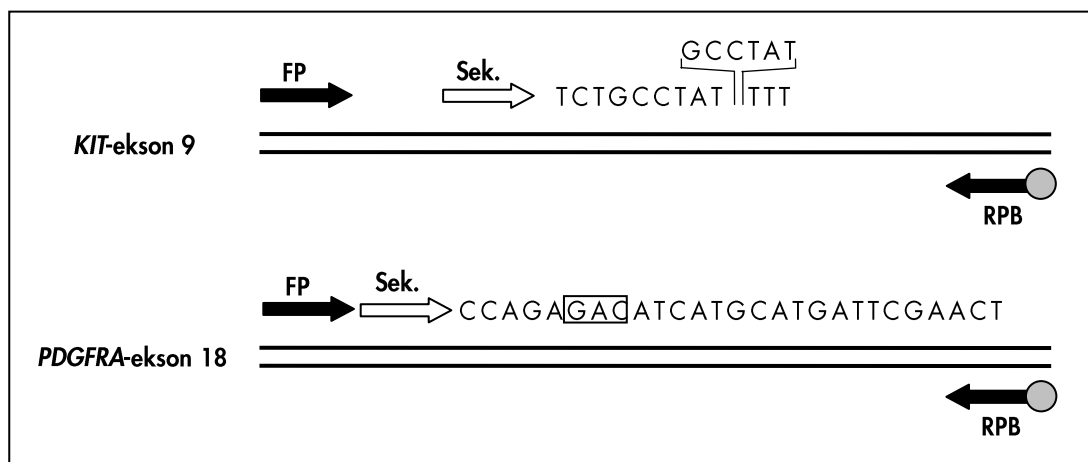
therascreen GIST RapidScreen Pyro-settet brukes til kvantitative målinger av mutasjoner i *KIT*-ekson 9 og *PDGFRA*-ekson 18 (se figur 1). Påvisning av mutasjoner i *KIT*-ekson 9 gjør det mulig å bruke en tilpasset dose imatinib, og påvisning av mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18 bidrar til å ekskludere mindre sensitive eller resistente genotyper (1–3).

KIT-ekson 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
PDGFRA-ekson 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

Figur 1. Den genomiske konteksten til de sekvenserte områdene av de humane *KIT*- og *PDGFRA*-genene (Ensembl-ID-er: ENSG00000157404 og ENSG00000134853). Kodon 503 i *KIT*-genet og kodon 842 i *PDGFRA*-genet angis med firkanter.

Settet består av to analyser: én for påvisning av mutasjoner i *KIT*-ekson 9 og én for påvisning av mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18 (se 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.

Merk: Begge analyser sekvenseres oppstrøms.



Figur 2. Illustrasjon av *KIT*/*PDGFRA*-analyser. Angitt sekvens er en analysert sekvens for en villtypeprøve. Posisjonen og sekvensen til 6 bp-duplikasjonen i *KIT*-ekson 9 er angitt. Firkanten angir kodon 842 i *PDGFRA*-ekson 18. **FP:** Oppstrøms PCR-primere; **RPB:** Nedstrøms PCR-primere (B indikerer biotinylering); **Sek.:** Sekvenseringsprimere.

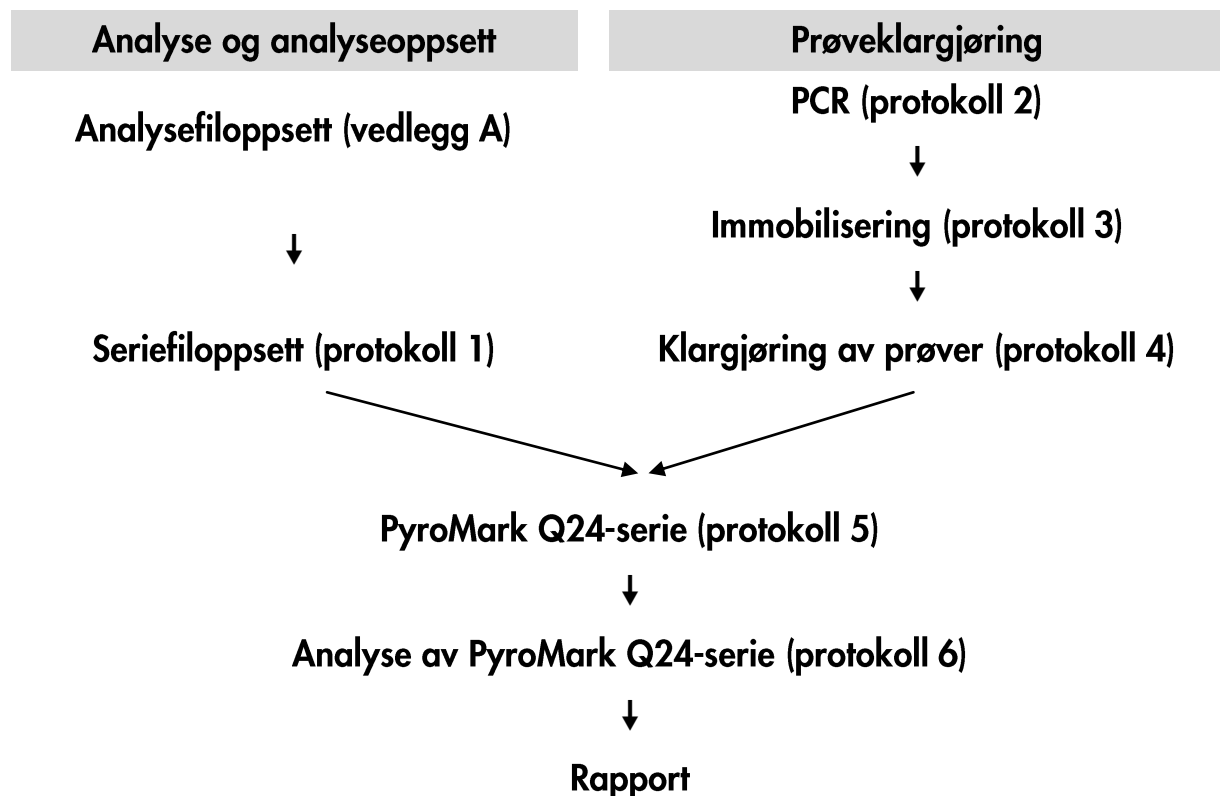
Produktet består av en PCR-primerblanding og en sekvenseringsprimer for hver analyse. Primerne leveres i en løsning. Hver flaske inneholder 32 µl av hver primer eller primerblanding.

Prosedyreprinsipp

Arbeidsgangen illustrerer analyseprosedyren. Etter PCR med primere som er rettet mot *KIT*-ekson 9 og *PDGFRA*-ekson 18, immobiliseres ampliconene på Streptavidin Sepharose® High Performance-mikropartikler. Enkeltrådet DNA klargjøres, og de tilhørende sekvenseringsprimerne hybridiseres til DNA-et. Prøvene analyseres deretter i PyroMark Q24 ved hjelp av en fil for å kjøre analyseoppsettet og en fil for å kjøre analyse.

