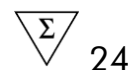


# Håndbok for *therascreen*<sup>®</sup> UGT1A1 Pyro<sup>®</sup>-sett



Versjon 1



Til bruk i in vitro-diagnostikk



971540



1061270NO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1061270NO



## **QIAGEN prøve- og analyseteknologier**

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

### **QIAGEN setter standardene innen:**

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

Målet er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) for mer informasjon.

# Innhold

<b>Tiltenkt bruk</b>	<b>5</b>
<b>Sammendrag og forklaring</b>	<b>5</b>
<b>Prosedyreprinsipper</b>	<b>6</b>
Kontroller	7
<b>Materialer som medfølger</b>	<b>8</b>
Settets innhold	8
<b>Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger</b>	<b>10</b>
Anbefalte platemiksere	11
<b>Advarsler og forholdsregler</b>	<b>11</b>
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	11
<b>Oppbevaring og håndtering av reagenser</b>	<b>12</b>
<b>Oppbevaring og håndtering av prøver</b>	<b>13</b>
<b>Prosedyre</b>	<b>14</b>
Isolering av DNA	14
Protokoller	
■ 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-settet	17
■ 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler	20
■ 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24	22
■ 5: Kjøring av PyroMark Q24	26
■ 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie	29
<b>Tolkning av resultater</b>	<b>30</b>
Feilsøkingsveiledning	32
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>35</b>
<b>Begrensninger</b>	<b>35</b>
<b>Ytelseskarakteristikker</b>	<b>35</b>
Presisjon	35
Diagnostisk vurdering	36

<b>Referanser</b>	<b>38</b>
<b>Symboler</b>	<b>39</b>
<b>Kontaktinformasjon</b>	<b>39</b>
<b>Vedlegg A: Oppsett av <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-analyser</b>	<b>40</b>
<b>Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar</b>	<b>42</b>
<b>Bestillingsinformasjon</b>	<b>43</b>

## Tiltenkt bruk

*therascreen* UGT1A1 Pyro-settet er en nukleinsyretest til in vitro-diagnostisk bruk basert på sekvensdetektering og Pyrosequencing<sup>®</sup>-teknologi (pyrosekvenseringsteknologi), til genotyping av allelvariant \*28 og \*6 av humant UGT1A1-gen i genomisk DNA som stammer fra human vevsprøve.

*therascreen* UGT1A1 Pyro-sett skal brukes for å gi leger informasjon som skal hjelpe dem å velge pasienter med større risiko for redusert UDP-glukuronosyltransferase-aktivitet. Til bruk i in vitro-diagnostikk.

Skal bare brukes sammen med PyroMark<sup>®</sup> Q24-systemet. PyroMark Q24-systemene omfatter:

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

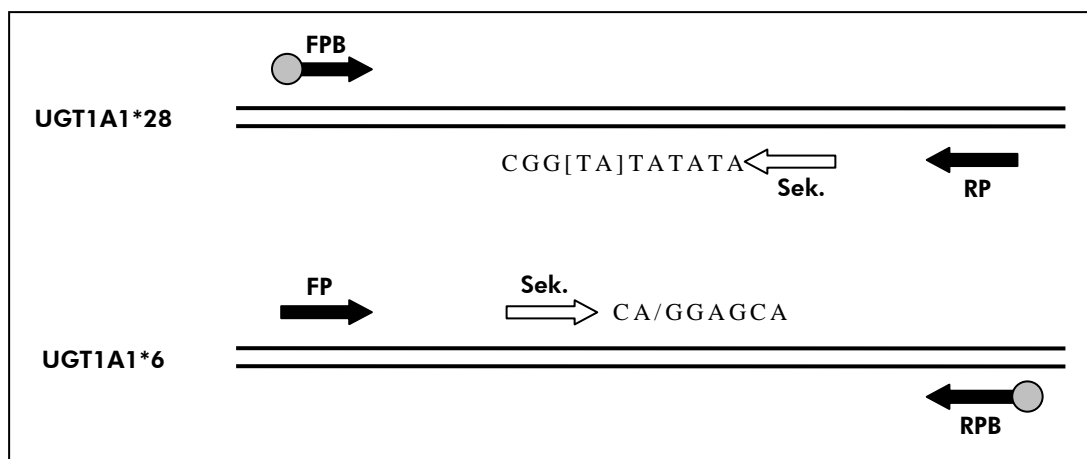
Dette produktet er beregnet til bruk av profesjonelle brukere, slik som teknikere og fysikere som har hatt opplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer, molekylær-biologiske teknikker og PyroMark Q24-systemet.

## Sammendrag og forklaring

*therascreen* UGT1A1 Pyro-sett brukes til genotyping av allelvariant \*28 (for å skille mellom 6 og 7 TA-repetisjoner) og allelvariant \*6 (for å skille mellom genotype G og A) av menneskelig UGT1A1-gen. Settet består av to analyser: den ene til genotyping av allelvariant \*28 og den andre til genotyping av allelvariant \*6 (figur 1). De to områdene amplifiseres separat av PCR og sekvenseres gjennom angitt område. Sekvenser som omgir de angitte posisjonene tjener som normaliserings- og referansetopper for genotyping og kvalitetsvurdering av analysen.

Allelvariant \*28 sekvenseres i nedstrøms retning og allelvariant \*6 i oppstrøms retning.

