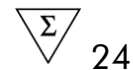


Handbok för *therascreen*[®] KRAS Pyro[®] Kit



Version 1



För in vitro-diagnostisk användning



971460



1061825SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1061825SV



QIAGEN provtagnings- och analysmetoder

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla typer av biologiska prover. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

QIAGEN sätter standarden för:

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på www.qiagen.com.

Innehåll

Avsedd användning	5
Sammanfattning och förklaring	5
Användningsprinciper	6
Material som medföljer	8
Kitets innehåll	8
Material som behövs men inte medföljer	10
Varningar och säkerhetsåtgärder	11
Säkerhetsinformation	11
Allmänna säkerhetsåtgärder	11
Förvaring och hantering av reagenser	13
Förvaring och hantering av prover	13
Procedur	14
DNA-isolering	14
Protokoll	
■ 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit17	
■ 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor	20
■ 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24	22
■ 5: Köra PyroMark Q24-systemet	26
■ 6: Analysera en PyroMark Q24-körning	28
Tolkning av resultat	32
Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivåmutationer	32
Felsökningsguide	36
Kvalitetskontroll	38
Begränsningar	38
Testets egenskaper	39
LOB och LOD	39
Linjäritet	41
Variationer inom laboratoriet	41

Diagnostisk utvärdering	42
Referenser	43
Symboler	44
Kontaktinformation	44
Bilaga A: Konfigurera <i>therascreen</i> KRAS Pyro-analyser	45
Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trågen	48
Beställningsinformation	49

Avsedd användning

therascreen KRAS Pyro Kit är ett in vitro-test med nukleinsyrasekvensering baserat på pyrosekvenseringsteknik för kvantitativ detektion av mutationer i kodonerna 12, 13 och 61 i den mänskliga KRAS-genen i genomiskt DNA taget från mänsklig vävnad.

therascreen KRAS Pyro Kit är avsett som ett hjälpmedel för att identifiera patienter med kolorektal cancer som är lämpade för anti-EGFR-behandling, t.ex. panitumumab och cetuximab. För in vitro-diagnostisk användning.

Endast för användning med systemet PyroMark® Q24. I PyroMark Q24-system ingår:

- Instrumentet PyroMark Q24 och instrumentet PyroMark Q24 MDx.
- Vakuumstationen PyroMark Q24 och vakuumstationen PyroMark Q24 MDx.
- Programmet PyroMark Q24 (version 2.0) och programmet PyroMark Q24 MDx (version 2.0).

Produkten är endast avsedd att användas av professionella användare som tekniker och läkare som har utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer, molekylärbiologiteknik och systemet PyroMark Q24.

Sammanfattning och förklaring

KRAS-mutationsanalys röner stor uppmärksamhet i Europa idag på grund av att Europiska kommissionen gett villkorsbaserat godkännande av panitumumab och cetuximab för behandling av metastaserad koloncancer hos patienter med icke-muterad (vildtyp) KRAS-gen. Det innebär att panitumumab och cetuximab endast kan ges till patienter vars KRAS-mutationsstatus har undersökts.

CE-IVD-märkta *therascreen* KRAS Pyro Kit är avsett för kvantitativa mätningar av mutationer i kodonerna 12, 13 och 61 i den mänskliga KRAS-genen. Produkten består av 2 analyser: en för detektion av mutationer i kodonerna 12 och 13 och en för detektion av mutationer i kodon 61 (bild 1) De två regionerna amplifieras separat med PCR och sekvenseras genom den definierade regionen. Sekvenser som omger de definierade positionerna fungerar som normaliserings- och referenstoppar för kvantifiering och kvalitetsbedömning av analysen.

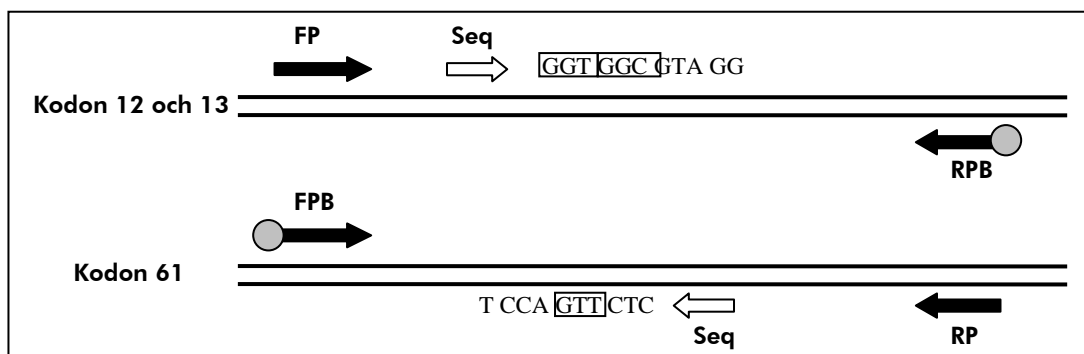


Bild 1. Illustration av KRAS-analysen. Den indikerade sekvensen är den analyserade sekvensen för ett vildtypsprov. **FP** och **FPB**: Forward PCR-primrar (B indikerar biotinylering); **RP** och **RPB**: Reverse PCR-primrar (B indikerar biotinylering); **Seq**: Sekvenseringsprimrar.

Obs: Kodonerna 12 och 13 sekvenseras framåt och kodon 61 bakåt.

Produkten består av en PCR-primerblandning och en sekvenseringsprimer för varje analys. Primrarna levereras i lösning. Varje flaska innehåller 24 µl av varje primer eller primerblandning.

Användningsprinciper

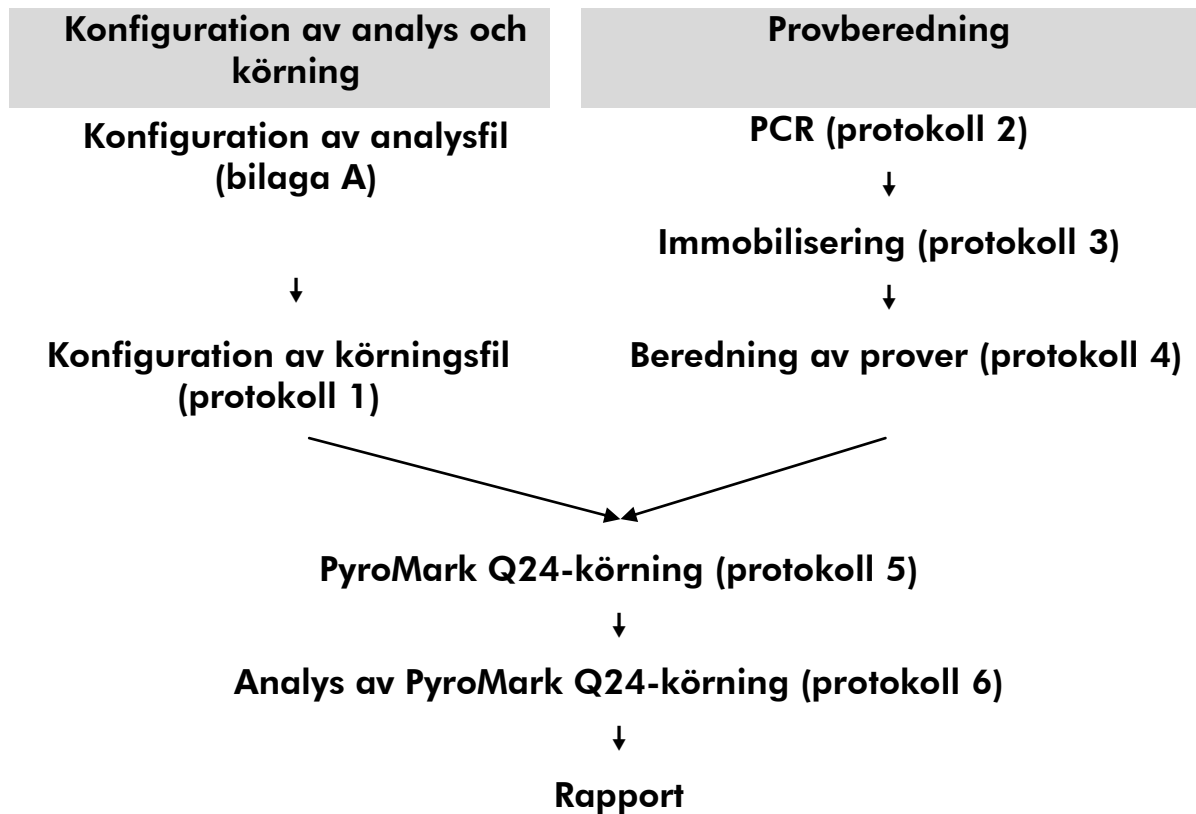
Arbetsflödet illustrerar analysproceduren. Efter PCR med primrar med kodon 12/13 och kodon 61 som mål immobiliseras ampliconerna på Streptavidin Sepharose® High Performance-kulor. Enkelsträngat DNA bereds och de motsvarande sekvenseringsprimrarna binds till DNA. Proverna analyseras sedan på systemet PyroMark Q24 med hjälp av en konfigurationsfil och en körningsfil.

Vi rekommenderar att KRAS Plug-in Report används för att analysera körningen. KRAS Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com.

Körningen kan dock även analyseras med hjälp av analysverktyget som är integrerat i systemet PyroMark Q24. "Sequence to Analyze" (Sekvens som ska analyseras) kan justeras för detektion av sällsynta mutationer efter körningen (se "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 28).

