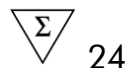


# Handbok för *therascreen*<sup>®</sup> UGT1A1 Pyro<sup>®</sup> Kit



Version 1

**IVD**

För in vitro-diagnostisk användning

**CE**

**REF**

971540

**HB**

1061270SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

**R3**

**MAT**

1061270SV



## **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](http://www.qiagen.com).

# Innehåll

<b>Avsedd användning</b>	<b>5</b>
<b>Sammanfattning och förklaring</b>	<b>5</b>
<b>Användningsprinciper</b>	<b>6</b>
Kontroller	7
<b>Material som medföljer</b>	<b>8</b>
Kitets innehåll	8
<b>Material som behövs men inte medföljer</b>	<b>10</b>
Rekommenderade plattmixrar	11
<b>Varningar och säkerhetsåtgärder</b>	<b>11</b>
Säkerhetsinformation	11
Allmänna säkerhetsåtgärder	11
<b>Förvaring och hantering av reagenser</b>	<b>13</b>
<b>Förvaring och hantering av prover</b>	<b>13</b>
<b>Procedur</b>	<b>14</b>
DNA-isolering	14
Protokoll	
■ 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR med de reagenser som medföljer <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	17
■ 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	26
■ 6: Analysera en PyroMark Q24-körning	29
<b>Tolkning av resultat</b>	<b>30</b>
Felsökningsguide	32
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>35</b>
<b>Begränsningar</b>	<b>35</b>
<b>Testets egenskaper</b>	<b>35</b>
Precision	35
Diagnostisk utvärdering	36

<b>Referenser</b>	<b>38</b>
<b>Symboler</b>	<b>39</b>
<b>Kontaktinformation</b>	<b>39</b>
<b>Bilaga A: Konfigurera <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro-analyser</b>	<b>40</b>
<b>Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trågen</b>	<b>42</b>
<b>Beställningsinformation</b>	<b>43</b>

## Avsedd användning

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit är ett in vitro-test med nukleinsyrasekvensering baserat på Pyrosequencing®-teknik för genotypning av allelvarianterna \*28 och \*6 i den mänskliga UGT1A1-genen i genomiskt DNA taget från mänsklig vävnad.

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit är avsett att ge läkare information som hjälper till att avgöra vilka patienter som har ökad risk för minskad UDP-glukuronosyltransferas-aktivitet. 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).

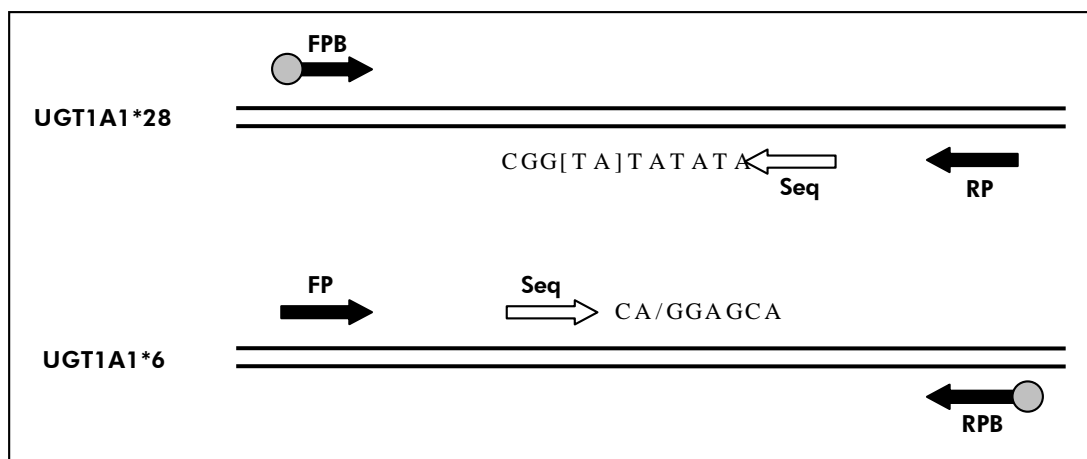
Produkten är endast avsedd att användas av professionella användare som tekniker och läkare som har utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer, molekylärbiologiteknik och systemet PyroMark Q24.

## Sammanfattning och förklaring

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit är avsett för genotypning av allelvariant \*28 (för att skilja mellan 6 och 7 TA-repetitioner) och allelvariant \*6 (för att skilja mellan genotyp G och A) i den mänskliga UGT1A1-genen. Kitet består av två analyser: en för genotypning av allelvariant \*28 och den andra för genotypning av allelvariant \*6 (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 genotypning och kvalitetsbedömning av analysen.

Allelvariant \*28 sekvenseras bakåt och allelvariant \*6 framåt.