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



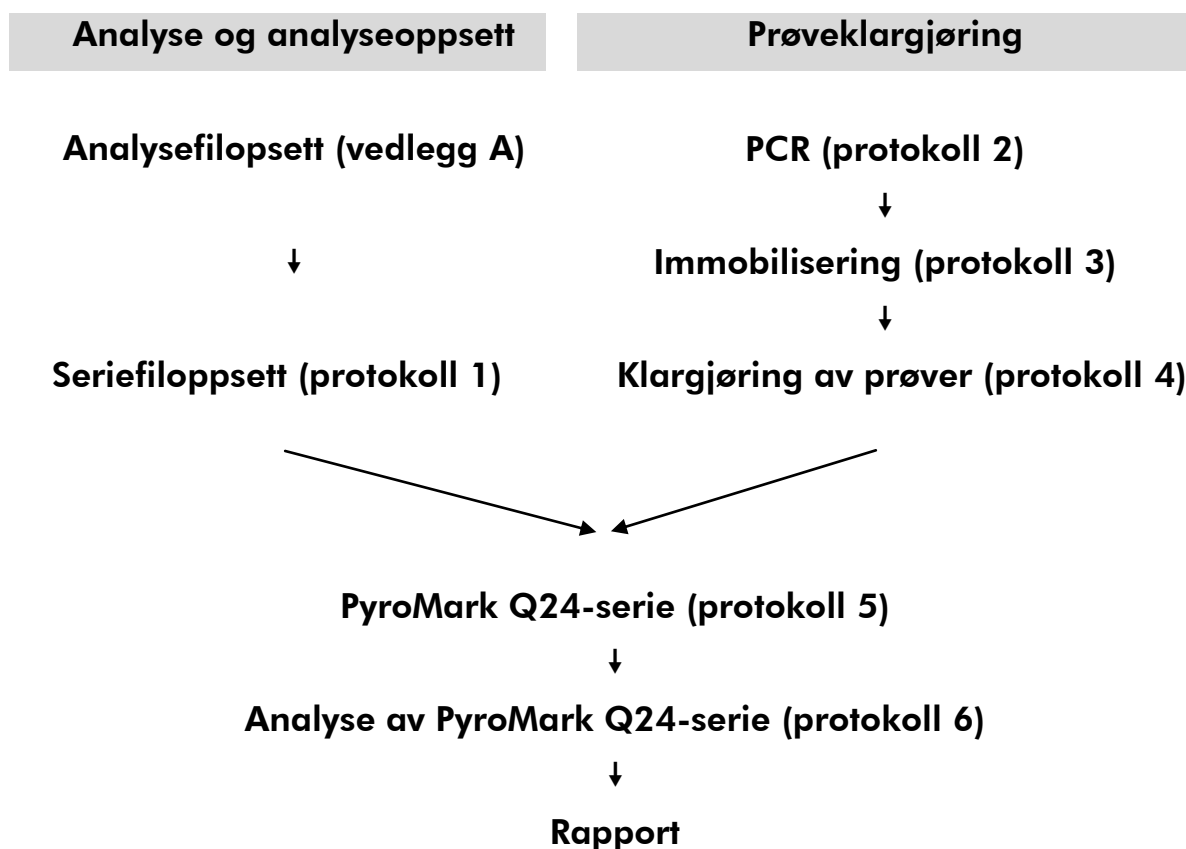
**Figur 1. Illustrasjon av *therascreen* UGT1A1-analyse.** Angitt sekvens er en analysert sekvens med polymorfe nukleotider indikert med hakeparentes eller skråstrek. Deler av TA-repetisjonene analysert med UGT1A1 \*28-prøven er dekket av sekvenseringsprimer. **FP, FPB:** Oppstrøms PCR-primere (B indikerer biotinylering); **RP, RPB:** Nedstrøms PCR-primere (B indikerer biotinylering); **Sek.:** Sekvenseringsprimere.

## Prosedyreprinsipper

Arbeidsgangen på side 7 illustrerer analyseprosedyren. Etter PCR med primere som har allelvariant \*28 og \*6 som mål, immobiliseres amplikonene på Streptavidin Sepharose® High Performance mikropartikler. Enkeltrådet DNA klargjøres, og de tilhørende sekvenseringsprimerne hybridiseres til DNA-et. Prøvene analyseres deretter i PyroMark Q24-systemet ved hjelp av en fil for å kjøre analyseoppsettet og en fil for å kjøre analyse.

**Merk:** Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med håndboken for PyroMark Q24 (se "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 22).

## Arbeidsgang for *therascreen* UGT1A1 Pyro-prosedyren



### Kontroller

Menneskelig kontroll-DNA er inkludert i settet som en positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner. Dette eksemplaret av kontroll-DNA har homozygot TA6/TA6 og genotype G/G ved analysing for henholdsvis allelvariant \*28 og \*6.

En negativ kontrollprøve (uten templat-DNA) bør alltid tas med i hvert PCR-oppsett for minst én analyse.

## Materialer som medfølger


### Settets innhold

#### *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett (eske 1/2)

<b><i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-sett</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalognr.</b>	<b>971540</b>
<b>Antall reaksjoner</b>	<b>24</b>
PCR-primerblanding UGT1A1 *28	24 $\mu$ l
PCR-primerblanding UGT1A1 *6	24 $\mu$ l
Sekvenseringsprimer UGT1A1 *28	24 $\mu$ l
Sekvenseringsprimer UGT1A1 *6	24 $\mu$ l
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	850 $\mu$ l
CoralLoad <sup>®</sup> -konsentrat, 10 x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Menneskelig kontroll-DNA, 2 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l



## **therascreen-buffere og -reagenser (eske 2/2)**

<b>therascreen buffere og reagenser</b>		
PyroMark bindingsbuffer		10 ml
PyroMark hybridiseringsbuffer		10 ml
PyroMark denatureringsløsning*		250 ml
PyroMark vaskebuffer, 10 x		25 ml
Enzymblanding		1 flaske
Substratblanding		1 flaske
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Håndbok		1

\* Inneholder natriumhydroksid.

## Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene), som fås fra leverandøren av produktet.

- DNA-isoleringssett (se "Isolering av DNA" på side 14)
- Pipetter (justerbare)\*
- Sterile pipettespisser (med filter for PCR-oppsett)
- Bordsentrifuge\*
- Termosykler\* og egnede PCR-rør
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (kat.nr. 9001514 eller 9001513)\*†
- PyroMark Q24-programvare (kat.nr. 9019062 eller 9019063)†
- PyroMark Q24-plate (kat.nr. 979301)†
- PyroMark Q24-kassett (kat.nr. 979302)†
- PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon (kat.nr. 9001515 eller 9001517)\*†
- Platemikser\* for immobilisering til mikropartikler (se "Anbefalte platemiksere" på side 11)
- Varmeblokk\* som kan oppnå 80 °C
- 24-brønners PCR-plate eller remser
- Korker
- Vann med høy renhetsgrad (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende)

**Merk:** Produktet inneholder tilstrekkelig vann for PCR, DNA-immobilisering og til å løse opp enzymblandingen og substratblandingen. Det er nødvendig med ekstra vann med høy renhetsgrad for å fortynne PyroMark vaskebuffer, 10 x.