Obs: Arbetsflödet har ändrats något jämfört med handboken för PyroMark KRAS Kit och den reviderade versionen R1 av handboken för *therascreen* KRAS Pyro Kit (se "Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer *therascreen* KRAS Pyro Kit", sidan 17 och "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 22).

Arbetsflöde för *therascreen* KRAS Pyro-proceduren



Kontroller

Ometylerat kontroll-DNA ingår i kitet som en positiv kontroll för PCR och sekvenseringsreaktioner. Det här kontrollprovet har en vildtyps-genotyp i de regioner som sekvenserats med detta kit, och det krävs för korrekt tolkning av resultat och identifiering av lågnivåmutationer (se "Tolkning av resultat", sidan 32). Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning.

Dessutom ska en negativ kontroll (utan mall-DNA) ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.


Material som medföljer

Kitets innehåll

therascreen KRAS Pyro Kit (förpackning 1/2)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
Katalognr	971460
Antal reaktioner	24
Sekvenseringsprimer KRAS 12/13	24 μ l
Sekvenseringsprimer KRAS 61	24 μ l
PCR-primer KRAS 12/13	24 μ l
PCR-primer KRAS 61	24 μ l
PyroMark PCR-huvudmix, 2x	850 μ l
CoralLoad [®] -koncentrat, 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Ometylerat kontroll-DNA, 10 ng/ μ l	100 μ l

therascreen-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2)

therascreen-buffertar och -reagenser		
PyroMark bindningsbuffert		10 ml
PyroMark hybridiseringsbuffert		10 ml
PyroMark denatureringslösning*		250 ml
PyroMark tvättbuffert, 10x		25 ml
Enzymblandning		1 flaska
Substratblandning		1 flaska
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Handbok		1

* Innehåller natriumhydroxid.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", sidan 14)
- Pipetter (justerbara)*
- Sterila pipettspetsar (med filter för PCR-uppställning)
- Bänkstående mikrocentrifug*
- Termocykler* och passande PCR-rör
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr 175113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (kat.nr 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24 Software (kat.nr 9019063 eller 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (kat.nr 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (kat.nr 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (kat.nr 9001515 eller 9001517)*†
- Plattmixer* för immobilisering med kulor
- Värmeblock* med kapacitet för 80 °C
- PCR-platta med 24 brunnar eller remsor
- Remslock
- Höggradigt rent vatten (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller motsvarande).
Obs: I kitet medföljer tillräckligt med vatten för PCR, DNA-immobilisering och för att lösa upp enzymblandningen och substratblandningen; det behövs ytterligare höggradigt rent vatten för att späda PyroMark tvättbuffert, 10x.
- Etanol (70%)‡

* Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

† CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EC. Alla andra produkter som listas är inte CE-IVD-märkta baserat på EU-direktivet 98/79/EC.

‡ Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

Rekommenderade plattmixrar

Plattmixrarna som visas i tabell 1 rekommenderas för användning med *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Tabell 1. Plattmixrar som rekommenderas för användning med *therascreen* KRAS Pyro Kit

Tillverkare	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer comfort (basenhet)	5355 000.011
	Termoblock för mikrotiterplattor	5363 000.012
	Adapterplatta för 96 x 0,2 ml PCR-rör för insättning i block för mikrotiterplattor	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpligt säkerhetsdatablad (SDS) för mer information. De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN®-kit och kitkomponent.

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller komponenter till *therascreen* KRAS Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution



Varning! Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan vara korrosivt för metaller. Sug upp spill för att undvika materiella skador. Förvaras endast i originalbehållaren. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

PyroMark Enzyme Mixture



Innehåller: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Fara! Irriterar huden. Orsakar allvarliga ögonskador. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller doktor/läkare. Ta av förorenade kläder och tvätta dem innan de används på nytt. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

PyroMark Substrate Mixture



Innehåller: acetic acid. Varning! Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp. Ta av förorenade kläder och tvätta dem innan de används på nytt. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Obs: Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- För optimalt resultat krävs att anvisningarna i användarmanualen följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrade egenskaper.
- Arbetsflödet har ändrats något (se "Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer *therascreen* KRAS Pyro Kit", sidan 17, och "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 22) jämfört med handboken för PyroMark KRAS Kit och den reviderade versionen R1 av handboken för *therascreen* KRAS Pyro Kit.
- Komponenterna i den här produkten räcker för att utföra de 24 reaktionerna i upp till 5 oberoende körningar.
- Använd sterila pipettspetsar med filter (för PCR-konfiguration).
- Förvara och extrahera positivt material (prover, positiva kontroller och amplikon) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Tina alla komponenter omsorgsfullt i rumstemperatur (15–25 °C) innan analysen påbörjas.
- När komponenterna tinats ska de blandas (genom att pipettera upp och ned upprepade gånger eller genom att vortexa i pulser) och centrifugeras en kort stund.

- Misslyckade resultat får inte ligga till grund för bedömning av mutationsstatus.

Förvaring och hantering av reagenser

therascreen KRAS Pyro Kit levereras i två förpackningar. *therascreen* KRAS Pyro Kit (förpackning 1/2) levereras på torris. PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, ometylerat kontroll-DNA och alla primrar ska förvaras i –30 till –15 °C direkt vid ankomst.

therascreen-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2) som innehåller buffertar, enzymblandning, substratblandning, dATP α S, dCTP, dGTP och dTTP (reagenserna för analys med pyrosekvensering) levereras i kylförpackning. De här komponenterna ska förvaras i 2–8 °C direkt vid ankomst. För att minimera försämring av aktiviteten rekommenderar vi att både enzymblandningen och substratblandningen förvaras i de medföljande flaskorna.

Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning är stabilt i minst 10 dagar i 2–8 °C. Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning kan frysas och förvaras i flaska i –30 till –15 °C. Frusna reagenser ska inte genomgå mer än 3 frys-/upptiningscykler.

Obs: Nukleotider ska inte frysas.

therascreen KRAS Pyro Kit är hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten om det förvaras under de här förhållandena.

Förvaring och hantering av prover

Alla prover ska betraktas som potentiellt smittbärande material.

Provmaterialet är mänskligt DNA som extraherats från blod eller formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) prover.

Prover från människor som genomgår behandling med heparin får inte användas. Blodprover som tagits i rör med heparin som antikoagulant får inte användas. Heparin påverkar PCR.

Procedur

DNA-isolering

Systemegenskaperna har fastställts med EZ1[®] DNA Tissue Kit och QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit för extrahering av mänskligt DNA från formalinfixerade, paraffininbäddade tumörprover. För systemet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit har egenskaperna fastställts med blodprover från friska patienter som delvis spikats med tumörceller.

De QIAGEN[®]-kit som visas i tabell 2 rekommenderas för DNA-rening från de angivna mänskliga provtyperna för användning med *therascreen* KRAS Pyro Kit. Utför DNA-reningen enligt instruktionerna i kit-handböckerna.

Tabell 2. DNA-reningskit som rekommenderas för användning med *therascreen* KRAS Pyro Kit

Provmaterial	Kit för isolering av nukleinsyra	Katalognummer (QIAGEN)
Paraffininbäddad vävnad	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* Följ protokollet för användning med paraffininbäddad vävnad. EZ1 DNA Tissue Kit ska användas tillsammans med EZ1 Advanced (kat.nr 9001410 eller 9001411) och EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat.nr 9001492) och EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9018700) eller med BioRobot[®] EZ1 (kat.nr 9000705; har utgått ur sortimentet) och EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9015862).

[†] CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EC.

Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet

Viktigt att tänka på före start

- Om det behövs kan LOB bekräftas genom att ett vildtypsprov används för att ta fram en full platta med resultat. Mer information finns i riktlinjen CLSI EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".

Saker som ska göras före start

- Om KRAS Plug-in Report inte har installerats ska du skapa en analyskonfiguration (se bilaga A, sidan 45). Detta behöver endast göras en gång innan du kör *therascreen* KRAS Pyro-analyserna för första gången. Om KRAS Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24 under sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/KRAS". KRAS Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com.

Procedur

1. Klicka på i verktygsfältet.

En ny körningsfil skapas.

2. Skriv in körningsparametrarna (se "Körningsparametrar", sidan 16).

3. Förbered plattan genom att lägga till analyser för de båda kodonerna 12/13 och kodon 61 i brunnar som motsvarar de prover som ska analyseras.

Obs: En negativ kontroll (utan mall-DNA) ska ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Obs: Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning (se "Kontroller", sidan 7).

4. När körningen är iordningställd och redo att köras på systemet PyroMark Q24 ska du skriva ut en lista med de volymer av enzymblandning, substratblandning och nukleotider som behövs, samt iordningställandet av plattan. Välj "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) och när rapporten sedan visas klickar du på .

5. Stäng körningsfilen och kopiera den på ett USB-minne (medföljer systemet) via Utforskaren i Windows®.

Obs: Den utskrivna Pre Run Information-rapporten kan användas som mall för provuppställningen (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 20).

Information om körning av plattan på PyroMark Q24-systemet finns i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 26.

