

Maj 2016

therascreen® RAS Extension Pyro® Kit Håndbog



Version 1

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug

Til påvisning af mutationer i exon 3 og 4 i det humane KRAS-onkogen og exon 2, 3 og 4 i det humane NRAS-onkogen

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R2

MAT

1085873DA



Contents

Tilsliget anvendelse	5
Opsummering og forklaring	5
Procedureprincip.....	7
Kontroller	8
Medfølgende materialer.....	9
Kit-indhold	9
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	12
Advarsler og forholdsregler	15
Generelle forholdsregler	15
Opbevaring og håndtering af reagenser.....	16
Prøveindsamling, klargøring til analyse og opbevaring	17
Procedure.....	19
DNA-isolation	19
Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet	19
Protokol 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro-kittet	22
Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler	25
Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24	27
Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet	32
Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel	35
Fortolkning af resultater.....	40

Repræsentative resultater	45
Fejlfindingsvejledning	48
Kvalitetskontrol.....	50
Begrænsninger	50
Brugsegenskaber	51
Tomgrænse og påvisningsgrænse.....	51
Mutationerne GGT > TGT og GGT > GTT i NRAS-codon 13	53
Linearitet	54
Præcision	55
Diagnostisk evaluering	58
Referencer	61
Symboler	62
Kontaktoplysninger.....	63
Bilag A: Opsætning af <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro-analyser	64
Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere.....	70
Bestillingsinformation	72

Tilsigtet anvendelse

therascreen RAS Extension Pyro-kittet er en in vitro-diagnostisk test, som er baseret på Pyrosequencing®-teknologien til kvantitativ påvisning af mutationer i codon 59, 61, 117 og 146 i det humane KRAS-onkogen og codon 12, 13, 59, 61, 117 og 146 i det humane NRAS-onkogen ved hjælp af DNA ekstraheret fra formalinfikseret, paraffinindlejret (FFPE) humant væv med metastatisk kolorektalcancer (mCRC).

therascreen RAS Extension Pyro-kittet er beregnet som en hjælp til identifikationen af de mCRC-patienter, som med størst sandsynlighed vil få fordel af anti-EGFR-behandlinger, som f.eks. cetuximab og panitumumab (1).

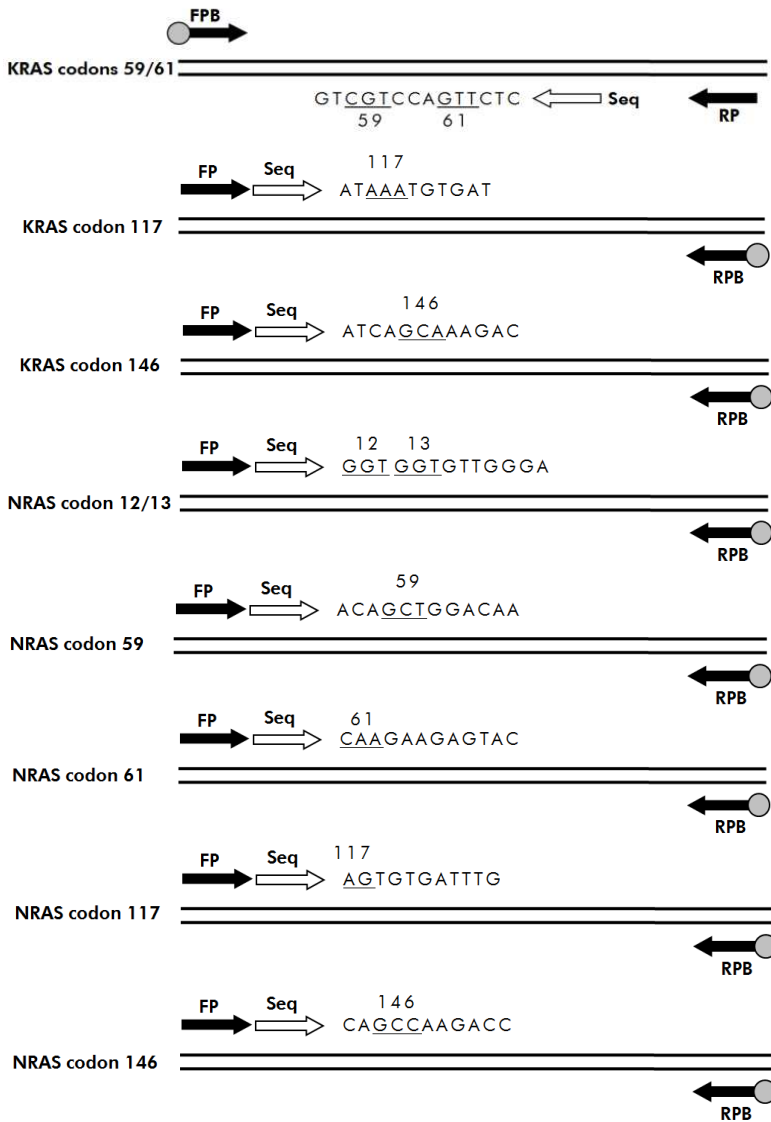
therascreen RAS Extension Pyro-kittet er kun beregnet til brug på PyroMark® Q24-systemet. Der findes følgende PyroMark Q24-systemer:

- PyroMark Q24-instrumentet eller PyroMark Q24 MDx-instrumentet.
- PyroMark Q24-vacuumarbejdsstationen eller PyroMark Q24 MDx-vacuumarbejdsstationen.
- PyroMark Q24-software (version 2.0) eller PyroMark Q24 MDx-software (version 2.0).

therascreen RAS Extension Pyro-kittet er beregnet til brug af professionelle brugere, f.eks. teknikere og læger med kvalifikationer inden for in vitro-diagnostiske procedurer, molekylærbiologiske teknikker samt PyroMark Q24-systemet.

Opsummering og forklaring

therascreen RAS Extension Pyro-kittet bruges til kvantitative målinger af mutationer i exon 3 og 4 i det humane KRAS-gen og exon 2, 3 og 4 i det humane NRAS-gen. Kittet består af 8 analyser (se Figur 1).



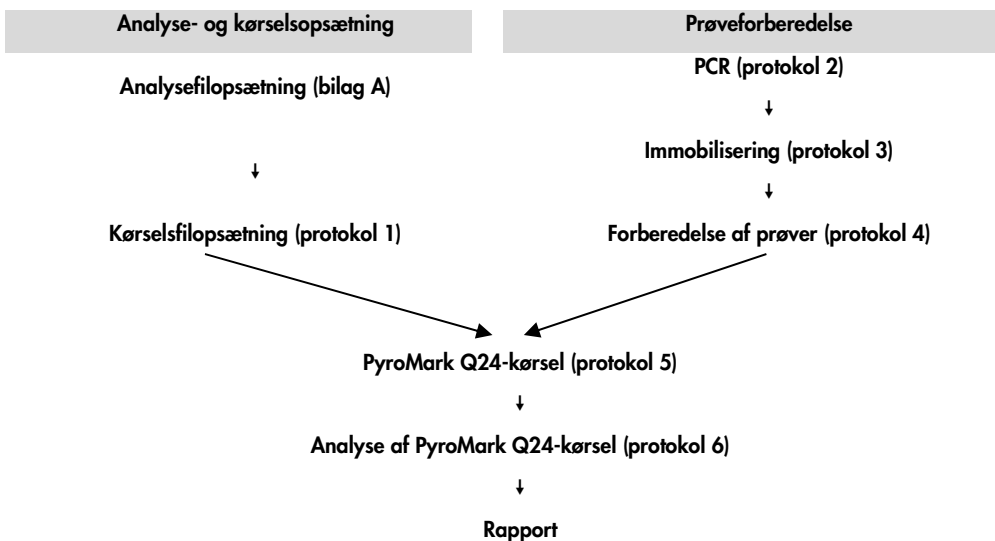
Figur 1. Analyserne i *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet.

De 8 regioner forstærkes separat ved hjælp af PCR og sekventeres i hele den definerede region. Mutationer i den dækkede region fører til tydelige mønstre i Pyrogram[®]-sporet, som adskiller sig fra de spor, der er opnået fra vildtypeprøver. De mutationer, som kan analyseres ved hjælp af PyroMark Q24-softwaren, er angivet i Tabel 13 (Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser). Analyserne for KRAS-codon 117 og 146 samt NRAS-codon 12/13, 59, 61, 117 og 146 sekventeres forfra, mens analysen for KRAS-codon 59/61 sekventeres bagfra. Produktet består af en PCR-primerblanding og en sekventeringsprimer til hver analyse. Primerne leveres i en opløsning sammen med hvert hætteglas, der indeholder 24 µl primer eller primerblanding.

Procedureprincip

Figur 2 nedenfor illustrerer rutediagrammet for analyseproceduren. Når der er udført PCR, skal der bruges primere på interesseområdet, mens ampliconerne immobiliseres på Streptavidin Sepharose[®] High Performance-kugler. Der forberedes enkeltstrenget DNA, og de tilsvarende sekvenseringsprimere afhærdes til DNA'et. Prøverne analyseres herefter på PyroMark Q24 ved hjælp af en kørselsopsætningsfil og en kørselsfil.

“Sequence to Analyze” (Sekvens, der skal analyseres) kan tilpasses med henblik på påvisning af forskellige mutationer efter kørslen (se “Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel”, side 35 og “Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser”, side 64).



Figur 2. Rutediagram for *theascreen* RAS Extension Pyro-kittets procedure.

Kontroller

Kittet indeholder umetyleret kontrol-DNA som positiv kontrol til PCR og sekventeringsreaktioner. Dette kontrol-DNA har en vildtype genotype i de regioner, der sekventeres med dette kit. Medtag en prøve af kontrol-DNA'et til hver analyse i hver enkelt pyrosekventeringskørsel. Dette er nødvendigt for korrekt fortolkning af resultaterne og identifikation af lave mutationsniveauer (se "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel", side 35).

