

November 2017

therascreen[®] PITX2 RGQ PCR Kit Handbuch



Version 1

IVD

In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM
Thermocycler

Zur Verwendung mit dem QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Zur Verwendung mit dem EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite Kit

CE

REF

873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,
DEUTSCHLAND

R1 **MAT**

1107245DE



Inhalt

| | |
|---|----|
| Verwendungszweck | 6 |
| Zusammenfassung und Erläuterung | 6 |
| Verfahrensprinzip | 7 |
| Mitgelieferte Materialien..... | 13 |
| Kit-Inhalt | 13 |
| Zusätzlich benötigtes Material..... | 13 |
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 16 |
| Sicherheitshinweise | 16 |
| Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen | 17 |
| Lagerung und Handhabung der Reagenzien | 20 |
| Transportbedingungen | 20 |
| Lagerungsbedingungen | 20 |
| Stabilität..... | 20 |
| Lagerung und Handhabung der Proben..... | 21 |
| Verfahren | 23 |
| Aufreinigung und Herstellung von genomischer DNA..... | 23 |
| Entparaffinierung von FFPE-Gewebeschnitten mit QIAGEN | |
| Entparaffinierungslösung | 24 |
| Manuelle gDNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit | 26 |
| Quantifizierung der DNA | 30 |
| Bisulfitreaktion der gDNA mit dem EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Protokoll: qPCR auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler | 38 |
| Interpretation der Ergebnisse | 57 |
| Datenanalyse | 57 |
| Angabe der Ergebnisse | 61 |
| Markierungen | 63 |
| Hilfe zur Fehlerbehebung | 68 |
| Qualitätskontrolle | 73 |
| Anwendungseinschränkungen | 73 |
| Leistungsmerkmale | 75 |
| Leerwertgrenze | 75 |
| Nachweisgrenze | 76 |
| DNA-Ausgangsmenge | 77 |
| Linearität | 78 |
| Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit | 78 |
| Störsubstanzen | 79 |
| Kreuzkontamination | 80 |
| Zeitraumen | 80 |
| Validierung des klinischen Cut-offs | 81 |
| Literatur | 83 |
| Symbole | 85 |
| Kontakt | 86 |
| Bestellinformationen | 87 |

Verwendungszweck

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit ist ein *In-vitro*-Echtzeit-PCR-Test, der DNA-Methylierungen spezifisch erkennt. Dieser Test dient zur Ermittlung des prozentualen Methylierungsverhältnisses (PMR, *percent methylation ratio*) im Promotor 2 für die hypophysäre Homöobox 2 (PITX2). Im Test reagiert genomische DNA (gDNA) aus FFPE-Gewebe von Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen mit Bisulfit zu bisDNA. Das PMR hilft Klinikern bei der Vorhersage des Ansprechens auf adjuvante anthracyclinbasierte Chemotherapie mit oder ohne endokrine Therapie bei Hochrisikopatientinnen mit östrogenrezeptorpositivem (ER+), HER2-negativem (HER-) Brustkrebs mit Lymphknotenbefall.

Das Produkt darf nur von Benutzern mit Qualifikationen wie z. B. MTA oder Ärzten verwendet werden, die für die Anwendung *in-vitro*-diagnostischer und molekularbiologischer Verfahren geschult wurden.

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wird zusammen mit der QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM Plattform benutzt.

Zusammenfassung und Erläuterung

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit wird für die Aufreinigung von DNA aus FFPE-Gewebe verwendet. Die hypophysäre Homöobox 2 (PITX2) ist ein Transkriptionsfaktor, der im Rahmen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs induziert wird. PITX2 ist ein Effektor des Wnt-Signalwegs: PITX2 rekrutiert und reagiert mit β -Catenin und erhöht so die Expression von Zielgenen, die bei Zellproliferation und -migration, Tumorprogression und Chemosensitivität eine Rolle spielen (1–6). Die Wirkung von PITX2 auf die Genexpression wird durch Methylierung in seiner Promotorregion reguliert, d. h. durch sogenannte epigenetische Modifikation. Kleine Moleküle, die sogenannten Methylgruppen, binden in der Promotorregion eines Gens an die DNA-Nukleinbase Cytosin. Die Aktivität eines solchen vollständig oder teilweise methylierten

Gens ist reduziert. Bei Brustkrebs dient PITX2 Berichten zufolge gleichzeitig als prognostischer und als prädiktiver Marker zur Abschätzung des Ansprechens auf eine endokrine bzw. anthracyclinbasierte Chemotherapie. Mehrere klinische Prüfungen verweisen auf eine starke statistische Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad der Promotorregion des PITX2-Gens und klinischen Outcome-Parametern wie progressionsfreies Überleben, metastasefreies Überleben, erkrankungsfreies Überleben und Gesamtüberleben (7–12).

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit ist ein methylierungsspezifischer Echtzeit-PCR-Assay (qMSP). Der Probenotyp ist bisDNA, d. h. genomische DNA (gDNA) nach Reaktion mit Bisulfit. Die gDNA wird aus FFPE-Gewebe (d. h. nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung) von Hochrisikopatientinnen mit östrogenrezeptorpositivem, HER2-negativem Brustkrebs mit Befall der Lymphknoten isoliert. Die Reaktion mit Bisulfit erlaubt eine Unterscheidung von methyliertem und nicht methyliertem PITX2. Das prozentuale Methylierungsverhältnis (PMR) der drei CpG-Motive im Promotor 2 des PITX2-Gens wird mithilfe von qMSP quantifiziert und von der Rotor-Gene AssayManager® Software mit Gamma Plugin und PITX2-Assay-Profil berechnet. Das erhaltene PMR liefert dem behandelnden Arzt Informationen darüber, wie wahrscheinlich eine Patientin auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie ansprechen wird. Beträgt das PMR 12 oder weniger, dann spricht die Patientin wahrscheinlich auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie an. Dagegen kann bei einem PMR über 12 eine andere Therapie vorgeschlagen werden, da die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens der Patientin auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie niedriger ist (siehe „Validierung des klinischen Cut-offs“ auf Seite 81)

Verfahrensprinzip

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit ist für Echtzeit-PCR (qPCR) vorgesehen und dient zur Ermittlung des prozentualen Methylierungsverhältnisses (PMR) im PITX2-Promotor 2. Als Probenotyp für das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wird gDNA nach Reaktion mit Bisulfit benötigt. Die Reaktion mit Bisulfit wird mit dem EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 59824 oder 59826) durchgeführt. Die gDNA für diese Reaktion stammt aus

FFPE-Gewebe von Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen, das mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr 60404) aufgereinigt wurde. Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

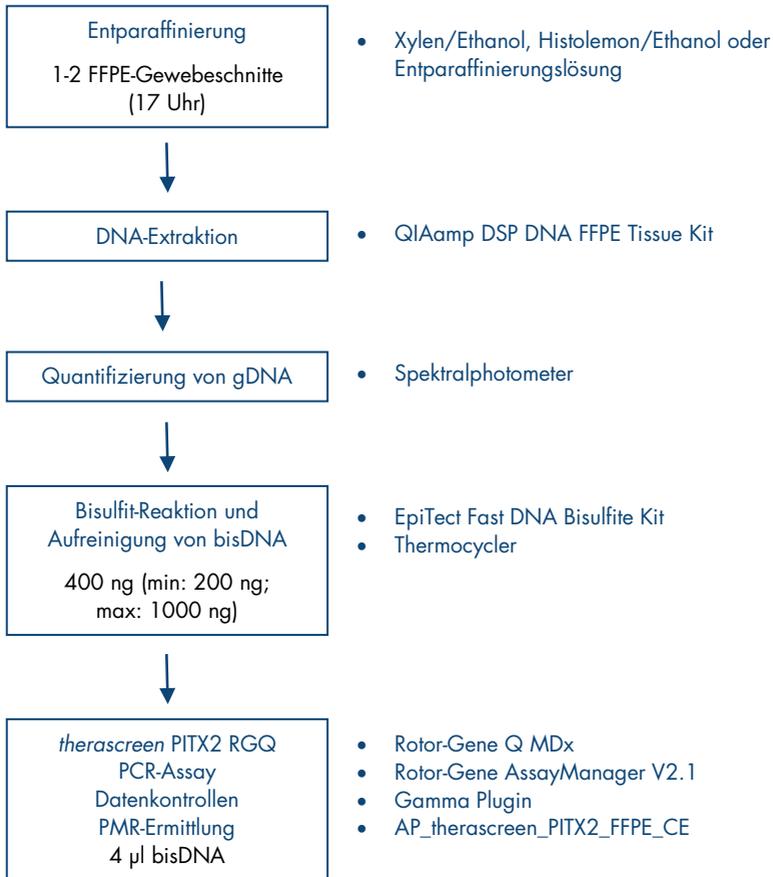


Abbildung 1. *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit – Arbeitsablauf

qPCR erlaubt den genauen Nachweis einer bisDNA-Zielsequenz während der exponentiellen Phase des Amplifikationsprozesses. qPCR-Daten stehen durch Echtzeitmessung von Fluoreszenzsignalen während der PCR schnell zur Verfügung und benötigen keine weitere Bearbeitung nach der PCR.

Der Assay des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits nutzt die oligonukleotidhydrolytische Aktivität von TaqMan®-Sonden in Kombination mit Primern, die von Methylierung unabhängig sind (Abbildung 2, nächste Seite). Bei diesem Assay erlaubt ein Primer-Paar die Amplifikation aller Zielsequenzen mit Bisulfit. Da zwei TaqMan-Sonden verwendet werden, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, ergibt diese Amplifikation zwei unterschiedliche Signale. Diese Sonden sind Oligonukleotide mit einem Reporterfarbstoff (FAM™ oder HEX™) am 5'-Ende und einem farblosen Quencher downstream am 3'-Ende. Die Sonden hybridisieren an die Zielsequenzen im PCR-Produkt. Dabei ist eine Sonde spezifisch für bisDNA-Sequenzen von methylierten Sequenzen, markiert mit FAM-Farbstoff. Die andere Sonde ist spezifisch für bisDNA-Sequenzen von unmethylierten Sequenzen, markiert mit HEX-Farbstoff. Die Analyse mittels TaqMan qPCR beruht auf der 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase *Thermus aquaticus* (*Taq*). Bei intakter Sonde führt die Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher zur Unterdrückung der Reporter-Fluoreszenz – ein Vorgang, der hauptsächlich auf dem Förster-Resonanzenergietransfer beruht. Wenn die gewünschte Zielsequenz vorhanden ist, lagern sich die Forward- und Reverse-Primer während der PCR an beiden Seiten der hybridisierten Sonde spezifisch an. Das 3'-Ende der Sonde ist blockiert, um eine Verlängerung der Sonde während der PCR zu verhindern (Abbildung 3, Seite 12). Die Sonde wird in der Polymerisationsphase durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase gespalten. Dies führt wiederum zur Abspaltung des Quencher-Farbstoffs und daher zur Emission des Reporter-Fluoreszenzsignals. Die Sondenfragmente werden dann von der Zielsequenz verdrängt und die Polymerisation des Strangs wird fortgesetzt. Dieser Vorgang findet in jedem Zyklus statt und hat keinen störenden Einfluss auf die exponentielle Akkumulation des Produkts (Abbildung 3, Seite 12). Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ist nur nachweisbar, wenn die Zielsequenz zu den Primern und zur Sonde komplementär ist und somit bei der PCR amplifiziert wird. Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion den von dem *therascreen* PITX2 Assay Package vorgegebenen Schwellenwert überschreitet, wird als C_T-Wert bezeichnet.

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit gibt daher am Ende zwei C_T -Werte aus, einen für FAM und einen für HEX. Anhand dieser ΔC_T -Werte von den beiden Signalen wird das PMR berechnet (Abbildung 2, nächste Seite). Die Berechnung des PMR beruht auf der folgenden Formel (11):

$$\text{PMR} = \frac{100}{1 + 2^{C_{T,\text{FAM}} - C_{T,\text{HEX}}}}$$

Das erhaltene PMR liefert dem behandelnden Arzt Informationen darüber, wie wahrscheinlich eine Patientin auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie ansprechen wird. Beträgt das PMR 12 oder weniger, dann spricht die Patientin wahrscheinlich auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie an. Dagegen kann bei einem PMR über 12 eine andere Therapie vorgeschlagen werden, da die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens der Patientin auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie niedriger ist.

Die Gesamtdauer zur Durchführung aller Vorgänge, von der gDNA-Aufreinigung bis hin zur Datenanalyse, beträgt weniger als zwei Arbeitstage.

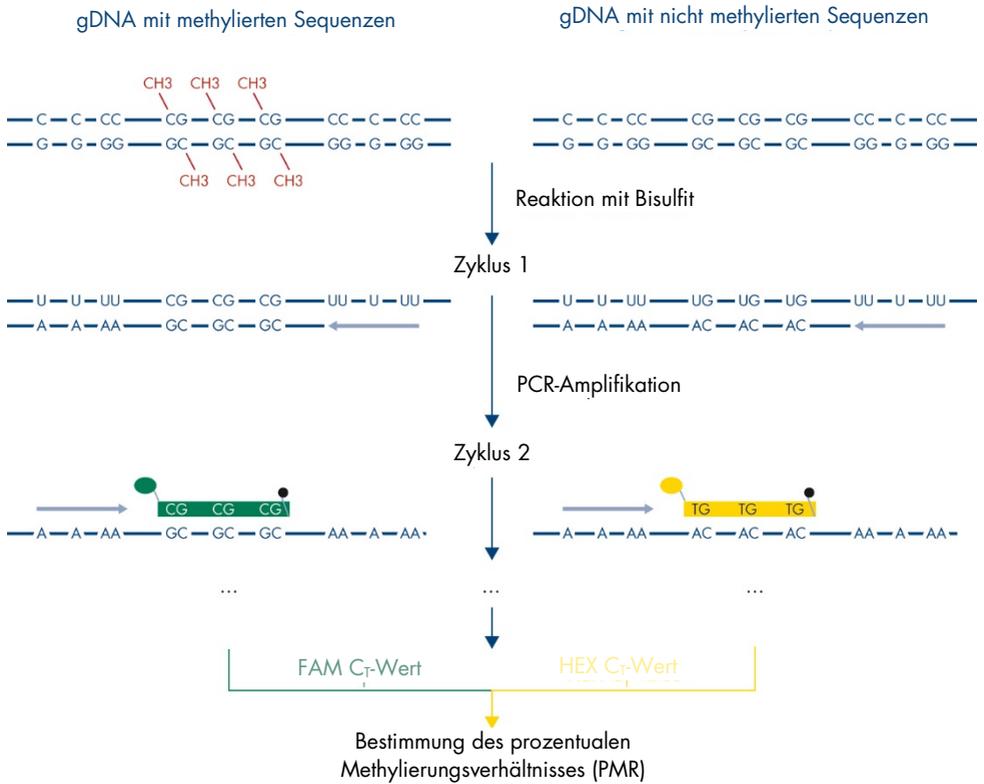


Abbildung 2. Assayprinzip des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits

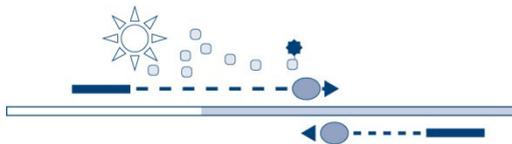


Annealing

Primer und Sonde hybridisieren

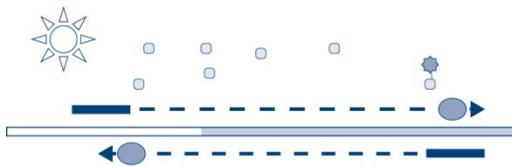


Polymerisation
Strangablösung



Spaltung

Der Quencher-Farbstoff wird abgespalten und das Reporter-Fluoreszenzsignal emittiert.