Körningsparametrar

- "Run name" (Namn på körningen): Namnet på körningen ges när filen sparas. Om du byter namn på filen ändras också namnet på körningen.
- "Instrument method" (Instrumentmetod): Välj instrumentmetod efter vilken kassettsom ska användas för körningen. Se instruktionerna som medföljer produkterna.
- "Plate ID" (Platt-ID): **Valfritt:** Ange ID för PyroMark Q24 Plate.
- "Bar code" (Strekkod): **Valfritt:** Ange ett strekkodsnummer för plattan eller, om du har en strekkodsläsare ansluten till din dator, placera muspekaren i textrutan "Barcode" (Strekkod) (genom att klicka i rutan) och läs in strekkoden.
- "Kit ID" (Kit-ID): **Valfritt:** Ange lotnumret för det *therascreen* KRAS Pyro Kit som ska användas. Lotnumret finns på produktetiketten.
Obs: Vi rekommenderar att du anger både reagens-ID och kit-ID så att eventuella oväntade problem som uppstår med reagenserna kan spåras.
- "Run note" (Anteckning om körningen): **Valfritt:** Gör en anteckning om innehållet i eller syftet med körningen.

Lägga till analysfiler

Om du vill lägga till en analysfil för en brunn gör du på ett av följande sätt:

- Högerklicka på brunnen och välj "Load Assay" (Ladda analys) på kontextmenyn.
- Markera analysen i snabbmenyn, klicka på den och dra den till brunnen.

En brunn färgkodas enligt den analys som laddas för brunnen.

Ange prov-ID och anteckningar

Om du ska ange ett prov-ID eller en anteckning markerar du cellen och skriver in texten.

Om du ska redigera ett prov-ID eller en anteckning markerar du antingen cellen (det aktuella innehållet markeras) eller dubbelklickar på cellen.

Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer *therascreen* KRAS Pyro Kit

Det här protokollet är avsett för PCR-amplifieringar av en region som innehåller kodon 12 och kodon 13, och en separat PCR-amplifiering av en region som innehåller kodon 61 med hjälp av *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Viktigt att tänka på före start

- Arbetsflödet har ändrats något jämfört med handboken för PyroMark KRAS Kit (steg 5).
- HotStarTaq[®] DNA-polymeras i PyroMark-huvudmix kräver aktivering i **15 minuter vid 95 °C**.
- Förbered alla reaktionsblandningar i ett område avskilt från det område som används för DNA-rening, tillägg av mall-DNA till PCR, PCR-produktanalys eller beredning av prover före analys med pyrosekvensering.
- Använd engångsspetsar med hydrofobiskt filter för att undvika korskontaminering.

Saker som ska göras före start

- Innan rören med PCR-primrar öppnas, ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Justera koncentrationen av kontroll och prov-DNA vid behov till 0,4–2 ng/μl.

Procedur

1. Tina alla reagenser som behövs (se tabell 3).

Blanda väl före användning.

2. Bered en reaktionsmix för varje PCR-primer enligt tabell 3.

Reaktionsmixen innehåller vanligtvis alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Bered en volym reaktionsmix som är större än vad som krävs för det totala antalet PCR-analyser som ska utföras.

Tabell 3. Beredning av reaktionsmix för varje PCR-primermix

Komponent	Volym/reaktion (μ l)
PyroMark PCR-huvudmix, 2x	12,5
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5
PCR-primer KRAS 12/13 eller PCR-primer KRAS 61	1,0
Vatten (H_2O , medföljer)	4,0
Total volym	20,0

3. Blanda reaktionsmixen väl och fördela 20 μ l i varje PCR-rör.

Det är inte nödvändigt att ha PCR-rör på torr is eftersom HotStarTaq DNA-polymeras är inaktivt i rumstemperatur.

4. Tillsätt 5 μ l mall-DNA (2–10 ng genomiskt DNA) i varje PCR-rör (se tabell 4) och blanda väl.

Obs: En negativ kontroll (utan mall-DNA) ska ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Obs: Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning (se "Kontroller", sidan 7).

Tabell 4. Beredning av PCR

Komponent	Volym/reaktion (μ l)
Reaktionsmix	20
Prov-DNA	5
Total volym	25

5. **Programmera termocyklern enligt tillverkarens anvisningar med hjälp av villkoren som anges i tabell 5.**

Tabell 5. Optimerat cyklingsprotokoll

			Kommentar
Initialt aktiveringssteg:	15 minuter	95 °C	HotStarTaq DNA-polymeras aktiveras i det här värmesteget.
3-stegscyklning:			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Hybridisering	30 sekunder	53 °C	
Extension	20 sekunder	72 °C	
Antal cykler	42		
Slutlig extension:	5 minuter	72 °C	

6. **Placera PCR-rören i termocyklern och starta cyklingsprogrammet.**
7. **Fortsätt efter amplifieringen med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 20.**

Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor

Det här protokollet är avsett för immobilisering av mall-DNA på Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) före analys på systemet PyroMark Q24.

Saker som ska göras före start

- Låt alla reagenser och lösningar uppnå rumstemperatur (15–25 °C) innan du sätter igång.

Procedur

1. Skaka försiktigt flaskan som innehåller Streptavidin Sepharose High Performance tills lösningen är homogen.
2. Bered en huvudmix för DNA-immobilisering enligt tabell 6. Bered en volym som är 10 % större än vad som krävs för det totala antalet reaktioner som ska utföras.

Tabell 6. Huvudmix för DNA-immobilisering

Komponent	Volym/prov (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark bindningsbuffert	40
Vatten (H ₂ O, medföljer)	28
Total volym	70

3. Tillsätt 70 µl huvudmix i brunnarna i en PCR-platta med 24 brunnar eller remsor enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15).
4. Tillsätt 10 µl biotinylerad PCR-produkt från protokoll 2 i varje brunn med huvudmix enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15).

Obs: Den totala volymen per brunn ska vara 80 µl efter tillsats av huvudmix och PCR-produkt.

5. Förslut PCR-plattan (eller remsorna) med hjälp av remslocken.

Obs: Se till att det inte kan förekomma läckage mellan brunnarna.

6. Skaka PCR-plattan i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter vid 1400 rpm.

Obs: Förbered under tiden vakuumbestationen PyroMark Q24 för provberedning enligt anvisningarna i *PyroMark Q24 User Manual*.

7. Fortsätt omedelbart med "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24 ", sidan 22.

Obs: Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Infångning av kulor måste ske omedelbart efter skakning.

Om mer än 1 minut har gått sedan plattan (eller remsorna) skakades, ska du skaka på nytt i 1 minut innan kulorna fångas in.

Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24

Det här protokollet är avsett för beredning av enkelsträngat DNA och bindning av sekvenseringsprimern till mallen före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24.

Viktigt att tänka på före start

- Innan rören med sekvenseringsprimrar öppnas, ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Tillsätt de 2 olika sekvenseringsprimrarna enligt den förinställning för plattan som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15), beroende på analysregion (kodonerna 12 och 13 eller kodon 61)
- Arbetsflödet har ändrats något jämfört med den reviderade versionen R1 av handboken för *therascreen* KRAS Pyro Kit (steg 18). Förkorta inte tiden för nedkylning av proverna efter uppvärmning till 80 °C.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 och byt ut filterproberna när detta indikeras.

Saker som ska göras före start

- Placera en PyroMark Q24-plathållare på ett värmeblock med temperaturen 80 °C för användning i steg 17. Lämna en andra PyroMark Q24-plathållare i rumstemperatur (15–25 °C) för användning i steg 18.
- PyroMark tvättbuffert levereras som ett koncentrat, 10x. Innan det används första gången ska det spädas till en 1x-arbetslösning genom tillsats av 225 ml höggradigt rent vatten i 25 ml PyroMark tvättbuffert, 10x (slutlig volym 250 ml).

Obs: 1x PyroMark tvättbuffert-arbetslösning är stabil i 2–8 °C till angivet utgångsdatum.

Procedur

- 1. Späd en tillräcklig mängd av varje sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer KRAS 12/13 och sekvenseringsprimer KRAS 61, i PyroMark hybridiseringsbuffert enligt tabell 7.**

Bered en volym utspädd sekvenseringsprimer som är större än den volym som krävs för det totala antalet prover som ska sekvensbestämmas (antalet prover + en extra).

Tabell 7. Exempel på spädning av sekvenseringsprimrarna

Komponent	Volym/prov (μ l)	Volym för 9 + 1 reaktioner (μ l)
Sekvenseringsprimer KRAS 12/13 eller Sekvenseringsprimer KRAS 61	0,8	8
PyroMark hybridiseringsbuffert	24,2	242
Total volym	25	250

2. Tillsätt 25 μ l utspädd sekvenseringsprimer i varje brunn i PyroMark Q24-plattan enligt körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15).

Obs: Behåll en av PyroMark Q24-platthållarna (medföljer vakuumbrytaren PyroMark Q24) i rumstemperatur (15–25 °C), och använd den som hjälp när plattan bereds och flyttas.

3. Placera PCR-plattan (eller remsorna) från protokoll 3 och PyroMark Q24-plattan på arbetsbordet (bild 2).

Obs: Se till att plattan är i samma läge som när proverna laddades.



Bild 2. Placering av PCR-platta (eller remsor) och PyroMark Q24-platta på vakuumbrytaren.

4. Applicera vakuumbrytaren i verktyget genom att öppna vakuumbrytaren.

5. Sänk försiktigt ned vakuumverktygets filterprober i PCR-plattan (eller remsorna) för att fånga in kulorna som innehåller immobiliserad mall. Håll proberna på plats i 15 sekunder. Var försiktig när du tar upp vakuumverktyget.

Obs: Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Infångning av kulorna måste ske omedelbart efter skakning.

Om mer än 1 minut har gått sedan plattan (eller remsorna) skakades, ska du skaka på nytt i 1 minut innan kulorna fångas in.

6. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml 70-procentig etanol (bild 2). Spola filterproberna i 5 sekunder.
7. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml denatureringslösning (bild 2). Spola filterproberna i 5 sekunder.
8. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 50 ml tvättbuffert (bild 2). Spola filterproberna i 10 sekunder.
9. Lyft upp vakuumverktyget och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (bild 3).

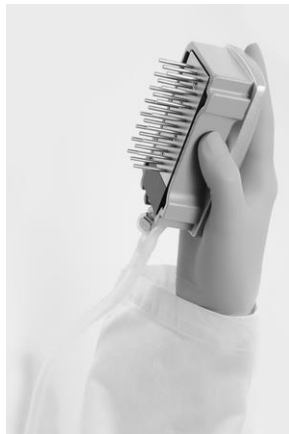


Bild 3. Bilden visar vakuumverktyget i mer än 90° lodrät lutning.

10. Stäng verktygets vakuumbrytare (Off) medan vakuumverktyget hålls ovanför PyroMark Q24 Plate.
11. Frigör kulorna i PyroMark Q24-plattan genom att sänka ned filterproberna i den utspädda sekvenseringsprimern och flytta verktyget försiktigt fram och tillbaka.
Obs: Var försiktig så att du inte skadar ytan på PyroMark Q24-plattan genom att skrapa den med filterproberna.
12. Flytta vakuumverktyget till tråget med höggradigt rent vatten (bild 2) och skaka verktyget i 10 sekunder.
13. Tvätta filterproberna genom att sänka ned proberna i höggradigt rent vatten (bild 2) och applicera vakuum. Spola proberna med 70 ml höggradigt rent vatten.
14. Lyft upp vakuumverktyget och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (bild 3).

- 15. Stäng verktygets vakuumbrytare (Off) och placera vakuumverktyget i parkeringsposition (P).**
- 16. Stäng av vakuumpumpen.**

Obs: I slutet av arbetsdagen ska vätskeavfall och återstående lösning kasseras och vakuumstationen PyroMark Q24 ska kontrolleras avseende damm och spill, se bilaga B, sidan 48).
- 17. Värm PyroMark Q24-plattan med prover i 80 °C i 2 minuter med hjälp av en föruppvärmd PyroMark Q24-platthållare.**
- 18. Ta bort PyroMark Q24-plattan från platthållaren och placera den på en andra PyroMark Q24-platthållare som förvarats i rumstemperatur (15–25 °C) för att låta proverna svalna till rumstemperatur i 10–15 minuter.**
- 19. Fortsätt med "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 26.**

Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet

Det här protokollet beskriver hur du bereder och laddar PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-kassetten samt hur du startar och slutför en körning på PyroMark Q24. Mer information om hur du utför en körning finns i användarmanualen till PyroMark Q24.

Viktigt att tänka på före start

- I rapporten "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15) finns information om mängden nukleotider, enzym och substratbuffert som behövs för en specifik körning.

Saker som ska göras före start

- Slå på PyroMark Q24. Strömbrytaren sitter på instrumentets baksida.

Procedur

1. Lös upp frystorkat enzym och substratblandningar i vardera 620 µl vatten (H₂O, medföljer).
2. Blanda genom att skaka flaskan försiktigt.

Obs: Vortexa inte!

Obs: Låt blandningen stå i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter för att försäkra dig om att den är helt upplöst. Kontrollera att lösningen inte är grumlig innan du fyller PyroMark Q24-kassetten. Om reagenserna inte ska användas omedelbart ska reagensflaskorna placeras på is* eller i ett kylskåp.

3. Låt reagenserna och PyroMark Q24-kassetten uppnå rumstemperatur (20–25 °C).
4. Placera PyroMark Q24-kassetten så att etiketten är vänd mot dig.
5. Ladda PyroMark Q24-kassetten med korrekta volymer av nukleotider, enzym och substratblandningar enligt bild 4.

Se till att inga luftbubblor överförs från pipetten till kassetten.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

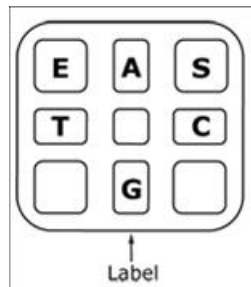


Bild 4. PyroMark Q24-kassetten sedd ovanifrån. Märkningarna motsvarar etiketterna på reagensflaskorna. Tillsätt enzymblandning (**E**), substratblandning (**S**) och nukleotider (**A**, **T**, **C**, **G**) enligt den mängd som anges i rapporten Pre Run [Info före körning] på menyn "Tools" [Verktyg] vid körningskonfigurationen.

6. **Öppna kassettdörren och sätt in den fyllda reagenskassetten med etiketten utåt. Tryck in kassetten helt och tryck den sedan nedåt.**
7. **Kontrollera att randen är synlig framför kassetten och stäng dörren.**
8. **Öppna ramen som håller plattan och placera plattan på värmeblocket.**
9. **Stäng ramen och instrumentluckan.**
10. **Sätt in USB-minnet (med körningsfilen) i USB-porten på instrumentets framsida.**
Obs: Ta inte bort USB-minnet förrän körningen är avslutad.
11. **Välj "Run" (Kör) i huvudmenyn (med skärmknapparna ▲ och ▼) och tryck på "OK".**
12. **Välj körningsfilen med skärmknapparna ▲ och ▼.**
Obs: Om du vill se innehållet i en mapp markerar du mappen och trycker på "Select" (Välj). Om du vill gå tillbaka till föregående fönster trycker du på "Back" (Bakåt).
13. **När körningsfilen är vald trycker du på "Select" (Välj) för att starta körningen.**
14. **När körningen är avslutad och instrumentet bekräftar att körningsfilen har sparats på USB-minnet trycker du på "Close" (Stäng).**
15. **Ta ut USB-minnet.**
16. **Öppna instrumentluckan.**
17. **Öppna kassettdörren och ta bort reagenskassetten genom att lyfta upp och dra ut den.**
18. **Stäng kassettdörren.**
19. **Öppna ramen som håller plattan och ta bort plattan från värmeblocket.**
20. **Stäng ramen och instrumentluckan.**
21. **Kassera plattan och rengör kassetten enligt instruktionerna i produktdatabladet som medföljde kassetten.**

22. Analysera körningen enligt "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 28.

Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning

Det här protokollet beskriver mutationsanalysen av en slutförd KRAS-körning med programmet PyroMark Q24.

Procedur

- 1. Sätt in USB-minnet (där den bearbetade körningsfilen finns) i datorns USB-port.**
- 2. Flytta körningsfilen från USB-minnet till önskad plats på datorn med hjälp av Utforskaren i Windows.**
- 3. Öppna körningsfilen i AQ-läget i programmet PyroMark Q24 genom att antingen välja "Open" (Öppna) i menyn "File" (Arkiv) eller genom att dubbelklicka på filen (👉) i snabbmenyn.**
- 4. Körningen kan analyseras på 2 sätt. Gå till steg 5 om du använder KRAS Plug-in Report. Gå till steg 6 om du använder den AQ-analys som är integrerad i systemet PyroMark Q24.**

Obs: Vi rekommenderar starkt att KRAS Plug-in Report används för tolkning av resultat. KRAS Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com. Rapporten garanterar att de respektive LOD-värdena (tabell 8) och de olika "Sequences to Analyze" (Sekvens att analysera) används för att detektera alla mutationer automatiskt.

5. Använda KRAS Plug-in Report:

Generera en rapport genom att välja "AQ Add On Reports/KRAS" (AQ-tilläggsrapporter/KRAS) och "Codon 12 and 13" (Kodon 12 och

13) eller "Codon 61" (Kodon 61) på menyn "Reports" (Rapporter).

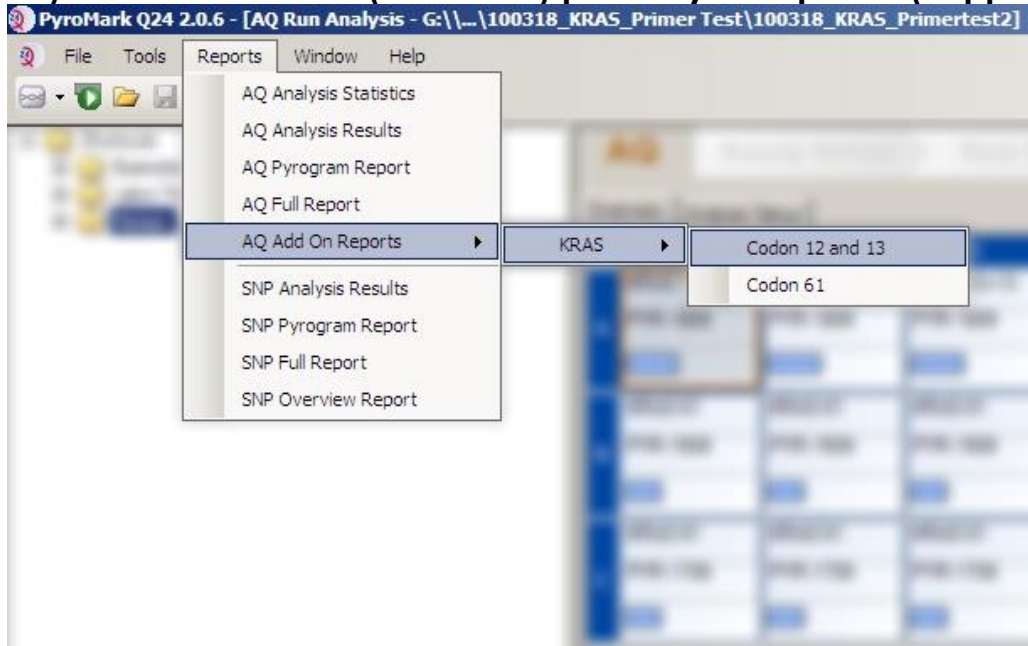


Bild 5. AQ-körningsanalys-fönstret.