Det anbefales å bruke GIST RapidScreen plug-in-rapporten til analyse av serien. Du kan be om GIST RapidScreen plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com. Serien kan også analyseres ved hjelp av analyseverktøyet integrert i 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" på side 30, og "Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser" på side 49).

Arbeidsgang for *therascreen* GIST RapidScreen 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 med lavt nivå (se "Tolkning av resultater" på side 30). Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie.

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

Medfølgende materiale

Settets innhold

therascreen GIST RapidScreen Pyro-sett (eske 1/2)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit	(24)
Katalognr.	971510
Antall reaksjoner	24
Seq Primer KIT exon 9 (Sekvenseringsprimer KIT-ekson 9)	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (Sekvenseringsprimer PDGFRA-ekson 18)	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (PCR-primerblanding KIT-ekson 9)	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (PCR-primerblanding PDGFRA-ekson 18)	32 µl
PyroMark PCR Master Mix (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 Pyro-buffere og -reagenser (eske 2/2)

therascreen Pyro-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	1 180 μ l
dCTP	1 180 μ l
dGTP	1 180 μ l
dTTP	1 180 μ l
therascreen <i>GIST RapidScreen 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.

Reagenser

- DNA-isoleringssett (se "Isolering av DNA" på side 14)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- Vann med høy renhetsgrad (Milli-Q[®] 18,2 M Ω x cm eller tilsvarende)
Merk: Settet inneholder nok vann til 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 %)*

* Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, f.eks. metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

Forbruksartikler

- Sterile pipettespisser (med filter for PCR-oppsett)
- 24-brønners PCR-plater (se "Anbefalte 24-brønners plater" på side 12)
- Klebefolie

Utstyr

- Pipetter (justerbare)*
- Bordsentrifuge*
- Termosykler* og egnede PCR-rør
- PyroMark Q24 (kat.nr. 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24-programvare (kat.nr. 9019063 eller 9019062)†
- PyroMark Q24-plate (kat.nr. 979201)†
- PyroMark Q24-kassett (kat.nr. 979202)†
- PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjon (kat.nr. 9001515 eller 9001517)*†
- Platemikser* for immobilisering til mikropartikler (se "Anbefalte platemiksere" på side 12)
- Varmebløkk* som kan nå 80 °C

* 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.

Anbefalte 24-brønners plater

De 24-brønners platene som er vist i tabell 1, anbefales for bruk med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet.

Tabell 1. 24-brønners plater som anbefales for bruk med *therascreen* GIST RapidScreen 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

Anbefalte platemiksere

De orbitale platemikserne som er vist i tabell 2, anbefales for bruk med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet.

Tabell 2. Platemiksere som anbefales for bruk med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet

Produsent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer 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)

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

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 enkelt komponent.

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i *therascreen* GIST RapidScreen 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.

Generelle forholdsregler

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

therascreen Pyro-bufferne og -reagensene (eske 2/2) som inneholder buffere, enzymblanding, 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 –15 til –30 °C. Frosne reagenser bør ikke utsettes for mer enn 6 fryse/tine-sykluser.

Merk: Nukleotider må ikke fryses.

therascreen GIST RapidScreen Pyro-settet er stabilt frem til settets utløpsdato når 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 blod eller formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) prøver.

Prøver fra personer som mottar heparinbehandling, skal ikke brukes. Blodprøver som er tatt i rør som inneholder heparin som antikoagulant, skal ikke brukes. Heparin påvirker PCR.

Prosedyre

Isolering av DNA

Systemets ytelse er etablert ved hjelp av EZ1[®] DNA Tissue-settet og QIAamp[®] DNA FFPE-vevssett for ekstrahering av humant DNA fra formalinfikserte, parafinlagrede tumorprøver. Ytelsen for QIAamp DSP DNA Blood Mini-sett-systemet er etablert ved hjelp av friske donorblodprøver delvis tilsatt med tumorceller.

QIAGEN-settene som er vist i tabell 3, er godkjent for DNA-rensing fra de angitte humane prøvetypene som skal brukes sammen med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet. Utfør DNA-rensing i henhold til instruksjonene angitt i settets håndbøker.

Tabell 3. Sett for DNA-rensing som anbefales for bruk med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet

Prøvemateriale	Nukleinsyreisoleringssett	Katalognummer (QIAGEN)
Parafinlagret vev	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Følg protokollen for bruk sammen med parafinlagret vev. EZ1 DNA vevssett skal 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).

† CE-IVD-merket i samsvar med EU-direktiv 98/79/EF.

Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet


Viktige punkter 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" (Protokoll for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer.).

Dette må du gjøre før du starter:


- Hvis GIST RapidScreen plug-in-rapporten ikke er installert, må du lage et analyseoppsett (se "Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser" på side 49). Dette skal kun gjøres én gang, før du kjører *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analysene første gang. Hvis GIST RapidScreen plug-in-rapporten er installert, er forhåndsdefinerte analyseoppsett tilgjengelige i PyroMark Q24-programvarens snarveifunksjon under banen "Example Files/PyroMark Setups/GIST" (Eksempelfiler/PyroMark-oppsett/GIST). Du kan be om GIST RapidScreen 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)" på side 17).**
3. **Sett opp platen ved å legge til analyser for både KIT-ekson 9 og PDGFRA-ekson 18 i brønner som samsvarer med prøvene som skal analyseres.**

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 8).

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.**

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 22).

Slik kjører du platen på PyroMark Q24, se "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 28.

"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 til eske 1 og eske 2 i <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-settet som skal brukes. Partinummeret er angitt på produktemballasjen. Merk: Vi anbefaler at du skriver inn begge partinummene, slik at eventuelle uventede problemer med <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-settet 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 PCR-reagenser som leveres sammen med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet

Denne protokollen gjelder for PCR-amplifikasjoner av et område som inneholder *KIT*-ekson 9 og en separat PCR-amplifikasjon av et område som inneholder *PDGFRA*-ekson 18 ved hjelp av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet.

Viktige punkter 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 atskilt fra det som brukes til DNA-rensing. Tilsett templat til PCR, PCR-produktanalyse eller klargjør 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 om nødvendig konsentrasjonen av kontrollen og prøve-DNA-et til 0,4–2 ng/µl.

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
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	12,5 µl
CoralLoad-konsentrat, 10 x	2,5 µl
PCR-primer, KIT-ekson 9 eller PCR-primer, PDGFRA-ekson 18	1 µl
Vann (H ₂ O, følger med)	4 µl
Totalt volum	20 µl

3. Bland reaksjonsblandingen grundig, og pipetter 20 µl 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 µl templat-DNA (2–10 ng genomisk DNA) i hvert PCR-rør (tabell 5) og bland godt.