Abschluss der Polymerisation

Herstellung des PCR-Produkts ist abgeschlossen und in jedem Zyklus akkumuliert das Fluoreszenzsignal



Abbildung 3. Assayprinzip der Echtzeit-PCR mit TaqMan

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

| <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit | | (8) |
|---|---|---------------|
| Katalog-Nr. | | 873211 |
| Anzahl der Reaktionen | | 8 |
| Lila | PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx) | 660 µl |
| Blau | PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (PPM, Primer/Sonden-Gemisch) | 192 µl |
| Gelb | PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Referenz 50) | 12 µl |
| Orange | PITX2 RGQ PCR Reference Low (Referenz niedrig) | 12 µl |
| Grün | PITX2 RGQ PCR Negative Control (Negativkontrolle) | 12 µl |
| Farblos | PITX2 RGQ PCR NTC | 12 µl |
| – | Gebrauchsanleitung (Handbuch) | 1 |

Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden. Stellen Sie sicher, dass keine Kitreagenzien abgelaufen sind und alle Reagenzien unter den korrekten Bedingungen transportiert und gelagert wurden.

Reagenzien

- Ethanol (molekulare Reinheit 96–100 %)

Hinweis: Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, da dieser andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methylethylketon enthält.

Laborgeräte

- Thermomixer, beheizter Orbitalinkubator, Heizblock oder Wasserbad zur Inkubation bei 56 °C und 90 °C.

Hinweis: Wählen Sie eine Röhrchengröße, die mit dem Thermomixer kompatibel ist (z. B. 2-ml- oder 1,5-ml-Röhrchen).

- Einstellbare Pipetten* für die PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)

Es wird der Gebrauch von mindestens zwei Sätzen Pipetten empfohlen: einen Satz für die Herstellung und Verteilung der PCR-Reaktionsgemische und ein weiterer für die Handhabung von bisDNA und Kontrollen, einschließlich zum Laden der PCR-Templates.

- Benutzen Sie nukleasefreie, aerosolresistente, sterile PCR-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern (Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren werden empfohlen, um eine Kreuzreaktion zu vermeiden).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (1,5-ml- oder 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen) (1,5-ml-Röhrchen erhältlich beispielsweise von Eppendorf [*Safe-Lock Tubes, Katalog-Nr. 0030120.086*] oder Sarstedt [*Standard-Reagiergefäß, Katalog-Nr. 72.690*])
- Tischzentrifuge mit Rotor für 0,5-/1,5-/2,0-ml-Reaktionsröhrchen (zentrifugierbar bei 20000 g)
- Vortexmischer
- Spektralphotometer, z. B. NanoDrop® oder QIAxpert® (QIAamp Plugin: Gesamtnukleinsäuremessung)[†]
- Einweghandschuhe

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen der Hersteller geprüft und kalibriert wurden.

[†] Dies ist keine vollständige Liste von Anbietern.

Optionale Reagenzien zur Kontrolle des Arbeitsablaufes

- One vial containing one section (15 or 20 μm) of KRAS G13D Reference Standard (Ein Röhrcchen mit einem Schnitt (15 oder 20 μm) KRAS G13D Referenzstandard) (Horizon Discovery, Katalog-Nr. HD216).

Für die manuelle DNA-Aufreinigung

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404)
- Deparaffinization Solution (Entparaffinierungslösung) (Katalog-Nr. 19093) oder Xylen oder Histolemon) (Carlo Erba, Katalog-Nr. 454911)

Wichtig: Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit enthält weder Entparaffinierungslösung noch Xylen oder Histolemon. Diese Produkte müssen separat bestellt werden.

Zusätzlich für die Reaktion mit Bisulfit

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Katalog-Nr. 59824 oder 59826)
- 0,2-ml-Reaktionsröhrcchen oder 8-Well-Streifen
- 0,2-ml-Mikrozentrifugenröhrcchen
- Thermocycler mit beheiztem Deckel (da Bisulfitreaktionen nicht mit einer Schicht Mineralöl verschlossen werden können, sind nur Thermocycler mit beheiztem Deckel für dieses Verfahren geeignet.)

Für PCR mit Rotor-Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Katalog-Nr. 9002032) und mitgeliefertes Zubehör
- Rotor-Gene AssayManager Software, Version 2.1.x (x = 0 oder höher)
- Gamma Plugin Version 1.0.x (x = 0 oder höher) für Rotor-Gene AssayManager V2.1
- theascreen_PITX2_FFPE_CE Assay Profile V1.0.x (x = 1 oder höher)
- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (Ladeblock für 72 x 0,1-ml-Röhrcchen, Katalog-Nr. 9018901)

- 72-Well-Rotor (Katalog-Nr. 9018903)
- Adaptor Locking Ring (Adapter-Schließring) für 72-Well-Rotor (Katalog-Nr. 9018904)
- Rotor Holder (Rotorhalter, Katalog-Nr. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q MDx (Röhrchenstreifen und Deckel, 0,1 ml, für den Rotor-Gene Q MDx, Katalog-Nr. 981103 oder 981106)
- Eis (oder ein Kühlblock)

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDS) entnehmen. In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN® Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Sicherheitshinweise zu der Entparaffinierungslösung, Xylen/Ethanol, Histolemen/Ethanol, dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit oder EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit finden Sie im jeweiligen Handbuch. Sicherheitshinweise/-informationen zu den Geräten finden Sie in den jeweiligen Handbüchern.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Die Durchführung von qPCR-Tests setzt eine gute Laborpraxis voraus. Dazu gehört die Rückverfolgbarkeit, die Wartung der Laborgeräte, die ausschließlich für molekularbiologische Anwendungen zu verwenden sind, und die Einhaltung der Anforderungen aller geltenden Vorschriften und relevanten Standards.

Dieses Kit ist für den Gebrauch als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen. Die Reagenzien und Anweisungen in diesem Kit wurden auf optimale Leistung hin überprüft.

- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Die Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Die Reagenzien im *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann.
- Eine Verwendung von Reaktionsvolumina (Reaktionsgemisch plus Probe) unter oder über 20 µl wird nicht empfohlen.
- Bei QIAGEN wird jede einzelne Kit-Charge im Rahmen der Qualitätskontrolle zur Freigabe einem Funktionstest unterzogen. Die Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen daher nicht vermischt werden, da dies die Leistung beeinträchtigen kann.
- Beim Gesamtarbeitsablauf für *therascreen* PITX2 müssen Proben in andere Röhrchen überführt werden. Daher muss bei jedem Schritt streng auf die Rückverfolgbarkeit geachtet werden.
- Stellen Sie sicher, dass das Assay-Profil für PITX2 und das benötigte Rotor-Gene AssayManager V2.1 Plugin installiert sind.
- Weitere Informationen zu Warnhinweisen, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren finden Sie im Rotor-Gene Q MDx Handbuch (Rotor-Gene Q MDx User Manual) und im Rotor-Gene AssayManager V2.1 Core Application Handbuch (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual).

- Die Veränderung der Inkubationszeiten und -temperaturen kann zu falschen oder widersprüchlichen Ergebnissen führen.
- Tauen Sie alle Komponenten von *therascreen* PITX2 RGQ PCR und Proben in einem Kühlschrank, auf Eis, in einem Kühlblock oder bei Raumtemperatur so lang auf wie notwendig.

Hinweis: Beim Auftauen bei Raumtemperatur muss regelmäßig überprüft werden, ob das Material aufgetaut ist, insbesondere weil der PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx) dNTPs enthält, die temperaturempfindlich sind.

Hinweis: PITX2 RGQ PCR PPM muss vor Licht geschützt werden, da es Farbstoff-Nukleotide enthält.

Hinweis: Wiederholtes Auftauen und Einfrieren muss vermieden werden. Die Reagenzien dürfen nicht häufiger als viermal aufgetaut und wieder eingefroren werden.

- Bereiten Sie alle Reaktionen (Reaktionsgemisch und Probe) auf Eis oder in einem Kühlblock vor.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Die Reaktionsgemische können sich durch Lichteinwirkung verändern.
- Reagenzien dürfen nicht verschluckt werden.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Reaktionsgemische und die Zugabe der Templates einzelne Pipetten, die ausschließlich für den jeweiligen Vorgang vorgesehen sind.
- Warten Sie das Ende des Laufs ab, bevor Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler öffnen.
- Rotor-Gene Q MDx-Röhrchen dürfen nach Abschluss des Testlaufs nicht geöffnet werden. Die Röhrchen sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Ergreifen Sie alle Vorsichtsmaßnahmen, um sicherzustellen, dass die Proben korrekt analysiert werden. Achten Sie diesbezüglich besonders auf das Einsetzen der Proben, Beladungsfehler und Pipettierfehler.
- Achten Sie darauf, dass die Proben auf systematische Weise behandelt werden, um eine korrekte Identifizierung zu ermöglichen.

- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Reaktionsgemische mit den Materialien zu vermeiden, die in den Reagenzien PITX2 RGQ PCR Referenz 50 und PITX2 RGQ PCR Referenz Niedrigkontrolle enthalten sind.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination durch die Verschleppung von DNA oder PCR-Produkten zu verhindern, die zu einem falsch-positiven Signal führen kann.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination mit DNase zu vermeiden, die zu einem Abbau der Template-DNA führen kann.

Wir empfehlen daher Folgendes:

- Bei der Durchführung des Assays müssen nukleasefreie Laborgeräte (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) verwendet und Einweg-Handschuhe getragen werden.
- Verwenden Sie für alle Pipettierschritte frische, aerosolresistente Pipettenspitzen, um eine Kreuzkontamination von Proben und Reagenzien zu verhindern.

Setzen Sie das PCR-Reaktionsgemisch mit speziellen Materialien (Pipetten, Spitzen usw.) in einem speziellen Bereich an, in dem keine DNA-Matrizen (DNA, Plasmid oder PCR-Produkte) gehandhabt werden. Im gleichen Bereich geben Sie PITX2 RGQ PCR NTC in das dafür vorgesehene Röhrchen (Abbildung 4, Seite 41), schließen Sie dieses Röhrchen aber erst nach dem Laden aller anderen Kontrollen und Proben, um etwaige Kreuzkontaminationen zu beurteilen. Fügen Sie die zu testenden Proben, PITX2 RGQ PCR Referenz 50, PITX2 RGQ PCR Niedrigreferenz und PITX2 RGQ PCR Negativkontrolle in einem gesonderten Raum mit speziellen Materialien (Pipetten, Spitzen usw.) hinzu.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Transportbedingungen

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versendet. Wenn Bestandteile des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits beim Empfang nicht gefroren sind, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde oder die Lieferung keine Stückliste oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktangaben siehe www.qiagen.com).

Lagerungsbedingungen

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -30 bis -15°C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden.

Sicherheits- und Handhabungshinweise zu der Entparaffinierungslösung, Xylen/Ethanol, Histolemen/Ethanol, dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit oder EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit finden Sie im jeweiligen Handbuch.

Stabilität

Bei Lagerung unter den angegebenen Lagerungsbedingungen ist das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit bis zum Ablauf des angegebenen Verfallsdatums stabil.

Nach dem Öffnen können die Reagenzien bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei -30 bis -15°C in der Originalverpackung gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren muss vermieden werden. Die Reagenzien dürfen nicht häufiger als viermal aufgetaut und wieder eingefroren werden.

Hinweise zu der Stabilität von Entparaffinierungslösung, Xylen/Ethanol, Histolemen/Ethanol, dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit oder EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit finden Sie im jeweiligen Handbuch.

Achten Sie auf die Verfallsdaten und Lagerbedingungen, die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Lagerung und Handhabung der Proben

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit ist für bisDNA-Proben vorgesehen. Die aufgereinigte DNA nach Reaktion mit Bisulfit stammt aus FFPE-Tumorgewebe von Hochrisikopatientinnen mit primärem östrogenrezeptorpositivem, HER2-negativem Brustkrebs mit Lymphknotenbefall. Die Gewebeproben sollten nach der chirurgischen Entnahme so schnell wie möglich unter Befolgung des Laborprotokolls in Formalin fixiert werden (10 %iges neutral gepuffertes Formalin ist generell akzeptabel).

- So schnell wie möglich nach der chirurgischen Entnahme bzw. Stanzbiopsie sollten Gewebeproben in 4 bis 10 % Formalin fixiert werden.
- Die Fixierdauer sollte idealerweise bei 14 bis 24 Stunden liegen (längere Fixierdauer führt zu einer stärkeren DNA-Fragmentierung, was die Leistung von qPCR/qMSP-Assays beeinträchtigt).
- Die Proben sind vor dem Einbetten gründlich zu entwässern (Formalinrückstände können den Proteinase K-Verdau hemmen).
- Vom Paraffinblock müssen 5 µm dicke Schnitte angefertigt werden.
- Hat das Tumorgewebe im Gewebeschnitt eine Fläche < 100 mm², wird empfohlen, zwei Schnitte zu bearbeiten, damit die Gesamt-Tumorfläche mindestens 100 mm² beträgt.

-
- Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Tumorproben, Blöcke, Schnitte und Proben, die für die Aufreinigung bereit sind, auf kontrollierte Weise und unter Einhaltung der geltenden Vorschriften.
 - Transportieren und lagern Sie FFPE-Blöcke und -Schnitte bei Raumtemperatur. Die Schnitte können sofort für die Aufreinigung von DNA verwendet werden.
 - DNA, die mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit isoliert worden ist, kann für eine kurzzeitige Lagerung bis zu 24 Stunden bei 2 bis 8°C aufbewahrt werden. Eine Langzeitlagerung muss bei -30 bis -15 °C erfolgen.
 - DNA nach Reaktion mit Bisulfit, die mit dem EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit hergestellt worden ist, kann bei -30 bis -15 °C mindestens 9 Monate lang ohne Einbußen der Qualität bzw. Veränderung aufbewahrt werden. Es werden zurzeit weitere Untersuchungen zur Langzeitlagerung durchgeführt. Weiterführende Informationen dazu erhalten Sie von QIAGEN.
 - Schnitte des KRAS G13D Referenzstandards (Horizon Discovery, Katalog-Nr. HD216) für die Arbeitsablaufkontrolle können ab dem Herstellungsdatum 36 Monate lang bei Raumtemperatur gelagert werden.

Verfahren

Aufreinigung und Herstellung von genomischer DNA

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wurde in Kombination mit den folgenden Produkten validiert: QIAGEN Entparaffinierungslösung (Katalog-Nr. 19093) zur Entparaffinierung von FFPE-Schnitten, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404) für die Aufreinigung von gDNA und EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Katalog-Nr. 59824 oder 59826) für die Reaktion von gDNA mit Bisulfid.

Die Entparaffinierung des FFPE-Schnitts kann mit Entparaffinierungslösung, Xylen/Ethanol oder Histolemon/Ethanol erfolgen – die Äquivalenz dieser drei Entparaffinierungsmethoden wurde während der Produktentwicklung nachgewiesen.

Wird Entparaffinierungslösung (Katalog-Nr. 19093) benutzt, beginnen Sie mit dem Verfahren „Entparaffinierung von FFPE-Gewebeschnitten mit QIAGEN Entparaffinierungslösung“ auf Seite 24.

Wird Xylen/Ethanol oder Histolemon/Ethanol verwendet, gehen Sie direkt zum Verfahren „Manuelle gDNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ auf Seite 26 über.

Optional: Um den Erfolg der Aufreinigung und Bisulfidreaktion zu prüfen, kann eine Arbeitsablaufkontrolle verwendet werden. Für den Arbeitsablauf mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wurden KRAS G13D Referenzstandard-Schnitte (Horizon Discovery, Katalog-Nr. HD216) als Arbeitsablaufkontrollen validiert.

Stellen Sie sicher, dass die Reagenzien für die gDNA-Aufreinigung nicht abgelaufen sind und unter den korrekten Bedingungen transportiert und gelagert wurden. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Ausgangsmaterial

Ausgangsmaterial für DNA-Aufreinigungen sind frische FFPE-Gewebeschnitte, die bei Bedarf über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden können. Als Startmaterial für die gDNA-Aufreinigung müssen bis zu zwei Schnitte mit einer Dicke von 5 µm und einer Gesamtfläche über 100 mm² verwendet werden.