Brunnarna analyseras automatiskt med avseende på alla mutationer för vilka LOD anges i tabell 8. Resultaten visas i en översiktstabell (bild 6) som följs av detaljerad resultatinformation, t.ex. pyrogram och analyskvalitet.

Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	⚠
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				

⚠ See detailed results for further explanation.

Bild 6. Tabell med resultatsammanfattning.

6. Använda AQ-analys:

Klicka på en av analysknapparna för att analysera körningen och få en översikt av resultaten.



Analysera alla brunnar.



Analysera den markerade brunnen.

Analysresultaten (allelfrekvenser) och kvalitetsbedömning visas ovanför variabelns position i Pyrogram[®]-kurvan. Mer information om hur en körning analyseras finns i *PyroMark Q24 User Manual*.

Generera en rapport genom att välja "AQ Full Report" (AQ fullständig rapport) eller "AQ Analysis Results" (AQ-analysresultat) på menyn "Reports" (Rapporter).

Obs: De mest frekventa mutationerna i KRAS finns i nukleotid 35 (andra basen i kodon 12). Därför är standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) för analysen av KRAS-kodonerna 12 och 13 inriktad på mutationer på denna position enligt definitionen i analyskonfigurationen (se bilaga A, sidan 45). Om ett prov innehåller en mutation i nukleotid 34 (första basen i kodon 12) kan "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ändras så att även mutationstatus för den aktuella positionen analyseras enligt beskrivningen i bilaga A. På samma sätt kan "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ändras för analysen för KRAS-kodon 61 enligt beskrivningen i bilaga A.

Uppdaterade frekvenser av mutationer i den mänskliga KRAS-genen i kodon 12/13 och kodon 61 finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Obs: För så pålitliga resultat som möjligt rekommenderar vi enskilda höjdtoppar på över 30 RLU. Ange 30 RLU som "required peak height for passed quality" (tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet) i analyskonfigurationen (se bilaga A och användarmanualen till PyroMark Q24).

Obs: Rapporten "AQ Analysis Results" (AQ-analysresultat) bör användas för dokumentation och tolkning av allelkvantifiering. De siffror som visas i pyrogrammet är avrundade och anger inte den exakta kvantifieringen.

Obs: Pyrogrammet ska alltid jämföras med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. De uppmätta topparna ska matcha höjden på histogramstaplarna.

Omanalys av prover där ingen mutation har detekterats i nukleotid 35 (kodon 12) eller 183 (kodon 61) eller med kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad).

Vi rekommenderar omanalys av alla prover där ingen mutation har detekterats med standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) samt av prover som kvalitetsbedömts som "Check" (Kontrollera) eller

"Failed" (Misslyckad). Kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) och "Failed" (Misslyckad) kan indikera en mutation i en annan position än nukleotid 35 eller 183, vilket resulterar i topphöjdsavvikelser från referensdispenseringarna. En topp i någon av de 3 första dispenseringarna påvisar exempelvis att en mutation är närvarande i nukleotid 34.

Om du vill omanalysera och fokusera på mutationer i nukleotid 34 går du till "Analysis Setup" (Analyskonfiguration) och ändrar "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) från GNTGRCGTAGGC till NGTGRCGTAGGC. Klicka på "Apply" (Tillämpa), och "To All" (För alla) när fönstret "Apply Analysis Setup" (Tillämpa analyskonfiguration) visas.

Om du vill omanalysera och fokusera på mutationer i nukleotid 182 (andra positionen i kodon 61) ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) i analysen för kodon 61 till följande sekvens.
CTCTHGACCTG

Om du vill omanalysera och fokusera på mutationer i nukleotid 181 (andra positionen i kodon 61) ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) i analysen för kodon 61 till följande sekvens.
CTCTTSACCTG

Obs: När du har ändrat "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ska du se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

Obs: Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta eller oväntade mutationer är inte resultatet en grund för bedömning av mutationsstatus. Vi rekommenderar att provet körs på nytt.

Tolkning av resultat

Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivåmutationer

Vi rekommenderar starkt att ometylerat kontroll-DNA ingår i varje körning för jämförelse och som kontroll för bakgrunds nivåer. Den uppmätta frekvensen för kontrollprovet ska vara mindre än eller lika stor som LOB (limit of blank).

Alla prover ska undersökas enligt detektionsgränsen (LOD, se tabell 8) och tolkas på följande sätt.

- Mutationsfrekvens $<$ LOD: Vildtyp
- Mutationsfrekvens \geq LOD och \leq LOD + 3 procentenheter: Potentiell lågnivåmutation

Obs: Om Plug-in Report används (steg 5 av "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 28) och detta inträffar genereras ett varningsmeddelande.

Prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation ska endast anses vara positiva för mutationen om det bekräftas genom att de körs om i duplikat tillsammans med ett prov med ometylerat kontroll-DNA. Resultatet för båda duplikaten ska vara \geq LOD och inte samma som kontrollprovet. Annars ska provet bedömas som vildtyp.

- Mutationsfrekvens $>$ LOD och + 3 procentenheter: Mutation

Om KRAS Plug-in Report används görs detta automatiskt.

Obs: Vi rekommenderar att KRAS Plug-in Report används för tolkning av resultat. För en närmare undersökning av prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation rekommenderar vi att även analysera provet manuellt i tillämpningsprogrammet (t.ex. för jämförelse med mutationsfrekvensen i kontrollprovet).

Obs: En uppmätt frekvens som ligger över LOB i kontrollprovet indikerar en högre bakgrunds nivå än vanligt i respektive körning, vilket kan påverka allelkvantifiering, särskilt för låga mutationsnivåer. I det här fallet är uppmätta frekvenser i intervallet från LOD (tabell 8) till LOD + 3 procentenheter inte en grund för bedömning av mutationsstatus. Vi rekommenderar att prover med en potentiell lågnivåmutation körs på nytt.

Obs: Algoritmen för KRAS Plug-in Report användes för att generera LOB- och LOD-data. Manuell analys med hjälp av PyroMark-tillämpningsprogrammet enligt beskrivningen i protokoll 6 (sidan 28) kan resultera i något annorlunda värden.

Obs: Ett beslut om behandling för cancerpatienter får inte enbart baseras på KRAS-mutationsstatus.

Tabell 8. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer

Nukleinsyra-substitution	Aminosyrasubstitution	LOB (procentenheter)	LOD (procentenheter)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), analyserad bakåt (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Den lägsta mutationsnivån i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \geq LOD.

Karakteristiska resultat vid användning av AQ-analysen som är integrerad i systemet PyroMark Q24

Karakteristiska pyrogramresultat visas i bild 7–11.

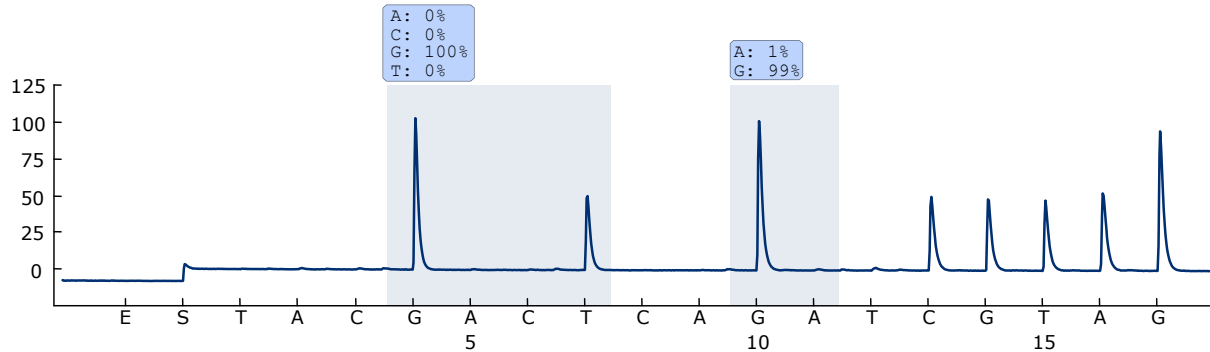


Bild 7. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp i kodonerna 12 och 13.

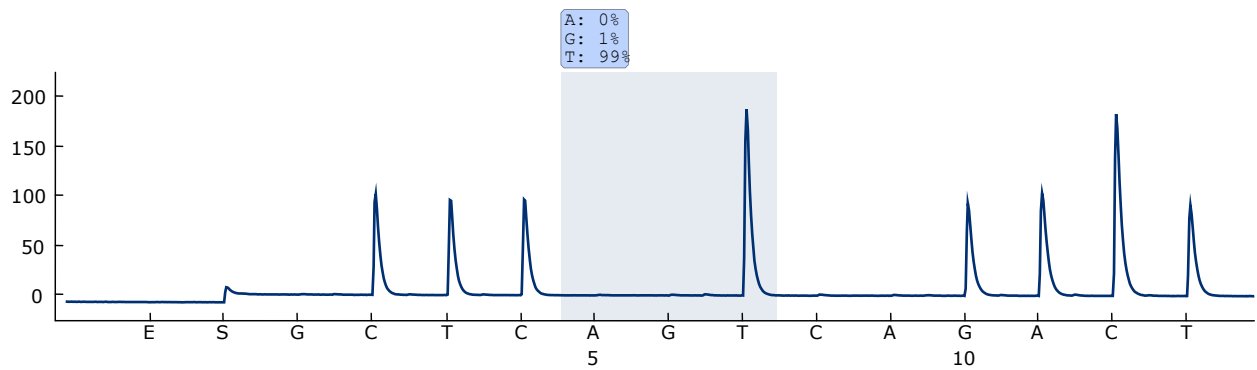


Bild 8. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp i kodon 61.