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



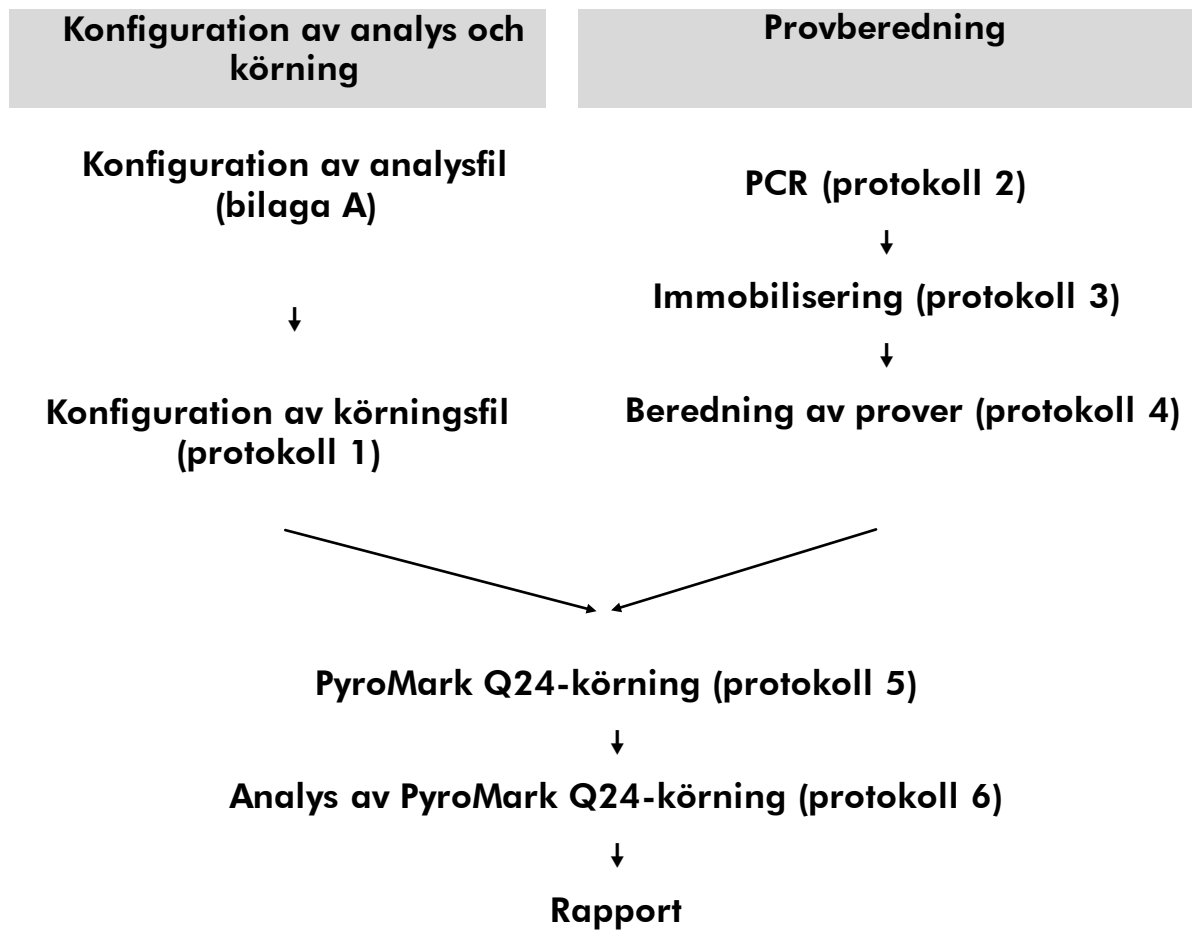
**Bild 1. Illustration av *therascreen* UGT1A1-analysen.** Den indikerade sekvensen är den analyserade sekvensen med polymorfa nukleotider som indikeras med hakparenteser eller snedstreck. En del av TA-repetitionerna som analyseras med UGT1A1 \*28-analysen täcks av sekvenseringsprimern. **FP, FPB:** framåt-PCR-primrar (B indikerar biotinylering); **RP, RPB:** bakåt-PCR-primrar (B indikerar biotinylering); **Seq:** sekvenseringsprimrar.

## Användningsprinciper

Arbetsflödet på sidan 7 illustrerar analysproceduren. Efter PCR med primrar med allelvarianterna \*28 och \*6 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 analyskonfigurationsfiler och en körningsfil.

**Obs:** Arbetsflödet har ändrats något jämfört med *användarmanualen till PyroMark Q24* (se "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 22).

## Arbetsflöde för *therascreen* UGT1A1 Pyro-proceduren



### Kontroller

Mänskligt kontroll-DNA ingår i kitet som en positiv kontroll för PCR och sekvenseringsreaktioner. Detta kontroll-DNA har en homozygot TA6/TA6- och G/G-genotyp när det analyseras för allelvarianterna \*28 respektive \*6.