Entparaffinierung von FFPE-Gewebeschnitten mit QIAGEN Entparaffinierungslösung

WICHTIG: Wird die Entparaffinierung mit Xylen/Ethanol oder Histolemon/Ethanol durchgeführt, fahren Sie mit „Manuelle gDNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ auf Seite 26 fort.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Alle Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchzuführen.
- Äquilibrieren Sie alle Puffer auf Raumtemperatur; äquilibrieren Sie die Entparaffinierungslösung auf 20–25 °C.
- Entparaffinierungslösung ist im QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit nicht enthalten und muss separat bestellt werden.

Vorbereitende Schritte

- Heizen Sie einen Thermomixer oder einen beheizten Orbitalinkubator für den Gebrauch in den Schritten 4 und 8 auf 56 °C vor. Wenn kein Thermomixer oder beheizter Orbitalinkubator verfügbar ist, können Sie stattdessen einen Heizblock oder ein Wasserbad verwenden.
- Wenn der AL-Puffer oder der ATL-Puffer einen Niederschlag enthalten, kann dieser durch Erwärmen auf 70 °C unter leichtem Schütteln gelöst werden.
- Achten Sie darauf, AW1- und AW2-Puffer gemäß den Anweisungen im QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) vorzubereiten.

Verfahren (bis zu zwei Schnitte)

1. Schneiden Sie mit einem Skalpell überschüssiges Paraffin vom Probenblock ab.
Schneiden Sie Schnitte mit einer Dicke von 5 μm .

Hinweis: War die Oberfläche der Probe Luft ausgesetzt, entsorgen Sie die ersten zwei–drei Schnitte.

2. Geben Sie den Schnitt/die Schnitte sofort in ein 1,5-ml- oder 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten).
3. Geben Sie 160 μl Entparaffinierungslösung hinzu und mischen Sie 10 Sekunden lang gründlich mit dem Vortexmischer.
Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich die Probe am Boden des Röhrchens sammelt.
4. Inkubieren Sie 3 Minuten lang bei 56 °C und lassen Sie die Proben auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) abkühlen.
5. Geben Sie 180 μl ATL-Puffer dazu und mischen Sie auf dem Vortexmischer.
6. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 11.000 g (10.000 U/min). Zwei unterschiedliche Phasen werden sichtbar (blau und durchsichtig).
7. Geben Sie 20 μl Proteinase K zur unteren, durchsichtigen Phase. Drücken Sie die Pipette dazu durch die obere Phase. Mischen Sie den Inhalt vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren.
8. Inkubieren Sie ungefähr ≥ 1 Std. bei 56 °C ± 3 °C (bis die Probe vollständig lysiert ist).
9. Inkubieren Sie 1 Stunde ± 5 Min. bei 90 °C ± 5 °C.

Durch die Inkubation bei 90 °C in ATL-Puffer wird die Formaldehyd-Denaturierung der Nucleinsäuren teilweise rückgängig gemacht. Eine längere Inkubationsdauer bzw. eine höhere Inkubationstemperatur kann die DNA stärker fragmentieren.

Hinweis: Wenn Sie nur einen Heizblock verwenden, lassen Sie die Probe nach der Inkubation bei 56 °C in Schritt 8 bei Raumtemperatur (15–25°C) stehen, bis sich der Heizblock für Schritt 9 auf 90 °C erwärmt hat.

10. Zentrifugieren Sie das 1,5-ml-Röhrchen kurz, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.

11. Überführen Sie die untere, durchsichtige Phase in ein neues 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten).

Hinweis: Überführen Sie keine blaue Phase.

12. Fahren Sie mit Schritt 14 unter „Manuelle gDNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ auf Seite 26 fort.

Manuelle gDNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Die manuelle gDNA-Aufreinigung wird mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404) gemäß dem *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* durchgeführt.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Alle Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchzuführen.

Vorbereitende Schritte

- Äquilibrieren Sie alle Puffer bei Raumtemperatur.
- Stellen Sie einen Thermomixer oder einen beheizten Orbitalinkubator für den Gebrauch in Schritt 12 auf 56 °C ein.
- Wenn kein Thermomixer oder beheizter Orbitalinkubator verfügbar ist, können Sie stattdessen einen Heizblock oder ein Wasserbad verwenden.
- Wenn der AL-Puffer oder der ATL-Puffer einen Niederschlag enthalten, kann dieser durch Erwärmen auf 70 °C unter leichtem Schütteln gelöst werden.
- Achten Sie darauf, AW1- und AW2-Puffer gemäß den Anweisungen im *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* vorzubereiten.

Verfahren

Hinweis: Wird QIAGEN Entparaffinierungslösung verwendet, werden die Schritte 1 bis 14 mit dem Verfahren unter „Entparaffinierung von FFPE-Gewebeschnitten mit QIAGEN Entparaffinierungslösung“ auf Seite 24 ersetzt.

1. Schneiden Sie mit einem Skalpell überschüssiges Paraffin vom Probenblock ab.
2. Schneiden Sie 1 bis 2 Schnitte mit einer Dicke von 5 µm und sorgen Sie für mindestens 100 mm² Tumorrofläche (siehe „Ausgangsmaterial“ auf Seite 24).
War die Oberfläche der Probe Luft ausgesetzt, entsorgen Sie die ersten zwei–drei Schnitte.
3. Geben Sie die Schnitte sofort in ein 1,5-ml- oder 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten).
4. Fügen Sie 1 ml Xylen oder Histolemon zur Probe hinzu. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie ≥ 10 Sekunden lang gründlich mit dem Vortexmischer.
5. Zentrifugieren Sie bei voller Drehzahl 2 Minuten \pm 30 Sekunden lang bei Raumtemperatur.
6. Pipettieren Sie den Überstand ab. Lassen Sie das Pellet intakt.
7. Geben Sie 1 ml Ethanol (96–100 %) zu dem Pellet und mischen Sie auf dem Vortexmischer.
Ethanol entfernt restliches Xylen aus der Probe.
8. Zentrifugieren Sie bei voller Drehzahl 2 Minuten \pm 30 Sekunden lang bei Raumtemperatur.
9. Pipettieren Sie den Überstand ab. Lassen Sie das Pellet intakt.
Entfernen Sie etwaige Ethanolreste vorsichtig mit einer feinen Pipettenspitze.
10. Öffnen Sie das Röhrchen und inkubieren Sie es bei 15–40 °C. Die Inkubation dauert 10 Minuten \pm 1 Minute oder bis alle Ethanolrückstände verdunstet sind.
11. Resuspendieren Sie das Pellet in 180 µl ATL-Puffer. Geben Sie 20 µl Proteinase K dazu und mischen Sie auf dem Vortexmischer.
12. Inkubieren Sie ≥ 1 Std. bei 56 °C \pm 3 °C (oder bis die Probe vollständig lysiert ist).

13. Inkubieren Sie 1 Stunde \pm 5 Minuten bei $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Durch die Inkubation bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ATL-Puffer wird die Formaldehyd-Denaturierung der Nucleinsäuren teilweise rückgängig gemacht. Eine längere Inkubationsdauer bzw. eine höhere Inkubationstemperatur kann die DNA stärker fragmentieren. Wenn Sie nur einen Heizblock verwenden, lassen Sie die Probe nach der Inkubation bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei Raumtemperatur stehen, bis sich der Block auf $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt hat.

14. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.

Hinweis: Bei Verwendung von Entparaffinierungslösung fahren Sie mit Schritt 15 fort.

15. Geben Sie $200\text{ }\mu\text{l}$ AL-Puffer zu der Probe und mischen Sie gründlich auf dem Vortexmischer. Geben Sie dann $200\text{ }\mu\text{l}$ Ethanol (96–100 %) hinzu und mischen Sie erneut gründlich auf dem Vortexmischer.

Probe, AL-Puffer und Ethanol müssen unbedingt sofort und gründlich auf dem Vortexmischer oder durch Pipettieren zu einer homogenen Lösung gemischt werden. AL-Puffer und Ethanol können bereits vorab gemischt und gemeinsam hinzugegeben werden, um Zeit zu sparen, wenn mehrere Proben parallel verarbeitet werden. Bei Zugabe von AL-Puffer und Ethanol kann sich ein weißer Niederschlag bilden. Dieser Niederschlag wirkt sich nicht störend auf das QIAamp-Verfahren aus.

16. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.

17. Überführen Sie das gesamte Lysat sorgfältig auf die QIAamp MinElute® Säule (in einem 2-ml-Sammelröhrchen) ohne den oberen Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie ≥ 1 Minute lang bei 6000 g . Stellen Sie die QIAamp MinElute Säule in ein sauberes 2-ml-Sammelröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) und entsorgen Sie das Sammelröhrchen mit dem Filtrat.

Wenn das Lysat nach der Zentrifugation nicht vollständig durch die Membran gelaufen ist, wiederholen Sie die Zentrifugation bei einer höheren Geschwindigkeit, bis die QIAamp MinElute Säule leer ist.

18. Öffnen Sie die QIAamp MinElute Säule vorsichtig und geben Sie 500 µl AW1-Puffer dazu, ohne dabei den oberen Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie ≥ 1 Minute lang bei 6000 g. Stellen Sie die QIAamp MinElute Säule in ein sauberes 2-ml-Sammelröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) und entsorgen Sie das Sammelröhrchen mit dem Filtrat.
19. Öffnen Sie die QIAamp MinElute Säule vorsichtig und geben Sie 500 µl AW2-Puffer dazu, ohne dabei den oberen Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie ≥ 1 Minute lang bei 6000 g. Stellen Sie die QIAamp MinElute Säule in ein sauberes 2-ml-Sammelröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) und entsorgen Sie das Sammelröhrchen mit dem Filtrat.

Die QIAamp MinElute-Säule sollte möglichst nicht mit dem Filtrat in Berührung kommen. Manche Zentrifugenrotoren können während dem Abbremsen vibrieren, was dazu führt, dass das ethanolhaltige Filtrat mit der QIAamp MinElute Säule in Berührung gelangt. Gehen Sie beim Herausnehmen der QIAamp MinElute Säule und des Sammelröhrchens aus dem Rotor vorsichtig vor, damit das Filtrat nicht mit der QIAamp MinElute Säule in Berührung kommt.
20. Zentrifugieren Sie ≥ 3 Minuten lang bei voller Drehzahl (ungefähr 20.000 g), um die Membran vollständig zu trocknen.

Dieser Schritt ist notwendig, da eine Verschleppung von Ethanol in das Eluat die späteren qPCR-Reaktionen hemmen kann.
21. Stellen Sie die QIAamp MinElute Säule in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) und entsorgen Sie das Sammelröhrchen mit dem Filtrat. Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der QIAamp MinElute Säule und geben Sie 50 µl ATE-Puffer in die Mitte der Membran.
22. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–25 °C). Zentrifugieren Sie ≥ 1 Minute lang bei voller Drehzahl (ungefähr 20.000 g).

Quantifizierung der DNA

Zur Elution verwendeter ATE-Puffer in gDNA-Aufreinigungskits enthält den Konservierungsstoff Natriumazid. Da Natriumazid bei 260 nm absorbiert, muss zur Kalibrierung des Spektralphotometers ein Leerwert mit ATE-Puffer gemessen werden.

Die DNA-Konzentration wird anhand der Extinktion bei 260 nm mit der Gerätemethode gemessen. Zum Einsatz kommt dazu beispielsweise ein QIAxpert Spektralphotometer von QIAGEN (QIAamp Plugin: Gesamtnukleinsäuremessung) oder ein NanoDrop Spektralphotometer*. Um die Genauigkeit der Messwerte zu gewährleisten, muss die Extinktion bei 260 nm im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen. Eine Extinktion von 1 OD bei 260 nm entspricht 50 µg DNA pro ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 50 \text{ µg/ml}$). Gesamtmenge aufgereinigte DNA (ng) = DNA-Konzentration (ng/µl) × Probenvolumen (µl)

Hinweis: Bei Verwendung des QIAamp Plugins wird ein internes ATE-Leerspektrum automatisch von den OD-Werten abgezogen. Daher ist für diese Konfiguration keine zusätzliche ATE-Leerprobe erforderlich.

Idealerweise liegt die gDNA-Mindestkonzentration bei 10 ng/µl[†], es können jedoch Proben mit einer Mindestkonzentration von 5 ng/µl bearbeitet werden, wobei das Risiko ungültiger Ergebnisse wegen „Low input“ (geringe Ausgangsmenge) besteht.

* Dies ist keine vollständige Liste möglicher Spektralphotometer, die sich für die Messung von OD_{260 nm} eignen.

† Für die Bisulfit-Reaktion wird eine Ausgangsmenge von 400 ng gDNA empfohlen. Da das gDNA-Höchstvolumen für diese Reaktion bei 40 µl liegt, ergibt sich eine Mindestkonzentration von 10 ng/µl.

Bisulfitreaktion der gDNA mit dem EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit

Dieses Protokoll erlaubt die Reaktion von 200, 400 oder bis zu 1000 ng DNA (ermittelt anhand der OD₂₆₀ nm-Messwerte) mit Bisulfit in einem Volumen von bis zu 40 µl. Die empfohlene Ausgangsmenge DNA pro Bisulfitreaktion beträgt 400 ng. Bei einer niedrigen DNA-Ausbeute können jedoch DNA-Ausgangsmengen von lediglich 200 ng DNA verwendet werden. Ist das Ergebnis der qPCR-Analyse jedoch mit „Low Input“ gekennzeichnet (siehe „Markierungen“ auf Seite 63) und somit ein erneuter Test erforderlich, sollten 1000 ng oder ein diesem Wert möglichst naher Wert verwendet werden.

Hinweis: Die gDNA-Ausgangsmenge wird durch Messungen des OD-Werts bei 260 nm ermittelt (z. B. mit einem NanoDrop oder QIAxpert mit QIAamp Plugin für Gesamtnukleinsäuremessung).

Ausgangsmaterial

- Die genomische DNA für die Bisulfitbehandlung sollte ohne vorherigen Verdauungsschritt verwendet werden.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Stellen Sie sicher, dass die Reagenzien für die Bisulfitreaktion nicht abgelaufen sind und unter den korrekten Bedingungen transportiert und gelagert wurden. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Nach Zugabe der Mischung mit DNA-Bisulfit-Lösung sollte der DNA-Schutzpuffer von grün auf blau umschlagen. Dies ist ein Hinweis auf ausreichendes Mischen und den korrekten pH-Wert für die Bisulfitreaktion. Ein falscher pH-Wert könnte sich auf die Bindung der umgewandelten DNA an das Säulenmaterial auswirken.
- Alle Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchzuführen.
- Die Bisulfitlösung kann bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) mindestens 6 Monate lang gelagert werden.

- Nach etwas Lagerzeit kann sich ein weißer Niederschlag in der BD-Puffer/Ethanol-Mischung bilden. Solche Niederschläge haben keinen Einfluss auf die Leistung des BD-Puffers. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, keinen Niederschlag zur MinElute DNA Spin-Säule zu überführen.

Vorbereitende Schritte

- Bereiten Sie die Reagenzien des Kits vor wie im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien“ im *EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook (EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbuch)* beschrieben.
- Äquilibrieren Sie die Proben und Puffer bei Raumtemperatur.
- **Optional:** Stellen Sie einen Thermomixer, Heizblock oder beheizten Orbitalinkubator auf 60 °C ein, um die Bisulfitlösung zu lösen.

Handhabung von MinElute DNA Spin-Säulen

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik sind bei der Handhabung der MinElute DNA Spin-Säulen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen nötig, um Kreuzkontaminationen zwischen den Probenpräparaten zu vermeiden:

- Pipettieren Sie die Probe vorsichtig in die MinElute DNA Spin-Säule, ohne den oberen Rand der Säule zu benetzen. Achten Sie darauf, dass Sie die Membran der MinElute DNA Spin-Säule nicht mit der Pipettenspitze berühren.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Wir empfehlen, Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren zu verwenden.
- Öffnen Sie stets nur eine MinElute DNA Spin-Säule, und vermeiden Sie Aerosolbildung.
- Tragen Sie während der gesamten Verarbeitung Laborhandschuhe. Sollten Sie die Proben mit den Handschuhen berühren, müssen die Handschuhe sofort gewechselt werden.