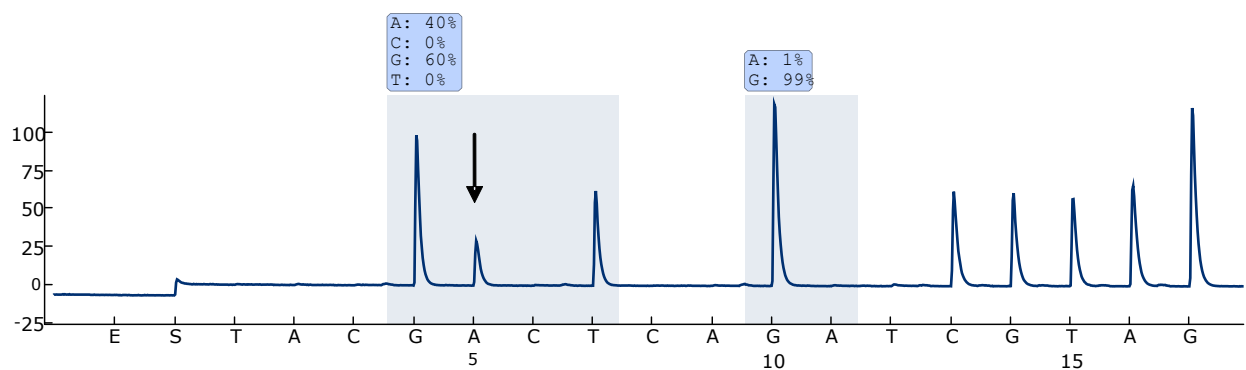


Bild 9. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en GGT → GAT-mutation i bas 2 i kodon 12 (nukleotid 35, indikeras med en pil).

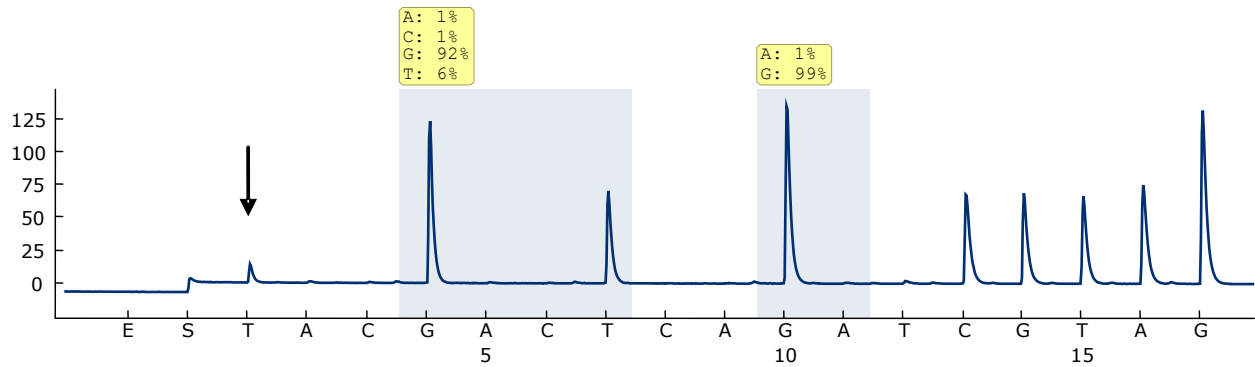


Bild 10. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en GGT → TGT-mutation i bas 1 i kodon 12 (nukleotid 34, indikeras med en pil), med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) GNTGRCGTAGGC bas 2 i kodon 12 (nukleotid 35) som mål. Den gula färgen indikerar att den här sekvensen är oväntad och behöver kontrolleras.

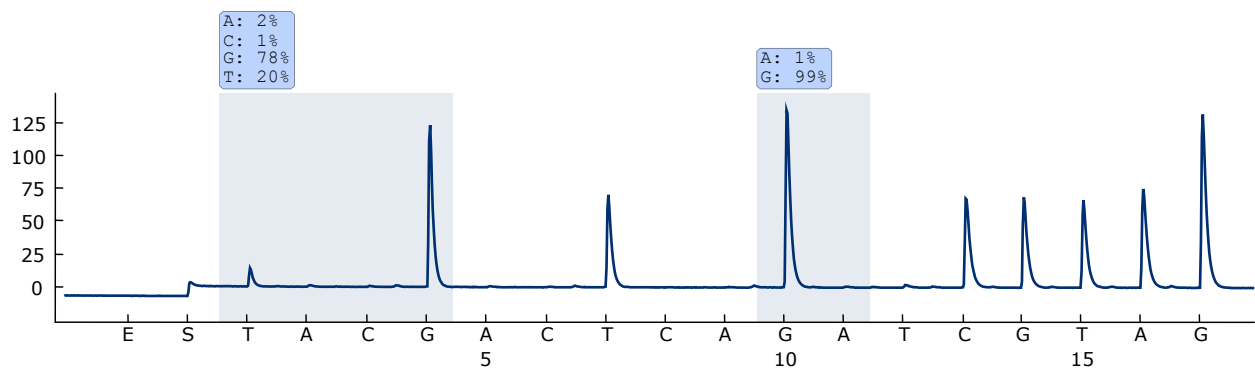


Bild 11. Pyrogramkurva och resultat som erhålls efter omanalys av provet i bild 10. Mutationen GGT → TGT TGT omanalysades med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) NGTGRCGTAGGC bas 1 kodon 12 (nukleotid 34) som mål.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vetenskapsmännen på QIAGENs tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på www.qiagen.com).

Obs: Se *PyroMark Q24 User Manual* för allmän felsökning av instrumentet.

Kommentarer och förslag

Signaler i kontrollen utan mall (negativ kontroll)

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Överhörning mellan brunnar | Signalen från en brunn har detekterats i en intilliggande brunn. Undvik att placera prover med hög signalintensitet bredvid brunnar med kontroll utan mall. |
| b) PCR-kontaminering | Använd sterila pipettspetsar med filter. Förvara och extrahera material såsom prover, kontroller och amplikon separerat från PCR-reagenser. |

Dålig eller oväntad sekvens

- | | |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Genomiskt DNA av dålig kvalitet | Genomiskt DNA av dålig kvalitet kan göra att PCR misslyckas. Analysera PCR-prover med hjälp av elektroforetisk teknik (t.ex. systemet QIAxcel [®] eller agarosgelelektrofores). |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad)

- | | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Låg topphöjd | Hanteringsfel vid PCR-konfigurationen eller provberedningen innan pyrosekvensering kan resultera i låga toppar. Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 och byt ut filterproberna när detta indikeras.

Om varningsmeddelandet "Check" (Kontrollera) visas ska du jämföra pyrogrammet noggrant med histogrammet, vilket visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna är resultatet giltigt. Annars rekommenderar vi att provet körs på nytt. |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Kommentarer och förslag

- b) Mutationen är inte definierad i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) Justera sekvensen som ska analyseras i analyskonfigurationen (se bilaga A, sidan 45) och analysera körningen på nytt.
- c) Oväntad och sällsynt mutation En kvalitetsbedömning med resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad) kan orsakas av ett oväntat mönster av toppar. Detta kan indikera en oväntad mutation som inte analyseras av plugin-rapporten. Dessa prover ska analyseras manuellt med programmet PyroMark Q24 där hänsyn ska tas till oväntade mutationer.
- d) Varning om topphöjdsavvikelse för en dispensering Pyrogrammet ska jämföras noggrant med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta mutationer, rekommenderar vi att provet körs på nytt.

Högt bakgrundsvärde

- a) Felaktig förvaring av nukleotider Förvara nukleotider i 2–8 °C. Förvaring i –15 till –30 °C kan orsaka en ökning i bakgrunden.
- b) Kort tid för nedkylning av prover innan analys med pyrosekvensering Förvara proverna på en PyroMark Q24-platthållare i rumstemperatur i 10–15 minuter. Förkorta inte tiden för nedkylning.
- c) Kontaminering av kassetten Rengör kassetten noggrant enligt instruktionerna i produktdatabladet. Förvara kassetten skyddad mot ljus och damm.

Inga signaler i positiv kontroll (ometylerat kontroll-DNA)

- a) Otillräcklig mängd enzym eller substratblandning för alla brunnar Se till att fylla PyroMark Q24-kassetten enligt "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg).
- b) Reagenser felaktigt förvarade eller spädda Bered PyroMark Q24 Gold-reagenserna enligt de instruktioner som medföljde reagenserna.