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

# Material som medföljer


## Kitets innehåll

### *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit (förpackning 1/2)

<b><i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalognr</b>	<b>971540</b>
<b>Antal reaktioner</b>	<b>24</b>
PCR-primermix UGT1A1 *28	24 $\mu$ l
PCR-primermix UGT1A1 *6	24 $\mu$ l
Sekvenseringsprimer UGT1A1 *28	24 $\mu$ l
Sekvenseringsprimer UGT1A1 *6	24 $\mu$ l
PyroMark PCR-huvudmix, 2x	850 $\mu$ l
CoralLoad <sup>®</sup> -koncentrat, 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Mänskligt kontroll-DNA, 2 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l



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

<b>therascreen-buffertar och -reagenser</b>		
PyroMark bindningsbuffert		10 ml
PyroMark hybridiseringsbuffert		10 ml
PyroMark denatureringslösning*		250 ml
PyroMark tvättbuffert, 10x		25 ml
Enzymblandning		1 flaska
Substratblandning		1 flaska
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ 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 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (kat.nr 9001514 eller 9001513)\*†
- PyroMark Q24 Software (kat.nr 9019062 eller 9019063)†
- 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 (se "Rekommenderade plattmixrar", sidan 11)
- 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 produkten 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* UGT1A1 Pyro Kit.

**Tabell 1. Plattmixrar som rekommenderas för användning med *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit**

Tillverkare	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer komfort (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](http://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* UGT1A1 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

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 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 22) jämfört med *användarmanualen till PyroMark Q24*.
- 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).
- 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 genotyp.

## Förvaring och hantering av reagenser

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit levereras i två förpackningar. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit (förpackning 1/2) levereras på torris. PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, kontroll-DNA och alla primrar ska förvaras i  $-30$  till  $-15$  °C direkt vid ankomst.

Pyro-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2) som innehåller buffertar, enzymblandning, substratblandning, dATP $\alpha$ 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 6 frys-/upptiningscykler.

**Obs:** Nukleotider ska inte frysas.

*therascreen* UGT1A1 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, paraffininbäddade (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<sup>®</sup> DNA Tissue Kit och QIAamp<sup>®</sup> 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 kit från QIAGEN som visas i tabell 2 rekommenderas för DNA-rening från de angivna mänskliga provtyperna för användning med *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit. Utför DNA-reningen enligt instruktionerna i kit-handböckerna.

**Tabell 2. DNA-reningskit som rekommenderas för användning med *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit**

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

\* CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EC.


<sup>†</sup> 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<sup>®</sup> EZ1 (kat.nr 9000705; har utgått ur sortimentet) och EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9015862).

# Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet

## Saker som ska göras före start


- Skapa en analyskonfiguration enligt beskrivningen i "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* UGT1A1 Pyro-analyser", sidan 40. Detta behöver endast göras en gång innan du kör *therascreen* UGT1A1 Pyro-analysen för första gången.

## 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 allelvariant \*28 och allelvariant \*6 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:** Ett prov med mänskligt kontroll-DNA kan inkluderas för varje analys som en positiv kontroll för PCR- och sekvenseringsreaktionerna (se "Kontroller", sidan 7).

4. **När körningen är konfigurerad och redo att köras på PyroMark Q24 ska du skriva ut en lista med de volymer av enzymblandning, substratblandning och nukleotider som behövs, samt konfigurationen 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®.**

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 finns i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24", sidan 26.

## Körningsparametrar

Namn på körningen:	Namnet på körningen ges när filen sparas. Om du byter namn på filen ändras också namnet på körningen.
Instrumentmetod:	Välj instrumentmetod efter vilken kassettsom ska användas för körningen. Se instruktionerna som medföljer produkterna.
Platt-ID:	<b>Valfritt:</b> Ange ID för PyroMark Q24-plattan.
Streckkod:	<b>Valfritt:</b> Ange ett streckodsnummer för plattan eller, om du har en streckodsläsare ansluten till din dator, placera muspekaren i textrutan "Barcode" [Streckkod] (genom att klicka i rutan) och läs in streckkoden.
Reagens-ID:	<b>Valfritt:</b> Ange lotnumren för den <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit-förpackning 1 och -förpackning 2 som ska användas. Lotnumren finns på produktetiketten. <b>Obs:</b> Vi rekommenderar att du anger lotnumren så att eventuella oväntade problem med <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit kan spåras.
Anteckning om körningen:	<b>Valfritt:</b> 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 reagenser som medföljer *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit

Det här protokollet är avsett för PCR-amplifiering av en region för genotypning av allelvariant \*28 och en separat PCR-amplifiering av en region för genotypning av allelvariant \*6 med hjälp av *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit.

### Viktigt att tänka på före start

- HotStarTaq<sup>®</sup> DNA-polymeras i PyroMark PCR-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 prov-DNA vid behov till 0,4–2 ng/μl.  
**Obs:** Mänskligt kontroll-DNA som ingår i kitet har en koncentration på 2 ng/μl.