Zentrifugieren

- MinElute DNA Spin-Säulen passen in die meisten 1,5- bis 2-ml-Mikrozentrifugen-Standardröhrchen. Für den trockenen Zentrifugationsschritt ist ein Satz 2-ml-Sammelröhrchen im Lieferumfang enthalten.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.
- Benutzen Sie eine Mikrozentrifuge für MinElute DNA Spin-Säulen.
- Verschließen Sie die MinElute DNA Spin-Säulen stets, bevor Sie sie in die Mikrozentrifuge setzen.
- Für eine effiziente Parallelverarbeitung mehrerer Proben empfehlen wir, ein Gestell mit den Sammelröhrchen bereitzustellen, in welche die MinElute DNA Spin-Säulen nach dem Zentrifugieren überführt werden können. Sammelröhrchen können mehrmals verwendet werden.

Verfahren

1. Tauen Sie die DNA auf, für die sie eine Bisulfit-Reaktion planen. Stellen Sie sicher, dass die Bisulfitlösung vollständig gelöst ist.

Hinweis: Bei Bedarf wärmen Sie die Bisulfitlösung auf 60 °C auf und mischen Sie die Lösung mit dem Vortexmischer, bis alle Niederschläge wieder gelöst sind.

Hinweis: Setzen Sie die gelöste Bisulfitlösung nicht auf Eis.

2. Bereiten Sie die Bisulfitreaktionen in 200-µl-PCR-Röhrchen vor (nicht im Lieferumfang enthalten). Richten Sie sich dabei nach Tabelle 1 auf der nächsten Seite. Geben Sie die Bestandteile in der genannten Reihenfolge hinzu.

Hinweis: Das kombinierte Volumen von DNA und RNase-freiem Wasser muss insgesamt 40 µl betragen.

Hinweis: Mit der folgenden Formel berechnen Sie das Volumen, das die benötigte gDNA-Ausgangsmenge enthält:

$$\text{Benötigtes Volumen der gDNA-Lösung für eine Bisulfitreaktion (}\mu\text{l)} = \frac{\text{benötigte Ausgangsmenge (ng)}}{\text{mittlere gDNA-Konzentration (ng}/\mu\text{l)}}$$

Hinweis: Bei Verwendung des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits muss das Protokoll für niedrige Konzentrationen („Low concentration“) im *EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbuch* immer befolgt werden, auch bei einer Ausgangsmenge von 1000 ng, da die gDNA-Konzentration aus FFPE-Proben gewöhnlich niedrig ist.

Hinweis: Nach Zugabe von DNA-Schutzpuffer muss die Bisulfitmischung sofort 5 Sekunden lang mit dem Vortexmischer gemischt werden, um die Proben vor einem Abbau zu schützen.

Tabelle 1. Komponenten der Bisulfitreaktion

| Komponente | Volumen pro Reaktion (µl) |
|----------------------|---------------------------|
| DNA | variabel* (maximal 40 µl) |
| RNase-freies Wasser | variabel* |
| Bisulfitlösung | 85 |
| DNA-Schutzpuffer | 15 |
| Gesamtvolumen | 140 |

* Das kombinierte Volumen von DNA und RNase-freiem Wasser muss insgesamt 40 µl betragen.

- Schließen Sie die PCR-Röhrchen und mischen Sie die Bisulfitreaktionen gründlich und ohne Verzögerung. Bewahren Sie Röhrchen bei Raumtemperatur (15–25 °C) auf.

Hinweis: Nach Zugabe zur Mischung mit DNA-Bisulfit-Lösung sollte der DNA-Schutzpuffer von grün auf blau umschlagen. Dies ist ein Hinweis auf ausreichendes Mischen und den korrekten pH-Wert für die Bisulfitreaktion bzw. für die Bindung der DNA an die MinElute DNA Spin-Säule.

- Führen Sie die Bisulfit-DNA-Reaktion in einem Thermocycler durch. Programmieren Sie den Thermocycler dazu wie in Tabelle 2 auf der nächsten Seite beschrieben. Der vollständige Zyklus sollte ungefähr 30 Minuten dauern.

Hinweis: Wenn Sie einen Thermocycler verwenden, der keine Eingabe des genauen Reaktionsvolumens (140 µl) zulässt, stellen Sie das größte verfügbare Volumen ein.

Tabelle 2. Thermocycler-Bedingungen für die Bisulfitreaktion

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|---------------|-------------|------------|
| Denaturierung | 5 min | 95 °C |
| Inkubation | 10 min | 60 °C |
| Denaturierung | 5 min | 95 °C |
| Inkubation | 10 min | 60 °C |
| Halten | Unbestimmt* | 20 °C |

* Nach der Reaktion kann die DNA über Nacht im Thermocycler verbleiben, ohne dass Leistungseinbußen zu befürchten sind.

5. Setzen Sie die PCR-Röhrchen mit den Bisulfitreaktionen in den Thermocycler. Starten Sie die Inkubation des Temperaturzyklus.

WICHTIG: Bisulfitreaktionen werden nicht mit einer Schicht Mineralöl verschlossen. Daher sind nur Thermocycler mit beheiztem Deckel für dieses Verfahren geeignet. Es ist wichtig, PCR-Röhrchen zu verwenden, die sich fest schließen lassen.

Hinweis: Nach der Reaktion kann die DNA über Nacht im Thermocycler verbleiben, ohne dass Leistungseinbußen zu befürchten sind.

Reinigung der DNA nach Bisulfitreaktion

6. Nach Abschluss der Bisulfitreaktion zentrifugieren Sie die PCR-Röhrchen mit den Bisulfitreaktionen kurz, dann überführen Sie die Bisulfitreaktionen vollständig in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen.
Eine Überführung von Niederschlag in der Lösung hat keine Auswirkungen auf die Leistung oder Ausbeute der Reaktion.
7. Geben Sie 310 µl BL-Puffer zu jeder Probe. Mischen Sie die Lösung im Vortexmischer und zentrifugieren Sie die Röhrchen anschließend kurz.
8. Geben Sie 250 µl Ethanol (96–100 %) zu jeder Probe. Mischen Sie die Lösungen 15 Sekunden lang pulsartig mit dem Vortexmischer, und zentrifugieren Sie sie, um die Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.
9. Setzen Sie die notwendige Zahl an MinElute DNA Spin-Säulen und Sammelröhrchen in ein geeignetes Gestell. Überführen Sie aus jedem Röhrchen aus Schritt 8 die Mischung vollständig in die entsprechende MinElute DNA Spin-Säule.
10. Zentrifugieren Sie die Spin-Säulen 1 Minute lang bei maximaler Drehzahl. Entsorgen Sie das Filtrat und setzen Sie die Spin-Säulen wieder in die Sammelröhrchen.
11. Geben Sie 500 µl BW-Puffer (Waschpuffer) in jede Säule und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei maximaler Drehzahl. Entsorgen Sie das Filtrat und setzen Sie die Spin-Säulen wieder in die Sammelröhrchen.
12. Fügen Sie 500 µl BD-Puffer (Desulfonierungspuffer) zu jeder Spin-Säule und inkubieren Sie 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (15–25 °C).
Jegliche Niederschläge im BD-Puffer sollten nicht auf die Spin-Säulen überführt werden.
WICHTIG: Die Flasche mit BD-Puffer muss sofort nach der Benutzung erneut verschlossen werden, um eine Ansäuerung durch das Kohlendioxid der Luft zu vermeiden.
Hinweis: Es ist wichtig, die Deckel der Spin-Säulen vor der Inkubation zu verschließen.
13. Zentrifugieren Sie die Spin-Säulen 1 Minute lang bei maximaler Drehzahl. Entsorgen Sie das Filtrat und setzen Sie die Spin-Säulen wieder in die Sammelröhrchen.

14. Geben Sie 500 µl BW-Puffer in jede Spin-Säule und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei maximaler Drehzahl. Entsorgen Sie das Filtrat und setzen Sie die Spin-Säulen wieder in die Sammelröhrchen.
15. Wiederholen Sie Schritt 14 einmal.
16. Geben Sie 250 µl Ethanol (96-100 %) in jede Spin-Säule und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei maximaler Drehzahl.
17. Setzen Sie die Spin-Säulen in neue 2-ml-Sammelröhrchen (im Lieferumfang enthalten) und zentrifugieren Sie die Spin-Säulen 1 Minute lang bei maximaler Drehzahl, um jegliche Flüssigkeitsrückstände zu entfernen.
18. Setzen Sie die Spin-Säulen mit offenen Deckeln in saubere 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) und inkubieren Sie die Säulen 5 Minuten lang bei 60 °C in einem Heizblock. Dieser Schritt sorgt für die Verdampfung jeglicher verbleibender Flüssigkeiten.
19. Geben Sie je 15 µl EB-Puffer (Elutionspuffer) direkt in die Mitte jeder Spin-Säulenmembran und schließen Sie die Deckel vorsichtig.
Hinweis: Benutzen Sie zur Elution nicht weniger als 15 µl, da sonst nicht genug Volumen für den qPCR-Schritt vorhanden ist.
20. Inkubieren Sie die Spin-Säulen 1 Minute lang bei Raumtemperatur.
21. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei ungefähr 15.000 g oder 12.000 U/min, um die DNA zu eluieren.
Hinweis: Zur Lagerung der aufgereinigten DNA bis zu 24 Stunden empfehlen wir 2 bis 8 °C. Soll die aufgereinigte DNA länger als 24 Stunden gelagert werden, empfehlen wir -30 bis -15 °C.

Protokoll: qPCR auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler

Für das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit muss der Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler* benutzt werden, und die automatisierte Interpretation der Ergebnisse erfolgt mit der Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software.

Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q MDx Thermocycler und der Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Detaillierte Informationen finden Sie in den Handbüchern des Instruments, der Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software und des Gamma Plugins.

Wichtiger Hinweis: Wenn Sie die Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software, das Gamma Plugin und das Assay-Profil zum ersten Mal verwenden, finden Sie im Abschnitt „Installation der Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software und des Gamma Plugins sowie Import des Assay-Profiles“ auf Seite 54 Anweisungen zur Installation. Sind die Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software, das Gamma Plugin und das Assay-Profil bereits auf Ihrem Computer importiert und installiert, fahren Sie mit den folgenden Anweisungen fort:

Einrichten der qPCR

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit enthält Produkte für acht Probestests in maximal drei Läufen.

* Ggf. Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit Produktionsdatum ab Januar 2010. Das Herstellungsdatum kann aus der Seriennummer auf der Rückseite des Geräts abgeleitet werden. Die Seriennummer hat das Format „MMJJNNNN“, wobei „MM“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „JJ“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „NNN“ für die eindeutige Instrumentenkennung steht.

Vorbereitende Schritte

- Kühlen Sie einen Ladeblock mit 72 0,1-ml-Röhrchen 10 Minuten lang in der Tiefkühltruhe oder mindestens 1 Stunde lang im Kühlschrank.
- Tauen Sie alle Komponenten des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits und die Proben in einem Kühlschrank, auf Eis, in einem Kühlblock oder bei Raumtemperatur so lang auf wie notwendig.

Hinweis: Beim Auftauen bei Raumtemperatur muss regelmäßig geprüft werden, ob das Material bereits aufgetaut ist, und zwar insbesondere der PITX2 RGQ PCR MMx, da dieser dNTPs enthält, die temperaturempfindlich sind.

Hinweis: PITX2 RGQ PCR PPM muss vor Sonnenlicht geschützt werden, da es Farbstoff-Nukleotide enthält.

- Bewahren Sie die aufgetauten Produkte bis zur Rückkehr zu -30 bis -15 °C auf Eis bzw. in einem Kühlblock oder Kühlschrank auf.

Hinweis: Die Komponenten des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits können bei 2–8 °C und vor Licht geschützt maximal 6 Stunden lang aufbewahrt werden, wenn sie an einem Tag mehrmals gebraucht werden.

Hinweis: Die Komponenten des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits können maximal viermal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

- Reinigen Sie den Arbeitsbereich, der für die Herstellung des PCR-Gemisches vorgesehen ist, um das Risiko einer Kontamination mit Template oder Nuklease zu reduzieren.
- Mischen Sie die Röhrchen im Vortexmischer (10-12 Sekunden) und zentrifugieren Sie sie vor Gebrauch kurz. Die Ausnahme ist PITX2 RGQ PCR MMx, der durch Auf- und Abpipettieren gemischt wird, da er *Taq*-Polymerase enthält.

Verfahren

1. Bereiten Sie je nach Anzahl der zu verarbeitenden Proben die passende Menge PITX2 qPCR-Reaktionsgemisch in einem 1,5- bzw. 2-ml- Rörchen (nicht im Lieferumfang enthalten) **auf Eis** (oder in einem Kühlblock) vor.

Das in Tabelle 3 (nächste Seite) dargestellte Pipettierschema für die Herstellung des PITX2-Reaktionsgemischs wird so berechnet, dass nach der Zugabe von 4 µl bisDNA oder Kontrolle ein endgültiges Reaktionsvolumen von 20 µl erhalten wird. Bei der Berechnung wird zusätzliches Volumen berücksichtigt, um Pipettierfehler auszugleichen und sicherzustellen, dass genug Reaktionsgemisch für vier Doppelproben plus vier Kontrollen hergestellt wird. Sollen weniger Proben getestet werden, kann das Reaktionsgemisch entsprechend angepasst werden. Denken Sie daran, etwas zusätzliches Volumen für Pipettierfehler zu berechnen (ein zusätzliches Well pro 10 Wells bzw. zwei zusätzliches Wells pro 20 Wells).

Tabelle 3. Herstellung des Reaktionsgemisches des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits

| Komponente | 1 Reaktion (µl) | Beispiel für eine Platte mit 12 Wells: 12 +2 zusätzliche Reaktionen (µl)* |
|---|-------------------|---|
| PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx) | 10 | 140 |
| PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (PPM, Primer/Sonden-Gemisch) | 6 | 84 |
| Gesamtvolumen des qPCR-Reaktionsgemisches (µl) | 16 | 224 |
| Verteilung des qPCR-Reaktionsgemisches | 16 µl pro Rörchen | |
| Probenverteilung | 4 µl pro Rörchen | |
| Gesamtvolumen der qPCR-Reaktion | 20 µl | |

* Ein zusätzliches Reaktionsvolumen ist vorgesehen, um Pipettierfehler auszugleichen: ein zusätzliches Well für bis zu 10 Wells und zwei zusätzliche Wells für bis zu 20 Wells.

2. Mischen Sie das PITX2 qPCR-Reaktionsgemisch (10–12 Sekunden) und zentrifugieren Sie es kurz. Stellen Sie den qPCR-Rörchenstreifen in einen vorgekühlten Ladeblock für 72 Rörchen und geben Sie 16 µl PITX2 qPCR Reaktionsgemisch in jedes Streifenröhrchen. Beachten Sie dabei die in Abbildung 4 dargestellte Einrichtung des Ladeblocks.