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 8).

Tabell 5. Klargjøring av PCR

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

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 22 etter amplifikasjonen.

PCR-prøvene kan lagres ved 2–8 °C i opptil 3 dager.

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.
 - Slå på PyroMark Q24 minst 30 minutter før analysestart. Strømbryteren er plassert bak på instrumentet.
 - Sett én PyroMark Q24-plateholder på en forvarmet varmeblokk som holder 80 °C. Hold en annen PyroMark Q24-plateholder ved romtemperatur (15–25 °C).
 - 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:** Den 1 x aktive løsningen av PyroMark vaskebuffer er stabil ved 2–8 °C til den angitte utløpsdatoen.
- Klargjør PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjonen for prøveklargjøring, slik det er beskrevet i håndboken for PyroMark Q24.

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 større enn det som kreves for det totale antallet reaksjoner som skal utføres (for antall reaksjoner + en ekstra).

Tabell 7. Master Mix for DNA-immobilisering

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

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 til et passende nivå.

- 3. Tilsett 70 µl Master Mix til brønnene i en 24-brønners PCR-plate, slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 16).**

Sepharose-mikropartikler lager fort bunnfall. Se til at Master Mix er homogen ved å blande ofte ved hjelp av en pipette eller pulsvorteksering. Ikke virvle Master Mix ned.

- 4. Tilsett 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokoll 2 til hver brønn som inneholder Master Mix, slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 2: PCR ved bruk av PCR-reagenser som leveres sammen med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet" på side 19).**

Det totale volumet per brønn skal være 80 µl etter at Master Mix og PCR-produktet er tilsatt.

- 5. Forsegl PCR-platen ved hjelp av klebefolie.**

Se til at det ikke lekker mellom brønnene.

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

Fortsett umiddelbart med "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 24 under dette trinnet.

Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24

Denne protokollen er til klargjøring av enkelttrådet DNA og hybridisering av sekvenseringsprimer til templatet før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24.

Viktige punkter før du starter

- Før du åpner rørene med sekvenseringsprimere, 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 16), avhengig av analyseområdet (KIT-ekson 9 eller PDGFRA-ekson 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.

Prosedyre

- 1. Fortynn en tilstrekkelig mengde av hver sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer KIT-ekson 9 og sekvenseringsprimer PDGFRA-ekson 18, i PyroMark hybridiseringsbuffer som vist i tabell 8.**

Klargjør et volum med fortyntet 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 fortykning av sekvenseringsprimerne

Komponent	Volum/prøve	Volum til 9 + 1 reaksjoner
PyroMark hybridiseringsbuffer	24,2 µl	242 µl
Sekvenseringsprimer KIT-ekson 9 eller Sekvenseringsprimer PDGFRA- ekson 18	0,8 µl	8 µl
Totalt volum	25 µl	250 µl

2. Tilsett 25 µl fortynnet sekvenseringsprimer til hver brønn i PyroMark Q24-platen i henhold til analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 16).

Én av PyroMark Q24-plateholderne (leveres med PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjonen) må holde romtemperatur (15–25 °C) og brukes som støtte ved klargjøring og flytting av platen.

3. Slå på vaakumpumpen på PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjonen.
4. Sett PCR-platen fra protokoll 3 og PyroMark Q24-platen på vakuumarbeidsstasjonen (figur 3).

Inspiser PCR-platen og se til at Sepharose-mikropartiklene er i en løsning. Se til at PCR-platen står i samme retning som da prøvene ble satt inn.



Figur 3. Plassering av PCR-plate og PyroMark Q24-plate på vakuumarbeidsstasjonen.

5. Sett vakuum på verktøyet ved å åpne vakuumbryteren.

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

Sepharose-mikropartikler lager fort bunnfall. Innhenting av mikropartikler må skje umiddelbart etter bevegelse av platen. Hvis det er gått mer enn 1 minutt siden platen ble beveget opp og ned, bør dette gjøres på nytt i 1 minutt før mikropartiklene hentes.

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

7. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml 70 % etanol (kar 1, figur 3). Skyll filterprobene i 5 sekunder.**
8. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml denatureringsløsning (kar 2, figur 3). Skyll filterprobene i 5 sekunder.**
9. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 50 ml vaskebuffer (kar 3, figur 3). Skyll filterprobene i 10 sekunder.**
10. **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.

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

Vær forsiktig så du ikke skader overflaten på PyroMark Q24-platen ved å ripe den med filterprobene.
13. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder vann med høy renhetsgrad (kar 4, figur 3), og beveg verktøyet frem og tilbake i 10 sekunder.**

- 14. Vask filterprobene ved å senke probene ned i vann med høy renhetsgrad (kar 5, figur 3) og anvende vakuum. Skyll probene med 70 ml vann med høy renhetsgrad.**
- 15. Løft vakuumverktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 4).**
- 16. Slå av verktøyets vakuumbryter (Off) og sett vakuumverktøyet i posisjon P (Parking).**
- 17. Slå av vakuumpumpen.**

Mot slutten av arbeidsdagen må væskeavfall og resterende løsninger kastes, og PyroMark Q24-vakuumarbeidsstasjonen må kontrolleres for støv og søl. Se "Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar" på side 52.
- 18. Varm opp PyroMark Q24-platen med prøvene ved 80 °C i 2 minutter med forhåndsoppvarmet PyroMark Q24-plateholder.**
- 19. Fjern PyroMark Q24-platen fra den varme plateholderen og sett den på den andre PyroMark Q24-plateholderen som ble holdt ved romtemperatur (15–25 °C) for å la prøvene avkjøles til romtemperatur i 10–15 minutter.**
- 20. Fortsett med "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 28.**

Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet

Denne protokollen beskriver klargjøringen og innlastingen av PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-kassetten, og hvordan du starter og ferdigstiller en analyseserie på PyroMark Q24. Du finner en mer utførlig beskrivelse om analyseoppsett i håndboken for PyroMark Q24.

Viktige punkter 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 16), gir informasjon om hvor mye nukleotider, enzym og substratbuffer som er nødvendig for en bestemt analyseserie.
- Bruk engangsspisser uten vannavstøtende filter ved innlasting i kassetten for å sikre at kassetten fungerer som den skal.

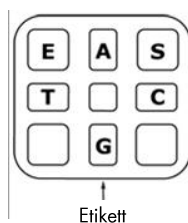
Prosedyre

1. **Løs opp hver enkelt frysetørret enzym- og substratblanding i 620 µl vann (H₂O, følger med).**
2. **Bland ved å bevege flasken forsiktig rundt.**
Ikke vorteks!

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.



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 kassetåpningen 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.
USB-enheten må ikke fjernes før serien er fullført.
11. Velg "Run" (Serie) i hovedmenyen (ved hjelp av skjermknappene ▲ og ▼) og trykk på "OK".
12. Velg seriefil ved hjelp av skjermknappene ▲ og ▼.
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 kassetåpningen 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 30.

Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie

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

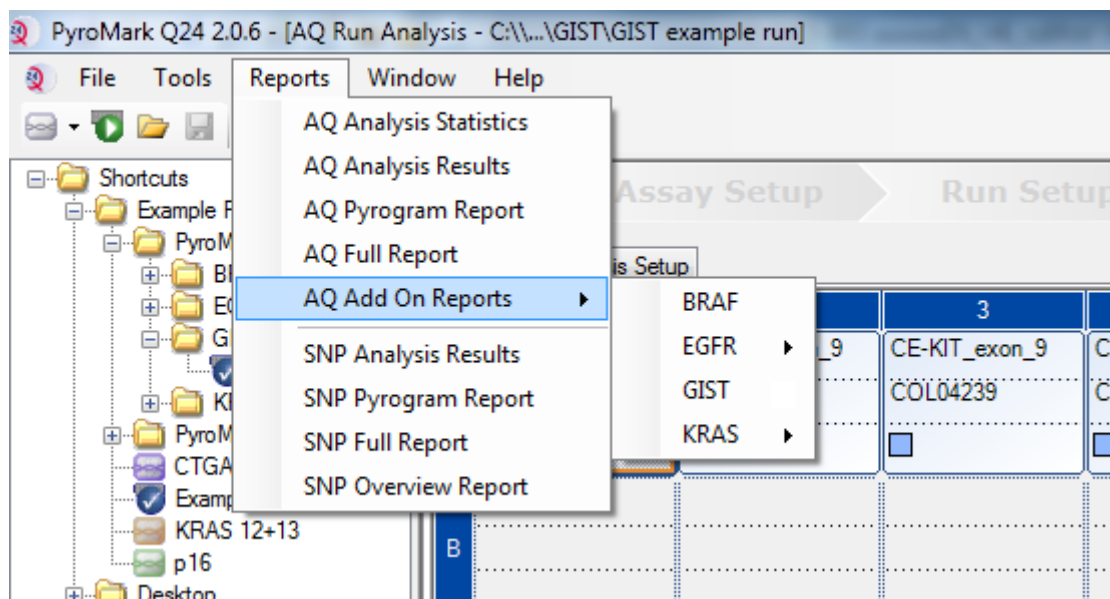
Prosedyre

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 datamaskinen 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 GIST RapidScreen plug-in-rapporten. Gå til trinn 6 hvis du bruker AQ-analysen integrert i PyroMark Q24-systemet.

Merk: Vi anbefaler på det sterkeste at du bruker GIST RapidScreen plug-in-rapporten til dokumentasjon og tolkning av resultater. Du kan be om GIST RapidScreen 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 "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) brukes til å detektere alle mutasjoner automatisk.

Merk: To komplekse mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18 (2526_2538>G og 2524_2526 GAC>TAT) kan ikke analyseres ved hjelp av AQ-analysen i PyroMark Q24-programvaren. Vi anbefaler at du bruker GIST RapidScreen plug-in-rapporten til å analysere komplekse mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18

5. **Bruk av GIST RapidScreen plug-in-rapport:**
Hvis du ønsker å opprette en rapport, velg "AQ Add On Reports/GIST" (AQ legge til rapporter / GIST) fra "Reports" (Rapporter) i menyen (se figur 6).



Figur 6. Menyen GIST RapidScreen plug-in-rapport.

Brønnene vil automatisk bli analysert for alle mutasjoner der LOD er angitt i tabell 9. Resultatene vil bli presentert i en oversiktstabell (se 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	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		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. GIST RapidScreen plug-in-rapport.

6. Bruke AQ-analyse:

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



Analyser alle brønner.



Analyser den valgte brønnen.

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*.

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: Oppsett av therascreen GIST RapidScreen Pyro-analyser" og *håndboken for PyroMark Q24*).

Merk: AQ-analyseresultatrapporten bør brukes som dokumentasjon på og tolkning av allekvantifisering. 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 det ikke er påvist mutasjon med standard "Sequence to analyze" (Analysesekvens) eller med kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes)

Standard "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), som definert i analyseoppsettet, retter seg mot 6 bp-duplikasjonen i *KIT*-ekson 9 og den hyppigste punktmutasjonen i kodon 842 (GAC>GTC) i *PDGFRA*-ekson 18 (se vedlegg A, side 49). Hvis en prøve inneholder en mindre hyppig mutasjon i *PDGFRA*-ekson 18, kan "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) endres slik at den analyserer mutasjonsstatusen til denne mutasjonen, som beskrevet i vedlegg A.

To komplekse mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18 (2526_2538>G og 2524_2526GAC>TAT) kan ikke analyseres ved hjelp av AQ-analysen i PyroMark Q24-programvaren. Vi anbefaler at du bruker GIST RapidScreen plug-in-rapporten til å analysere komplekse mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18

Vi anbefaler på det sterkeste at du analyserer alle prøver der det ikke er påvist mutasjon med standard "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), i tillegg til prøver med kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes). Kvalitetsvurderingene "Check" (Kontroller) og "Failed" (Mislyktes) kan indikere

en sjelden mutasjon som ikke berøres av standard "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), noe som fører til uventede referansetopper.

Mindre hyppige mutasjoner kan analyseres på nytt eller spores under "Analysis Setup" (Analyseoppsett) ved å endre "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) til varianter beskrevet i vedlegg A eller varianter for andre sjeldne eller uventede mutasjoner. Klikk på "Apply" (Bruk) og deretter på "To All" (På alle) når vinduet "Apply Analysis Setup" (Bruk analyseoppsett) vises.

Oppdaterte mutasjonsfrekvenser i humant *KIT/PDGFR*A 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 histogramøyene og ikke kan forklares av sjeldne eller uventede mutasjoner, danner ikke resultatet grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus. Det er 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). Verdiene for LOB (blank grense) og LOD (deteksjonsgrense) som er gitt i håndbøkene, kan brukes for å bestemme tilstedeværelsen av en mutasjon. Disse verdiene ble oppnådd ved å bruke plasmidblandinger som bar villtypen eller den relevante muterte sekvensen.

Analyse ved bruk av PyroMark Q24-programvaren eller plug-in-rapportene har 3 mulige resultater.

- Mutasjonsfrekvens $<LOD$: Mutasjon ikke påvist
- Mutasjonsfrekvens $>LOD + 3 \%$ enheter: Mutasjon
- Mutasjonsfrekvens $\geq LOD$ og $\leq LOD + 3 \%$ enheter: Potensiell mutasjon med lavt nivå

Merk: Hvis du bruker GIST RapidScreen plug-in-rapporten (se trinn 5 i "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 30) og dette skjer, vil et varsel bli vist.