- Etanol (70 %)‡

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

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

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

## Anbefalte platemiksere

Platemikserne som er vist i tabell 1 anbefales for bruk med *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett.

**Tabell 1. Platemiksere som anbefales for bruk med *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett**

Produsent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Termomikser komfort (grunnleggende utstyr)	5355 000.011
	Varmeblokk for mikrotiterplater	5363 000.012
	Adapterplate for 96 x 0,2 ml PCR-rør til å settes inn i blokker for mikrotiterplater	5363 007.009
H+P Labortechnik Gmbh	Variomag <sup>®</sup> 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. Du finner mer informasjon på de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene). Disse er tilgjengelige elektronisk i et praktisk og kompakt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) der du kan finne, vise og skrive ut datablad for hvert QIAGEN<sup>®</sup>-sett og hver settkomponent.

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i *therascreen* UGT1A1 Pyro-settet.

#### PyroMark Denaturation Solution



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

### PyroMark Enzyme Mixture



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

### PyroMark Substrate Mixture



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

## Generelle forholdsregler

Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Håndboken må følges nøyaktig for å få mest mulig optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.
- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med håndboken for PyroMark Q24 (se "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 22).
- Komponentene i dette produktet er tilstrekkelige til å utføre de 24 reaksjonene i opptil fem uavhengige serier.
- Bruk sterile pipettespisser (med filter for PCR).
- 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 analysing.
- 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 genotype.

## Oppbevaring og håndtering av reagenser

*therascreen* UGT1A1 Pyro-settet leveres i to esker. *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett (eske 1/2) sendes på tørris. PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-

konsentrat, kontroll-DNA og alle primere bør oppbevares ved  $-30$  til  $-15$  °C etter levering.

Pyro-bufferne og reagensene (eske 2/2) som inneholder buffere, enzymblanding, substratblanding, dATP $\alpha$ 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. Rekonstituert enzym- og substratblandinger kan fryses og oppbevares i flaskene ved  $-30$  til  $-15$  °C. Frosne reagenser bør ikke utsettes for mer enn 6 fryse/tine-sykluser.

**Merk:** Nukleotider må ikke fryses.

*therascreen* UGT1A1 Pyro-settet er stabilt frem til settets utløpsdato dersom det oppbevares under disse betingelsene.

## Oppbevaring og håndtering av prøver

Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet er humant DNA ekstrahert fra 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<sup>®</sup> DNA-vevssett og QIAamp<sup>®</sup> 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 2 anbefales for DNA-rensing fra de angitte humane prøvetypene som skal brukes sammen med *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett. Utfør DNA-rensing i henhold til instruksjonene angitt i settets håndbøker.

**Tabell 2. Sett for DNA-rensing som anbefales for bruk med *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett**

Prøvemateriale	Nukleinsyrisoleringssett	Katalognummer (QIAGEN)
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini-sett*	61104
Parafinlagret vev	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue-sett (48) <sup>†</sup>	953034

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

<sup>†</sup> Følg protokollen for bruk sammen med parafinlagret vev. EZ1 DNA vevssett bør brukes i kombinasjon med EZ1 Advanced (kat.nr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat.nr. 9001492) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9018700) eller med BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (kat.nr. 9000705; ikke lenger tilgjengelig) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9015862).

# Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet

## Dette må du gjøre før du starter:

- Lag et analyseoppsett slik det er beskrevet i "Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* UGT1A1 Pyro-analyser" på side 40. Dette trenger kun å gjøres én gang, før du kjører *therascreen* UGT1A1 Pyro-analysene første gang.

## Prosedyre

### 1. Klikk på på verktøylinjen.

En ny seriefil opprettes.

### 2. Skriv inn analyseparameterne (se "Serieparametere" på side 16).

### 3. Sett opp platen ved å legge til analyser for allelvariant \*28 and allelvariant \*6 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:** En prøve med menneskelig kontroll-DNA kan tas med i hver prøve som positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner (se "Kontroller" på side 7).

### 4. Når serien er satt opp og klar til å kjøre på PyroMark Q24, 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 20).

Slik kjører du platen på PyroMark Q24, se "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24" på side 26.

## Serieparametere

Serienavn:	Navnet på serien gis når filen er lagret. Hvis man gir filen et nytt navn, vil dette også endre navnet på serien.
Instrumentmetode:	Velg instrumentmetode i henhold til kassetten som vil bli brukt til serien. Se instruksjonene som følger med produktene.
Plate-ID:	<b>Valgfritt:</b> Skriv inn ID for PyroMark Q24-plate.
Strekkode:	<b>Valgfritt:</b> 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.
Reagens-ID:	<b>Valgfritt:</b> Skriv inn partinumrene for <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-sett eske 1 og eske 2 som skal brukes. Partinumrene er angitt på produktemballasjen. <b>Merk:</b> Vi anbefaler at du skriver inn lotnumrene, slik at eventuelle uventede problemer med <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-settet kan spores.
Merknad til serie:	<b>Valgfritt:</b> Skriv inn en merknad om innholdet eller målet med serien.

## Legge til analysefiler

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

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

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

## Legg inn prøve-ID-er og merknader

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

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



## Protokoll 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med *therascreen* UGT1A1 Pyro-settet

Denne protokollen er for PCR-amplifikasjoner av et område for genotyping av allelvariant \*28, og en separat PCR-amplifikasjon av et område for genotyping of allelvariant \*6 ved hjelp av *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett.

### Viktige poeng før du starter

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

### Dette må du gjøre før du starter:

- Før du åpner rørene med PCR-primere, må disse sentrifugeres en kort stund for at innholdet skal samles i bunnen av rørene.
- Juster konsentrasjonen av prøve-DNA til 0,4–2 ng/μl ved behov.  
**Merk:** Menneskelig kontroll-DNA i settet har en konsentrasjon på 2 ng/μl.