Hinweis: Es wird empfohlen, die 16 µl Reaktionsgemisch durch reverses Pipettieren abzugeben.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------|----|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | REF50 | 9 | Sample 3 | 17 | NA | 25 | NA | 33 | NA | 41 | NA | 49 | NA | 57 | NA | 65 | NA |
| 2 | REFlow | 10 | Sample 3 | 18 | NA | 26 | NA | 34 | NA | 42 | NA | 50 | NA | 58 | NA | 66 | NA |
| 3 | NC | 11 | Sample 4 | 19 | NA | 27 | NA | 35 | NA | 43 | NA | 51 | NA | 59 | NA | 67 | NA |
| 4 | NTC | 12 | Sample 4 | 20 | NA | 28 | NA | 36 | NA | 44 | NA | 52 | NA | 60 | NA | 68 | NA |
| 5 | Sample 1 | 13 | NA | 21 | NA | 29 | NA | 37 | NA | 45 | NA | 53 | NA | 61 | NA | 69 | NA |
| 6 | Sample 1 | 14 | NA | 22 | NA | 30 | NA | 38 | NA | 46 | NA | 54 | NA | 62 | NA | 70 | NA |
| 7 | Sample 2 | 15 | NA | 23 | NA | 31 | NA | 39 | NA | 47 | NA | 55 | NA | 63 | NA | 71 | NA |
| 8 | Sample 2 | 16 | NA | 24 | NA | 32 | NA | 40 | NA | 48 | NA | 56 | NA | 64 | NA | 72 | NA |

Abbildung 4. Einrichtung des Ladeblocks für eine Analyse mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit zum Testen von vier Proben Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an. Die Positionen der Kontrollen werden im PITX2-Assay-Profil festgelegt und können nicht geändert werden. Wenn die Kontrollen nicht wie angegeben platziert werden, kann keine automatisierte Ergebnisanalyse durchgeführt werden. **REF50:** PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Referenz 50); **REFlow:** PITX2 RGQ PCR Reference Low (Niedrigreferenz); **NC:** PITX2 RGQ PCR Negative Control (Negativkontrolle), **NTC:** PITX2 RGQ PCR NTC; **Probe 1 bis 4:** bisDNA-Proben, **NA:** Leeres Well.

- Mischen Sie die bisDNA-Proben, PITX2 RGQ PCR Referenz 50 (Ref50), PITX2 RGQ PCR Niedrigreferenz (RefLow), PITX2 RGQ PCR Negativkontrolle (NC) und PITX2 RGQ PCR NTC (NTC) mit dem Vortexmischer (10–12 Sekunden) und zentrifugieren Sie die Röhren kurz.
- Geben Sie gemäß der Einrichtung in Abbildung 4 4 µl Probe oder Kontrollmaterial in das entsprechende Röhren, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Mischen Sie den Inhalt vorsichtig durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren.

Hinweis: Gehen Sie beim Wechseln von Spitzen zwischen den Röhren mit Vorsicht vor, um falsch-positive Ergebnisse durch eine Kontamination mit nicht-spezifischem Template zu vermeiden.

- Verschließen Sie alle Röhren und stellen Sie sicher, dass unten in den Röhren keine Blasen vorhanden sind.
- Bewahren Sie alle Komponenten des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits wieder unter den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen auf, um einen Abbau des Materials zu verhindern.

Vorbereitung von Rotor-Gene MDx

Es wird dringend empfohlen, den Lauf so schnell wie möglich nach der Einrichtung zu starten. Wurde die Platte vorbereitet, kann aber nicht sofort gestartet werden (weil das Gerät nicht verfügbar ist), dann kann die Platte bei 2–8 °C und vor Licht geschützt bis zu 24 Stunden lang aufbewahrt werden (siehe „Zeitrahen“ auf Seite 80).

7. Setzen Sie einen 72-Well-Rotor in den Rotor-Gene Q MDx-Rotorhalter ein.
8. Füllen Sie die vorbereiteten Streifenröhrchen in den Rotor. Achten Sie dabei auf die zugewiesenen Positionen, beginnend mit Position 1 wie in Abbildung 5 dargestellt.
9. Füllen Sie leere Positionen mit leeren, verschlossenen Röhrchen, damit alle Plätze im Rotor besetzt sind.

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass das erste Röhrchen an Position 1 und die Röhrchenstreifen in der korrekten Ausrichtung und Position platziert werden (wichtig für die Gültigkeit des Laufs und die Rückverfolgbarkeit der Proben, siehe Abbildung 5).

Hinweis: Die vier Kontrollen (REF50, REFlow, NC und NTC) müssen immer an den Positionen 1 bis 4 verbleiben, damit die (an Röhrchenposition 1 durchgeführte) Verstärkungsoptimierung immer an der gleichen Amplifikation durchgeführt wird. Achten Sie darauf, dass die Kontrollen in der für die automatische Analyse der Kontrollen richtigen Reihenfolge geladen werden (eine Umkehrung der Kontrollen macht den Lauf ungültig gemäß PITX2-Assay-Profil).

Erstellen einer Arbeitsliste und Starten des qPCR-Laufs

Hinweis: Die Arbeitsliste kann entweder vor der Vorbereitung der Proben oder beim Einrichten der Analyse am Gerät erstellt und gespeichert werden (siehe Beschreibung in diesem Handbuch).

12. Schalten Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler ein.

13. Öffnen Sie die Rotor-Gene AssayManager Software durch Klicken auf das Symbol:  .
Das Fenster der Rotor-Gene AssayManager Software wird geöffnet (Abbildung 6).

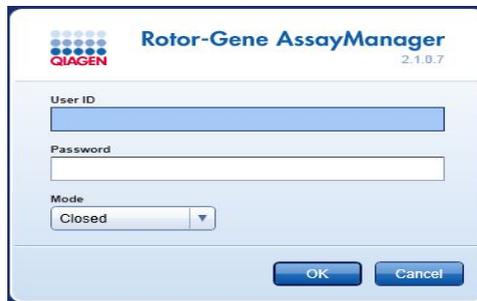


Abbildung 6. Anmeldebildschirm der Rotor-Gene AssayManager Software

14. Melden Sie sich als Benutzer mit der Rolle „Operator“ (Bediener) in der geschlossenen Betriebsart an. Klicken Sie auf „OK“. Das Fenster der Rotor-Gene AssayManager Software wird geöffnet (Abbildung 7 auf der nächsten Seite).

15. Prüfen Sie vor dem Start des Laufs, ob die Software den Rotor-Gene Q Thermocycler korrekt erkennt.

16. Wählen Sie die Registerkarte „Setup“ (Einrichtung) aus.

Hinweis: Eine Beschreibung aller Funktionen der Umgebung „Setup“ und „Creating/Editing a Work List“ (eine Arbeitsliste erstellen/bearbeiten) finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager V2.1 Core Application Handbuch*.

17. Klicken Sie auf „New work list“ (neue Arbeitsliste) (Abbildung 7).

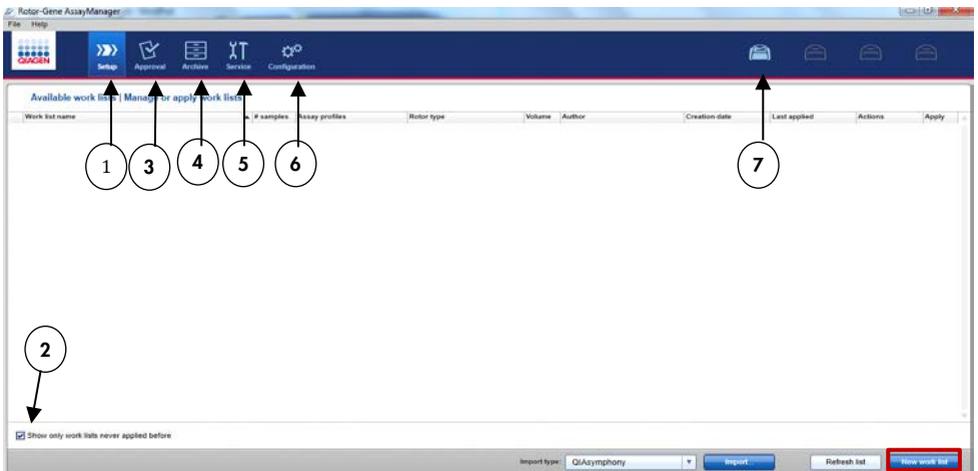


Abbildung 7. Beschreibung der verschiedenen Registerkarten der Rotor-Gene ApplicationManager Software.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Registerkarte „Setup“. Auf dieser Registerkarte können Sie Arbeitslisten verwalten oder anwenden.</p> <p>2 Kontrollkästchen für angewendete Arbeitslisten. Bei Aktivierung werden nur neue Arbeitslisten angezeigt. Eine „angewendete Arbeitsliste“ wurde bereits ausgeführt.</p> <p>3 Registerkarte „Approval“ (Genehmigung). Auf dieser Registerkarte können Sie nach vorherigen Analysen suchen.</p> <p>4 Registerkarte „Archive“ (Archiv). Auf dieser Registerkarte können Sie nach alten Analysen suchen, die bereits genehmigt wurden.</p> | <p>5 Registerkarte „Service“. Auf dieser Registerkarte wird der Audit-Trail-Bericht jeder Datei angezeigt, die mit der Software erstellt wird.</p> <p>6 Registerkarte „Configuration“ (Konfiguration). Ermöglicht die Konfiguration aller Softwareparameter.</p> <p>7 Symbole für Rotor-Gene Q MDx (RGQ):</p> <p> nicht verbunden  verbunden</p> |
|---|---|

18. Wählen Sie in der Liste der verfügbaren Assay-Profile das PITX2-Assay-Profil aus (Abbildung 8).

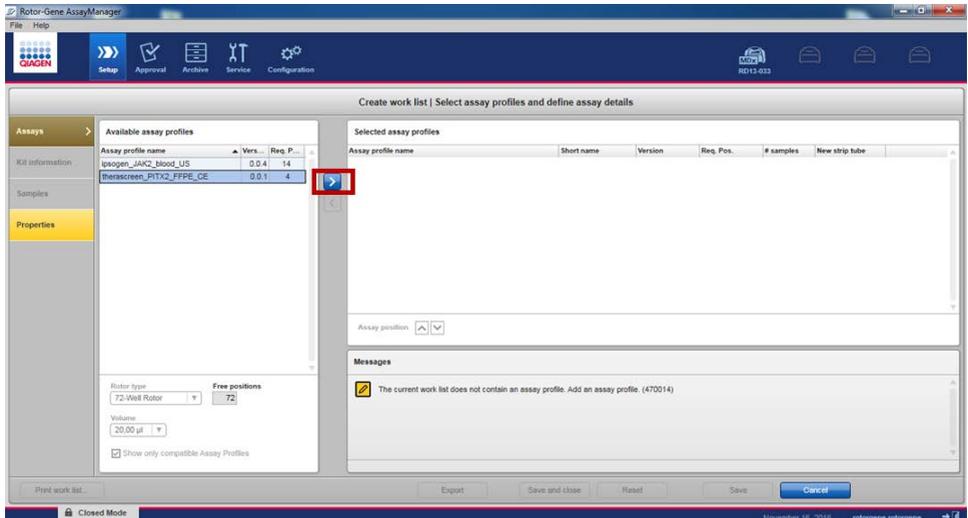


Abbildung 8. Import von Assay-Profilen.

19. Übertragen Sie das ausgewählte Assay-Profil in die Liste „Selected assay profiles“ (ausgewählte Assay-Profile). Klicken Sie dazu auf den Pfeil (rechts neben dem Namen des Assay-Profiles). Das Assay-Profil sollte nun in der Liste „Selected assay profiles“ angezeigt werden (Abbildung 8).

20. In der Registerkarte „Assays“ füllen Sie die gelben Felder aus: Anzahl der Proben (max. 8) gemäß Einrichtung der Platte (Abbildung 9).

Hinweis: Die Anzahl der Proben entspricht nicht der Anzahl der Wells und umfasst keine Kontrollen. Die Proben werden in Doppelbestimmung gemessen, daher besetzt eine Probe zwei Wells. Beispielsweise muss für die Platte mit 12 Wells in Abbildung 4 (Seite 41) als Probenanzahl „4“ eingegeben werden.

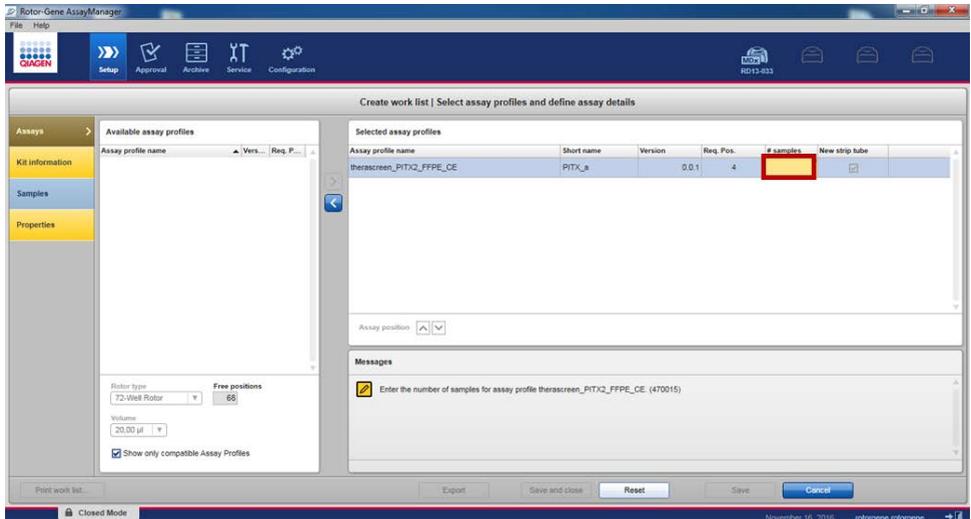


Abbildung 9. Eingabe der Probenanzahl.

21. Wählen Sie die Registerkarte „Kit Information“ (Kit-Informationen) aus. Wählen Sie zur Eingabe der Kit-Informationen entweder „Use kit bar code“ (Kit-Barcode lesen) und scannen Sie den Barcode. Oder aber wählen Sie „Enter kit information manually“ (Kit-Informationen manuell eingeben) und geben Sie die Kit-Informationen auf dem Etikett der Verpackung des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits manuell ein:



Materialnummer



Verfallsdatum



Chargenbezeichnung

22. Wählen Sie die Registerkarte „Samples“ (Proben) aus. Es wird eine Liste mit den Probendetails angezeigt. In dieser Liste wird die erwartete Rotoranordnung angezeigt.

23. Geben Sie für jede Probe die Proben-ID und ggf. optionale Probeninformationen als Kommentar ein (Abbildung 10).

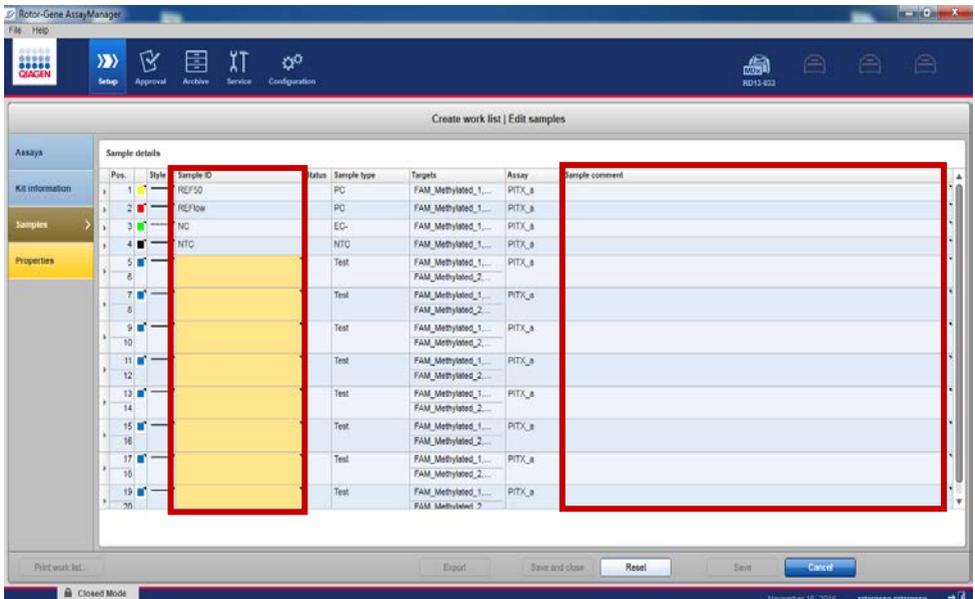


Abbildung 10. Probeneinrichtung.

24. Wählen Sie die Registerkarte „Properties“ (Eigenschaften) aus und geben Sie einen Arbeitslistenamen ein (Abbildung 11).