### Procedur

#### 1. Tina alla komponenter som behövs.

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**

<b>Komponent</b>	<b>Volym/reaktion (µl)</b>
PyroMark PCR-huvudmix, 2x	12,5
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5
PCR-primermix UGT1A1 allelvariant *28 <b>eller</b> PCR-primermix UGT1A1 allelvariant *6	1,0
Vatten (H <sub>2</sub> O, medföljer)	4,0
<b>Total volym</b>	<b>20,0</b>

**3. Blanda reaktionsmixen väl och fördela 20 µl 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 µl 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:** Ett prov med mänskligt kontroll-DNA kan inkluderas för varje analys som en positiv kontroll för PCR- och sekvenseringsreaktionerna (se "Kontroller", sidan 7).

**Tabell 4. Beredning av PCR**

<b>Komponent</b>	<b>Volym/reaktion (µl)</b>
Reaktionsmix	20
Prov-DNA	5
<b>Total volym</b>	<b>25</b>

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

**Tabell 5. Optimerat cyklingsprotokoll**

			<b>Kommentar</b>
<b>Initialt aktiveringssteg:</b>	15 minuter	95 °C	HotStarTaq DNA-polymeras aktiveras i det här värmesteget.
<b>3-stegscyklning:</b>			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Hybridisering	30 sekunder	53 °C	
Extension	20 sekunder	72 °C	
Antal cykler	42		
<b>Slutlig extension:</b>	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/reaktion (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark bindningsbuffert	40
Vatten (H <sub>2</sub> O, medföljer)	28
<b>Total volym</b>	<b>70</b>

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 2: PCR med de reagenser som medföljer *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit", sidan 17).  
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.  
Se till att det inte kan förekomma läckage mellan brunnarna.

**6. Skaka PCR-plattan i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter vid 1 400 rpm.**

Förbered under tiden vakuumstationen PyroMark Q24 för provberedning enligt anvisningarna i *användarmanualen till PyroMark Q24*.

**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 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.

## 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 (allelvariant \*28 eller allelvariant \*6).
- Arbetsflödet har ändrats något jämfört med *användarmanualen till PyroMark Q24* (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. Tillsätt höggradigt rent vatten i 25 ml 10x PyroMark tvättbuffert innan första användning för att uppnå en slutlig volym på 250 ml och få en 1x-arbetslösning.  
1x PyroMark tvättbuffert-arbetslösning är stabil i 2–8 °C till angivet utgångsdatum.

### Procedur

#### 1. Späd en tillräcklig mängd av varje sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer UGT1A1 \*28 och sekvenseringsprimer UGT1A1 \*6 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/reaktion ( $\mu$ l)	Volym för 9 + 1 reaktioner ( $\mu$ l)
Sekvenseringsprimer UGT1A1 *28 <b>eller</b> sekvenseringsprimer UGT1A1 *6	0,8	8,0
PyroMark hybridiseringsbuffert	24,2	242,0
<b>Total volym</b>	<b>25,0</b>	<b>250,0</b>

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

Behåll en av PyroMark Q24-platthållarna (medföljer vakuumbstationen 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 (se bild 2).**

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 vakuumbstationen.**

- 4. Applicera vakuumb i verktyget genom att öppna vakuumbrytaren.**

5. Sänk försiktigt ned filterproberna 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 vakuumentyttyget.

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



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

10. Stäng vakuumentyttygets vakuumbrytare (Off) medan vakuumentyttyget hålls ovanför PyroMark Q24-plattan.
11. Frigör kulorna i PyroMark Q24-plattan genom att sänka ned filterproberna i den utspädda sekvenseringsprimern och flytta vakuumentyttyget försiktigt fram och tillbaka.  
Var försiktig så att du inte skadar ytan på PyroMark Q24-plattan genom att skrapa den med filterproberna.
12. Flytta vakuumentyttyget till tråget med höggradigt rent vatten (bild 2) och skaka vakuumentyttyget 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 verktyget 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 verktyget 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: Tömma avfallsbehållaren och trågen", sidan 42).
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", sidan 26.

## Protokoll 5: Köra PyroMark Q24

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.

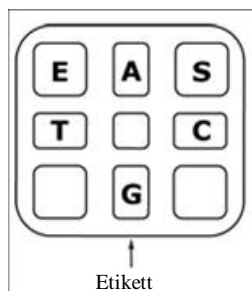
### Saker som ska göras före start

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

### Procedur

- 1. Lös upp frystorkat enzym och substratblandningar i vardera 620  $\mu$ l vatten ( $H_2O$ , medföljer).**
- 2. Blanda genom att skaka flaskan försiktigt. Vortexa inte!**  
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.**  
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 ▼.**  
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 29.**

## Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning

Det här protokollet beskriver genotypningsanalysen av en slutförd *therascreen* UGT1A1-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] på menyn "File" [Arkiv] eller genom att dubbelklicka på filen (👉) på snabbmenyn.
4. Klicka på en av analysknapparna för att analysera körningen och få en översikt av resultaten.



Analysera alla brunnar.



Analysera den markerade brunnen.

Mer information om hur en körning analyseras finns i *användarmanualen till PyroMark Q24*.