### Prosedyre

#### 1. Tin alle nødvendige komponenter.

Bland godt før bruk.

#### 2. Klargjør en reaksjonsblanding for hvert PCR-primersett i henhold til tabell 3.

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 3. Klargjøring av reaksjonsblanding for hver PCR-primerblanding**

<b>Komponent</b>	<b>Volum/reaksjon (<math>\mu</math>l)</b>
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	12,5
CoralLoad-konsentrat, 10 x	2,5
PCR-primerblanding UGT1A1 allelvariant *28 <b>eller</b> PCR-primerblanding UGT1A1 allelvariant *6	1,0
Vann (H <sub>2</sub> O, følger med)	4,0
<b>Totalt volum</b>	<b>20,0</b>

**3. Bland reaksjonsblandingen grundig, og pipetter 20  $\mu$ l i hvert PCR-rør.**

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

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

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

**Merk:** En prøve med menneskelig kontroll-DNA kan tas med i hver prøve som positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner (se "Kontroller" på side 7).

**Tabell 4. Klargjøring av PCR**

<b>Komponent</b>	<b>Volum/reaksjon (<math>\mu</math>l)</b>
Reaksjonsblanding	20
Prøve-DNA	5
<b>Totalt volum</b>	<b>25</b>

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

**Tabell 5. Optimalisert syklusprotokoll**

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

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

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

### Dette må du gjøre før du starter:

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

### 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 6. Klargjør et volum som er 10 % større enn det som kreves for det totale antallet reaksjoner som skal utføres.

Tabell 6. Master Mix for DNA-immobilisering

Komponent	Volum/prøve (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark bindingsbuffer	40
Vann (H <sub>2</sub> O, følger med)	28
<b>Totalt volum</b>	<b>70</b>

3. Tilsett 70 µl Master Mix til brønnene i en PCR-plate med 24 brønner (eller remser), slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).
4. Tilsett 10 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 reagensene som leveres sammen med theascreen UGT1A1 Pyro-settet" på side 17).  
Det totale volumet per brønn skal være 80 µl etter at Master Mix og PCR-produktet er tilsatt.
5. Forsegl PCR-platen (eller remsene) ved hjelp av korker.  
Se til at det ikke kan lekke mellom brønnene.

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

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

**7. Fortsett umiddelbart med “Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24” på side 22.**

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

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

## Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24

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

### Viktige poeng 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 to ulike sekvenseringsprimerne i det samme mønsteret som er angitt for platen i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15), avhengig av analyseområdet (allelvariant \*28 or allelvariant \*6).
- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med håndboken for PyroMark Q24 (trinn 18). Ikke kort ned tiden for nedkjøling av prøvene etter oppvarming til 80 °C.
- Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 regelmessig og bytt filterprober når dette angis.

### Dette må du gjøre før du starter:

- Sett én PyroMark Q24-plateholder på en forvarmet varmeblokk som holder 80 °C til bruk i trinn 17. Hold en andre PyroMark Q24-plateholder ved romtemperatur (15–25 °C) for bruk i trinn 18.
- PyroMark vaskebuffer tilsettes som et 10 x-konsentrat. Før den brukes første gang, tilsett vann med høy renhetsgrad til 25 ml 10 x PyroMark vaskebuffer for å oppnå et endelig volum på 250 ml og oppnå en 1 x aktiv løsning.  
  
1 x PyroMark vaskebuffer aktiv løsning er stabil ved 2–8 °C til den angitte utløpsdatoen.

### Prosedyre

- 1. Fortynn en tilstrekkelig stor mengde av hver sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer UGT1A1 \*28 og sekvenseringsprimer UGT1A1 \*6, i PyroMark hybridiseringsbuffer som vist i tabell 7.**

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

**Tabell 7. Eksempel på fortynning av sekvenseringsprimerne**

Komponent	Volum/prøve (µl)	Volum til 9 + 1 reaksjoner (µl)
Sekvenseringsprimer UGT1A1 *28 <b>eller</b> Sekvenseringsprimer UGT1A1 *6	0,8	8,0
PyroMark hybridiseringsbuffer	24,2	242,0
<b>Totalt volum</b>	<b>25,0</b>	<b>250,0</b>

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 15).

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

3. Sett PCR-platen (eller remsene) fra protokoll 3 og PyroMark Q24-platen på arbeidsbenken (figur 2).

Se til at platen står i samme retning som når prøvene ble satt inn.



**Figur 2. Plassering av PCR-plate (eller remser) og PyroMark Q24-plate på vakuumarbeidsstasjonen.**

4. Sett vakuum på vakuumverktøyet ved å åpne vakuumbryteren.
5. Senk filterprobene forsiktig ned i PCR-platen (eller remser) for å fange opp mikropartiklene som inneholder immobilisert templat. Hold probene på plass i 15 sekunder. Vær forsiktig når du henter opp vakuumverktøyet.

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

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

6. Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml med 70 % etanol (figur 2). Skyll filterprobene i 5 sekunder.
7. Overfør verktøyet til karet som inneholder 40 ml denatureringsløsning (figur 2). Skyll filterprobene i 5 sekunder.
8. Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 50 ml med vaskebuffer (figur 2). Skyll filterprobene i 10 sekunder.
9. Løft vakuumverktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 3).



Figur 3. Illustrasjon av vakuumverktøyet som er løftet mer enn 90° vertikalt.

10. Mens vakuumverktøyet holdes over PyroMark Q24-platen, skal vakuumbryteren på verktøyet slås av (Off).
11. Frigjør mikropartiklene i PyroMark Q24-platen ved å senke filterprobene i den fortynnede sekvenseringsprimeren og bevege verktøyet forsiktig frem og tilbake.  
Vær forsiktig så du ikke skader overflaten på PyroMark Q24-platen ved å ripe den med filterprobene.
12. Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder vann med høy renhetsgrad (figur 2), og beveg verktøyet frem og tilbake i 10 sekunder.