Hertil kommer, at en negativ kontrol (uden skabelon-DNA) skal medtages i PCR-opsætningen af mindst én analyse.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

Æske 1/2

therascreen RAS Extension Pyro Kit	(24)
Katalognr	971590
Antal forberedelser	24
<hr/>	
Seq Primer KRAS 59/61 (sekvenseringsprimer KRAS 59/61)	24 µl
Seq Primer KRAS 117 (sekvenseringsprimer KRAS 117)	24 µl
Seq Primer KRAS 146 (sekvenseringsprimer KRAS 146)	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13 (sekvenseringsprimer NRAS 12/13)	24 µl
Seq Primer NRAS 59 (sekvenseringsprimer NRAS 59)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (sekvenseringsprimer NRAS 61)	24 µl
Seq Primer NRAS 117 (sekvenseringsprimer NRAS 117)	24 µl
Seq Primer NRAS 146 (sekvenseringsprimer NRAS 146)	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61 (PCR-primer KRAS 59/61)	24 µl
PCR Primer KRAS 117 (PCR-primer KRAS 117)	24 µl
PCR Primer KRAS 146 (PCR-primer KRAS 146)	24 µl

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Katalognr	971590
Antal forberedelser	24
PCR Primer NRAS 12/13 (PCR-primer NRAS 12/13)	24 µl
PCR Primer NRAS 59 (PCR-primer NRAS 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (PCR-primer NRAS 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (PCR-primer NRAS 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (PCR-primer NRAS 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix (PyroMark PCR-masterblanding), 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad®-koncentrat), 10x	1.2 ml
H ₂ O	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA (umethyleret kontrol-DNA), 10 ng/µl	3 x 100 µl

Æske 2/2

Buffers and reagents	Volume
PyroMark Binding Buffer (PyroMark-bindingsbuffer)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark-afhædningsbuffer)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark-denatureringsopløsning)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (PyroMark-vaskebuffer), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (enzymblanding)	2 vials
Substrate Mixture (substratblanding)	2 vials
dATP α S	2 x 1180 μ l
dCTP	2 x 1180 μ l
dGTP	2 x 1180 μ l
dTTP	2 x 1180 μ l
therascreen RAS Extension Pyro Kit Håndbog (engelsk)	1 pc

*Indeholder natriumhydroxid

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Reagenser

- DNA-isolationskit (se "DNA-isolation", side 19)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalognr. 17-5113-01; www.gelifsciences.com)
- Rektificeret vand (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende)

Bemærk: Der medfølger tilstrækkeligt vand i kittet til PCR, DNA-immobilisering og til at opløse enzymblandingen og substratblandingen. Der skal bruges yderligere rektificeret vand til fortynding af PyroMark-vaskebufferen 10x.

- Ethanol (70 %)*

Forbrugsvarer

- Sterile pipettespidser (med filtre til PCR-opsætning)
- PCR-plader med 24 brønde (se "Anbefalede 24-brønnds plader", side 14)
- Selvklæbende folie
- PyroMark Q24 Plate (PyroMark Q24-plade) (katalognr. 979301)†
- PyroMark Q24-beholder (katalognr. 979302)†

* Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer som f.eks. metanol eller methylethylketon.

† CE-IVD-mærket i henhold til EU-direktiv 98/79/EF. De øvrige produkter på listen er ikke CE-IVD-mærkede i henhold til EU-direktiv 98/79/EF.

Udstyr

- Pipetter (justerbare)*
- Bordmikrocentrifuge*
- Termocykler* og egnede PCR-rør
- PyroMark Q24 MDx eller PyroMark Q24 (katalognr. 9001513 eller 9001514)*
- PyroMark Q24 MDx- eller PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen (katalognr. 9001515, 9001516, 9001518 eller 9001519)*
- Plademikser* til immobilisering af kugler (se "Anbefalede plademiksere", side 14)
- Varmebløkk*, som kan nå op på 80 °C

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

Anbefalede plademiksere

De orbitale plademiksere i Tabel 1 anbefales til brug med *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet.

Tabel 1. Plademiksere anbefalet til brug med *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet

Producent	Produkt	Katalognr.
Eppendorf	ThermoMixer® C (grundenhed)	5382000031
Eppendorf	Eppendorf® SmartBlock™ PCR96	5306 000.006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Anbefalede 24-brønds plader

De 24-brønds plader, der er vist i Tabel 2, anbefales til brug sammen med *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet.

Tabel 2. 24-brønds plader anbefales til brug sammen med *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet

Producent	Produkt	Katalognr.
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24-well	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene 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

Til in vitro-diagnostisk brug.

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er). Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN®-kit og hver kitkomponenter.

Generelle forholdsregler

Vær altid opmærksom på følgende:

- Komponenterne i dette produkt er tilstrækkelige til at udføre 24 reaktioner for hver analyse.
- Brug sterile pipettespidser (med filtre til PCR-opsætning).
- Positive materialer (prøver, positive kontroller og amplikoner) skal opbevares og ekstraheres separat fra alle andre reagenser og tilsættes reaktionsblandingen på et separat sted.
- Alle komponenter skal omhyggeligt optøs til stuetemperatur (15-25 °C), inden analysen startes.
- Efter optøning skal komponenterne blandes (ved gentagen pipettering op og ned eller ved pulsvortexing) og centrifugeres kortvarigt.
- Mislykkede resultater kan ikke bruges som udgangspunkt for vurdering af mutationsstatus.

Opbevaring og håndtering af reagenser

therascreen RAS Extension Pyro-kittet forsendes i 2 æsker. *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet (æske 1/2) forsendes på tøris. PyroMark PCR-masterblandingen, CoralLoad-koncentratet, det umethylerede kontrol-DNA og samtlige primere skal opbevares ved -15 til -25 °C efter modtagelsen.

Pyrobufferne og reagenserne (æske 2/2), der indeholder buffere, enzymblanding, substratblanding, dATPaS, dCTP, dGTP og dTTP (reagenserne til pyrosekventeringsanalyse) sendes på køleelementer. Disse komponenter skal opbevares ved 2-8 °C efter modtagelse. For at minimere aktivitetstab anbefales det at opbevare både enzymblandingen og substratblandingen i de leverede hætteglas.

Rekonstituerede enzym- og substratblandinger er stabile i mindst 10 dage ved 2-8 °C. Rekonstituerede enzym- og substratblandinger kan nedfryses og opbevares i hætteglassene ved -15 °C til -25 °C. Frosne reagenser bør ikke udsættes for mere end 6 optønings- og indfrysningscyklusser.

Bemærk: Nucleotider må ikke fryses.

Når det opbevares under disse forhold, er *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet stabilt, indtil den anførte kitudløbsdato.

Prøveindsamling, klargøring til analyse og opbevaring

Bemærk: Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Prøvemateriale skal være humant genomisk DNA, ekstraheret fra FFPE-væv. Prøverne skal transporteres i henhold til standardmetoder inden for patologien for at sikre prøvernes kvalitet.

Tumorprøver er heterogene, og data fra én tumorprøve vil muligvis ikke være samstemmende med data fra andre præparater fra den samme tumor. Tumorprøver kan også indeholde ikke-tumorstof. DNA fra ikke-tumorstof forventes ikke at indeholde de mutationer, der påvises af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet.

Forberedelse af vævsprøver

Bemærk: Brug tørre skalpeller. Udfør ikke dette trin i laminar strømning eller stinkskab.

- Skrab tumorstofet bort fra sektionerne og ind i mærkede mikrocentrifugeringsrør med en ny skalpel for hver prøve.

Sådan forberedes vævsprøver til DNA-ekstrahering

- Ved hjælp af standardmaterialer og -metoder fikseres vævsprøven i 10 % neutralt bufret formalin (NBF) og indstøbes i paraffin. Ved hjælp af en mikrotom skal man skære 5 µm serielle sektioner fra paraffinblokken og montere dem på objektglas.
- En uddannet person (f.eks. en patolog) skal undersøge en hæmatoxylin og eosin-farvet sektion for tumorindhold og områdebestemmelse. Markér det farvede objektglas for at adskille tumoren fra normalt væv. Brug serielle sektioner til DNA-ekstrahering.

-
- Brug sektioner med > 20 % tumorindhold i et område til behandling uden makrodissektion (se næste punkt).
 - For sektioner med < 20 % tumorindhold i området skal én eller flere sektioner makrodissekeres. Bortskaf ikke-tumorstof.
 - For sektioner med < 4 mm² i området skal to eller flere sektioner behandles for at øge det samlede tumorområde til mindst 4 mm² (gælder for prøver både med og uden makrodissektion). Bortskaf ikke-tumorstof.
 - Skrab overskydende paraffin bort fra vævet med en ny, steril skalpel.

Opbevaringsforhold

Opbevar FFPE-blokke og objektglas ved stuetemperatur. Objektglas kan opbevares ved stuetemperatur i op til 4 uger før DNA-ekstrahering.

Genomisk DNA kan opbevares ved 2-8 °C i en uge efter ekstrahering, derefter ved -15 til -25 °C i op til 8 uger før brug.

Procedure

DNA-isolation

Det QIAGEN-kit, der vises nedenfor i Tabel 3, anbefales til oprensning af DNA for den angivne humane prøvetype samt til brug sammen med *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet. For at bruge dette kit skal du følge instruktionerne til DNA-oprensning i den pågældende kit-håndbog.

Tabel 3. DNA-oprensningskit anbefalet til brug med *therascreen* RAS Extension Pyro-kit


Prøvemateriale	Isolationskit til nucleinsyre	Katalognr.
Paraffinindlejret væv	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet

Ting, der skal gøres før start


- Opret en analyseopsætning som beskrevet i "Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser", side 64. Dette skal kun gøres én gang, før RAS Extension Pyro-analysen køres første gang.
- Undgå at placere prøver med høje signalintensiteter ved siden af "kontrolbrønde uden skabelon" og brønde med forventede lave signaler. Dette kan medføre crosstalk-signaler mellem brøndene, hvor et signal fra én brønd påvises i en tilstødende brønd.

Procedure

1. Klik på  på værktøjslinjen.
Der oprettes en ny kørselsfil.
2. Angiv kørselsparametrene (se "Kørselsparametre", side 20).
3. Forbered pladen ved at føje analyser for alle 8 analyser fra *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet til brønde, der svarer til de prøver, der skal analyseres.

Bemærk: Der skal medtages en negativ kontrolprøve (uden skabelon-DNA) i hver PCR-opsætning for mindst én analyse.