Området fra LOD til $LOD + 3 \%$ enheter tillater sensitiv deteksjon av mutasjoner med lavt nivå under optimale betingelser. En målt frekvens over LOB i den umetylerte kontrollprøven indikerer et høyere bakgrunnsnivå enn vanlig i den respektive serien, som kan påvirke allelkvantifisering, særlig for lave mutasjonsnivåer. Derfor må resultater med advarselen "Potensiell mutasjon med lavt nivå" evalueres nøye.

Prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå skal bare betraktes som positive for mutasjonen hvis dette bekreftes ved å kjøre dem på nytt i duplikat sammen med det umetylerte kontroll-DNA-et. Resultatene av begge duplikatene skal rapportere samme mutasjon med verdier $\geq LOD$, og kontrollprøven skal rapporteres som "No mutation detected" (Ingen mutasjon påvist). Hvis ikke, skal prøven anses som "No mutation detected" (Ingen mutasjon påvist).

Økt bakgrunn for en mutasjon kan detekteres ved å sammenligne LOB-verdiene som er angitt i håndboken med målene som er oppnådd med det umetylerte kontroll-DNA-et. Prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå, kan klassifiseres som "Mutation not detected" (Mutasjon ikke påvist) uten gjentakelse

dersom den målte frekvensen for det umetylerte kontroll-DNA-et er høyere enn LOB-verdien som er angitt i håndboken for den relevante mutasjonen. Derfor kan rapporterte potensielle mutasjoner med lavt nivå ha 3 forskjellige utfall.

1. Målingsfrekvens med umetylert kontroll-DNA >LOB for denne mutasjonen: Prøven kan klassifiseres som "Mutation not detected" (Mutasjon ikke påvist) uten gjentakelse.
2. Resultat ikke gjenskapt i duplikat med samme resultat: Klassifiser prøve som "Mutation not detected" (Mutasjon ikke påvist).
3. Gjenskapt i duplikat med samme resultat og villtype-prøve <LOB for relevant mutasjon: Mutasjon påvist.

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. Pyrogrammene bør undersøkes for tilstedeværelse av uventede topper. Hvis de målte toppene ikke stemmer overens med høydene på histogramsøylene og ikke kan forklares av sjeldne eller uventede mutasjoner, er det anbefalt å kjøre prøven på nytt. Det ikke-godkjente resultatet danner ikke grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus. For en gyldig mutasjon er en endring av topphøyden alltid knyttet til en tilsvarende endring av en annen topps høyde. En endring av en enkelt topphøyde skal ikke klassifiseres som indikerende for en mutasjon.

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

Merk: En behandlingsbeslutning for kreftpasienter må ikke bare baseres på mutasjonsstatus i *KIT*-ekson 9 og *PDGFRA*-ekson 18.

Tabell 9. LOB og LOD bestemt for spesifikke mutasjoner

Nukleinsyresubstitusjon	Aminosyre-substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V58)
KIT-ekson 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
PDGFRA-ekson 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 eller [‡]	D842_H845del eller [‡]	2,2	5,2	737 eller [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

* 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/.

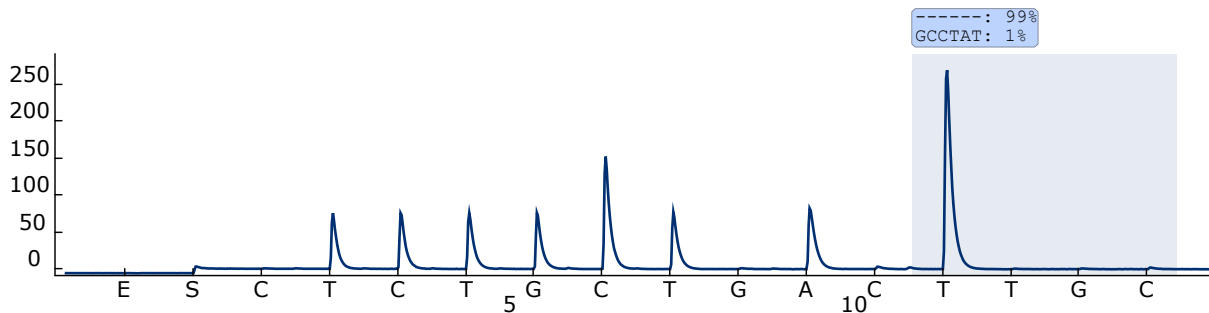
[†] Mutasjonene 2524G>T og 2524_2526GAC>TAT samt 2526_2537del12 og 2527_2538del12 resulterer i henholdsvis samme aminosyreendring.

[‡] Mutasjonene 2524_2535del12 og 2526_2537del12 resulterer i samme nukleinsyreendring.

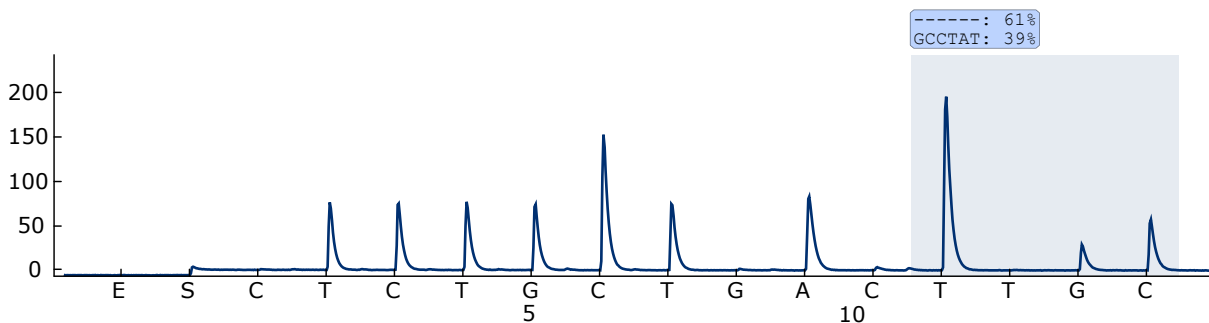
[§] Mutasjonen 2526_2538>G og 2524_2526GAC>TAT kan ikke analyseres i AQ-modus i PyroMark Q24-programvaren.

Representative resultater

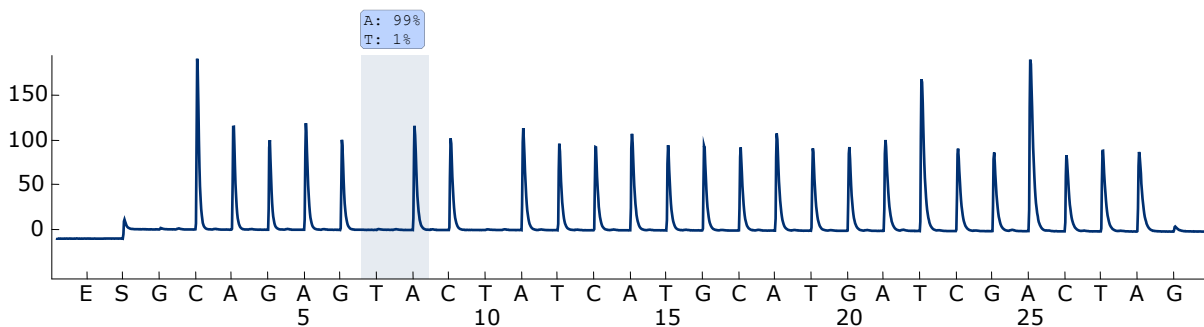
Representative Pyrogram-resultater er vist i figur 8–11.