13. Vask filterprobene ved å senke probene ned i vann med høy renhetsgrad (figur 2) og ved å tilføye vakuumbrytere. Skyll probene med 70 ml vann med høy renhetsgrad.
14. Løft verktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 3).
15. Slå av verktøyets vakuumbrytere (Off) og sett verktøyet i posisjon P (Parking).
16. Slå av vakuumpumpen.

**Merk:** Mot slutten av en arbeidsdag må væskeavfall og resterende løsninger kastes, og PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon skal kontrolleres for støv og søl (se "Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar" på side 42).

17. Varm opp PyroMark Q24-platen med prøvene ved 80 °C i 2 minutter med forhåndsoppvarmet PyroMark Q24-plateholder.
18. Fjern PyroMark Q24-platen fra den varme plateholderen og sett den på en andre PyroMark Q24-plateholder, som ble holdt ved romtemperatur (15–25 °C), for å la prøvene avkjøles til romtemperatur i 10–15 minutter.
19. Fortsett med "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24" på side 26.

## Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24

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

### Viktige poeng før du starter

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

### Dette må du gjøre før du starter

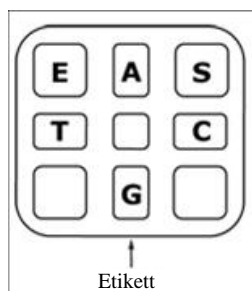
- Slå på PyroMark Q24. Strømbryteren er plassert bak på instrumentet.

### Prosedyre

- 1. Frysetørret enzym- og substratblanding skal oppløses i 620  $\mu$ l vann ( $H_2O$ , følger med).**
- 2. Bland ved å bevege flasken forsiktig rundt. Ikke vorteks!**  
For å 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 4.**

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

\* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene), som fås fra leverandøren av produktet.



**Figur 4. Illustrasjon av PyroMark Q24-kassetten sett ovenfra.** Kommentarene svarer til etiketten på reagensflaskene. Tilsett enzymblending (**E**), substratblending (**S**) og nukleotider (**A**, **T**, **C**, **G**) i samsvar med det volumet som er angitt i rapporten som inneholder informasjon før analyse, i menyen "Tools" (Verktøy) i analyseoppsettet.

6. **Åpne kassettopningen og sett inn den fylte reagenskassetten med etiketten vendt utover. Skyv kassetten helt inn og trykk den ned.**
7. **Pass på at linjen er synlig foran på kassetten, og lukk åpningen.**
8. **Åpne rammen som holder platen på plass, og plasser platen på varmeblokken.**
9. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
10. **Sett inn USB-enheten (som inneholder analysefilen) i USB-porten foran på instrumentet.**  
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 kassettopningen og ta ut reagenskassetten ved å løfte den opp og dra den ut.**
18. **Lukk åpningen.**
19. **Åpne rammen som holder platen på plass, og ta ut platen fra varmeblokken.**
20. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
21. **Kast platen og rengjør kassetten i henhold til instruksjonene i produktarket som leveres med kassetten.**

**22. Analyser serien i henhold til "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 29.**

## Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie

Denne protokollen beskriver genotyping-analyse av en fullført *therascreen* UGT1A1-serie ved bruk av Q24-programvare.

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



Analyser alle brønner.



Analyser den valgte brønnen.

Du finner mer informasjon om hvordan du analyserer en serie i håndboken for *PyroMark Q24*.

5. Du kan opprette en rapport ved å velge "SNP Full Report" (SNP fullstendig rapport) eller "SNP Overview Report" (SNP oversiktsrapport) 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* UGT1A1 Pyro-analyser" på side 40 og håndboken for *PyroMark Q24*).

**Merk:** Pyrogram® (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.

## Tolkning av resultater

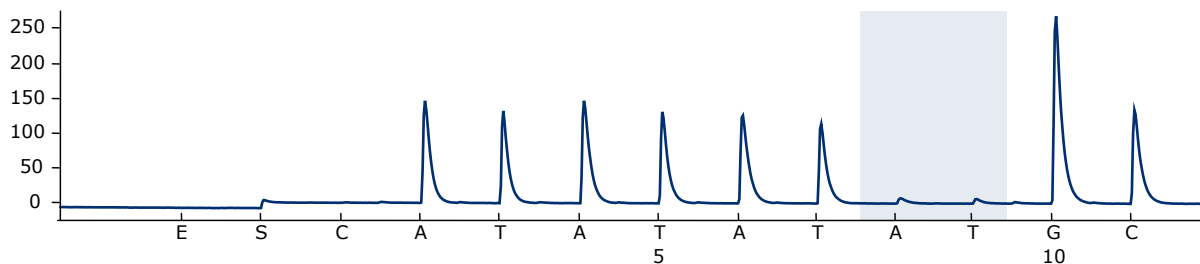
Medfølgende menneskelig kontroll-DNA kan brukes til sammenligning av resultater. Dette eksemplaret av kontroll-DNA har homozygot TA6/TA6 og genotype G/G ved analysing for henholdsvis allelvariant \*28 og \*6.

Genotyping-analyse utføres automatisk av PyroMark Q24-programvare, og finnes i "SNP Full Report" (SNP fullstendig rapport) og "SNP Overview Report" (SNP oversiktsrapport).

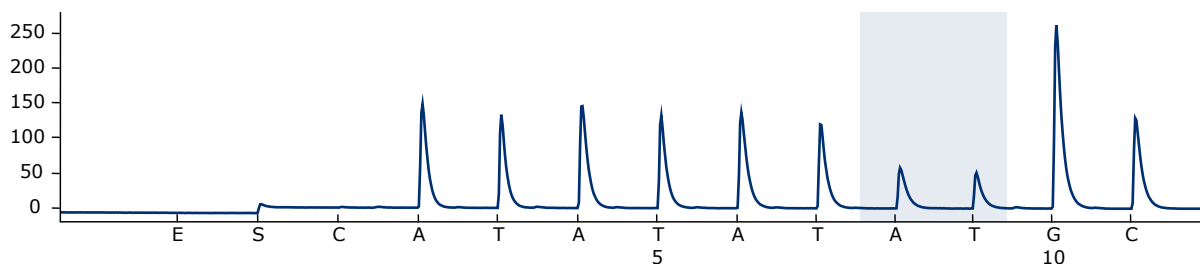
**Merk:** Kvalitetsvurdering og advarsler generert i SNP-rapportene er relevante for genotyping-analyse. Du kan se bort fra andre kvalitetsvurderinger og advarsler generert i AQ-modus i PyroMark Q24.