Bemærk: Medtag en prøve med umethyleret kontrol-DNA som en vildtype-kontrol for hver analyse i hver pyrosekventeringskørsel (se Figur 2. **Rutediagram for *therascreen* RAS Extension Pyro-kittets procedure.**, side 8).

4. Når kørslen er konfigureret og klar til at køre på PyroMark Q24-systemet, skal der udskrives en liste over de påkrævede volumener enzymblanding, substratblanding og nucleotider samt pladeopsætningen. Vælg "Pre Run Information" (Information før kørsel) i menuen "Tools" (Funktioner). Når rapporten vises, skal du klikke på .
5. Luk kørselsfilen, og kopiér den til en USB-nøgle (leveres med systemet) ved hjælp af Windows® Stifinder.

Bemærk: Den udskrevne information før kørsel kan bruges som skabelon for prøveopsætningen (se "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 25).

Bemærk: Se "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 32, for at køre pladen på PyroMark Q24-systemet.

Kørselsparametre

- **Run name (Kørselsnavn):** Navnet på kørslen angives, når filen gemmes. Hvis filen omdøbes, ændres navnet på kørslen også.
- **Instrument method (Instrumentmetode):** Vælg instrumentmetode ud fra den beholder, der skal bruges til kørslen. Se de instruktioner, der fulgte med produkterne.
- **Plate ID (Plade-id, valgfrit):** Angiv id'et for PyroMark Q24-pladen.
- **Bar code (Stregkode, valgfrit):** Angiv et stregkodennummer for pladen. Hvis der er en stregkodelæser tilsluttet computeren, kan du også placere markøren i feltet "Barcode" (Stregkode) ved at klikke i feltet og herefter scanne stregkoden.
- **Kit and reagent ID (Kit og reagens-id, valgfrit):** Angiv lotnummeret for det *therascreen* RAS Extension Pyro-kit, der skal bruges. Lotnummeret fremgår af etiketten på produktet.

Bemærk: Det anbefales at angive lotnumrene, så eventuelle uventede problemer med theascreen RAS Extension Pyro-kittet kan spores.

- **Run note (Kørselsbemærkning, valgfrit):** Angiv en bemærkning om indholdet af eller formålet med kørslen.

Tilføj analysefiler

En analyse kan føjes til en brønd på en af følgende måder:

- Højreklik på brønden, og vælg "Load Assay" (Indlæs analyse) i genvejsmenuen.
- Marker analysen i genvejsbrowseren, klik på den, og træk den til brønden.

En brønd har farve efter den analyse, der er anbragt i brønden.

Angiv prøve-id'er og bemærkninger

Der kan angives prøve-id'er eller bemærkninger ved at vælge den pågældende celle og indtaste teksten.

Eksisterende prøve-id'er eller bemærkninger kan redigeres ved at markere cellen (det aktuelle indhold markeres) eller dobbeltklikke på cellen.

Protokol 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet

Denne protokol er til PCR-forstærkning af 8 separate regioner i exon 3 og 4 i det humane KRAS-gen og exon 2, 3 og 4 i det humane NRAS-gen ved hjælp af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet.

Vigtige anvisninger før start

- HotStarTaq® DNA-polymerasen i PyroMark PCR-masterblandingen kræver et aktiveringstrin på 15 minutter ved 95 °C.
- Alle reaktionsblandinger skal klargøres i et område, som er adskilt fra det område, der bruges til DNA-oprensning, tilføjelse af skabelon i PCR, PCR-produktanalyse eller klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse.
- Brug engangspidser med hydrofobiske filtre for at minimere krydskontaminering.

Ting, der skal gøres før start

- Inden rørene med PCR-primere åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- Juster evt. koncentrationen af kontrollen og prøve-DNA'et til 0,4-2 ng/μl.

Procedure

1. Optø alle nødvendige reagenser (se Tabel 4).

Bland dem godt inden brug.

2. Klargør en reaktionsblanding for hvert PCR-primersæt i henhold til Tabel 4.

Reaktionsblandingen indeholder som regel alle de komponenter, der er nødvendige ved PCR, undtagen prøven.

Klargør en større mængde reaktionsblanding end den, der er nødvendig for det samlede antal PCR-analyser, som skal udføres.

Tabel 4. Klargøring af reaktionsblanding til hver PCR-primerblanding

Komponent	Volumen/reaktion (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 eller PCR Primer KRAS 117 eller PCR Primer KRAS 146 eller PCR Primer NRAS 12/13 eller PCR Primer NRAS 59 eller PCR Primer NRAS 61 eller PCR Primer NRAS 117 eller PCR Primer NRAS 146	1
Vand (H ₂ O, medfølger)	4
Volumen i alt	20

3. Bland reaktionsblandingen grundigt, og dispenser 20 µl i hvert PCR-rør.

Det er ikke nødvendigt at opbevare PCR-rørene på is, da HotStarTaq-DNA-polymerasen er inaktiv ved stuetemperatur.

4. Tilføj 5 µl skabelon-DNA (2-10 ng genomisk DNA) i de enkelte PCR-rør (se Tabel 5), og bland grundigt.

Bemærk: En negativ kontrolprøve (uden skabelon-DNA) skal medtages i PCR-opsætningen af mindst én analyse.

Bemærk: Medtag en prøve med umethyleret kontrol-DNA som en vildtype-kontrol for hver analyse i hver pyrosekventeringskørsel (se "Kontroller", side 8).

Tabel 5. Klargøring af PCR

Komponent	Volumen/reaktion (µl)
Reaktionsblanding	20
Prøve-DNA	5
Volumen i alt	25

5. Programmér termocyklere i henhold til producentens instruktioner og de betingelser, der er skitseret i Tabel 6

Tabel 6. Optimeret cyklusprotokol

	Tid	Temperatur	Kommentarer
Første aktiveringstrin:	15 min	95°C	HotStarTaq-DNA-polymerasen aktiveres med dette opvarmningstrin.
3-trinscyklus:			
Denaturering	20 s	95°C	
Afhærdning	30 s	53°C	
Udvidelse	20 s	72°C	
Antal cyklusser	42	–	
Endelig udvidelse:	5 min	72°C	

6. Anbring PCR-rørene i termocyklere, og start cyklusprogrammet.
7. Efter forstærkning skal der fortsættes med "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 25.
PCR-prøverne kan opbevares ved 2-8 °C i op til 3 dage.

Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler

Denne protokol er til immobilisering af skabelon-DNA på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler inden analyse på PyroMark Q24-systemet.

Ting, der skal gøres før start

- Lad de påkrævede reagenser og opløsninger nå stuetemperatur (15-25 °C) inden start.
- Tænd for PyroMark Q24 mindst 30 minutter, før en kørsel startes. Tænd/sluk-knappen er placeret bag på instrumentet.
- Anbring én PyroMark Q24-pladeholder på en forvarmet varmeblok ved 80 °C. Lad en anden PyroMark Q24-pladeholder stå ved stuetemperatur (15-25 °C).
- PyroMark-vaskebufferen leveres som 10x-koncentrat. Inden den bruges for første gang, skal den fortyndes til 1x-arbejdsopløsning ved at tilsætte 225 ml rektificeret vand i 25 ml 10x PyroMark-vaskebuffer (endeligt volumen på 250 ml).

Bemærk: 1x PyroMark-vaskebufferopløsningen er stabil ved 2-8 °C indtil den anførte udløbsdato.

- Forbered PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen til prøveklargøring som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

Procedure

1. Ryst forsigtigt flasken med Streptavidin Sepharose High Performance fra side til side, til der opnås en homogen opløsning.
2. Klargør en masterblanding til DNA-immobilisering i henhold til Tabel .
Klargør et volumen, som er større end det, der er nødvendigt for det samlede antal reaktioner, som skal udføres (antallet af prøver + én ekstra).

Tabel 7. Masterblanding til DNA-immobilisering

Komponent	Volumen/reaktion (µl)
PyroMark Binding Buffer	40
Vand (H ₂ O, medfølger)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Volumen i alt	70

3. Tilsæt 70 µl masterblanding i brøndene på en PCR-plade med 24 brønde, som dette er defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 19).

Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Sørg for, at masterblandingen er homogen ved jævnlige at blande med en pipette eller ved hjælp af en pulsvortexing. Masterblandingen må ikke centrifugeres.

4. Tilsæt 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokol 2 i hver brønd med masterblanding, som dette er defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i theascreen RAS Extension Pyro-kittet", side 22).

Det samlede volumen pr. brønd skal være 80 µl efter tilsætning af masterblanding og PCR-produkt.

5. Forsegl PCR-pladen med selvklæbende folie.

Kontrollér, at der ikke er risiko for lækage mellem brøndene.

6. Ryst PCR-pladen ved stuetemperatur (15-25 °C) i 5-10 minutter ved 1.400 o/min.

Under dette trin skal du straks gå videre med "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24", side 27.

Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24

Denne protokol er til klargøring af enkeltstrengt DNA og afhærdning af sekvenseringsprimeren til skabelonen inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24.

Vigtige anvisninger før start

- Inden rørene med sekventeringsprimere åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- De forskellige sekventeringsprimere skal tilsættes i det mønster, der er defineret for pladen under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 19), afhængigt af analyseregionen.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen* med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, når det er påkrævet.

Procedure

1. Fortynd en tilstrækkelig mængde sekventeringsprimer i PyroMark-afhærdningsbuffer som vist i
2. Tabel .

Klargør et større volumen af fortyndet sekventeringsprimer end det, der skal bruges til det samlede antal prøver, som skal sekventeres (det samlede antal prøver + én ekstra).

Du må ikke fortynde og gemme mere sekventeringsprimer, end du skal bruge.

Tabel 8. Eksempel på fortynding af sekventeringsprimere

Komponent	Volumen/prøve (µl)	Volumen til 9 + 1 reaktioner (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 eller Seq Primer KRAS 117 eller Seq Primer KRAS 146 eller Seq Primer NRAS 12/13 eller Seq Primer NRAS 59 eller Seq Primer NRAS 61 eller Seq Primer NRAS 117 eller Seq Primer NRAS 146	0.8	8
Volumen i alt	25	250

3. Tilsæt 25 µl fortyndet sekventeringsprimer i hver brønd på PyroMark Q24-pladen i henhold til kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 19).