Kommentarer och förslag

- | | |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| c) Otillräcklig aktivering av HotStarTaq DNA-polymeras | HotStarTaq DNA-polymeras i PyroMark PCR-huvudmix kräver aktivering i 15 minuter vid 95 °C. |
| c) PCR- eller provberedningsfel | Hanteringsfel vid PCR-konfiguration, programmering av PCR-cyklern eller provberedning innan pyrosekvensering kan resultera i uteblivna signaler. Utför funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 och byt ut filterproberna när detta indikeras. Upprepa PCR och analys med pyrosekvensering. |

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* KRAS Pyro Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med resultat från andra kliniska studier och laboriestudier.

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENs egenskapsstudier.

Testets egenskaper

LOB och LOD

LOB (limit of blank) och LOD (limit of detection) har fastställts för ett antal mutationer med hjälp av blandningar av plasmider (tabell 9). LOB och LOD fastställdes enligt rekommendationerna i Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". α - och β -fel (falskt positiva respektive falskt negativa resultat) ställdes in på 5 %.

LOB-värden representerar den frekvens som mätts upp med ett vildtypsprov. LOD-värden representerar den lägsta signal (uppmätt frekvens) som kan ses som positiv för den respektive mutationen.

Mutationen GGT → GTT i kodon 12

För den här mutationen var blankmätningarna konsekvent nära 0 procentenheter ($n=72$), vilket resulterade i en icke-gaussisk fördelning. LOD fastställdes därför med en annan metod, enligt rekommendationerna i CLSI Guideline EP17A. Den lägsta signalen som indikerar närvaro av en mutation (LOD) i den här positionen ställdes in på 1 procentenhet, vilket är tydligt över den konsekventa baslinjenivån på 0 procentenheter. Vid analys av ett prov med en mutationsnivå på 7% gav 95 % av resultaten ($n = 89$) en signal som kan anses vara positiv (\geq LOD, dvs., ≥ 1 % procentenhet).

Tabell 9. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procentenheter)	LOD (procentenheter)	COSMIC ID* (V42)
Kodon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), analyserad bakåt (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Den lägsta mutationsnivån i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \geq LOD.

Obs: De här värdena baserades på körningar där blandningar av plasmider som bar på vildtyps- eller mutantsekvensen användes som mall för PCR-amplifiering.

Obs: Algoritmen för KRAS Plug-in Report användes för att generera LOB- och LOD-data. Manuell analys med hjälp av PyroMark Q24-tillämpningsprogrammet enligt beskrivningen i protokoll 6 (sidan 28) kan resultera i något annorlunda värden.

Obs: Vi rekommenderar att metodegenskaperna bekräftas i laboratoriet.

Linjäritet

Linjäriteten uppmättes enligt riktlinjen CLSI EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline".

Plasmider som bar på vildtyps- och mutantsekvenser blandades i proportioner som gav följande mutationsnivåer: 0, 12,5, 25, 37,5 och 50 %. Fyra replikat av blandningarna placerades i ett slumpmässigt mönster på en platta och analyserades. Resultaten för mutationen GGT → TGT i kodon 12 analyserades med programmet Analyse-it® v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) och visas i bild 12.

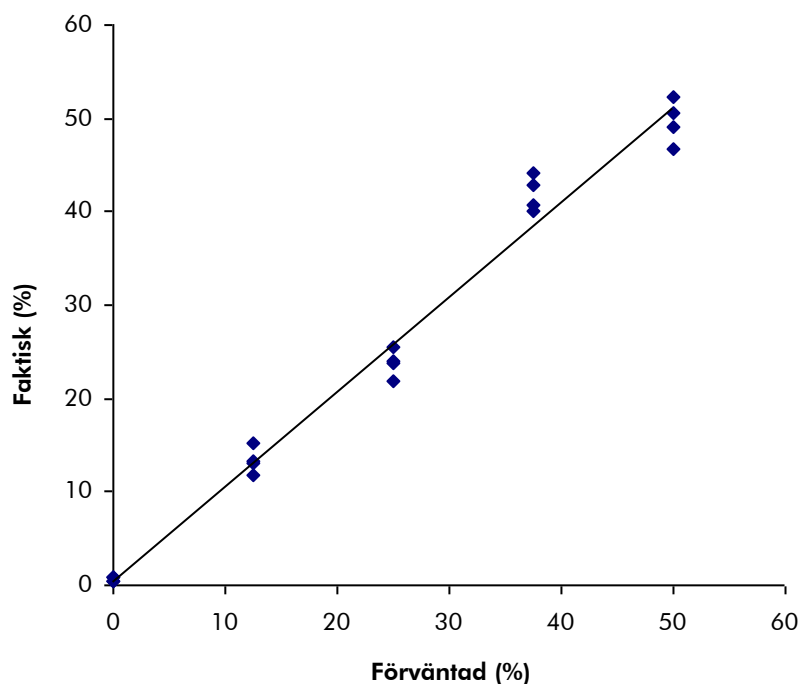


Bild 12. Linjäritet för mutationen GGT → TGT i kodon 12.

Den totala repeterbarheten var 1,64 procentenheter och resultaten var linjära inom en tillåten icke-linjäritet på 3 procentenheter. Liknande resultat erhöles för mutationen GGC → GAC i kodon 13.

Variationer inom laboratoriet

Bestämning av linjäritet för mutationen GGT → TGT i kodon 12 upprepades av 3 operatörer på 3 separata dagar med hjälp av olika kombinationer av instrumentet PyroMark Q24 och reagenser. Resultatet för de 3 körningarna visas i tabell 12.

Tabell 12. Variationer inom laboratoriet*

% muterad plasmid [†]	Körning 1		Körning 2		Körning 3		Sammanfattning	
	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

* Alla värden ges som procentenheter. SD: standardavvikelse.

[†] Baserat på OD₂₆₀-mätning.

Värdena för variationer inom laboratoriet (SD) var därför 0,6–2,0 procentenheter i det uppmätta intervallet på 0–50 % mutationsnivå.

Diagnostisk utvärdering

therascreen KRAS Pyro Kit utvärderades i jämförelse med DxS KRAS Mutation Kit. DNA extraherades från 100 formalinfixerade och paraffinbäddade (FFPE) prospektiva kolorektala tumörprover och analyserades med avseende på mutationer i kodonerna 12 och 13.

DNA för testning isolerades med EZ1 DNA Tissue Kit, och analysen genomfördes med *therascreen* KRAS Pyro Kit på systemet PyroMark Q24 och med DxS KRAS Mutation Kit på ABI PRISM[®] 7900HT SDS.

Av de 100 prover som analyserades kunde mutationsstatus bestämmas i 91 prover med DxS KRAS Mutation Kit. Med *therascreen* KRAS Pyro Kit var det möjligt att bestämma mutationsstatus för 94 prover.

Om de prover som misslyckades i ett av eller båda kiten räknades bort visade *therascreen* KRAS Pyro Kit och DxS KRAS Mutation Kit 100 % överensstämmande resultat.

Den diagnostiska sensitiviteten för *therascreen* KRAS Pyro Kit var 100 %, och den diagnostiska specificiteten var 100 % (tabell 13).

Tabell 13. Resultat för de analyserade prospektiva kolorektala tumörproverna för kodonerna 12 och 13

		DxS KRAS Mutation Kit			
		Mutant	Vildtyp	Okänd	Totalt
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Mutant	33	0	1	34
	Vildtyp	0	57	3	60
	Okänd	0	1	5	6
	Totalt	33	58	9	100

Analys av kodon 61

Samma 100 prover analyserades med avseende på mutationer i kodon 61 med *therascreen* KRAS Pyro Kit. Endast ett prov gav en misslyckad kvalitetsbedömning för kodon 61-analysen. Det här provet misslyckades också i både *therascreen* KRAS Pyro Kit- och DxS-analyserna för kodon 12 och 13, vilket indikerar att kvaliteten på DNA var för låg. Den högre andelen lyckade resultat för kodon 61-analysen indikerar att den är mindre beroende av DNA-kvaliteten än både *therascreen* KRAS Pyro Kit- och DxS-analyserna för kodon 12 och 13. Eftersom DxS-analysen inte testar för mutationer i kodon 61 kan ingen direkt jämförelse av analyserna göras.

Mutationer i kodon 61 upptäcktes i 4 av de 99 proverna. Tre prover innehöll frekventa mutationer (CAC, CAT, CTA) i kodon 61 medan det fjärde provet innehöll mutationer i både kodon 60 (GGT→GGA) och kodon 61 (CAA→AAA).

Obs: I alla körningar för bestämning av testegenskaper låg signalen på över 60 RLU, rutinmässigt erhållet från 10 ng DNA isolerat från formalinfixerad och paraffininbäddad (FFPE) vävnad.

Referenser

QIAGEN upprätthåller en stor, uppdaterad databas online med vetenskapliga publikationer där QIAGEN-produkter avhandlas. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelordssökning eller genom att specificera applikation, forskningsområde, titel, etc.

En fullständig lista med referenser finns i QIAGENS referensdatabas online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller hos QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Symboler



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test

<N>



Används senast



Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Innehåller



Antal



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support eller ringa någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Bilaga A: Konfigurera *therascreen* KRAS Pyro-analyser


Om KRAS Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna för kodonerna 12 och 13 och kodon 61 tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24 under sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/KRAS". Följande steg behöver inte utföras. KRAS Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com.

Vi rekommenderar starkt att du använder KRAS Plug-in Report framför manuell analys. Efter installation av plugin-rapporten eller varje gång ett nytt program har installerats eller uppgraderats på kontorsdatorn ska du verifiera att plugin-rapporten fungerar korrekt enligt anvisningarna i Plug-In Quick Guide.