5. Generera en rapport genom att välja "SNP Full Report" [SNP fullständig rapport] eller "SNP Overview Report" [SNP översiktsrapport] på menyn "Reports" [Rapporter].

**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: Konfigurera *therascreen* UGT1A1 Pyro-analyser", sidan 40 och *användarmanualen till PyroMark Q24*).

**Obs:** Pyrogram<sup>®</sup> ska alltid jämföras noggrant med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. De uppmätta topparna ska matcha höjden på histogramstaplarna.

## Tolkning av resultat

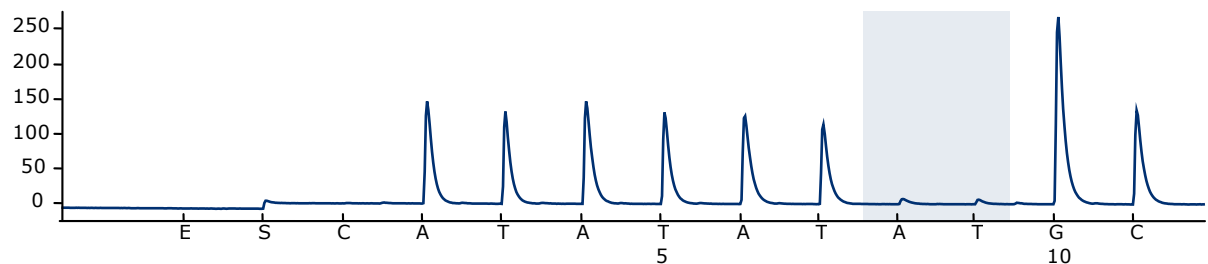
Medföljande mänskligt kontroll-DNA kan användas för att jämföra resultat. Detta kontroll-DNA har en homozygot TA6/TA6- och G/G-genotyp när det analyseras för allelvarianterna \*28 respektive \*6.

Genotypningsanalys utförs automatiskt av programmet PyroMark Q24 och ingår i "SNP Full Report" [SNP fullständig rapport] och "SNP Overview Report" [SNP översiktsrapport].

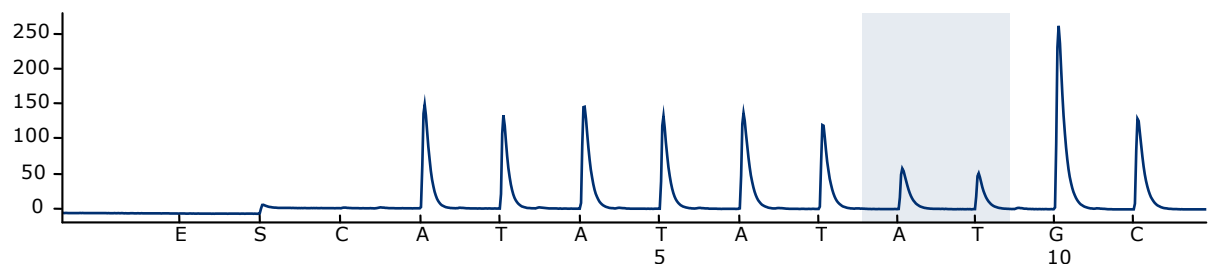
**Obs:** Kvalitetsbedömningen och varningarna som genereras i SNP-rapporterna är relevanta för genotypningsanalysen. Ytterligare kvalitetsbedömningar och varningar som genereras i AQ-läget för programmet PyroMark Q24 kan ignoreras.

### Karakteristiska resultat

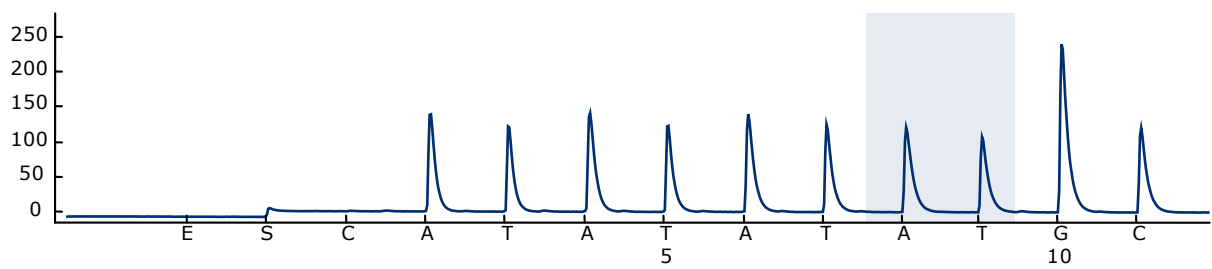
Karakteristiska pyrogramresultat visas i bild 5–10.