Lad én af PyroMark Q24-pladeholderne (leveres med PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen) være ved stuetemperatur (15-25 °C), og brug den som underlag under klargøring og flytning af pladen.

4. Tænd for vakuumpumpen på PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen.
5. Anbring PCR-pladen fra protokol 3 og PyroMark Q24-pladen på vakuumarbejdsstationen (Figur 3).

Inspicer PCR-pladen, og kontrollér, at der er Sepharose-kugler i opløsningen. Kontroller, at PCR-pladen vender samme vej, som da prøverne blev isat.



Figur 3. Placering af PCR-plade og PyroMark Q24-plade på vakuumarbejdsstationen.

6. Sæt vakuum på værktøjet ved at tænde for vakuumpumpe.
7. Sænk vakuumpærktøjets filterprober langsomt ned i PCR-pladen for at opfange kuglerne, der indeholder immobiliseret skabelon. Hold proberne på plads i 15 sekunder. Vær forsigtig, når vakuumpærktøjet løftes.

Bemærk: Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Opfangning af kuglerne skal ske umiddelbart efter omrystning. Hvis der er gået mere end 1 minut, siden pladen blev rystet, skal den rystes igen i 1 minut, før kuglerne opfanges.

Inspicer PCR-pladen for fuldstændig optagelse af alle prøver af vakuumpærktøjet.

8. Overfør vakuumpærktøjet til beholderen med 40 ml 70 % ethanol (**beholder 1; Figur 3**). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
9. Overfør vakuumpærktøjet til beholderen med 40 ml denatureringsopløsning (**beholder 2; Figur 3**). Skyl filterproberne i 5 sekunder.

10. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 50 ml vaskebuffer (**beholder 3; Figur 3**). Skyl filterproberne i 10 sekunder.
11. Løft vakuumværktøjet op og tilbage over en lodret vinkel på 90° i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (Figur 4).



Figur 4. Illustration af vakuumværktøjet, der er løftet til over en lodret vinkel på 90°.

12. Hold vakuumværktøjet over PyroMark Q24-pladen, og sluk for vakuumpummen.
13. Frigør kuglerne i PyroMark Q24-pladen ved at sænke filterproberne ned i den fortyndede sekventeringsprimer og bevæge vakuumværktøjet forsigtigt fra side til side.
Bemærk: Pas på ikke at beskadige overfladen på PyroMark Q24-pladen ved at ridse den med filterproberne.
14. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med rektificeret vand (**beholder 4; Figur 3**), og ryst vakuumværktøjet i 10 sekunder.
15. Vask filterproberne ved at sænke proberne ned i beholderen med rektificeret vand (**beholder 5; Figur 3**) og anvende vakuum. Skyl filterproberne med 70 ml rektificeret vand.
16. Løft vakuumværktøjet op og tilbage over en lodret vinkel på 90° i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (Figur 4).
17. Sluk for vakuumværktøjet, og sæt det i parkeringsstilling (P).

18. Sluk for vakuumpumpen.

Bemærk: Når arbejdsdagen er slut, skal flydende affald og resterende opløsninger kasseres, og PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen skal inspiceres for støv og spild. Se "Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere", side 70.

19. Opvarm PyroMark Q24-pladen med prøverne ved 80 °C i 2 minutter ved hjælp af den foropvarmede PyroMark Q24-pladeholder.

20. Fjern PyroMark Q24-pladen fra den varme pladeholder, og anbring den på den anden PyroMark Q24-pladeholder, som blev opbevaret ved stuetemperatur (15-25 °C), for at lade prøverne køle af til stuetemperatur i 10-15 minutter.

Fortsæt straks til "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 32.

Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet

Denne protokol beskriver klargøring og isætning af PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-beholderen samt start og afslutning af en kørsel på PyroMark Q24. Detaljeret information om opsætning af en kørsel findes i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

Vigtige anvisninger før start

- Rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), der findes i menuen "Tools" (Funktioner) (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 19), indeholder information om den mængde nucleotider, enzym og substratbuffer, som er nødvendig til en bestemt kørsel.
- Isæt beholderen med engangsspidser (uden hydrofobiske filtre) for at sikre, at beholderen fungerer korrekt.

Procedure

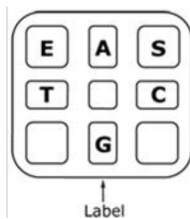
1. Opløs de frysetørrede enzym- og substratblandinger i 620 µl vand (H₂O, medfølger).
2. Bland ved at slynge hætteglasset forsigtigt rundt.

Bemærk: Må ikke vortexes!

For at sikre, at blandingen er helt opløst, skal blandingen stå ved stuetemperatur (15-25 °C) i 5-10 minutter. Sørg for, at opløsningen ikke er uklar, før PyroMark Q24-beholderen fyldes op. Hvis reagenserne ikke skal bruges med det samme, skal reagenshætteglassene lægges på is eller sættes i køleskab.

3. Lad reagenserne og PyroMark Q24-beholderen nå stuetemperatur (20-25 °C).
4. Anbring PyroMark Q24-beholderen, så etiketten vender ind mod dig.
5. Isæt PyroMark Q24-beholderen med de korrekte mængder nucleotider samt enzym- og substratblandinger som vist i Figur 5.

Sørg for, at der ikke overføres nogen luftbobler fra pipetten til beholderen.



Figur 5. Illustration af PyroMark Q24-beholderen set oppefra.

Forklaringerne svarer til etiketten på reagenshætteglassene. Tilføj enzymblanding (E), substratblanding (S) og nucleotider (A, T, C, G) i overensstemmelse med den volumeninformation, der er oplyst i rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), som findes i menuen "Tools" (Funktioner) ved kørselsopsætningen.

6. Åbn beholderåbningen, og isæt den fyldte reagensbeholder. Etiketten skal vende udad. Skub beholderen helt ind, og tryk den derefter nedad.
7. Kontrollér, at linjen er synlig foran beholderen, og luk lågen.
8. Åbn pladeholderrammen, og sæt pladen på varmeblokken.
9. Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.
10. Sæt USB-nøglen (med kørselsfilen) i USB-porten på instrumentets forside.
Tag ikke USB-nøglen ud, før kørslen er afsluttet.
11. Vælg "Run" (Kør) i hovedmenuen (ved hjælp af skærmknapperne ▲ og ▼), og tryk på "OK".
12. Vælg kørselsfilen ved hjælp af skærmknapperne ▲ og ▼.
For at se indholdet af en mappe markeres mappen, og der trykkes på "Select" (Vælg).
For at vende tilbage til det foregående billede trykkes på "Back" (Tilbage).
13. Når kørselsfilen er valgt, trykkes på "Select" (Vælg) for at starte kørslen.
14. Når kørslen er afsluttet, og instrumentet bekræfter, at kørselsfilen er gemt på USB-nøglen, trykkes på "Close" (Luk).
15. Fjern USB-nøglen.

16. Åbn instrumentlåget.

17. Åbn beholderåbningen, og tag reagensbeholderen ud ved at løfte den op og trække den ud.

18. Luk lemmen.

19. Åbn den ramme, der holder pladen, og tag pladen ud fra varmeblokken.

20. Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.

21. Kassér pladen, og rengør beholderen i henhold til instruktionerne i produktarket til beholderen.

Analysér kørslen i henhold til "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel"

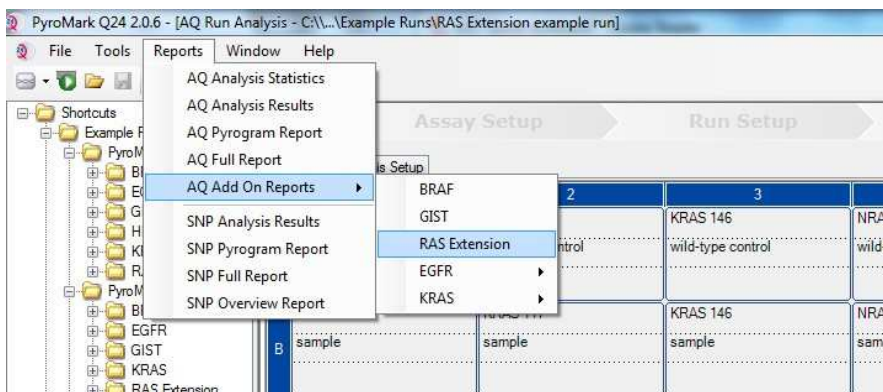
Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel

Denne protokol beskriver mutationsanalysen for en afsluttet *therascreen* RAS Extension Pyro-kørsel ved hjælp af PyroMark Q24-softwaren.

Procedure

1. Sæt USB-nøglen med den behandlede kørselsfil i USB-porten på computeren.
2. Flyt kørselsfilen fra USB-nøglen til den ønskede placering på computeren ved hjælp af Windows Stifinder.
3. Åbn kørselsfilen i AQ-tilstand i PyroMark Q24-softwaren ved enten at vælge "Open" (Åbn) i menuen "File" (Filer) eller dobbeltklikke på filen (✓) i genvejsbrowseren.
4. Brug RAS Extension-plug-in'en Report til at oprette en plug-in-rapport, og vælg "AQ Add On Reports/RAS Extension" (AQ-tilføjelsesrapporter/RAS Extension) i "Reports" (Rapporter) i menuen (se).

Bemærk: Mutationer i KRAS-codon 61 skal derudover analyseres med den separate KRAS-plug-in ved at vælge "AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61" (AQ-tilføjelsesrapporter/KRAS/Codon 61) i "Reports" (Rapporter) i menuen (se).



Figur 6. Menuen med RAS Extension-plug-in'en Report.

Brøndene analyseres automatisk for samtlige mutationer, hvor der er angivet en LOD i Tabel 9. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer. Resultaterne præsenteres i en oversigtstabel (se

) efterfulgt af de detaljerede resultater, som inkluderer pyrogrammer og analysekvalitet.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	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. Rapport for RAS Extension-plug-in'en

5. Sådan bruges AQ-analysen:

Klik på en af analyseknapperne for at analysere kørslen og få et overblik over resultaterne.



Analysér alle brønde.

Analysér den markerede brønd.