### Representative resultater

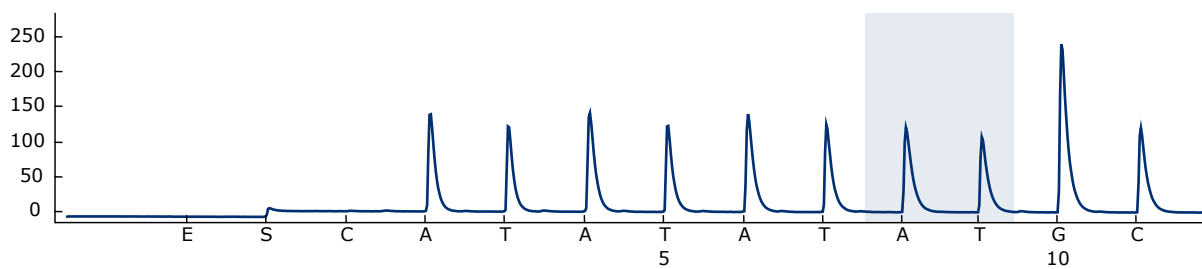
Representative Pyrogram-resultater er vist i figur 5–10.



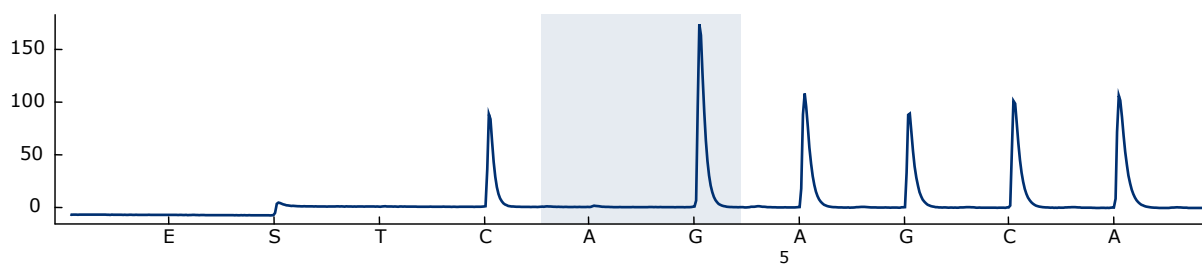
**Figur 5.** Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med genotype –/– (TA6/TA6) ved analyse for allelvariant \*28.



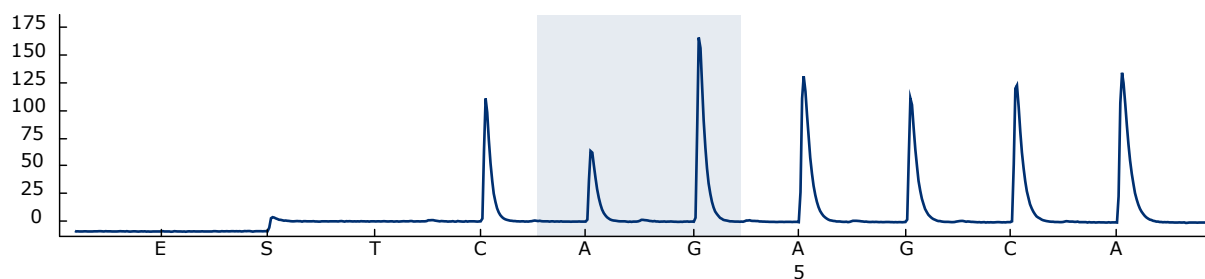
**Figur 6.** Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med genotype –/TA (TA6/TA7) ved analyse for allelvariant \*28.



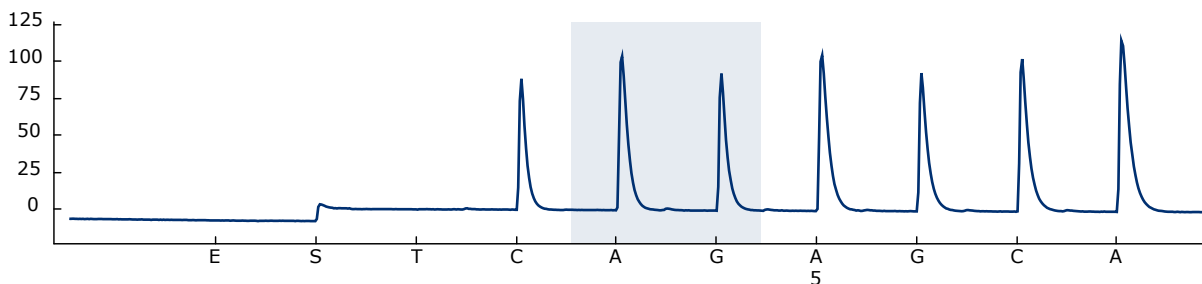
**Figur 7. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med genotype TA/TA (TA7/TA7) ved analyse for allelvariant \*28.**



**Figur 8. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av prøver med genotype G/G ved analyse for allelvariant \*6.**



**Figur 9. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av prøver med genotype G/A ved analyse for allelvariant \*6.**



**Figur 10. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av prøver med genotype A/A ved analyse for allelvariant \*6.**

## 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](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Forskerne ved QIAGENS tekniske tjenester er alltid klare til å besvare alle spørsmål du måtte ha, enten om informasjon og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

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

---

### Kommentarer og forslag

---

#### Signaler i ikke-templat-kontrollen (negativ kontroll)

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

#### Dårlig eller uventet sekvens

- |                                  |   |
|----------------------------------|---|
| 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 <sup>®</sup> -system eller agarosegelelektroforese). |
|----------------------------------|---|



## Kommentarer og forslag

---

### Resultatet "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) i SNP-rapporten

- a) Advarselen "Uncertain / Failed due to low peak height" (Usikker / ikke godkjent på grunn av 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 kvalitetsvurderingen "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) Advarselen "Uncertain / Failed genotype determination" (Usikker / ikke godkjent bestemmelse av genotype)
- Hvis kvalitetsvurderingen "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.
- For UGT1A1 \*28-analysen, kan advarselen forårsakes av utglidning av polymerase over TA-repetisjoner, noe som kan være mer merkbart for FFPE tumorprøver. Pass på at DNA med høy kvalitet brukes som templat (f.eks. isolert fra blodprøver) eller øk mengden templat-DNA.