Om KRAS Plug-in Report inte har installerats måste analysfilen konfigureras manuellt innan *therascreen* KRAS Pyro-analysen körs första gången. Konfigurera analysen för KRAS kodon 12 och 13 och KRAS kodon 61 med hjälp av programmet PyroMark Q24 enligt beskrivningen nedan.

Procedur

KRAS-kodoner 12 och 13

1. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).
2. Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).

GNTGRCGTAGGC

Obs: De mest frekventa mutationerna i kodon 12 kommer att detekteras i nukleotid 35 (andra positionen) med hjälp av "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera). Om du vill kontrollera huruvida mutationer finns närvarande i nukleotid 34 (första positionen) ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) till följande sekvens:

NGTGRCGTAGGC

Obs: Se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

3. Ange följande "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) manuellt:

TACGACTCAGATCGTAG

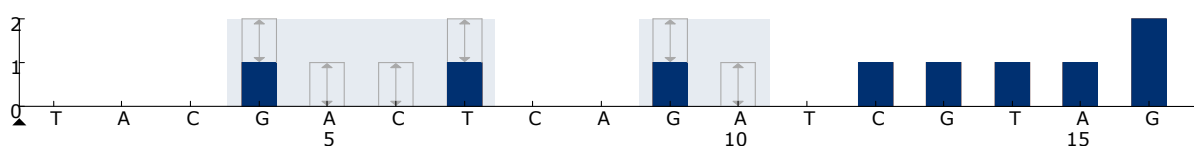


Bild 13. Histogram för kodonerna 12 (nukleotid 35) och 13 (nukleotid 38) med "Sequence to Analyze" GNTGRCGTAGGC.

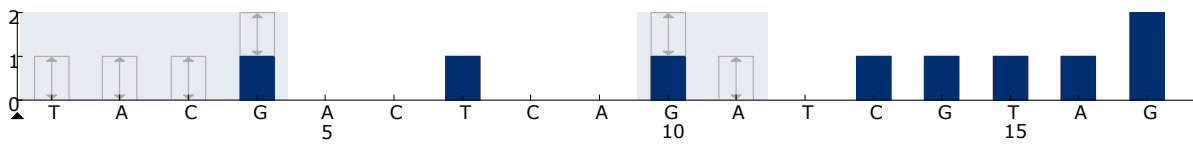




Bild 14. Histogram för kodonerna 12 (nukleotid 34) och 13 (nukleotid 38) med "Sequence to Analyze" NGTGRCGTAGGC.

4. Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.
5. Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "KRAScodon 12+13".

KRAS-kodon 61

6. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).
7. Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).
CTCDTGACCTG

Obs: De mest frekventa mutationerna i kodon 61 kommer att detekteras i nukleotid 183 (tredje positionen) med hjälp av sekvensen att analysera. Om du vill kontrollera huruvida mutationer finns närvarande i nukleotid 182 (första positionen) ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) till följande sekvens:

CTCTHGACCTG

Om du vill kontrollera huruvida mutationer finns närvarande i nukleotid 181 (första positionen) ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) till följande sekvens:

CTCTTSACCTG

Obs: Se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

8. Ange följande "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) manuellt.
GCTCAGTCAGACT

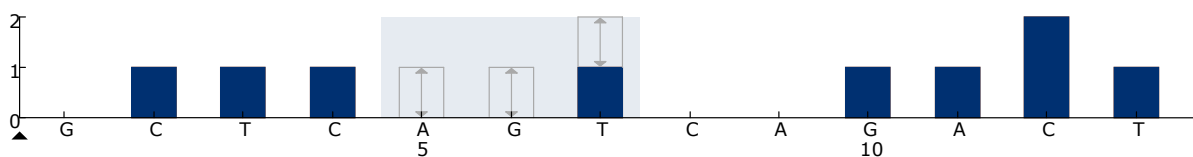


Bild 15. Histogram för kodon 61 (nukleotid 183) med "Sequence to Analyze" CTCDTGACCTG.

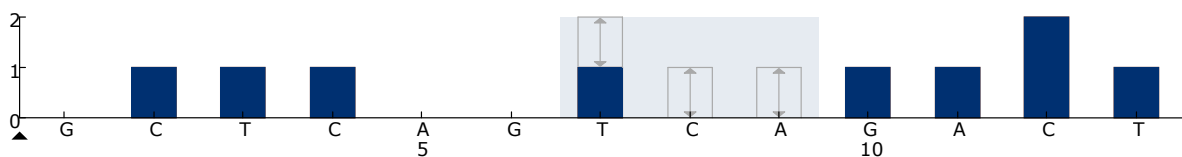


Bild 16. Histogram för kodon 61 (nukleotid 182) med "Sequence to Analyze" CTCTHGACCTG.

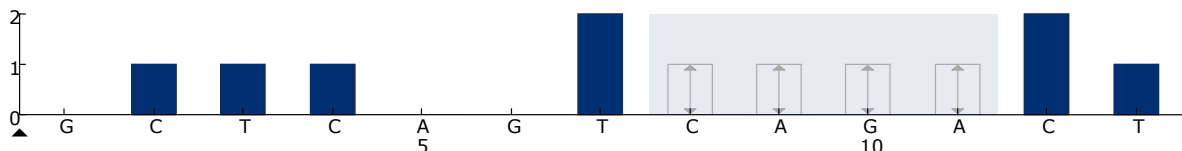




Bild 17. Histogram för kodon 61 (nukleotid 182) med "Sequence to Analyze" CTCTTSACCTG.

9. Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.
10. Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "KRAScodon 61".

Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trågen

VARNING 	Farliga kemikalier Denatureringslösningen som används tillsammans med vakuumbekämpningen innehåller natriumhydroxid som irriterar ögonen och huden. Använd alltid säkerhetsglasögon, handskar och en labbrock. Ansvarig person (t.ex. laboratoriechef) måste vidta nödvändiga åtgärder för att se till att den omgivande arbetsplatsen är säker och att användarna av instrumentet inte utsätts för farliga nivåer av giftiga ämnen (kemiska eller biologiska) enligt definitionen i tillämpliga materialsäkerhetsdatablad (SDSs) eller dokumenten OSHA,* ACGIH† eller COSHH‡. Ventilation för ångor och kassering av avfall måste ske i enlighet med alla nationella och lokala hälso- och säkerhetsföreskrifter och lagar.
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

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

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

Följ gällande nationella och regionala föreskrifter för miljövänlig hantering av laboratorieavfall.

Viktigt att tänka på före start

- För det här protokollet krävs höggradigt rent vatten (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com eller motsvarande).

Procedur

- 1. Se till att det inte finns något vakuum i vakuumverktyget. Kontrollera att vakuomet är stängt (Off) och att vakuumpumpen är avstängd.**
- 2. Kassera eventuell kvarvarande lösning i trågen.**
- 3. Skölj trågen med höggradigt rent vatten eller byt ut dem vid behov.**
- 4. Töm avfallsbehållaren.**
Obs: Locket kan tas bort utan att koppla loss slangarna.
- 5. Om vakuumbekämpningen måste rengöras (t.ex. från damm eller spill) följer du instruktionerna i *PyroMark Q24 User Manual*.**

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	För 24 reaktioner på PyroMark Q24-system: Seq-primrar, PCR-primrar, ometylerat kontroll-DNA, PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, PyroMark bindningsbuffert, PyroMark hybridiseringsbuffert, PyroMark denatureringslösning, PyroMark tvättbuffert, enzymblandning, substratblandning, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP och H ₂ O	971460
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vakuumbesättning (220 V) för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumbesättning (220 V) för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Tillämpningsprogram	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysprogram	9019062
Tillbehör		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatta för sekvensering med 24 brunnar	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter för dosering av nukleotider och reagenser	979302

* Endast UK.

† Övriga världen.

Produkt	Innehåll	Kat.nr
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Återanvändbara filterprober för vakuumstation PyroMark Q96 och Q24	979010
PyroMark Control Oligo	För installationskontroll av system	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	För bekräftelse av systemegenskaper	979304
Relaterade produkter		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: 50 QIAamp MinElute [®] -kolumner, proteinas K, buffertar, uppsamlingsrör (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	För 48 beredningar: reagenskassetter (Tissue), engångs-pipettspetsar med filter, engångs-spetshållare, provrör (2 ml), elueringsrör (1,5 ml), buffert G2, proteinas K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	För 50 beredningar: QIAamp Mini Spin-kolumner, buffertar, reagenser, rör, vakuumanslutningar	61104

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENs tekniska support eller din lokala distributör.

För användning gäller:

KÖPET AV DEN HÄR PRODUKTEN GER ANVÄNDAREN RÄTT ATT UTFÖRA DIAGNOSTISKA ANALYSER FÖR HUMAN IN VITRO-DIAGNOSTIK. INGET ALLMÄNT PATENT ELLER LICENS AV NÅGOT SLAG FÖRUTOM DEN HÄR SPECIFIKA RÄTTIGHETEN INGÅR I KÖPET.

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

Avtal om begränsad licens

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av *therascreen* KRAS Pyro Kit godkänner följande villkor:

1. *therascreen* KRAS Pyro Kit får endast användas i enlighet med *Handbok* för *therascreen* KRAS Pyro Kit och endast med de komponenter som finns i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i *Handbok för* *therascreen* KRAS Pyro Kit och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och ska inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kiten och/eller någon av deras komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, med ensamrätt.

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)