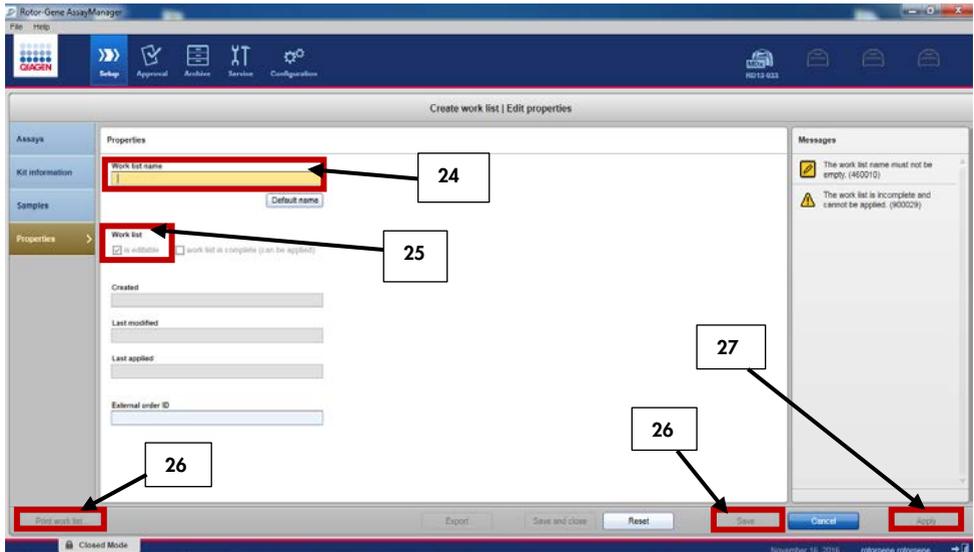


Abbildung 11. Erstellen der Arbeitsliste.

25. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen „Worklist is complete (can be applied)“ (Arbeitsliste ist abgeschlossen (kann angewendet werden)).

26. Speichern Sie die Arbeitsliste.

Optional: Klicken Sie auf „Print work list“ (Arbeitsliste drucken), um die Arbeitsliste zu drucken. Das Drucken der Arbeitsliste kann für die Vorbereitung und Einrichtung des Laufs hilfreich sein. Die Probendetails werden dabei als Teil der Arbeitsliste ausgedruckt.

27. Wählen Sie im Arbeitslistenmanager die entsprechende Arbeitsliste aus und klicken Sie auf „Apply“ (anwenden). Sie können auch auf „Apply“ klicken, wenn die Arbeitsliste noch geöffnet ist.

Hinweis: Prüfen Sie vor dem Start des Laufs, ob die Software den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler korrekt erkennt.

28. Geben Sie einen Namen für die Analyse ein.

29. Wählen Sie unter „Cycler Selection“ (Auswahl des Thermocyclers) den Thermocycler aus, der verwendet werden soll.

Hinweis: Es muss ein Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler verwendet werden.

30. Stellen Sie sicher, dass der Schließring richtig angebracht ist und bestätigen Sie dies auf dem Bildschirm.

31. Klicken Sie auf „Start Run“ (Lauf starten). Der qPCR-Lauf wird gestartet.

Freigabe und Berichterstattung der qPCR-Ergebnisse

Eine allgemeine Beschreibung der Funktionen der Umgebung „Approval“ (Genehmigung) finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager V2.1 Gamma Plugin Handbuch* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plugin User Manual).

Nach Ende des Laufs und Freigabe des Thermocyclers wird die Analyse in der internen Datenbank gespeichert. Die Auswertung der erfassten Daten wird abhängig von den vom Assay-Profil definierten Regeln und Parameterwerten automatisch durchgeführt.

Hinweis: Zum Genehmigen eines Laufs wird die Rolle „Approver“ (Genehmiger) benötigt.

1. Klicken Sie nach Abschluss des Laufs auf „Finish run“ (Lauf beenden), um die Daten zu analysieren und exportieren.

Hinweis: Die Analyse wird erst nach diesem Schritt in der internen Datenbank gespeichert.

2. Nach Klicken von „Finish run“ geben Sie das Passwort ein und klicken Sie auf „Release and go to approval“ (Freigeben und mit Genehmigung fortfahren) (Abbildung 12).

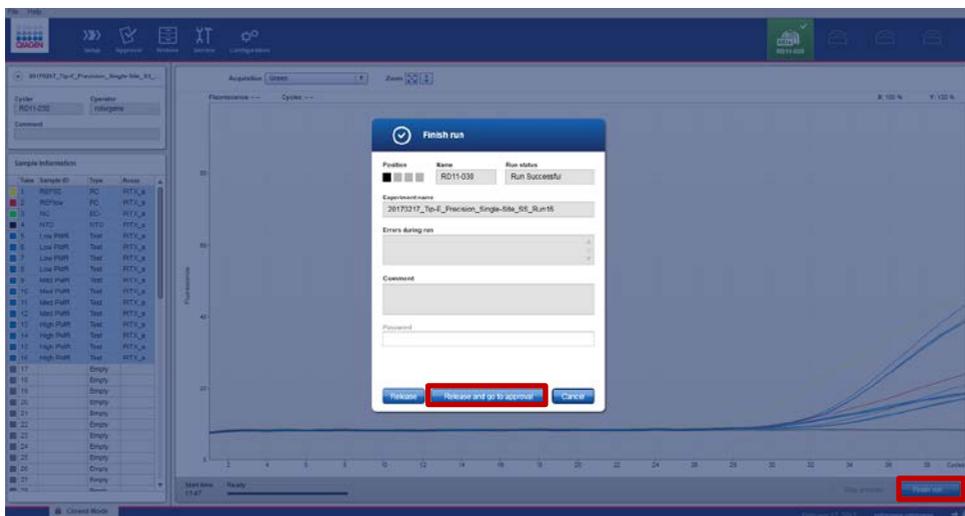


Abbildung 12. Abschließen des Laufs.

Wenn Sie sich mit der Rolle „Approver“ angemeldet haben, klicken Sie auf „Release and go to approval“.

Wenn Sie sich mit der Rolle „Operator“ angemeldet haben, klicken Sie auf „Release“ (Freigeben).

Nach dem Klicken auf „Release and go to approval“ werden die Ergebnisse der Analyse in der Umgebung „Approval“ angezeigt.

Wenn ein Benutzer mit der Rolle „Operator“ auf „Release“ klickt, muss sich eine andere Person mit der Rolle „Approver“ anmelden und die Umgebung „Approval“ auswählen.

Hinweis: In der Registerkarte „Approval“ können Sie sich auf den verschiedenen Registerkarten („Experiment“ (Analyse), „Assay“, „Audit trail“, „Run control results“ (Ergebnisse der Laufkontrolle)) die Eigenschaften der Analysen ansehen.

3. Prüfen Sie die Amplifikationskurven jeder Probe und aktivieren Sie das erste Optionsfeld rechts neben der Spalte „Flags“ (Markierungen). Das Feld wird daraufhin grün angezeigt (Abbildung 13).

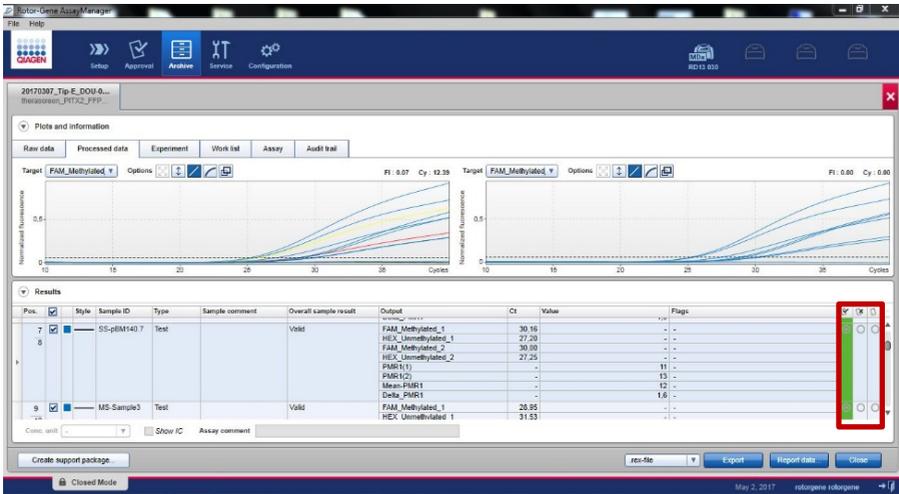


Abbildung 13. Prüfen der Amplifikationskurven.

4. Klicken Sie auf „Report data“ (Daten berichten) (unten rechts im Anzeigefenster). So erstellen Sie einen Bericht im PDF-Format und speichern eine LIMS-Datei (eine Kopie wird automatisch unter C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports gespeichert).
5. Schließen Sie die PDF-Datei und kehren Sie zum Rotor-Gene Assay Manager zurück. Klicken Sie jedes Mal, wenn Sie dazu aufgefordert werden, auf „OK“.
6. Gehen Sie zur Registerkarte „Archive“, um die REX-Datei zu exportieren. Prüfen Sie, ob „Start date“ (Datum Start) und „End date“ (Datum Ende) korrekt sind und klicken Sie auf „Apply filter“ (Filter anwenden). Wählen Sie die zu exportierende Analyse und klicken Sie auf „Show assays“ (Assays anzeigen) (Abbildung 14).

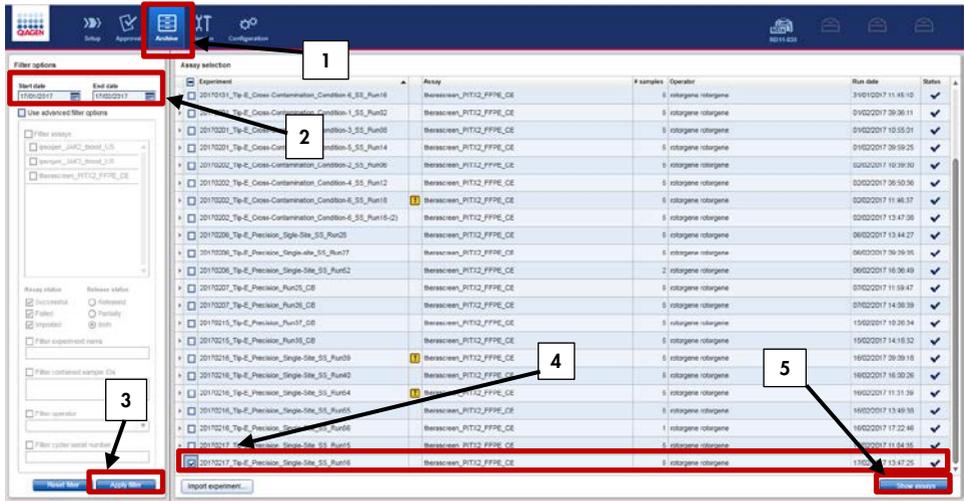


Abbildung 14. Export der Laufdaten.

- Exportieren Sie die REX-Datei (die Datei ist unter C:\Documents and settings\AllUsers\Documents \QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments gespeichert).

Hinweis: Die Software erstellt automatisch eine LIMS-Datei unter C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS.

- Entladen Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler und entsorgen Sie die Röhrenchenstreifen gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen.

Hinweis: Für Unterstützung bei der Fehlerbehebung durch den Technischen Service von QIAGEN wird eine Support-Containerdatei benötigt. Support-Containerdateien können in den Umgebungen „Approval“ oder „Archive“ erstellt werden. Weitere Informationen finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager V2.1 Core Application Handbuch* unter „Creating a support package“ (Eine Support-Containerdatei erstellen).

Neben der Support-Containerdatei kann das Audit-Trail von ± 1 Tag des entsprechenden Vorfalls hilfreich sein. Das Audit-Trail kann in der Umgebung „Service“ abgerufen werden. Weitere Informationen finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager V2.1 Core Application Handbuch*.

Installation der Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software und des Gamma Plugins sowie Import des Assay-Profiles

Auf dem Computer, der an den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler angeschlossen ist, muss die Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software installiert sein. Die Software kann von der Website unter „Operating Software“ (Software für den Systembetrieb) auf der Registerkarte „Product Resources“ (Produktressourcen) auf der Rotor-Gene AssayManager V2.1 Produktseite heruntergeladen werden: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

Detaillierte Informationen zur Installation der Softwareanwendung Rotor-Gene AssayManager V2.1 Core finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager V2.1 Core Application Handbuch*. Detaillierte Informationen zu weiteren Softwareanwendungen auf den angeschlossenen Computern finden Sie in der *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Kurzanleitung* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide).

Für die automatische Interpretation der Ergebnisse des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits mit der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software muss das neueste Gamma Plugin der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software installiert sein. Siehe „Product Resources“ auf der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Produktseite: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx für den Zugriff auf die neueste Version des Plugins.

Für das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wird zudem ein Assay-Profil benötigt. Das Assay-Profil enthält alle Parameter, die für die Zyklusdurchführung und Analyse des PITX2-Assays benötigt werden. Diese Zyklusparameter sind für den Lauf gesperrt. Das PITX2 Assay-Profil (AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE) ist in einer IAP-Datei enthalten, die auf der Produktseite des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits heruntergeladen werden kann:

www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/ in der Registerkarte „Product Resources“ unter „Protocol Files“ (Protokolldateien). Das Assay-Profil muss in die Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software importiert werden.

Im Folgenden finden Sie Details zur Installation des Gamma Plugins und zum Import von Assay-Profilen in die Rotor-Gene AssayManager V2.1 Software.

1. Laden Sie das Gamma Plugin hier herunter: **www.qiagen.com**.
2. Starten Sie die Installation mit Doppelklick auf die Datei *GammaPlugin.Installation.msi*, und befolgen Sie die Installationsanweisungen. Detaillierte Informationen hierzu finden Sie im Abschnitt „Installing Plugins“ (Installation von Plugins) im *Rotor-Gene AssayManager Core Application Handbuch*.
3. Nach der erfolgreichen Installation des Plugins muss eine Person mit Administratorrechten für die Rotor-Gene AssayManager Software das erforderliche Assay-Profil wie folgt importieren:
4. Navigieren Sie zu Windows Explorer und speichern Sie das Assay-Profil im folgenden Ordner: „C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles“.
5. Öffnen Sie die Rotor-Gene AssayManager Software durch Klicken auf das  Symbol.
6. Melden Sie sich mit Ihrer Benutzer-ID und Ihrem Kennwort bei der Rotor-Gene AssayManager Software an. Der Modus „Closed mode“ (geschlossene Betriebsart) darf nicht geändert werden. Klicken Sie auf „OK“. Das Fenster der Rotor-Gene AssayManager Software wird angezeigt.

7. Wählen Sie die Umgebung „Configuration“ aus (Abbildung 15).

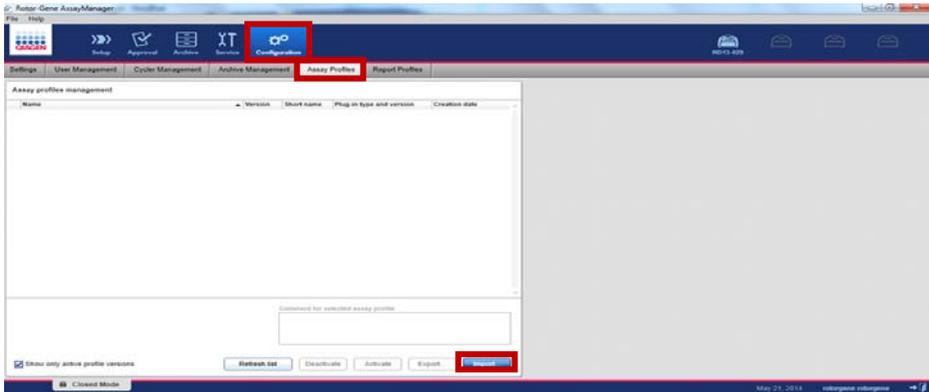


Abbildung 15. Registerkarte „Configuration“.