Analyseresultaterne (allelefrekvenser) og kvalitetsvurderingen vises over den variable position i Pyrogram-springen. Yderligere oplysninger om analyse af en kørsel findes i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

Vælg "AQ Full Report" (Fuld AQ-rapport) eller "AQ Analysis Results" (AQ-analyseresultater) i menuen "Reports" (Rapporter) for at oprette en rapport.

Bemærk: For at opnå pålidelige resultater anbefaler vi enkelte spidshøjder på over 30 RLU. "Required peak height for passed quality" (Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) skal indstilles til 30 RLU under analyseopsætningen, og sørg for, at reduktionsfaktoren for A-spidsen er indstillet til 0,86 for analyse af NRAS codon 61 (se "Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser", side 64 og *PyroMark Q24-brugervejledningen*).

Brug rapporten "AQ Analysis Results" (AQ-analyseresultater) til dokumentation og fortolkning af allekvanificering. De viste antal i pyrogrammet er afrundede og viser ikke den nøjagtige kvantificering.

Bemærk: Pyrogrammet skal altid sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. De målte spidser skal svare til højden af søjlerne i histogrammet. Se også side 40 "Fortolkning af resultater".

Ny analyse af prøver, hvor der ikke blev påvist mutationer med standard-kvalitetsvurderingen "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) eller med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt).

Standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), som beskrevet i analyseopsætningen, behandler de mest hyppige punktmutationer i *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser.

Vi anbefaler på det kraftigste, at alle prøver, hvor der ikke blev påvist mutationer med standardindstillingen "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), samt prøver, hvor kvalitetsvurderingen endte med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt), analyseres manuelt igen. Kvalitetsvurderingerne "Check" (Kontrollér) og "Failed" (Ikke godkendt) kan indikere, at der er en mutation, som der ikke fokuseres på med standardindstillingen "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), hvilket resulterer i uventede referencespidser.

Analysen kan gentages og målrettes andre mutationer ved at gå til "Analysis Setup" (Analyseopsætning) og ændre "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) til varianter, der er beskrevet i Tabel 14 og

i bilag A, eller varianter af andre sjældne eller uventede mutationer. Klik på "Apply" (Anvend), og klik derefter på "To All" (På alle), når vinduet "Apply Analysis Setup" (Anvend analyseopsætning) vises.

Opdaterede hyppigheder for mutationer i de humane KRAS- og NRAS-gener er gjort tilgængelige online af Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Bemærk: Kontrollér, at tærskelværdien for den enkelte spidshøjde er indstillet til 30 RLU efter ændring af "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), og sørg for, at A-spidsen er indstillet til 0,86 for analyse af NRAS codon 61 (se "Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser").

Bemærk: Der kan være yderligere sjældne eller uventede mutationer i den sekventerede region og disse kan analyseres ved hjælp af den alternative "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) med hensyntagen til uventede mutationer.

Bemærk: I tilfælde af at de målte spidser ikke svarer til højden af søjlerne i histogrammet, og dette ikke kan forklares med sjældne eller uventede mutationer, kan resultatet ikke bruges som basis for en vurdering af mutationsstatus. Det anbefales at køre prøven igen.

Fortolkning af resultater

Fortolkning af analyseresultater og påvisning af lavniveau-mutationer

Medtag en prøve af kontrol-DNA'et til hver analyse i hver enkelt pyrosekventeringskørsel. Dette er nødvendigt for korrekt fortolkning af resultaterne og identifikation af lave mutationsniveauer og som en kontrol af baggrunds niveauer. Den målte hyppighed for kontrolprøven skal være lavere end eller lig med tomgrænsen (LOB). De værdier af LOB (tomgrænse) og LOD (påvisningsgrænse), der er angivet i håndbøgerne, kan bruges ved bestemmelse af tilstedeværelsen af en mutation. Disse værdier blev opnået ved hjælp af plasmidblandinger, der bærer vildtypen eller den relevante mutantsekvens.

Efter en analyse med PyroMark Q24-softwaren eller Plug-In'en Reports viste der sig at være 3 mulige resultater. Se LOD-data i Tabel .

- Mutationshyppighed $< \text{LOD}$: Mutationen blev ikke registreret
- Mutationshyppighed $> \text{LOD} + 3$ procentenheder: Mutation
- Mutationshyppighed $\geq \text{LOD}$ og $\leq \text{LOD} + 3$ procentenheder: Potentiel lavniveau-mutation

Bemærk: Hvis RAS Extension Plug-In'en Report anvendes (se trin 5 i "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel)

Området fra LOD til LOD + 3 procentenheder giver mulighed for sensitiv påvisning af lavniveau-mutationer under optimale forhold. En målt hyppighed over LOB i den umethylerede kontrolprøve antyder et højere baggrunds niveau end normalt i den pågældende kørsel, hvilket kan påvirke allele-kvantificeringen især i tilfælde af lave mutationsniveauer. Resultater med advarslen "Potential low level mutation" (Potentiel lavniveau-mutation) skal derfor evalueres omhyggeligt.

Prøver med en rapporteret potentiel lavniveau-mutation må kun betragtes som positive for mutationen, hvis de kan bekræftes ved at gentage kørslen i duplikeret form sammen med det umethylerede kontrol-DNA. Resultatet af begge duplikater skal rapportere den samme

mutation med værdier \geq LOD, og kontrolprøven skal rapportere "No mutation detected" (Ingen mutation påvist). I modsat fald skal prøven vurderes som "No mutation detected" (Ingen mutation påvist).

En forøget baggrund for en mutation kan påvises ved at sammenligne de LOB-værdier, der er angivet i håndbogen, med de målinger, der opnås med det umethylerede kontrol-DNA. Prøver med en rapporteret potentiel lavniveau-mutation kan vurderes som "Mutation not detected" (Mutationen ikke påvist) uden gentagelse, hvis den målte hyppighed for det umethylerede kontrol-DNA er højere end den LOB-værdi, der er angivet i håndbogen, for den relevante mutation. Der er derfor 3 forskellige mulige scenarier med rapporterede potentielle lavniveau-mutationer.

1. Målingshyppighed med umethyleret kontrol-DNA $>$ LOB for denne mutation: Prøven kan vurderes som "Mutation not detected" (Mutationen ikke påvist) uden gentagelse.
2. Der kunne ikke reproducere identiske resultater i duplikeret form: Vurder prøven som "Mutation not detected" (Mutationen ikke påvist).
3. Samme resultater er gengivet i duplikeret og umethyleret kontrol-DNA $<$ LOB for den relevante mutation: Mutation påvist.

Bemærk: Pyrogrammet skal altid sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. De målte spidser skal svare til højden af søjlerne i histogrammet. Pyrogrammer skal undersøges for forekomsten af uventede spidser. Hvis de målte spidser ikke svarer til højden af søjlerne i histogrammet, og dette ikke kan forklares med sjældne eller uventede mutationer, anbefales det at køre prøven igen. Det mislykkede resultat kan ikke bruges som udgangspunkt for vurdering af mutationsstatus. For en gyldig mutation er en ændring i spidshøjden altid relateret til en tilsvarende ændring i højden på en anden spids. En ændring i højden på en enkelt spids skal ikke vurderes som indikation af en mutation.

Bemærk: Det anbefales, at bruge RAS Extension Plug-In'en Report til fortolkning af resultaterne. Med henblik på en nærmere undersøgelse af prøver med en rapporteret, potentiel lavniveau-mutation, anbefaler vi, at prøven yderligere analyseres manuelt i applikationens software (f.eks. for at sammenligne med kontrolprøvens mutationshyppighed).

Bemærk: Beslutninger om behandling af cancerpatienter må aldrig baseres udelukkende på KRAS- og NRAS-mutationsstatus.

Tabel 9. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	LOB (procent- enheder)	LOD (procent- enheder)	COSMIC-id* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574

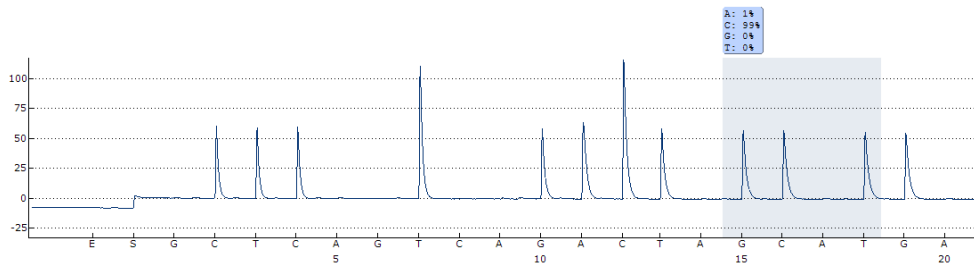
Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	LOB (procent- enheder)	LOD (procent- enheder)	COSMIC-id* (V70)
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS codon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online hos Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

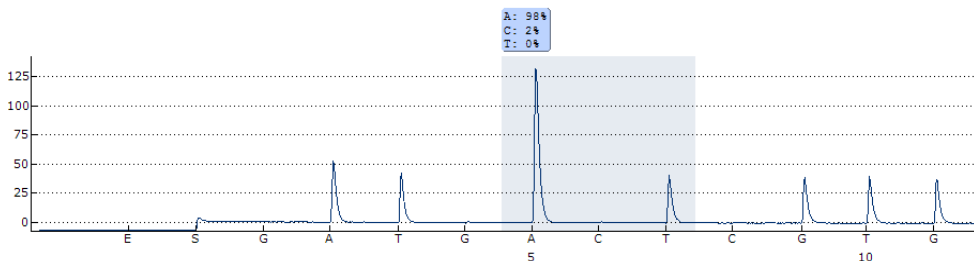
† Laveste mutationsniveau i en prøve, der resulterer i en målt hyppighed \geq LOD.

Repræsentative resultater

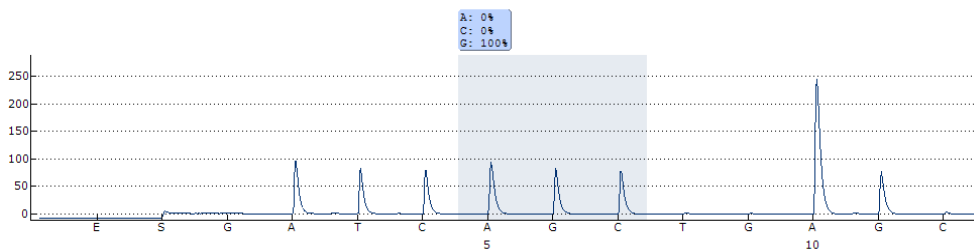
Figur 8 til Figur 15 viser repræsentative pyrogramresultater.