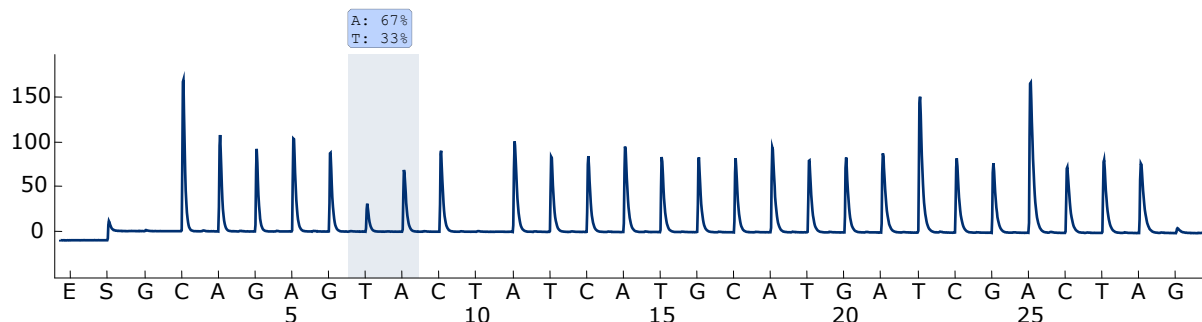
Figur 8. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i *KIT*-ekson 9 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* rettet mot 6 bp-duplikasjonen etter kodon 503.



Figur 9. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en GCCTAT-duplikasjon etter kodon 503 i *KIT*-ekson 9 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.



Figur 10. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i *PDGFRA*-ekson 18 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT* rettet mot mutasjonen GAC>GTC i kodon 842 (nukleotid 2525).



Figur 11. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en GAC>GTC-mutasjon i kodon 842 (nukleotid 2525) i PDGFRA-ekson 18 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

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).

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

- | | |
|----------------------------------|--|
| 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®-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 vakuumverktøyet. Sørg for at vakuumverktøyet 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 med et høyreklikk i vinduet Pyrogram. Hvis de målte toppene stemmer overens med høydene på histogramsøylene, er resultatet gyldig. Hvis ikke, anbefales det å kjøre prøven på nytt.
- b) Mutasjon ikke angitt i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens)
- Juster "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) i ananalyseoppsettet (se "Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser" på side 49), 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.

Kommentarer og forslag

- 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.

Høy bakgrunn

- a) Feil oppbevaring av nukleotider
- Nukleotider skal oppbevares ved 2–8 °C. Oppbevaring ved –15 til –30 °C kan forårsake en økning i bakgrunnen.
- b) Kort tid for nedkjøling av prøver før pyrosekvenseringsanalyse
- Prøvene på en PyroMark Q24-plateholder må holde romtemperatur i 10–15 minutter. Ikke kort ned tiden for nedkjøling.
- c) Kontaminering av kassett
- Rengjør kassetten grundig som beskrevet i produktarket. Beskytt kassetten mot lys og støv under oppbevaring.

Ingen signaler i positiv kontroll (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 reagensene i henhold til instruksjonene under "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 28.
- c) Feil i PCR eller prøveklargjøring
- Håndteringsfeil i PCR-oppsettet, programmering av PCR-sykleren eller prøveklargjøring før pyrosekvensering kan føre til mangel på signaler. Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i *håndboken for PyroMark Q24*, og bytt filterprober når dette angis. Gjenta PCR-en og pyrosekvenseringsanalysen.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hvert parti med *therascreen* GIST RapidScreen 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.

Håndboken må følges nøye for å sikre optimale PCR-resultater. Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato.

Ytelseskarakteristikker

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" (Protokoll for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer). α - og β -feil (henholdsvis falske positive og falske negative) ble satt til 5 %. LOD for enkelte sjeldne delesjoner i *PDGFRA*-ekson 18 ble bestemt ved å legge til 3 standardavvik for blanke målinger til LOB-verdien. LOD-verdiene ble satt til minst 3 % enheter over LOB-verdien.

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.

Tabell 10. LOB og LOD bestemt for spesifikke mutasjoner

Nukleinsyresubstitusjon	Aminosyre-substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V58)
KIT-ekson 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
PDGFRA-ekson 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 eller [‡]	D842_H845del eller [‡]	2,2	5,2	737 eller [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

* 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/.

[†] Mutasjonene 2524G>T og 2524_2526GAC>TAT samt 2526_2537del12 og 2527_2538del12 resulterer i henholdsvis samme aminosyreendring.

[‡] Mutasjonene 2524_2535del12 og 2526_2537del12 resulterer i samme nukleinsyreendring.

[§] LOD for disse delesjonene i *PDGFRA*-ekson 18 ble bestemt ved å legge til 3 standardavvik for blanke målinger til LOB-verdien.

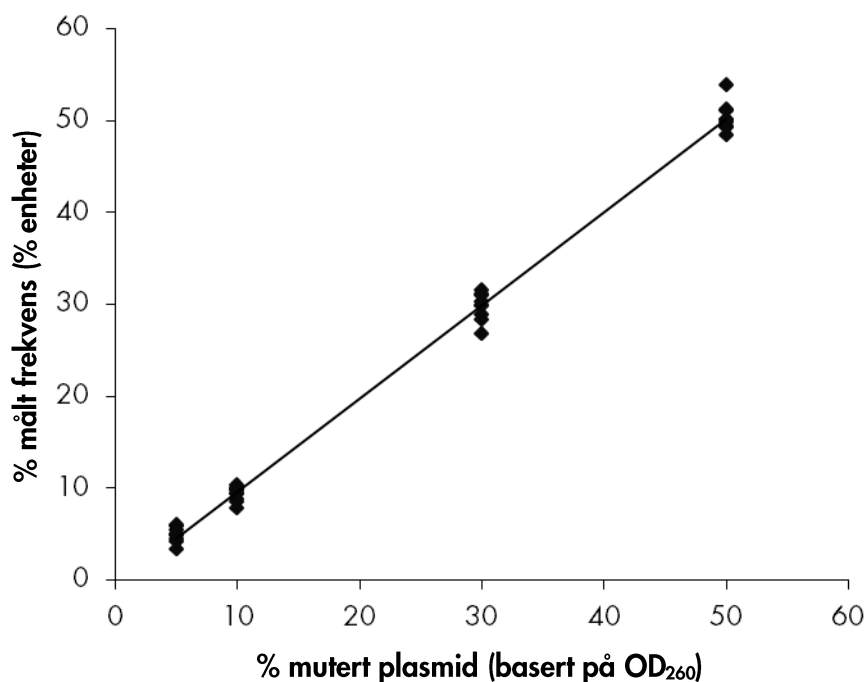
[¶] Mutasjonen 2526_2538>G kan ikke analyseres i AQ-modus i PyroMark Q24-programvaren.