8. Wählen Sie die Registerkarte „Assay Profiles“ (Assay-Profile) aus.

9. Klicken Sie auf „Import“ (Importieren).

10. Wählen Sie das Assay-Profil *AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE_V1.0.x.iap* aus (wobei $x = 1$ oder höher), um es in das Dialogfeld zu importieren und klicken Sie dann auf „Open“ (Öffnen).

11. Nach dem erfolgreichen Import des Assay-Profiles kann es in der Umgebung „Setup“ verwendet werden.

Interpretation der Ergebnisse

Datenanalyse

Die Analyse der *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit-Ergebnisse aller Kontrollen und Proben wird vom Rotor-Gene AssayManager V2.1 zusammen mit dem Gamma Plugin V1.0 und dem PITX2 Assay-Profil automatisch durchgeführt. Diese Kombination wird im Folgenden als PITX2 Assay Package bezeichnet.

Das PITX2 Assay Package analysiert die Amplifikationskurven, wobei nicht konforme Kurven je nach Form und Rauschamplitude u. U. als ungültig eingestuft werden. Ist dies der Fall, wird eine als ungültig eingestufte Kurve mit einer Markierung gekennzeichnet. Warnmarkierungen können auch für Kurvenanomalien angezeigt werden, die Kurven nicht ungültig machen (siehe Liste der Markierungen und Details im Abschnitt „Markierungen“ auf Seite 63).

Zur Bestimmung der Assay-Gültigkeit analysiert das PITX2 Assay Package außerdem die Kontrollen des Laufs, d. h. PITX2 RGQ PCR Referenz 50 (REF50), PITX2 RGQ PCR Referenz niedrig (REFlow), PITX2 RGQ PCR Negativkontrolle (NC) und PITX2 RGQ PCR NTC (NTC). Die Kontrollen sind gültig, wenn die jeweiligen C_T - und/oder PMR-Werte mit den vordefinierten Spezifikationen übereinstimmen (siehe „Gesamtergebnis der Probe“ auf Seite 61 und „Markierungen“ auf Seite 63).

Hinweis: Ist auch nur eine Kontrolle ungültig, sind die Ergebnisse für alle Testproben ungültig, und es werden keine PMR-Ergebnisse angezeigt.

Das PITX2 Assay Package analysiert außerdem die Proben, indem es die Gültigkeit der Doppelbestimmungen und die Gültigkeit der Eingaben geprüft (siehe „Gesamtergebnis der Probe“ auf Seite 61 und „Markierungen“ auf Seite 63). Abschließend wird den Proben ein PMR-Wert ohne Stelle hinter dem Komma zugewiesen. Dieser ist ein Mittelwert der beiden für jedes Probenreplikat erhaltenen PMR-Ergebnisse. Das erhaltene PMR für jede Patientenprobe

liefert dem behandelnden Arzt Informationen darüber, wie wahrscheinlich eine Patientin auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie ansprechen wird. Beträgt das PMR 12 oder weniger, dann spricht die Patientin wahrscheinlich auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie an. Dagegen kann bei einem PMR über 12 eine andere Therapie vorgeschlagen werden, da die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens der Patientin auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie niedriger ist (Abbildung 16).

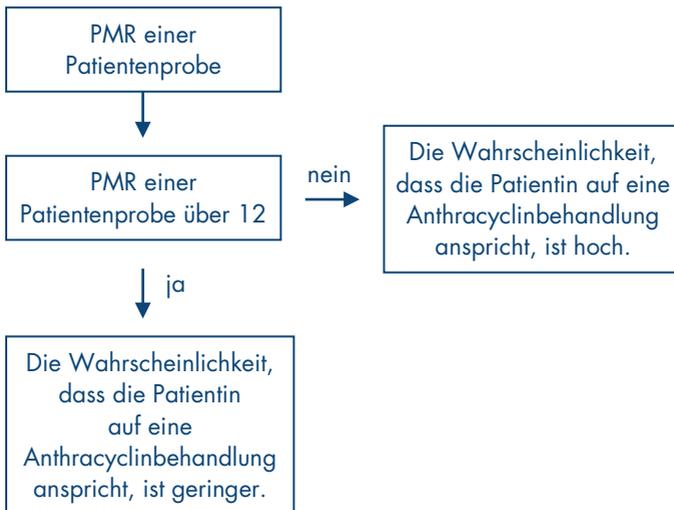


Abbildung 16. Interpretation der PMR-Ergebnisse von Patientenproben mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit.

Die automatisch von dem PITX2 Assay Package analysierten und festgelegten Ergebnisse der Testproben müssen von einem Benutzer, der mit der Rolle „Approver“ angemeldet ist, genehmigt und freigegeben werden. Für Probenergebnisse, die genehmigt werden müssen, befinden sich am Ende der zugehörigen Zeile drei zusätzliche Genehmigungs-Schaltflächen. Diese Schaltflächen dienen dazu, die Probenergebnisse interaktiv anzunehmen oder abzulehnen. Weitere Informationen finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plugin Handbuch*.

Hinweis zur Arbeitsablaufkontrolle: Die Probe HD216 (Arbeitsablaufkontrolle) sollte einen PMR-Wert zwischen 30 und 50 ergeben. Ergibt die Arbeitsablaufkontrolle einen solchen PMR-Wert, können sowohl die gDNA-Aufreinigung als auch die Bisulfitreaktion validiert werden.

Im Falle ungültiger Ergebnisse erhalten Sie unter „Hilfe zur Fehlerbehebung“ auf Seite 68 weitere Informationen.

Testwiederholungen

Im Falle ungültiger Ergebnisse müssen die betroffenen Tests wiederholt werden. Ist ein Assay ungültig (d. h. mindestens eine der vier Kontrollen ist ungültig), dann muss der gesamte Lauf einschließlich aller Testproben wiederholt werden. Ist ein Assay gültig (d. h. alle Kontrollen sind gültig), aber eine oder mehrere Proben sind ungültig, dann müssen die betreffenden ungültigen Proben nach Ermittlung des Fehlertyps erneut getestet werden (siehe „Markierungen“ auf Seite 63 sowie Tabelle 6 und Tabelle 7 auf den Seiten 64–65). Der Arbeitsablauf des Verfahrens zur Testwiederholung ist in Abbildung 17 dargestellt.

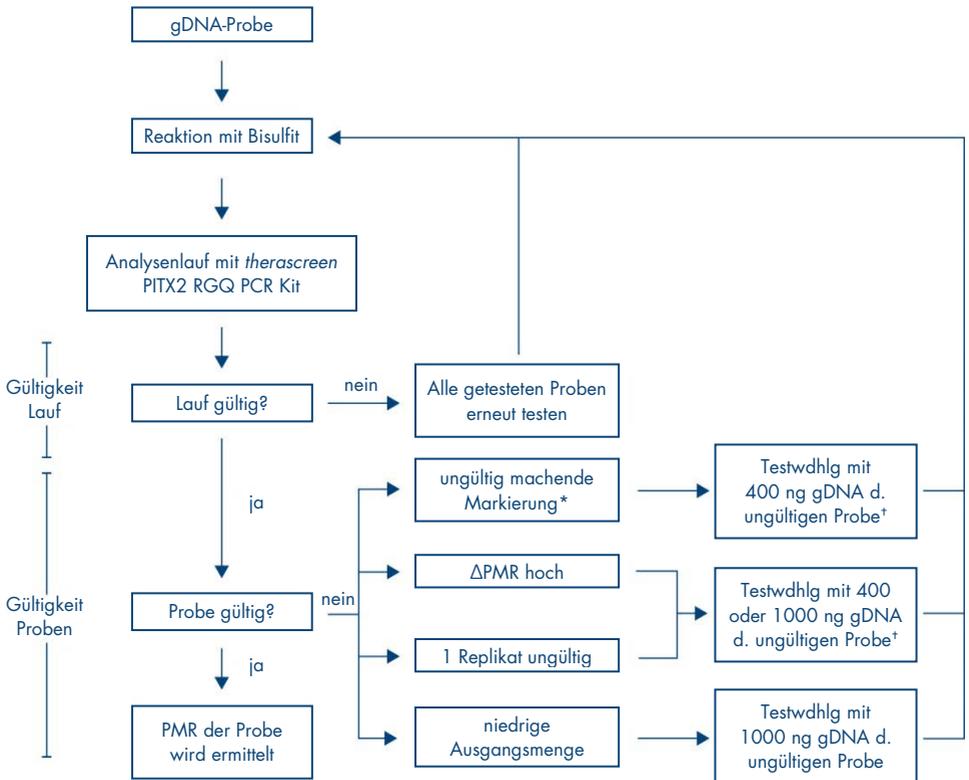


Abbildung 17. Arbeitsablauf für Testwiederholungen mit dem *theascreen* PITX2 RGQ PCR Kit.

* Siehe Tabelle 6 und Tabelle 7 auf Seiten 64–65.

† Eine Ausgangsmenge von 200 ng kann verwendet werden, wenn nicht genug gDNA verfügbar ist. Damit steigt jedoch das Risiko, dass das Ergebnis mit „low input“ markiert wird und ungültig ist.

Angabe der Ergebnisse

Ziele und kombinierte Ziele

Die Ergebnisse jeder Reaktion mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit werden unter den folgenden Ziel- und Kombinationszielbezeichnungen angezeigt:

- „FAM_Methylated_1“: Ergebnisse des grünen Kanals für alle Kontrollen und für Replikat 1 der Testproben.
- „FAM_Methylated_2“: Ergebnisse des grünen Kanals für Replikat 2 der Testproben.
- „HEX_Unmethylated_1“: Ergebnisse des gelben Kanals für alle Kontrollen und für Replikat 1 der Testproben.
- „HEX_Unmethylated_2“: Ergebnisse des gelben Kanals für Replikat 2 der Testproben.
- „PMR“: Diese Ziele sind kombinierte Zielwerte; beim dazugehörigen Ergebnis wird die Gültigkeit der Kontrollen berücksichtigt. Diese Ziele werden für alle Kontrollen und Testproben angezeigt, falls gültig.
- „Mean_PMR“: Diese Ziele sind kombinierte Zielwerte; beim dazugehörigen Ergebnis wird die Gültigkeit der Kontrollen berücksichtigt. Diese Ziele werden für alle Testproben angezeigt, falls gültig.

Gesamtergebnis der Probe

Das abschließende Ergebnis der Analyse wird für jede Kontrolle und Probe in der Spalte „Overall Sample Result“ (Gesamtergebnis der Probe) des Berichts angegeben (Tabelle 4).

Tabelle 4. Gesamtergebnisse der Proben und Maßnahmen

| Gesamtergebnis der Probe | Probenart | Beschreibung | Maßnahme |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| Gültig | REF50, REFlow, NC, NTC und Testprobe* | Kontrolle bzw. Testprobe ist gültig | n. z. |
| ungültig [†] | REF50, REFlow, NC, NTC und Testprobe | Kontrolle ist ungültig | Wiederholen Sie den gesamten Lauf |
| Ungültig | Testprobe | Testprobe ist ungültig | Richten Sie einen neuen Lauf ein, um die ungültigen Proben zu wiederholen. |
| ungültig, ein Replikat ungültig | Testprobe | Wenn ein Ziel (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 oder HEX_Unmethylated_2) ungültig ist, dann gilt die Probe als ungültig. | Richten Sie einen neuen Lauf ein, um die ungültigen Proben zu wiederholen. |
| Ungültig, Delta-PMR hoch [‡] | Testprobe | Liegt der Unterschied zwischen dem PMR des ersten und dem PMR des zweiten Replikats (Delta-PMR) über einem bestimmten Wert [§] , wird die Probe als ungültig eingestuft. | Richten Sie einen neuen Lauf ein, um die ungültigen Proben zu wiederholen. |

* Die Interpretation des PMR-Werts einer gültigen Probe wurde bereits erläutert (siehe Abbildung 16).

[†] Wenn die Kontrollen ungültig sind, werden die dann ebenso ungültigen C_T-Werte und PMR-Ergebnisse in eckigen Klammern angegeben und dienen lediglich zur Information.

[‡] Ist eine Probe wegen eines zu hohen Delta-PMR ungültig, werden die C_T-Werte, die PMR-Ergebnisse beider Replikate und der PMR-Mittelwert nur zur Information angezeigt. Die betroffene Probe muss jedoch erneut getestet werden, um ein gültiges Ergebnis zu erzeugen.

[§] Der spezifische Wert ist je nach dem für alle Proben erhaltenen PMR-Wert unterschiedlich (siehe Tabelle 5 auf der nächsten Seite).

Tabelle 5. Kriterien für Delta-PMR

| PMR-Mittelwert | Delta-PMR Duplikate |
|-----------------------|----------------------------|
| 0-1 | ≤ 1 |
| 1-5 | ≤ 5 |
| 5-10 | ≤ 7 |
| 10-15 | ≤ 9 |
| 15-35 | ≤ 13 |
| 35-65 | ≤ 15 |
| 65-85 | ≤ 18 |
| 85-100 | ≤ 6 |

Markierungen

Es werden Markierungen angezeigt, um zusätzliche Informationen zu den erhaltenen Ergebnissen anzugeben, insbesondere zu den ungültigen Ergebnissen. Unproblematische Anomalien können mit einer Warnung gekennzeichnet werden, die das Ergebnis nicht ungültig macht. Weitere Informationen zu den allgemeinen Markierungen des Gamma Plugins finden Sie außerdem im *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plugin Handbuch*.

Bei der automatischen Analyse im Zusammenhang mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit-Assay werden sowohl assayspezifische (Tabelle 6 auf der nächsten Seite) als auch allgemeine Markierungen (Tabelle 7 auf Seite 65) erzeugt.

Tabelle 6. Assayspezifische Markierungen

| Assayspezifische Markierung | Probenart | Beschreibung | Maßnahme |
|---|------------------|--|--|
| Assayspezifische Markierungen für Kontrollen | | | |
| BELOW_ACCEPTED_RANGE | REF50, REFlow | Das PMR-Ergebnis liegt unter dem akzeptablen Bereich (REF50: < 36, REFlow: < 2). | Wiederholen Sie den gesamten Lauf |
| ABOVE_ACCEPTED_RANGE | REF50, REFlow | Das PMR-Ergebnis liegt über dem akzeptablen Bereich (REF50: > 65, REFlow: > 13). | Wiederholen Sie den gesamten Lauf |
| NO_SIGNAL | REF50 | Der C _T -Wert des Ziels FAM_Methylated_1 oder/und HEX_Unmethylated_1 liegt bei > 32 | Wiederholen Sie den gesamten Lauf |
| NO_SIGNAL | REFlow | Der C _T -Wert des Ziels HEX_Unmethylated_1 liegt bei > 32 | Wiederholen Sie den gesamten Lauf |
| Assayspezifische Markierungen für Testproben | | | |
| PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92* | Testprobe | Das PMR-Ergebnis liegt über der Nachweisgrenze der Sonde für anfänglich unmethylierte Sequenzen. Diese Markierung macht das Ergebnis nicht ungültig, ist aber eine Warnung. | Keine |
| PMR_BELOW_OR_EQUAL_4* | Testprobe | Das PMR-Ergebnis liegt unter der Nachweisgrenze der Sonde für anfänglich unmethylierte Sequenzen. Diese Markierung macht das Ergebnis nicht ungültig, ist aber eine Warnung. | Keine |
| LOW_INPUT_RETEST_NEEDED | Testprobe | Die C _T -Werte des Ziels FAM_Methylated_1 und HEX_Unmethylated_1 oder FAM_Methylated_2 und HEX_Unmethylated_2 liegen bei > 32,5 | Führen Sie die Bisulfitreaktion mit mehr gDNA durch und wiederholen Sie den Lauf |

* Da das PMR-Ergebnis ohne Stelle hinter dem Komma ausgegeben wird, die Software das PMR jedoch mit Stelle hinter dem Komma rechnet, kann bei einem Wert an der Grenze des PMR-Nachweisbereichs, d. h. 4 oder 92, die Nachweisgrenzen-Markierung vorhanden sein oder nicht. Diese Markierung wird für PMR-Ergebnisse > 92 und < 4 ausgegeben. Ein PMR-Wert von 4,1 oder 91,8, der entsprechend auf 4 bzw. 92 gerundet wird, wird zum Beispiel nicht als unter bzw. über der Nachweisgrenze liegend markiert.