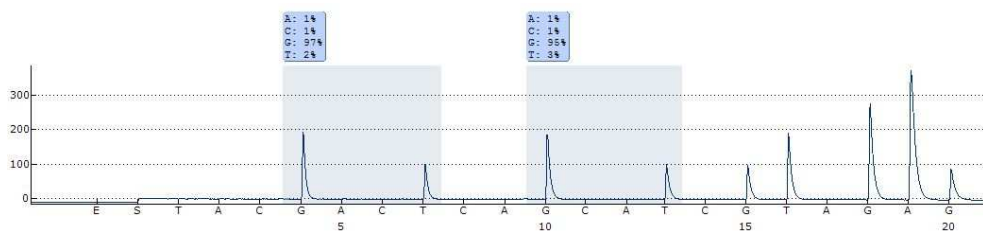
Figur 8. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype genotype med KRAS 59/61-analysen.



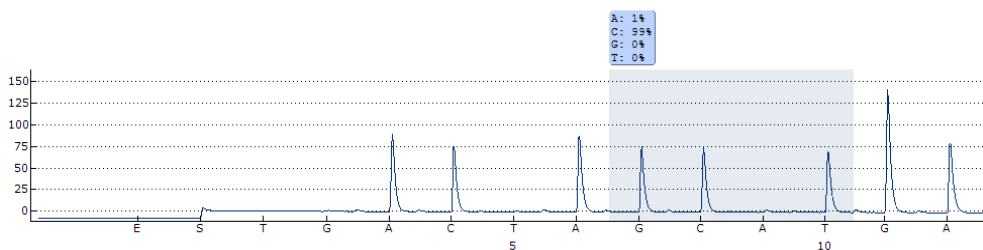
Figur 9. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med KRAS 117-analysen.



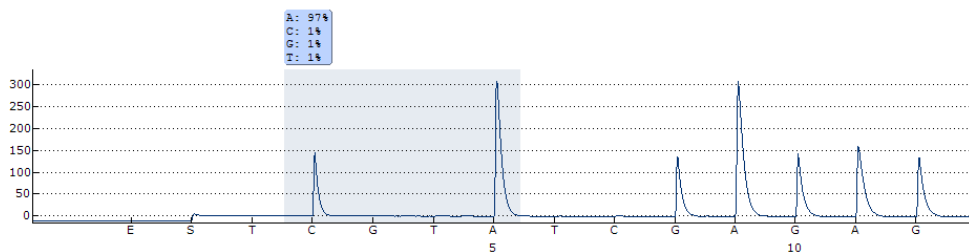
Figur 10. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med KRAS 146-analysen.



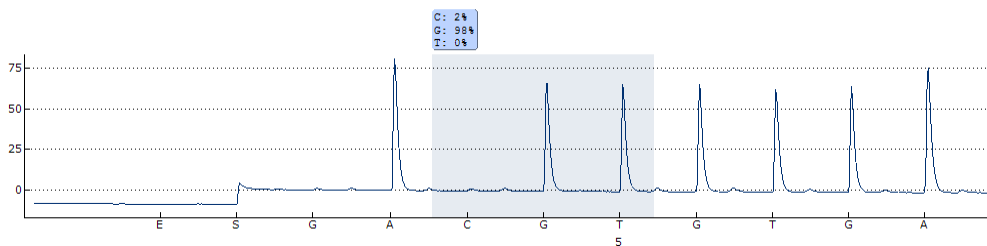
Figur 11. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med NRAS 12/13-analysen.



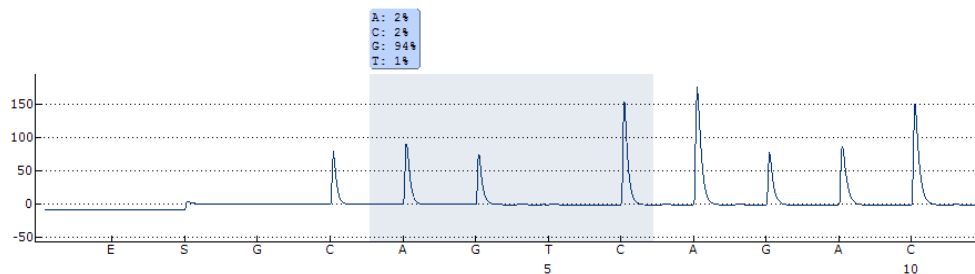
Figur 12. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med NRAS 59-analysen.



Figur 13. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med NRAS 61-analysen.



Figur 14. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med NRAS 117-analysen.



Figur 15. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en vildtype genotype med NRAS 146-analysen.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vores Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENS tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Resultatet var "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt)

- a) Lav spidshøjde
- Håndteringsfejl under PCR-opsætningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekventering kan resultere i lave spidser.
- Det er vigtigt, at prøverne optages helt af vakuumværktøjet. Sørg for, at vakuumværktøjet sænkes langsomt i prøverne, og at geometrien for den PCR-plade eller strips, der anvendes til immobilisering, gør det muligt at optage prøverne helt.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen* med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, når det er påkrævet.
- I tilfælde af en "Check"-advarsel skal pyrogrammet omhyggeligt sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. Hvis de målte spidser svarer til højden på søjlerne i histogrammet, er resultatet gyldigt. I modsat fald anbefales det at køre prøven igen.
- b) Mutation ikke defineret i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres)
- Juster den sekvens, der skal analyseres, i analyseopsætningen (se "Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser", side 64), og analysér kørslen igen. Mutationer, som ikke er omfattet af "Sequences to Analyze" (Sekvenser, der skal analyseres), kan identificeres med mønstersimulationsværktøjet.
- c) Uventet, sjældent mutation
- Hvis kvalitetsvurderingen ender med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt), kan det skyldes et uventet spidsmønster. Dette kan indikere en uventet mutation, der ikke analyseres med den angivne "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres). Sådanne prøver bør analyseres manuelt ved hjælp af den alternative "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) med hensyntagen til uventede mutationer. Mutationer, som ikke er omfattet af "Sequences to Analyze" (Sekvenser, der skal analyseres), kan identificeres med mønstersimulationsværktøjet.

Kommentarer og forslag

- d) Advarsel om store afvigelser af spidshøjder ved dispensering
- Pyrogrammet skal omhyggeligt sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. Hvis de målte spidser ikke svarer til histogram søjlernes højde, og dette ikke kan forklares med sjældne mutationer, anbefales det at køre prøven igen.

Høj baggrund

- a) Nucleotider opbevaret forkert
- Nucleotider skal opbevares ved 2-8 °C. Opbevaring ved -15 °C til -25 °C kan give anledning til en forøgelse af baggrunden.
- b) Kort afkølingstid for prøver forud for pyrosekventeringsanalyse
- Lad prøverne stå på en PyroMark Q24-pladeholder ved stuetemperatur i 10-15 minutter. Undgå at afkorte nedkølingstiden.
- c) Kontaminering af beholder
- Sørg for at gøre beholderen grundigt ren som beskrevet i produktarket. Opbevar beholderen beskyttet mod lys og støv.

Der er ingen signaler i den positive kontrol (umethyleret kontrol-DNA)

- a) Utilstrækkelig enzym- eller substratblanding i alle brønde
- PyroMark Q24-beholderen skal fyldes i henhold til "Pre Run Information" (Information før kørsel) i menuen "Tools" (Funktioner).
- b) Reagenser opbevaret eller fortyndet forkert
- Forbered reagenserne i henhold til instruktionerne i "Opbevaring og håndtering af reagenser" på side 16 og "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet" på side 32.
- c) Mislykket PCR eller prøveklargøring
- Sørg for at gøre beholderen grundigt ren som beskrevet i produktarket. Opbevar beholderen beskyttet mod lys og støv.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

Denne test er udviklet til at påvise 37 mutationer i KRAS- eller NRAS-generne. Prøver med resultater som "No Mutation Detected" (ingen mutation påvist) kan indeholde KRAS- eller NRAS-mutationer, der ikke påvises af analysen.

Påvisning af mutationer afhænger af prøvens integritet og mængden af amplificerbart DNA, der findes i prøven.

therascreen RAS Extension Pyro-kittet anvendes i en procedure, der indeholder en polymerasekædereaktion (PCR). Som med alle PCR-procedurer kan prøver være kontaminerede med eksterne kilder til DNA i testmiljøet og DNA'et i den positive kontrol. Udvis forsigtighed for at undgå kontaminering af prøver og reaktionsblandingsreagenser.

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

Brugsegenskaber

Tomgrænse og påvisningsgrænse

Tomgrænsen (LOB) og påvisningsgrænsen (LOD) er fastlagt for en række mutationer ved hjælp af blandinger af plasmider (Tabel 7). LOB og LOD blev bestemt i henhold til anbefalingerne i *CLSI's (Clinical and Laboratory Standards Institute) retningslinje EP17-A2 "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline"*. α - og β -fejl (hvv. falsk-positiv- og falsk-negativ-fejl) blev indstillet til 5 %. LOB-værdierne repræsenterer den målte hyppighed, der opnås med en vildtypeprøve. LOD-værdierne repræsenterer det laveste signal (målt hyppighed), der kan betragtes som positivt for den pågældende mutation.

Table 7. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	LOB (procent- enheder)	LOD (procent- enheder)	COSMIC-id* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	LOB (procent- enheder)	LOD (procent- enheder)	COSMIC-id* (V70)
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS codon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online hos Sanger Institutes websted på

† Laveste mutationsniveau i en prøve, der resulterer i en målt hyppighed \geq LOD.

Mutationerne GGT > TGT og GGT > GTT i NRAS-codon 13

For disse mutationer var tomme målinger for de fleste 0 procentenheder, hvilket resulterede i en ikke-gaussiansk fordeling. LOD blev derfor fastlagt ved hjælp af en anden metode i henhold til anbefalingerne i CLSI's retningslinje EP17-A. Det laveste signal, der indikerer tilstedeværelsen af en mutation (LOD) i denne position, blev angivet til 2 procentenheder over det respektive baseline-niveau som defineret af 95-percentilen for tomme målinger.