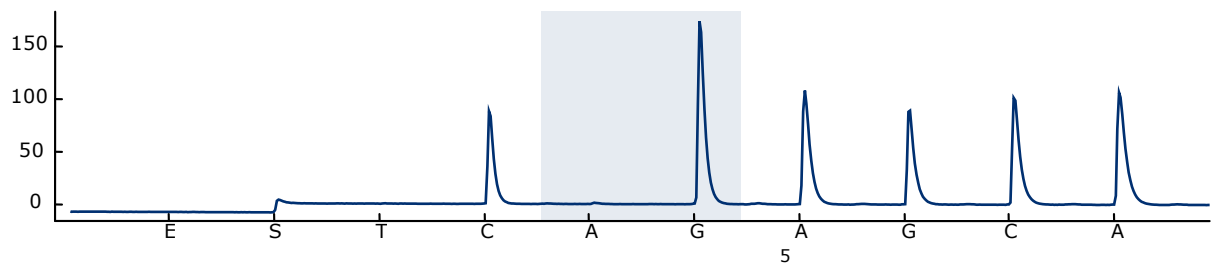
**Bild 5. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med genotypen –/– (TA6/TA6) när det analyseras för allelvarianten \*28.**



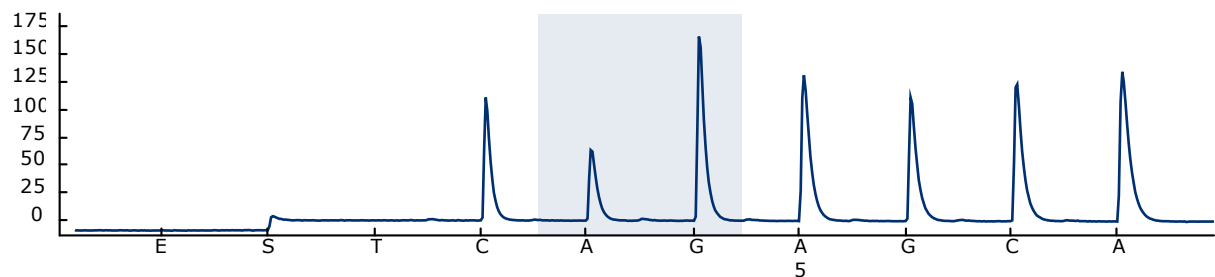
**Bild 6. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med genotypen –/TA (TA6/TA7) när det analyseras för allelvarianten \*28.**



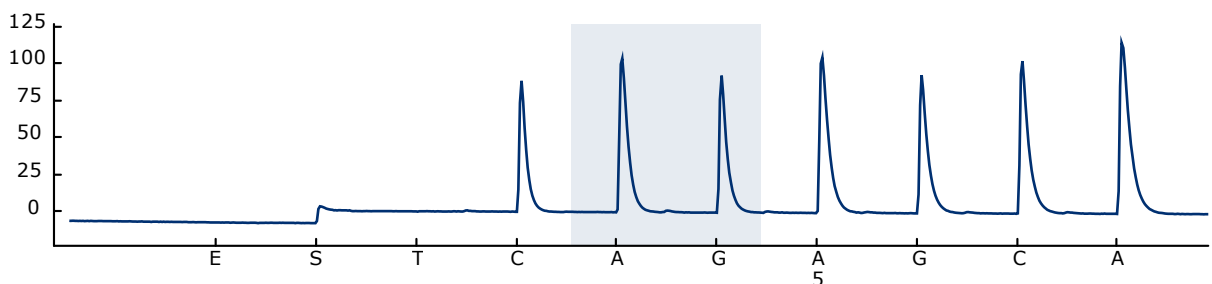
**Bild 7. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med genotypen TA/TA (TA7/TA7) när det analyseras för allelvarianten \*28.**



**Bild 8. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en genotyp G/G när de analyseras för allelvarianten \*6.**



**Bild 9. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en genotyp G/A när de analyseras för allelvarianten \*6.**



**Bild 10. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en genotyp A/A när de analyseras för allelvarianten \*6.**

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

**Obs:** Se *användarmanualen till PyroMark Q24* 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

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 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 <sup>®</sup> eller agarosgelelektrofores). |
|---------------------------------|--|



## Kommentarer och förslag

---

### Resultatet "Check" [Kontrollera] eller "Failed" [Misslyckad] i SNP-rapporten

- a) Varningen "Uncertain / Failed due to low peak height"  
[Osäker/Misslyckad på grund av låg topphöjd]
- Hanteringsfel vid PCR-konfigurationen eller provberedningen innan pyrosekvensering kan resultera i låga toppar.
- Det är viktigt att proverna tas upp helt av vakuumverktyget. Se till att vakuumverktyget sänks ned långsamt i proverna och att geometrin för den PCR-platta eller de remsor som används för immobilisering tillåter fullständig upptagning av proverna. Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i *användarmanualen till PyroMark Q24* och byt ut filterproberna när detta indikeras.
- Om kvalitetsbedömningen "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.
- b) Varningen "Uncertain / Failed genotype determination"  
[Osäker/Misslyckad bestämning av genotyp]
- Om kvalitetsbedömningen "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.
- För UGT1A1 \*28-analysen kan varningen orsakas av glidning av polymeras mellan TA-repetitioner, vilket kan vara mer uttalat för FFPE-tumörprover. Se till att DNA av hög kvalitet används som mall (t.ex. isolerat från blodprover) eller öka mängden mall-DNA.