Linearitet

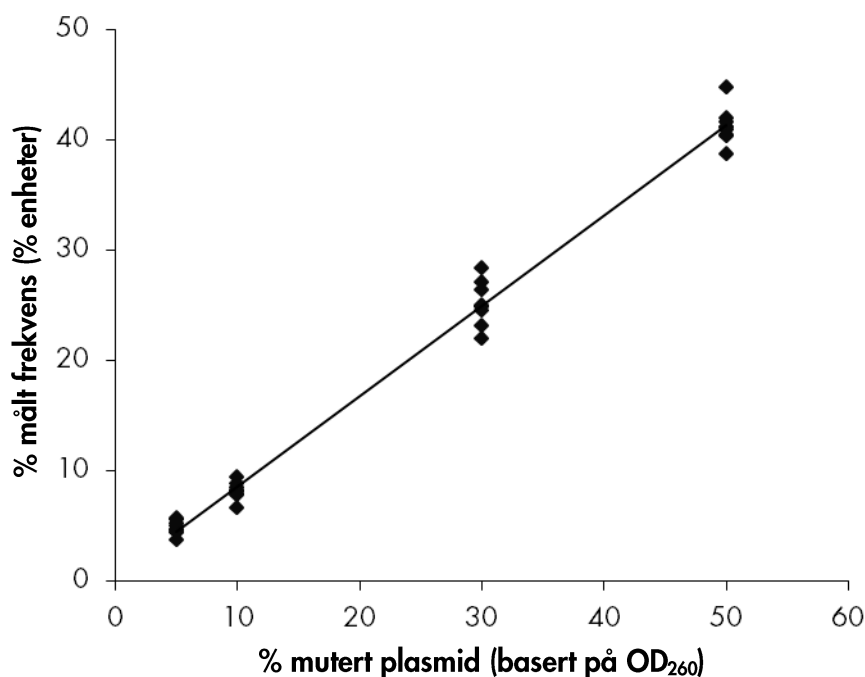
Linearitet ble bestemt ved å bruke plasmidblandinger som bar villtypen eller den muterte sekvensen for duplikasjonen 1509_1510insGCCTAT i *KIT*-ekson 9 og mutasjonen 2525A>T i *PDGFRA*-ekson 18. Plasmidene ble blandet i riktig forhold for å gi 4 mutasjonsnivåer (5, 10, 30 og 50 %). Hver blanding ble analysert med 3 forskjellige partier av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet i 3 pyrosekvenseringsserier med 3 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 hjelp av Analyse-it[®]-programvaren v2.21, og vises i figur 12 og 13.

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



Figur 12. Linearitet for duplikasjonen 1509_1510insGCCTAT i *KIT*-ekson 9.



Figur 13. Linearitet for mutasjonen 2525A>T i *PDGFRA*-ekson 18.

Presisjon

Presisjonsdataene gjør det mulig å bestemme analysenes totale variasjon og ble oppnådd på 3 forskjellige nivåer ved å analysere de ovennevnte plasmidblandingene med 3 replikater hver.

Repeterbarhet (variasjon for intra-analyse og mellom-batch) ble beregnet basert på dataene for bestemmelse av linearitet (3 serier på samme dag med forskjellige partier av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet). Intermediær presisjon (variasjon for intra-laboratorium) ble bestemt i 3 serier i ett laboratorium på 3 forskjellige dager med forskjellige brukere, PyroMark Q24-instrumenter og partier av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet. Reproduserbarhet (variasjon for mellom-laboratorium) ble beregnet fra 2 serier hver i et internt og eksternt laboratorium og ved å bruke forskjellige partier av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet.

Presisjonsestimater uttrykkes som standardavvik for de målte mutasjonsfrekvensene i % enheter (tabell 11). Repeterbarheten, den intermediære presisjonen og reproduserbarheten for duplikasjonen 1509_1510insGCCTAT i *KIT*-ekson 9 var henholdsvis 0,8–1,6, 0,5–1,5 og 0,7–1,9 % enheter i det målte området på 5 til 50 % mutasjonsnivå. Repeterbarheten, den intermediære presisjonen og reproduserbarheten for mutasjonen 2525A>T i *PDGFRA*-ekson 18 var henholdsvis 0,6–1,9, 0,6–3,7 og 0,5–2,4 % enheter i det målte området på 5 til 50 % mutasjonsnivå.

Tabell 11. Presisjon for duplikasjonen 1509_1510insGCCTAT i KIT-ekson 9*

% mutert plasmid [†]	Repeterbarhet		Intermediær presisjon		Reproduserbarhet	
	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

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

[†] Basert på OD₂₆₀-måling.

Tabell 12. Presisjon for mutasjonen 2525A>T i PDGFRA-ekson 18[‡]

% mutert plasmid [§]	Repeterbarhet		Intermediær presisjon		Reproduserbarhet	
	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

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

[§] Basert på OD₂₆₀-måling.

Diagnostisk vurdering

therascreen GIST RapidScreen Pyro-settet ble vurdert i forhold til Sanger-sekvensering. DNA ble ekstrahert fra 100 formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) GIST-tumorprøver og analysert for mutasjoner i KIT-ekson 9 og PDGFRA-ekson 18.

DNA ble isolert ved å bruke QIAamp DNA FFPE Tissue-settet. Analyser ble utført med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet på PyroMark Q24. Sanger-sekvensering ble utført på Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Av 100 prøver som ble analysert, kunne mutasjonsstatus bestemmes for alle KIT-ekson 9 (figur 13) og PDGFRA-ekson 18 (figur 14) med begge metodene.

Tabell 13. Resultater for de analyserte GIST-tumorprøvene for *KIT*-ekson 9

<i>KIT</i> -ekson 9		Sanger-sekvensering		
		Ingen mutasjon påvist	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Totalt
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-sett	Ingen mutasjon påvist	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Totalt	92	8	100

Tabell 14. Resultater for de analyserte GIST-tumorprøvene for *PDGFRA*-ekson 18

<i>PDGFRA</i> -ekson 18		Sanger-sekvensering				Totalt
		WT	2530_2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-sett	Ingen mutasjon påvist	92	0	0	0	92
	2530_2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Totalt	93	2	3	2	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 GIST RapidScreen 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.