Under analyse af en prøve med et mutationsniveau, der er oplyst i kantede parenteser i tabel 9, gav 95 % af resultaterne (n=72) et signal, der kan betragtes som positivt (\geq LOD). Se LOB/LOD i Tabel .

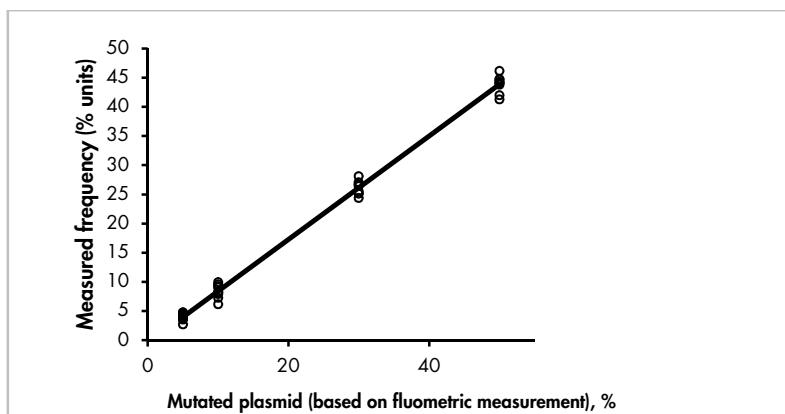
Bemærk: PCR- og pyrosekventeringsprimere til NRAS-codon 12, 13 og 61 tages uden ændringer fra *therascreen* NRAS Pyro-kittet (katalognr. 971530). Ydelsesdata for disse NRAS-codon-koder forbliver uændrede.

Linearitet

Lineariteten blev bestemt ved hjælp af plasmidblandinger, der bar vildtypen eller mutantsekvensen for mutationerne 176C>G i KRAS-codon 59, 351A>T i KRAS-codon 117, 436G>C i KRAS-codon 146, 34G>A i NRAS-codon 12, 37G>A i NRAS-codon 13, 175G>A i NRAS-codon 59, 182A>G i NRAS-codon 61, 351G>C i NRAS-codon 117 og 437C>T i NRAS-codon 146. Disse plasmider blev blandet i forhold, der gav 4 mutationsniveauer (5, 10, 30 og 50 %). Hver af blandingerne blev analyseret med 3 forskellige lot af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet i 3 pyrosekventeringskørsler hver med 3 replikater.

Resultaterne (n=9 for hvert mutationsniveau) blev analyseret i henhold til CLSI's retningslinje EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" ved hjælp af softwaren Analyse-it® v2.21. Resultaterne er vist i Figur 16.

Resultaterne var lineære inden for en tilladt nonlinearitet på 5 procentenheder over analyseområdet for mutationsniveauet fra 5 til 50 %. Lignende resultater blev opnået for alle dækkede mutationer i KRAS-codon 59, 117, 146 og NRAS-codon 12, 13, 59, 61, 117 og 146.



Figur 16. Linearitet i mutationen 176C>G i KRAS-codon 59.

Lignende resultater blev opnået for alle dækkede mutationer i KRAS-codon 59, 117, 146 og NRAS 12, 13, 59, 61, 117 og 146.

Præcision

Data for præcision gør det muligt at bestemme analysernes samlede variabilitet, og blev opnået på 3 forskellige niveauer ved at analysere ovennævnte plasmidblandinger hver med 3 replikater.

Reperbarhed (variabilitet inden for samme analyse og mellem batches) blev beregnet på basis af data til bestemmelse af linearitet (3 kørsler på samme dag med forskellige lot af *therascreen* RAS Extension Pyro-kit). Laboratorienøjagtigheden (variabilitet mellem laboratorier) blev bestemt over 3 kørsler i ét laboratorium på 3 forskellige dage. Kørslerne blev udført af forskellige operatører ved hjælp af PyroMark Q24-instrumenter samt mange *therascreen* RAS Extension Pyro-kit. Reproducerbarheden (variabilitet mellem laboratorier) blev beregnet ud fra 2 kørsler i to forskellige laboratorier ved hjælp af forskellige *therascreen* RAS Extension Pyro-kitlot.

Den estimerede præcision udtrykkes som standardafvigelse i forhold til de målte mutationshyppigheder i procentenheder (Tabel 8).

Tabel 8. Præcision af mutationer*

% muteret plasmid†	Repeterbarhed		Laboratoriønsjagtighed		Reproducerbarhed	
	Gns.	SD	Gns	SD	Gns	SD
176C>G in KRAS codon 59						
5	4.0	0.7	3.8	0.6	4.2	1.1
10	8.4	1.2	8.5	1.0	8.4	1.4
30	26.1	1.2	26.3	1.1	26.8	1.2
50	43.9	1.5	44.0	0.7	43.7	1.3
351A>T in KRAS codon 117						
5	5.5	1.6	5.5	2.2	7.1	2.0
10	11.0	1.7	10.8	1.4	12.5	2.9
30	30.6	1.7	30.6	2.0	31.9	2.7
50	52.8	2.0	53.5	1.3	54.5	1.6
436G>C in KRAS codon 146						
5	4.2	0.6	4.1	0.5	3.7	1.2
10	9.6	0.9	9.1	0.9	8.6	1.3
30	29.0	0.9	28.8	1.0	28.1	1.1
50	47.5	1.5	46.8	0.7	45.6	1.9
34G>A in NRAS codon 12†						
5	7.5	1.2	7.3	1.0	6.7	1.3
10	14.6	1.3	13.5	1.1	13.7	1.3
30	37.8	1.9	37.9	1.5	36.1	2.9
50	59.8	1.7	60.4	2.0	57.5	3.1
175G>A in NRAS codon 59						
5	7.8	0.9	7.3	0.5	7.1	1.3
10	11.9	1.0	11.6	2.0	12.5	1.7
30	29.5	1.1	29.6	1.2	29.9	1.9
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4

% muteret plasmid [†]	Repeterbarhed		Laboratorienøjagtighed		Reproducerbarhed	
	Gns.	SD	Gns	SD	Gns	SD
182A>G in NRAS codon 61						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
351G>C in NRAS codon 117						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
437C>T in NRAS codon 146						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

* Alle værdier er anført som procentenheder. SD: standardafvigelse (n=9 for repeterbarhed og laboratoriepræcision, n=12 for reproducerbarhed).

† Baseret på fluometrisk måling for 34G>A i NRAS-codon 12 baseret på OD₂₆₀.

Diagnostisk evaluering

therascreen RAS Extension Pyro-kittet blev evalueret ved sammenligning med Sanger-sekventering i 2 forskellige undersøgelser.

En indledende undersøgelse blev tidligere udført for at evaluere *therascreen* NRAS Pyro-kittet ved sammenligning med Sanger-sekventering. DNA blev ekstraheret fra 100 formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) tumorprøver fra knoglemarv og analyseret for mutationer i codon 12/13 og codon 61.

Da analyser, som dækker NRAS-codon 12/13 og 61 i *therascreen* NRAS Pyro-kittet, er inkluderet i *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet uden ændringer, vises resultaterne fra evalueringen af *therascreen* NRAS Pyro-kittet.

I den anden undersøgelse blev DNA ekstraheret fra 110 formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) mCRC-tumorprøver og analyseret for mutationer i codon 59, 61, 117 og 146 i det humane KRAS-gen samt codon 59, 117 og 146 for de humane NRAS-gener. Lave frekvensmutationer blev analyseret ved hjælp af plasmid-DNA, som blev tilsat vildtype FFPE DNA.

I begge undersøgelser blev DNA isoleret ved hjælp af QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet og derefter analyseret ved hjælp af analyser, som er inkluderet i *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet på PyroMark Q24. Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer udførte Sanger-sekventering.

Evaluering af NRAS-codon 12, 13 og 61

Ud af 100 prøver, der blev analyseret med Sanger-sekventering, kunne mutationsstatussen bestemmes i 97 prøver for både codon 12/13 og codon 61. I 4 af de 100 prøver blev en mutation i codon 12 eller codon 13 påvist med Sanger-sekventering.

I 2 ud af de 100 prøver blev mutationsstatussen reproduceret ved hjælp af *therascreen* NRAS Pyro-kittet, og ingen mutation blev påvist. Resultaterne er opsummeret i **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke..** Der påvistes ingen mutationer i codon 61.

Ved udeladelse af prøver, der mislykkedes i én eller begge metoder, viste *therascreen* NRAS Pyro-kittet og Sanger-sekventering 98 % og 100 % overensstemmelse i resultaterne for henholdsvis codon 12/13 og codon 61. Se **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke..**

Tabel 9. Resultater af de analyserede prøver for NRAS 12, 13 og 61

		Sanger-sekventering				I alt
		Mutant i codon 12/13	Mutant i codon 61	Vildtype	Ukendt	
therascreen NRAS Pyro Kit	Mutant i codon 12/13	2	–	–	–	2
	Mutant i codon 61	–	–	–	–	–
	Vildtype	2	–	90	3	95
	Ukendt	–	–	3	–	3
	I alt	4	–	93	3	100

Evaluering af KRAS-codon 59, 61, 117, 146 og NRAS-codon 59, 117, 146

DNA blev ekstraheret fra 110 formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) mCRC-tumorprøver og analyseret for mutationer i codon 59, 61, 117 og 146 i det humane KRAS-gen samt codon 59, 117 og 146 for det humane NRAS-gen. På grund af forventet lav forekomst i kliniske prøver blev alle mutationer, som var omfattet af *therascreen* RAS Extension-kittet, analyseret i 56 ekstra prøver ved hjælp af plasmid-DNA, som blev tilsat i vildtype FFPE DNA. Alle mutationer blev fundet ved både pyro- og Sanger-sekventering.

Ud af de 166 analyserede prøver blev der fundet samstemmende resultater for 137 prøver (83 %) mellem *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet og Sanger-sekventering.

Afvigende sager kan forklares ud fra flere faktorer.

På grund af et højt baggrundssignal mislykkedes 20 prøver af NRAS 59 Sanger-sekventeringsanalysen.