## Kommentarer och förslag

---

- c) **Oväntade sällsynta allelvarianter**  
En kvalitetsbedömning med resultatet "Check" [Kontrollera] eller "Failed" [Misslyckad] kan orsakas av ett oväntat mönster av toppar. Detta kan indikera en oväntad allelvariant som inte analyseras av "Sequence to Analyze" [Sekvens att analysera]. Dessa prover ska analyseras med alternativet "Sequence to Analyze" [Sekvens att analysera] där hänsyn ska tas till oväntade allelvarianter.
- d) **Varning om topphöjdsavvikelse vid dispensering x**  
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 allelvarianter, rekommenderar vi att provet körs på nytt.

### Högt bakgrundsvärde

- a) **Felaktig förvaring av nukleotider**  
Förvara nukleotider i 2–8 °C. Förvaring i –10 till –25 °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.

## Kommentarer och förslag

---

### Inga signaler i positiva kontroller

- |  |  |
|--|--|
| 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 <i>therascreen</i> -reagenserna enligt instruktionerna i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24", sidan 26.   |
| 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 <i>användarmanualen till PyroMark Q24</i> 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* UGT1A1 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

### Precision

Precisionsdata möjliggör bestämning av den totala variabiliteten för analysen avseende korrekt genotypning av allelvarianterna \*28 och \*6. Plasmider som bar på allelvarianterna blandades i proportioner (0, 50, 100 %) som representerade de homo- och heterozygota genotyperna (\*28 TA6/TA6, TA6/TA7 och TA7/TA7; \*6 G/G, G/A och A/A). Varje blandning analyserades i

tre pyrosekvenseringskörningar med vardera tre replikat med olika loter av *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit, PyroMark Q24-instrument, operatörer, dagar och laboratorier.

Precisionen uttrycks som korrekt bestämning (dvs. andelen analyserade prover med ett korrekt genotypningsresultat). Analyserna för genotypningsanalysen av allelvarianterna \*28 och \*6 som listas i tabell 8 respektive 9 visade korrekt bestämning för 100 % av de analyserade proverna.

**Tabell 8. Precision för genotypning av allelvarianterna \*28**

Genotyp*	Antal prover	Korrekta bestämningar
Homozygot TA6/TA6	21	21
Heterozygot TA6/TA7	21	21
Homozygot TA7/TA7	20	20

\* Representeras av plasmidblandningar på 0, 50 och 100 % baserat på OD<sub>260</sub>-mätning.

**Tabell 9. Precision för genotypning av allelvarianterna \*6**

Genotyp*	Antal prover	Korrekta bestämningar
Homozygot G/G	21	21
Heterozygot G/A	21	21
Homozygot A/A	21	21

\* Representeras av plasmidblandningar på 0, 50 och 100 % baserat på OD<sub>260</sub>-mätning.

## Diagnostisk utvärdering

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit utvärderades i jämförelse med Sanger-sekvensering. DNA extraherades från 100 formalinfixerade och paraffinbäddade (FFPE) tumörprover och analyserades med avseende på allelvarianterna \*28 och \*6.

DNA isolerades med hjälp av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Analys med pyrosekvensering utfördes med *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit på PyroMark Q24 och Sanger-sekvensering på ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Av 100 prover som analyserades med Sanger-sekvensering kunde genotypen bestämmas i 95 och 99 prover för allelvarianterna \*28 respektive \*6. Med

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit var det möjligt att bestämma genotypen i 98 och 99 prover för allelvarianterna \*28 respektive \*6.

Tjugonio, 49 och 12 prover rapporterades av båda metoderna ha en TA6/TA6-, TA6/TA7- respektive TA7/TA7-genotyp. Fyra ytterligare prover uppvisade en TA6/TA6-genotyp med *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit medan Sanger-sekvenseringen detekterade en TA6/TA7-genotyp (tabell 10).

Bortsett från de prover som misslyckades med en eller båda metoderna visade *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit och Sanger-sekvensering 96 % överensstämmande resultat för genotypning av allelvarianterna \*28 (tabell 10).

**Tabell 10. Genotypningsresultat för allelvarianterna \*28 i prover från kaukasier**

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

Alla prover visade en homozygot G/G-genotyp för allelvariant \*6 med både Sanger-sekvensering och *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit. Detta resultat överensstämmer med det kända faktumet att genotyperna A/G och A/A praktiskt taget saknas hos kaukasisk befolkning. Därför isolerades DNA från ytterligare 26 pinnprover från munhålan hos asiater med hjälp av QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit på QIAcube® och analyserades med avseende på allelvarianterna \*6.

Båda metoderna rapporterade att femton, nio och två prover hade en G/G-, G/A- respektive A/A-genotyp (tabell 11).