Angitte referanser

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:

	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester
	Skal brukes innen
	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Partinummer (lot)
	Materialnummer
	Komponenter
	Innhold
	Nummer
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent
	Se informasjonen i håndboken
	Forsiktig

Kontaktinformasjon

Hvis du ønsker teknisk assistanse eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenter på www.qiagen.com/Support eller ringe 00800-22-44-6000 eller en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller www.qiagen.com).

Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser


Hvis GIST RapidScreen plug-in-rapporten er installert, er forhåndsdefinerte analyseoppsett for *KIT*-ekson 9 og *PDGFRA*-ekson 18 tilgjengelige i PyroMark Q24-programvarens snarveifunksjon under banen "Example Files/PyroMark Setups/GIST" (Eksempelfiler/PyroMark-oppsett/GIST). Følgende trinn trenger ikke utføres: GIST RapidScreen plug-in-rapporten kan fås fra pyro.plugin@qiagen.com.

Vi anbefaler på det sterkeste at du bruker GIST RapidScreen plug-in-rapporten fremfor manuell analyse. Komplekse mutasjoner i *PDGFRA*-ekson 18 kan ikke legges til manuelt i en "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) og må analyseres ved å bruke GIST RapidScreen plug-in-rapporten. Etter installering av plug-in eller hver gang en ny programvare installeres eller oppgraderes på kontorets datamaskin, bør plug-in-funksjonene testes slik det er beskrevet i hurtigveiledningen for GIST RapidScreen plug-in.

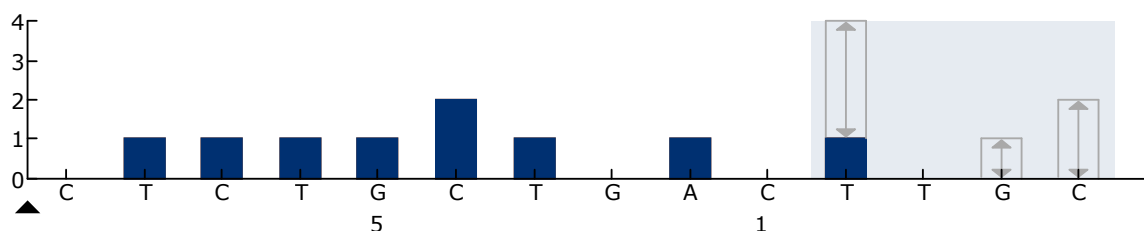
Hvis GIST RapidScreen plug-in-rapporten ikke er installert, må analysefilene angis manuelt før *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analysene kjøres første gang. Angi analysen for *KIT*-ekson 9 og *PDGFRA*-ekson 18 ved hjelp av PyroMark Q24-programvaren, som beskrevet nedenfor.

Prosedyre


KIT-ekson 9

- A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):
CTCTGCTGACTTGC
- A3. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens):
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA


6 bp-duplikasjonen GCCTAT etter kodon 503 i *KIT*-ekson 9 vil bli påvist ved hjelp av denne "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).



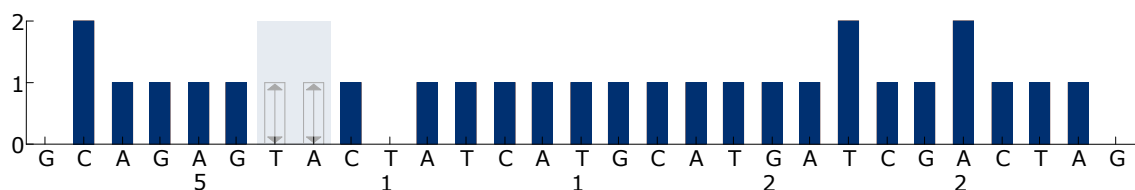
Figur 14. Histogram for *KIT*-ekson 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvensanalyse) **TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA** rettet mot 6 bp-duplikasjonen etter kodon 503.

- 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 "KIT exon 9" (KIT-ekson 9).

PDGFRA-ekson 18

- A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens):
CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT

Den hyppigste mutasjonen GAC>GTC i kodon 842 (nukleotid 2525) i PDGFRA-ekson 18 vil bli påvist ved hjelp av denne "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).




Figur 15. Histogram for PDGFRA-ekson 18 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) **CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT** rettet mot mutasjonen GAC>GTC i kodon 842 (nukleotid 2525).

"Sequence to Analyze" (Analysesekvens) kan endres etter analysen for i tillegg å analysere mutasjoner ved nukleotid 2524 (kodon 842) samt 9 deleasjoner og komplekse mutasjoner innenfor området av kodon 842 til 847.

Hvis du vil kontrollere om de følgende mutasjonene er til stede, endrer du "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) i henhold til tabell 15.

Merk: Du kan se bort fra advarselen "Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations" (Kvantifisering kan være usikker: den variable posisjonen krever mer enn 5 fordelinger) under analyseoppsett.

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

- 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 "PDGFRA exon 18" (PDGFRA-ekson 18).

Tabell 15. Vanlige mutasjoner påvist med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-settet ved bruk av ulike "Sequence to Analyze" (Analysesekvens)

Nukleinsyreendring	Aminosyreendring	"Sequence to Analyze" (Analysesekvens)
KIT-ekson 9		
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTAA*
PDGFRA-ekson 18		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCGAACTAT
2524_2535del12 eller [‡]	D842_H845del eller [‡]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2526_2537del12	I843_D846del [†]	
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	– [§]
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	– [§]


* Standard "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).

[†] Mutasjonene 2524G>T og 2524_2526GAC>TAT samt 2526_2537del12 og 2527_2538del12 resulterer i henholdsvis samme aminosyresubstitusjon.

[‡] Mutasjonene 2524_2535del12 og 2526_2537del12 resulterer i samme nukleinsyresubstitusjon og er analysert av samme "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).

[§] Mutasjonen 2526_2538>G og 2524_2526GAC>TAT kan ikke analyseres i AQ-modus i PyroMark Q24-programvaren.

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 de nødvendige forholdsreglene 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 HMS-databladene (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 punkter før du starter

- Denne protokollen krever vann med høy renhetsgrad (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com eller tilsvarende).

Prosedyre

- B1. Se til at vakuumverktøyet ikke mottar noe vakuum. Pass på at vakuomet 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.**
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> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	For 24 reaksjoner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenserings-primere, 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	971510
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 enkeltrådet templat	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkeltrådet templat	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Brukerorientert programvare	9019063
PyroMark Q24 Software	Analyseprogramvare	9019062

* Kun Storbritannia.

† Alle andre land.

Produkt	Innhold	Katalognr.
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-brønners reaksjonsplate til sekvensering	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter til pipettering av nukleotider og reagenser	979302
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
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini Spin-kolonner, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsavklaringer, 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.

Varemerker: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CorallLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation); FrameStar® (4fitude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

Begrenset lisensavtale for *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-sett

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem, og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte 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 de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme 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, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013-2015 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