Sanger-sekventering påviste ingen mutationer i KRAS 59 og KRAS 61 i henholdsvis 1 og 3 prøver. Alle 4 mutationer havde lave frekvensresultater fra pyrosekventering (7,5 %-13,1 %). Dette kan forklares med den lavere følsomhed i Sanger-sekventering (15-20 %) sammenlignet med pyrosekventering (5 %) (2). Alle andre gyldige prøver var vildtype for begge teknikker

Én prøve er blevet vurderet som ukendt for pyrosekventering på grund af en dobbelt mutationspåvisning (KRAS 59-61).

Fire prøver med tilsat plasmid-DNA viste en ekstra A>G-mutation ved KRAS-kodningssekvensens position 350, hvilket ikke er omfattet af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet. Mutationer blev påvist ved hjælp af manuel analyse.

Tablet 10. Resultater af de analyserede prøver for KRAS-codon 59, 61, 117, 146 og NRAS-codon 59, 117, 146

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	wt	Ukendt	I alt	
therascreen RAS Extension Pyro Kit	KRAS 59	8	–	–	–	–	–	1	9	
	KRAS 61	–	6	–	–	–	2	1	9	
	KRAS 117	–	–	4	–	–	–	–	4	
	KRAS 146	–	–	–	3	4	–	–	7	
	KRAS ^a	–	–	–	–	16	–	–	16	
	NRAS ^b	–	–	–	–	–	28	–	28	
	wt	–	–	–	–	–	–	71	16	87
	Ukendt	1	–	–	–	–	–	3	2	6
	I alt	9	6	4	3	20	28	76	20	166

VT: Vildtype

^a KRAS spiked samples carrying both KRAS 117 and 146 mutations.

^b NRAS spiked samples carrying mutation for NRAS 59, 117 and 146.

* One sample was detected mutant for KRAS 146 but showed an invalid result for NRAS 117.

Følsomheden og specificiteten i analyserne pr. codon er beskrevet i Tabel 11.

Tabel 12. Følsomheden og specificiteten i analyser for KRAS-codon 59, 61, 117, 146 og NRAS-codon 59, 117 og 146

	Følsomhed	Specificitet	Mutation omfattet
Mutation KRAS 59	100%	99%	175G>A / 176C>G
Mutation KRAS 61	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Mutation KRAS 117	100%	100%	351A>C / 351A>T
Mutation KRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Mutation NRAS 59	100%	100%	175G>A / 176C>G
Mutation NRAS 117	100%	100%	351G>C / 351G>T
Mutation NRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T

Bemærk: I samtlige kørsler, der blev brugt til bestemmelse af ydelseskarakteristika, var signalet over 30 RLU, der rutinemæssigt kan opnås med 10 ng DNA isoleret fra formalinfikseret, paraffinindstøbt (FFPE) væv. Pyrosekventeringsdataene blev analyseret ved hjælp af RAS Extension-plug-in'en Report til KRAS-codon 59, 117 146 og NRAS-codon 59, 117 og 146.













Referencer

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. **369**, 1023.

2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> reaktioner
	Anvendes inden
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lot-nummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Globalt varenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent

Symbol

Symboldefinition



Se de informationer, der er angivet i håndbogen



Forsigtig



Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> reaktioner

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på **www.qiagen.com/Support**, ring på 00800-22-44-6000, eller kontakt en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg **www.qiagen.com**).

Bilag A: Opsætning af *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser

Hvis RAS Extension Plug-in Report er blevet installeret, er der adgang til prædefinerede analyseopsætninger for KRAS-codon 59/61, 117 og 146 samt NRAS-codon 12/13, 59, 61, 117 og 146 i genvejsbrowseren i PyroMark Q24-softwaren. Følg stien "Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension". I dette tilfælde er det ikke nødvendigt at udføre følgende trin.


RAS Extension Plug-in Report kan hentes fra den relevante katalogside på www.qiagen.com under fanen "Product Resources" i sektionen "Protocol Files".

Vi anbefaler på det kraftigste, at RAS Extension-In'en Report bruges i stedet for manuel analyse.

Efter installation af plug-in'en, og hver gang der installeres eller opgraderes software på computeren, skal det kontrolleres, at plug-in'en fungerer korrekt, som beskrevet i RAS Extension Plug-In Quick Guide.

Hvis RAS Extension Plug-In Report ikke er installeret, skal analysefilen konfigureres manuelt, inden *therascreen* RAS Extension Pyro-analysen køres for første gang. Opret analysen for KRAS-codon 59/61, 117 og 146 samt NRAS-codon 12, 13, 59, 61, 117 og 146 ved hjælp af PyroMark Q24-softwaren som beskrevet nedenfor.

Procedure


1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
2. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** viser "Sequences to Analyze" (Sekvenser, der skal analyseres) for alle otte RAS Extension Pyro-analyser. Indtast den analysespecifikke sekvens i feltet "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).

3. "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) kan også ændres efter kørslen for at analysere, om der er mutationer i forskellige positioner (se "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel" for at kontrollere, om der er mutationer i andre nucleotider, skal "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) ændres i henhold til tabel 15. "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) kan ændres efter kørslen (hvis den ikke er låst).

Bemærk: Kontrollér, at tærskelværdien for enkelt spidshøjde er indstillet til 30 RLU. Desuden skal du sikre, at reduktionsfaktoren for A-spidsen er indstillet til 0,86 for analyse af NRAS codon 61.

4. Indtast den analysespecifikke "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge) fra **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** manuelt.

Bemærk: Knappen "Generate Dispensation Order" (Generer dispensationsrækkefølge) må ikke bruges. Både "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) og "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge) skal indtastes manuelt.

5. Klik på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre), og øg "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Tærskelværdi for spidshøjde – Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet:) til 30.
6. Klik på  i værktøjslinjen, og gem analysen som "KRAS 59/61" eller "KRAS 117" eller "KRAS 146" eller "NRAS 12/13" eller "NRAS 59" eller "NRAS 61" eller "NRAS 117" eller "NRAS 146".

Tabel 13. Analyseopsætning: "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) og "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge) for de otte analyser i *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet

<i>therascreen</i> RAS Extension analyse	Sekvens, der skal analyseres	Dispensationsrækkefølge
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Tabel 14. Almindelige mutationer i det humane KRAS-gen som påvist af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres)

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	Sekvens, der skal analyseres	COSMIC-id* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS codon 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
KRAS codon 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS codon 146 (GCA)			

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	Sekvens, der skal analyseres	COSMIC-id* (V70)
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online på Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Tabel 15. Almindelige mutationer i det humane NRAS-gen som påvist af *therascreen* RAS Extension Pyro-kittet med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres)

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	Sekvens, der skal analyseres	COSMIC-id* (V70)
NRAS codon 12 (GGT)			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	565
NRAS codon 13 (GGT)			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	575
NRAS codon 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACA VCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	–
NRAS codon 117 (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATT	–
351G>T	K117N	ABTGTGATT	–
NRAS codon 61 (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586

Nukleinsyresubstitution	Aminosyresubstitution	Sekvens, der skal analyseres	COSMIC-id* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS codon 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online på Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere



ADVARSEL

Sundhedsfarlige kemikalier

Den denatureringsopløsning, der anvendes sammen med vakuumarbejdsstationen, indeholder natriumhydroxid, som virker irriterende på øjne og hud.

Brug altid sikkerhedsbriller, handsker og en laboratoriekittel.

Den ansvarlige person (for eksempel laboratorielederen) skal træffe de nødvendige forholdsregler for at sikre, at den omgivende arbejdsplads er sikker, og at de, der betjener udstyret, ikke udsættes for sundhedsfarlige niveauer af giftige stoffer (kemiske eller biologiske) som defineret i de relevante sikkerhedsdatablade (SDS'er) eller OSHA*, ACGIH†- eller COSHH‡-dokumenter.

Udluftning af gasser og bortskaffelse af affald skal ske ifølge alle gældende sundheds- og sikkerhedsregler og love.

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Arbejdssikkerheds- og Sundheds-administrationen, USA).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Amerikansk Konference for Statslige Industrihygiejnere, USA).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrol af sundhedskadelige stoffer, Storbritannien).

Sørg for at overholde alle nationale, regionale og lokale miljøbestemmelser for bortskaffelse af laboratorieaffald.

Vigtig anvisning før start

- Denne protokol kræver rektificeret vand.

Procedure

1. Ensure that no vacuum is applied to the vacuum tool. Make sure that the vacuum is closed (Off) and the vacuum pump is turned off.
2. Discard any solutions left in the troughs.
3. Rinse the troughs with high-purity water, or replace them if necessary.
4. Empty the waste container.
5. The cap can be removed without disconnecting the tubing.

Hvis vakuumarbejdsstationen skal rengøres (f.eks. for støv eller spild), følges anvisningerne i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. no.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	Til 24 reaktioner: Sekventeringsprimere, PCR-primere, umethyleret kontrol-DNA, PyroMark PCR-masterblanding, CoralLoad-koncentrat, buffere og reagenser	971590
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekvensering af 24 prøver	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumarbejdsstation til parallel klargøring af 24 prøver fra PCR-produkt til enkeltstrenget skabelon	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Analysesoftware	9019063
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	Sekvensreaktionsplade med 24 brønde	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Beholdere til dispensering af nucleotider og reagenser	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Genanvendelige filterprober til PyroMark-vakuumarbejdsstation Q96 og Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Til installationskontrol af systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Til ydelseskontrol af systemet	979304

Produkt	Indhold	Kat. no.
Related products		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: 50 QIAamp MinElute®-kolonner, proteinase K, buffere og indsamlingsrør (2 ml)	56404

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGENs tekniske service eller den lokale distributør.

Denne side er tom med vilje.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Gruppen); Analyse-it® (Analyse-it Software Ltd); Applied Biosystems®, Variomag® (Thermo Fisher Scientific); Axygen® (Corning Inc.); FrameStar® (4titude Ltd); Milli-Q® (Merck Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); SmartBlock™, ThermoMixer® (Eppendorf AG); Windows® (Microsoft Corporation).

Aftale om begrænset licens til *therascreen* RAS Extension Pyro-kitet

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i panelet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette panel med komponenter, der ikke er inkluderet i dette panel, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogen af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette panel, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette panel og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af panelet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og sagsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med panelet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

Maj-16 HB-1882-DA-002 © 2016 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com