## Kommentarer og forslag

---

- c) Uventede sjeldne allelvarianter  
Kvalitetsvurderinger som "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) kan forårsakes av et uventet mønster av topper. Dette kan indikere en uventet allelvariant, 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 allelvarianter.
- d) Advarsel om avvik for høy topphøyde ved fordeling x  
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 histogramsøylene og ikke kan forklares med sjeldne allelvarianter, er det anbefalt å kjøre prøven på nytt.

### Høy bakgrunn

- a) Feil oppbevaring av nukleotider  
Nukleotider skal oppbevares ved 2–8 °C. Oppbevaring ved –10 til –25 °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.

## Kommentarer og forslag

---

### Ingen signaler i positive kontroller

- |   |   |
|---|---|
| a) Utilstrekkelig enzym eller substratblanding for alle brønner | Pass på å fylle PyroMark Q24-kassetten i henhold til "Pre Run Information" (Informasjon før analyse) i menyen "Tools" (Verktøy).  |
| b) Feil oppbevaring eller fortynning av reagenser               | Klargjør <i>therascreen</i> -reagenser i henhold til instruksjonene under "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24" på side 26.  |
| c) Feil i PCR eller prøveklargjøring                            | Håndteringsfeil i PCR-oppsettet, programmering av PCR-syklere eller prøveklargjøring før pyrosekvensering kan føre til mangel på signaler. Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for <i>PyroMark Q24</i> og bytt filterprober når dette angis. Gjenta PCR-en og pyrosekvenseringsanalysen. |

## Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

## Begrensninger

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

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

## Ytelseskarakteristikker

### Presisjon

Presisjonsdataene gjør det mulig å bestemme analysens totale variasjon i forhold til korrekt genotyping av allelvariant \*28 og \*6. Plasmider som bar allelvariantene ble blandet i riktig forhold (0, 50, 100 %), som representerte homo- og heterozygote genotyper (\*28 TA6/TA6, TA6/TA7 og TA7/TA7; \*6 G/G, G/A og A/A). Hver blanding ble analysert i sju pyrosekvenseringsserier med tre replikater hver, med vekslende partier av *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett, PyroMark Q24-instrumenter, brukere, dager og laboratorier.

Presisjon er uttrykt som korrekt andel (f.eks. andelen av analyserte prøver med korrekt genotypingresultat). Undersøkelsen av genotype-analysene av allelvariant \*28 og \*6 angitt henholdsvis i tabell 8 og 9 viste korrekt andel på 100 % for prøvene som ble analysert.

**Tabell 8. Presisjon for genotyping av allelvariant \*28**

Genotype*	Antall prøver	Korrekt andel
Homozygot TA6/TA6	21	21
Heterozygot TA6/TA7	21	21
Homozygot TA7/TA7	20	20

\* Represented med 0, 50 og 100 % plasmidblandinger basert på OD<sub>260</sub>-måling.

**Tabell 9. Presisjon for genotyping av allelvariant \*6**

Genotype*	Antall prøver	Korrekt andel
Homozygot G/G	21	21
Heterozygot G/A	21	21
Homozygot A/A	21	21

\* Represented med 0, 50 og 100 % plasmidblandinger basert på OD<sub>260</sub>-måling.

## Diagnostisk vurdering

*therascreen* UGT1A1 Pyro-settet ble vurdert i sammenligning med Sanger-sekvensering. DNA ble ekstrahert fra 100 formalinfikserte parafinlagrede (FFPE) tumorprøver, og analysert for allelvariant \*28 og \*6.

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

Pyrosekvenseringsanalyse ble utført med *therascreen* UGT1A1 Pyro-settet på PyroMark Q24 og Sanger-sekvensering på ABI™ 3130 genanalyseapparat.

Av 100 prøver analysert ved Sanger-sekvensering, kunne genotype bestemmes for 95 og 99 prøver for henholdsvis allelvariant \*28 og \*6. Med *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett, var det mulig å bestemme genotype for 98 og 99 prøver for henholdsvis allelvariant \*28 og \*6.

Tjueni, 49 og 12 prøver ble av begge metoder angitt å ha henholdsvis genotype TA6/TA6, TA6/TA7 og TA7/TA7. Fire ytterligere prøver påviste genotype TA6/TA6 ved bruk av *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett, mens Sanger-sekvensering detekterte genotype TA6/TA7 (tabell 10).

Med unntak av prøver som ikke ble godkjent ved bruk av én av metodene eller begge, viste *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett og Sanger-sekvensering 96 % overensstemmelse i resultater for genotyping av allelvariant \*28 (tabell 10).

**Tabell 10. Genotypingresultater for allelvariant \*28 i prøver av kaukasisk opprinnelse**

		Sanger-sekvensering				Totalt
		TA6/ TA6	TA6/ TA7	TA7/ TA7	Ukjent	
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-sett	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Ukjent	0	1	0	1	2
	<b>Totalt</b>	<b>29</b>	<b>54</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>100</b>

Alle prøver påviste homozygot genotype for allelvariant \*6 ved bruk av både Sanger-sekvensering og *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett. Dette resultatet er i tråd med ny kunnskap om at genotype A/G og A/A er så å si fraværende i kaukasiske populasjoner. Derfor ble DNA fra ytterligere 26 bukkale vattpinneprøver foretatt på asiater isolert ved bruk av QIAamp DSP DNA Blood Mini-sett på QIAcube® og analysert for allelvariant \*6.