Bortsett från de prover som misslyckades med en eller båda metoderna visade *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit och Sanger-sekvensering 100 % överensstämmande resultat för allelvarianterna \*6 (tabell 11).

**Tabell 11. Genotypningsresultat för allelvarianterna \*6 i prover från asiater**

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















**Obs:** I alla körningar för bestämning av testegenskaper låg signalen på över 30 RLU, rutinmässigt erhållet från 10 ng DNA isolerat från blod eller formalinfixerad och paraffininbäddad 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](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) eller hos QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

## Symboler

 $\Sigma$	Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test
	Används senast
	Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	Natriumhydroxid
	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](http://www.qiagen.com/Support) eller ringa någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Bilaga A: Konfigurera *therascreen* UGT1A1 Pyro-analyser

Analysfilen måste konfigureras innan *therascreen* UGT1A1-analysen körs första gången. Konfigurera analysen för UGT1A1-allelvarianter med hjälp av programmet PyroMark Q24, enligt beskrivningen nedan.

### Procedur

#### UGT1A1 \*28

1. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" [Ny AQ-analys].
2. Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" [Sekvens att analysera].  
**ATATAT[AT]GGCA**
3. Ange följande "Dispensation Order" [Dispenseringsordning] manuellt.  
**CATATATGC**
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 **UGT1A1 \*28**.

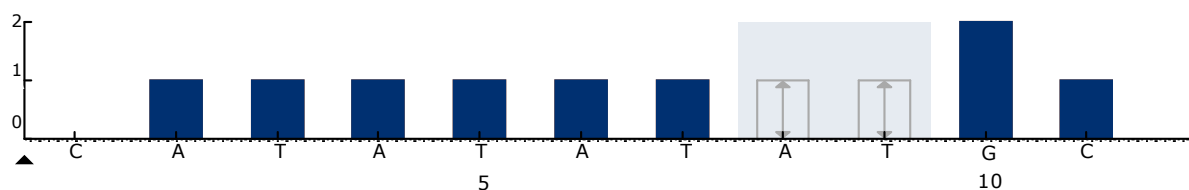



Bild 11. Histogram för genotypning av UGT1A1-allelvariant \*28.


#### UGT1A1 \*6

1. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" [Ny AQ-analys].
2. Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" [Sekvens att analysera].  
**CRGAGCAT**
3. Ange följande "Dispensation Order" [Dispenseringsordning] manuellt.  
**TCAGAGCA**
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.





## Bilaga B: Tömning avfallsbehållaren och trågen

<b>VARNING</b> 	<b>Farliga kemikalier</b> <p>Denatureringslösningen som används tillsammans med vakuumbekämpningen innehåller natriumhydroxid som irriterar ögonen och huden.</p> <p>Använd alltid säkerhetsglasögon, handskar och en labbrock.</p> <p>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,<sup>†</sup> eller COSHH<sup>‡</sup>.</p> <p>Ventilation för ångor och kassering av avfall måste ske i enlighet med alla nationella och lokala hälso- och säkerhetsföreskrifter och lagar.</p>
---	---

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

<sup>†</sup> ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (USA)

<sup>‡</sup> 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.

### Procedur

**B1. Se till att det inte finns något vakuum i vakuumentytet. Kontrollera att vakuemet är stängt (Off) och att vakuumpumpen är avstängd.**

**B2. Kassera eventuell kvarvarande lösning i trågen.**

**B3. Skölj trågen med höggradigt rent vatten eller byt ut dem vid behov.**

**B4. Töm avfallsbehållaren.**

Locket kan tas bort utan att koppla loss slangarna.

**B5. Om vakuumbekämpningen måste rengöras (t.ex. från damm eller spill) följer du instruktionerna i användarmanualen till PyroMark Q24.**

## Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit (24)	För 24 reaktioner på PyroMark Q24-system: Seq-primrar, PCR-primrar, mänskligt kontroll-DNA, PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, PyroMark bindningsbuffert, PyroMark hybridiseringsbuffert, PyroMark denatureringslösning, PyroMark tvättbuffert, enzymblandning, substratblandning, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP och H <sub>2</sub> O	971540
<b>Tillbehör</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatta för sekvensering med 24 brunnar	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter för dosering av nukleotider och reagenser	979302
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
<b>Relaterade produkter</b>		
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001514

Produkt	Innehåll	Kat.nr
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumstation (220 V) för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumstation (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
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 spinnkolonner, buffertar, reagenser, rör, vakuumanslutningar	61104

\* Endast UK

† Övriga världen

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](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Varumärken: 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).

#### **Avtal om begränsad licens**

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit godkänner följande villkor:

1. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit får endast användas i enlighet med handboken för *therascreen* UGT1A1 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 handboken för *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit och ytterligare protokoll som finns på [www.qiagen.com](http://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. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får 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 kitet godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka ofillägna 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 kitet och/eller någon av dess komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, med ensamrätt.

[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)