Femten, ni og to prøver ble av begge metodene angitt å ha henholdsvis genotype G/G, G/A og A/A (tabell 11).

Med unntak av prøver som ikke ble godkjent ved bruk av én av metodene eller begge, viste *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett og Sanger-sekvensering 100 % overensstemmelse i resultater for allelvariant \*6 (tabell 11).

**Tabell 11. Genotypingresultater for allelvariant \*6 i prøver hentet fra asiater**

		Sanger-sekvensering				Total †
		G/G	G/A	A/A	Ukjent	
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-sett	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Ukjent	0	0	0	0	0
	<b>Totalt</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>26</b>






**Merk:** I alle serier brukt til å bestemme ytelseskarakteristikker, ble signalet på over 30 RLU rutinemessig oppnådd fra 10 ng av DNA isolert fra blod eller formalinfiksert, parafinlagret vev.

## Referanser

QIAGEN opprettholder en stor, oppdatert elektronisk database med vitenskapelige publikasjoner ved 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](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) eller ved å ta kontakt med QIAGENS tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

## Symboler

 $\Sigma$	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til $\langle N \rangle$ tester
	Skal brukes innen
<b>IVD</b>	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
<b>REF</b>	Katalognummer
<b>LOT</b>	Partinummer (lot)
<b>MAT</b>	Materialnummer
<b>COMP</b>	Komponenter
<b>CONT</b>	Innhold
<b>NUM</b>	Nummer
<b>NaOH</b>	Natriumhydroksyd
<b>GTIN</b>	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent
	Se informasjonen som gis i håndboken

## Kontaktinformasjon



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

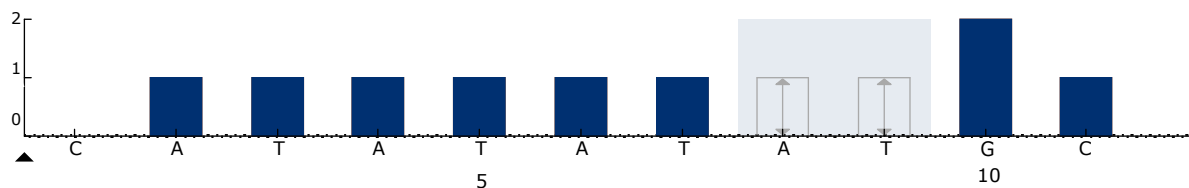
## Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* UGT1A1 Pyro-analyser

Før du kjører *therascreen* UGT1A1-analysen for første gang, må analysefilen angis. Angi analysen for UGT1A1-allelvarianter med PyroMark Q24-programvaren som beskrevet nedenfor.

### Prosedyre



#### UGT1A1 \*28

1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens):  
**ATATAT[AT]GGCA**
3. Skriv inn følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):  
**CATATATATGC**
4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Topp høydeterskel – Nødvendig topp for godkjent kvalitet) til 30.
5. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som **UGT1A1 \*28**.

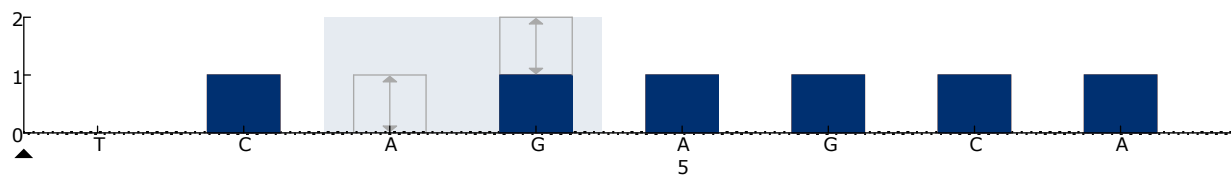


Figur 11. Histogram for genotyping av allelvariant UGT1A1 \*28.

#### UGT1A1 \*6


1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens):  
**CRGAGCAT**
3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):  
**TCAGAGCA**
4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Topp høydeterskel – Nødvendig topp for godkjent kvalitet) til 30.
5. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som **UGT1A1 \*6**.





**Figur 12. Histogram for genotyping av allelvariant UGT1A1 \*6.**

## Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar

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

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

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

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

Statlige og lokale miljøkrav til håndtering av laboratorieavfall må overholdes.

### Viktige poeng før du starter

- Denne protokollen krever vann med høy renhetsgrad.

### Prosedyre

- B1. Se til at vakuumverktøyet ikke mottar noe vakuum. Pass på at vakuumet er stengt av (Off) og at vakuumpumpen er slått av.**
- B2. Resterende løsninger som er igjen i karene skal kastes.**
- B3. Skyll karene med vann med høy renhetsgrad, eller bytt dem ut om nødvendig.**
- B4. Tøm avfallsbeholderen.**  
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> UGT1A1 Pyro Kit (24)	For 24 reaksjoner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenseringsprimer, PCR-primere, menneskelig kontroll-DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-konsentrat, PyroMark bindingsbuffer, PyroMark hybridiseringsbuffer, PyroMark denatureringsløsning, PyroMark vaskebuffer, enzymblanding, substratblanding, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP og H <sub>2</sub> O	971540
<b>Tilbehør</b>		
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
<b>Tilknyttede produkter</b>		
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001514

Produkt	Innhold	Katalognr.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Brukerorientert programvare	9019063
PyroMark Q24 Software	Analyseprogramvare	9019062
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

\* Kun Storbritannia

† Alle andre land

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasinger, 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](http://www.qiagen.com) eller kan leveres fra QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

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

#### **Begrenset lisensavtale**

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av *therascreen* UGT1A1 Pyro-settet samtykker i følgende vilkår:

1. *therascreen* UGT1A1 Pyro-settet kan bare brukes i samsvar med håndboken for *therascreen* UGT1A1 Pyro-sett og bare til bruk med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkluderte i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i håndboken for *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit og flere protokoller som nå finnes på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt overfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN. Med enerett.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

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

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

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

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

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

**China** ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

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

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

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

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

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

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

**Italy** ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

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

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

**Singapore** ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

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

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

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

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

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