Hinweis: Alle oben genannten Markierungen machen Ergebnisse ungültig, mit Ausnahme der beiden Markierungen, die sich auf die Nachweisgrenze beziehen. Sind Replikate ungültig, werden die C_T-Werte in eckigen Klammern zur Information angezeigt, das ungültige PMR-Ergebnis wird jedoch nicht angezeigt. Der PMR-Mittelwert der beiden Replikate wird ebenfalls nicht angezeigt.

Tabelle 7. Allgemeine Markierungen

| Allgemeine Markierung | Verhalten | Beschreibung | Maßnahme |
|-----------------------------|-----------|---|---|
| CONSECUTIVE_FAULT | Ungültig | Ein Ziel, das zur Berechnung dieses Ziels verwendet wurde, ist ungültig. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| ASSAY_INVALID | Ungültig | Der Assay ist ungültig, da mindestens eine Kontrolle ungültig ist. | Wiederholen Sie den gesamten Lauf. |
| ANALYSIS_FAILED | Ungültig | Ein Assay ist als ungültig eingestuft, da die Analyse aus verschiedenen Gründen fehlgeschlagen ist. | Wenden Sie sich für Unterstützung an den QIAGEN Technischen Service. |
| CURVE_SHAPE_ANOMALY | Ungültig | Die Amplifikationskurve der Rohdaten weist eine Form auf, die vom festgelegten Verhalten für diesen Assay abweicht. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für falsche Ergebnisse oder eine Fehlinterpretation der Ergebnisse. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| FLAT_BUMP | Ungültig | Die Amplifikationskurve der Rohdaten weist eine flache Beulenform auf, die vom festgelegten Verhalten für diesen Assay abweicht. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für falsche Ergebnisse oder eine Fehlinterpretation der Ergebnisse (z. B. fehlerhafte Bestimmung des C _T -Werts). | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| INVALID_CALCULATION | Ungültig | Die Berechnung für dieses Ziel ist fehlgeschlagen. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| LOW_FLUORESCENCE_CHANGE | Warnung | Die prozentuale Fluoreszenzänderung dieser Probe relativ zu dem Probenröhrchen mit der größten Fluoreszenzänderung ist kleiner als ein definierter Grenzwert. | Keine |
| LOW_REACTION_EFFICIENCY | Warnung | Die Reaktionseffizienz für diese Probe hat einen festgelegten Grenzwert nicht erreicht. | Keine |
| MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING | Ungültig | Die Amplifikationskurve überschreitet den Schwellenwert mehrmals. Ein eindeutiger C _T -Wert kann nicht bestimmt werden. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| NO_BASELINE | Ungültig | Es wurde keine Anfangsbasislinie erkannt. Die anschließende Analyse kann nicht durchgeführt werden. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |

| | | | |
|------------------------------|----------|--|---|
| RUN_FAILED | Ungültig | Der Assay ist aufgrund eines Problems mit dem Cycler oder dem Cycleranschluss als ungültig eingestuft. | Wiederholen Sie den gesamten Lauf. |
| RUN_STOPPED | Ungültig | Der Assay ist als ungültig eingestuft, da der Lauf manuell angehalten wurde. | Wiederholen Sie den gesamten Lauf. |
| SATURATION | Ungültig | Vor dem Wendepunkt der Amplifikationskurve ist die Rohdaten-Fluoreszenz deutlich gesättigt. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| SATURATION_IN_PLATEAU | Warnung | Die Rohdaten-Fluoreszenz erreicht in der Plateauphase der Amplifikationskurve einen Sättigungszustand. | Keine |
| SPIKE | Warnung | In der Rohdaten-Fluoreszenz wurde ein Spike in der Amplifikationskurve erkannt, der jedoch außerhalb der Region liegt, in der der C_T -Wert bestimmt wird. | Keine |
| SPIKE_CLOSE_TO_CT | Ungültig | Die Amplifikationskurve weist in der Nähe des C_T -Werts einen Spike auf. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| STEEP_BASELINE | Ungültig | Die Amplifikationskurve weist eine steil ansteigende Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| STRONG_BASELINE_DIP | Ungültig | Die Amplifikationskurve weist einen ausgeprägten Abfall der Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| STRONG_NOISE | Ungültig | Außerhalb des Anstiegsbereichs der Amplifikationskurve wird starkes Rauschen detektiert. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE | Ungültig | In dem (exponentiellen) Anstiegsbereich der Amplifikationskurve wird starkes Rauschen detektiert. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |
| WAVY_BASE_FLUORESCENCE | Ungültig | Die Amplifikationskurve weist eine wellenförmige Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf. | Wiederholen Sie die Probe oder – wenn eine Kontrolle ungültig ist – den Lauf. |

Hinweis: Sind Proben-Replikate als ungültig markiert, werden die C_T -Werte in eckigen Klammern zur Information angezeigt, das ungültige PMR-Ergebnis wird jedoch nicht angezeigt. Der PMR-Mittelwert der beiden Replikate wird ebenfalls nicht angezeigt.

Hilfe zur Fehlerbehebung

Die hier beschriebenen Anleitungen sollen Sie bei der Lösung von Problemen unterstützen, die bei der Bestimmung des PMR-Verhältnisses des PITX2-Promotors 2 mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit auftreten können. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim QIAGEN Technischen Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder zu den für die Proben und Tests verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter www.qiagen.com).

Informationen zur Fehlerbehebung für die Entparaffinierungslösung (Katalog-Nr. 19093), das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404) und das EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Katalog-Nr. 59824 oder 59826) finden Sie in den zugehörigen Kit-Handbüchern.

Informationen zur Fehlerbehebung beim Rotor-Gene Q MDx Thermocycler und der Rotor-Gene AssayManager v2.1 Software finden Sie in den zugehörigen Benutzerhandbüchern.

Kommentare und Vorschläge

Geringe gDNA-Ausbeute

Die Ausbeute aufgereinigter gDNA liegt unter der für den Arbeitsablauf mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit empfohlenen Menge.

Eine Anfangsmenge von 200 ng kann verwendet werden. Damit steigt jedoch das Risiko, dass das Ergebnis mit „low input“ markiert wird und ungültig ist.

Assay ungültig wegen „REFlow“ und/oder „REF50 invalid“

- a) Eine Komponente des Reaktionsgemisches wurde nicht hinzugefügt.
- b) Funktionsstörung im Rotor-Gene Q MDx Thermocycler

Die korrekte Herstellung des Reaktionsgemisches prüfen (Tabelle 3 auf Seite 40). Sicherstellen, dass alle Komponenten des qPCR-Reaktionsgemisches hinzugegeben wurden. Den PCR-Lauf wiederholen.

Die Wartungsprotokolle des Geräts überprüfen.
Eine fehlerhafte Ausrichtung der Linse kann z. B. zu einem höheren Hintergrund führen. Wenn die Linsenausrichtung nicht Teil des Wartungsplans ist, erhalten Sie weitere Informationen und mögliche Dienstleistungen vom Technischen Service von QIAGEN.

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|---|--|
| c) Funktionsstörung im Zubehör des Rotor-Gene Q MDx Thermocyclers | Der 72-Well-Rotor ist u. U. fehlerhaft verriegelt. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| d) Unzureichende Qualität des Reaktionsgemisches | Das Kit ist häufiger als viermal eingefroren und wieder aufgetaut worden. Oder aber die Inhalte des Kits wurden nicht bei -30 °C bis -15 °C aufbewahrt. Oder aber das PPM/Reaktionsgemisch wurde nicht vor Licht geschützt. Die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) prüfen und bei Bedarf ein neues Kit verwenden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| e) Inversion des Röhrchenstreifens und/oder der Proben-ID | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| f) Kontrollen fehlen oder befinden sich an der falschen Position | Darauf achten, die korrekten Kontrollen in die korrekten Positionen zu laden. |
| g) Vermischung der Kontrollproben nicht ausreichend | Vor dem Laden waren die Kontrollen nicht vollständig aufgetaut bzw. nicht ordnungsgemäß mit Reaktionsgemisch (durch Auf- und Abpipettieren) gemischt worden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| h) Falsches Pipettiervolumen | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Sicherstellen, dass 4 µl Kontrolle und 16 µl qPCR-Reaktionsgemisch hinzugegeben wurden. Alle Pipettiervolumen einer Sichtprüfung unterziehen. Die Pipetten prüfen und bei Bedarf vor der Wiederholung des qPCR-Schritts neu kalibrieren. |
| i) Unzureichender Verschluss der Röhrchen | Das Röhrchen war nicht ordentlich verschlossen. Daher trat während des qPCR-Laufs Verdunstung auf. |

Kommentare und Vorschläge

Der Assay ist ungültig, da die Kontrolle ohne Template (NTC) bzw. die Negativkontrolle (NC) ungültig ist

- | | |
|--|--|
| a) Kreuzkontamination oder Kontamination der Reagenzien | Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsmaterialien stets gemäß den empfohlenen Verfahren handhaben, um eine Kontamination durch Verschleppung zu vermeiden. Sicherstellen, dass die Spitzen zwischen der Pipettierung unterschiedlicher Reagenzien oder dem Laden unterschiedlicher Röhrchen ausgewechselt werden. Das qPCR-Reaktionsgemisch unter Verwendung spezieller Materialien (Pipetten, Spitzen usw.) ansetzen. Das qPCR-Reaktionsgemisch und die NTC-Reaktion in einem speziellen Bereich ansetzen, in dem keine DNA-Matrizen (DNA, Plasmid oder PCR-Produkte) gehandhabt werden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| b) Eine Komponente des Reaktionsgemisches wurde nicht hinzugefügt. | Die korrekte Herstellung des Reaktionsgemisches prüfen (Tabelle 3 auf Seite 40). Sicherstellen, dass alle Komponenten des qPCR-Reaktionsgemisches hinzugegeben wurden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| c) Inversion des Röhrchenstreifens und/oder der Proben-ID | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Den qPCR-Lauf wiederholen. |
| d) Unzureichende Qualität des Reaktionsgemisches oder der Sonden | Den Kit-Inhalt bei -30 bis -15 °C lagern und das PPM-Röhrchen vor Licht schützen. Die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) prüfen und bei Bedarf ein neues Kit verwenden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| e) Falsche Amplifikationskurve (Artefakte) | Die entsprechende Amplifikation auf einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf untersuchen (z. B. gerade Linie). Den qPCR-Lauf wiederholen. |

Ungültige Probe wegen Markierung „Low input“

- | | |
|----------------------------------|--|
| a) Zustand des FFPE-Blocks | Transport-/Lagerbedingungen des benutzten FFPE-Blocks prüfen. |
| b) Herstellung des FFPE-Blocks | Prüfen, ob die Probe in 4–10 % Formalin fixiert worden ist. Prüfen, ob ein Schnitt oder zwei Schnitte mit einer Dicke von 5 µm ca. 100 mm ² Gewebeoberfläche enthalten, damit genug Zellen vorhanden sind. |
| c) Pipettiervolumen u. U. falsch | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Sicherstellen, dass 4 µl Probe und 16 µl qPCR-Reaktionsgemisch hinzugegeben wurden. Alle Pipettiervolumen einer Sichtprüfung unterziehen. Die Pipetten prüfen und bei Bedarf vor der Wiederholung des qPCR-Schritts neu kalibrieren. |

Kommentare und Vorschläge

- d) gDNA-Aufreinigung oder Bisulfitreaktion fehlgeschlagen
Prüfen, ob die Arbeitsablaufkontrollen die erwarteten Ergebnisse hatten. Prüfen, ob das Arbeitsablaufprotokoll des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits befolgt worden ist (siehe obige Beschreibung). Vergewissern, dass die Kits nicht abgelaufen sind, die Reagenzien korrekt hergestellt wurden (z. B. Ethanol wurde hinzugefügt, Niederschläge wurden nicht zur MinElute DNA Spin-Säule überführt). Vergewissern, dass die Raumtemperatur bei der Vorbereitung nicht unter 15 °C liegt, um ein Auskristallisieren der Puffer zu vermeiden. Transport- und Lagerbedingungen prüfen.
Den gesamten Arbeitsablauf wiederholen.
- e) Inversion des Röhrchenstreifens und/oder der Proben-ID
Das Pipettierschema prüfen bzw. ob sich ein leeres Röhrchen an der korrekten Position befindet. Die Einrichtung der Reaktion prüfen. Den PCR-Lauf wiederholen.
- f) Schlechte Qualität der gDNA-Probe
Mit mehr Material wiederholen. Es können bis zu 1000 ng DNA-Ausgangsmaterial verwendet werden (gemessen durch Extinktion bei 260 nm).
- g) Unzureichender Verschluss der Röhrchen
Das Röhrchen war nicht ordentlich verschlossen. Daher trat während des qPCR-Laufs Verdunstung auf.
- h) Probe nicht geladen
Vergewissern, dass sich in beiden Wells Probe befand.

Ungültige Probe wegen „Delta PMR high“

- a) Unzureichende Qualität des Reaktionsgemisches
Den Kit-Inhalt bei -30 bis -15 °C lagern und die Reaktionsgemische vor Licht schützen.
Die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) prüfen und bei Bedarf ein neues Kit verwenden. Den PCR-Lauf wiederholen.
- b) Pipettiervolumen u. U. falsch
Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Sicherstellen, dass 4 µl Kontrolle/Probe und 16 µl qPCR-Reaktionsgemisch hinzugegeben wurden. Alle Pipettiervolumen einer Sichtprüfung unterziehen.
Die Pipetten prüfen und bei Bedarf vor der Wiederholung des qPCR-Schritts neu kalibrieren.
- c) Inversion des Röhrchenstreifens und/oder der Proben-ID
Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Den PCR-Lauf wiederholen.
- d) Amplifikationskurve u. U. falsch
Die entsprechende Amplifikationskurve auf einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf untersuchen.
Ungültige Proben wiederholen.

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|---|--|
| e) Spätes Signal wegen niedriger Ausgangsmenge, deshalb stärker variable PMR-Ergebnisse | Mit mehr Material wiederholen. Es kann bis zu 1000 ng DNA-Ausgangsmaterial verwendet werden (gemessen durch Extinktion bei 260 nm). |
| f) Vermischung der Kontrollproben nicht ausreichend | Vor dem Laden waren die Kontrollen nicht vollständig aufgetaut bzw. nicht ordnungsgemäß mit Reaktionsgemisch (durch Auf- und Abpipettieren) gemischt worden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| g) Unzureichender Verschluss der Röhren | Das Röhren war nicht ordentlich verschlossen. Daher trat während des qPCR-Laufs Verdunstung auf. |

Ungültige Proben wegen „One replicate invalid“

- | | |
|---|--|
| a) Nicht genug Material (fast am Grenzwert) | Mit mehr Material wiederholen. Es kann bis zu 1000 ng DNA-Ausgangsmaterial verwendet werden (gemessen durch Extinktion bei 260 nm). |
| b) Pipettiervolumen u. U. falsch | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Sicherstellen, dass 4 µl Kontrolle/Probe und 16 µl qPCR-Reaktionsgemisch hinzugegeben wurden. Alle Pipettiervolumen einer Sichtprüfung unterziehen. Die Pipetten prüfen und bei Bedarf vor der Wiederholung des qPCR-Schritts neu kalibrieren. |
| c) Inversion des Röhrenstreifens und/oder der Proben-ID | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| d) Amplifikationskurve u. U. falsch | Die entsprechende Amplifikationskurve auf einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf untersuchen. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| e) Vermischung der Kontrollproben nicht ausreichend | Vor dem Laden waren die Kontrollen nicht vollständig aufgetaut bzw. nicht ordnungsgemäß mit Reaktionsgemisch (durch Auf- und Abpipettieren) gemischt worden. Den PCR-Lauf wiederholen. |
| f) Unzureichender Verschluss der Röhren | Das Röhren war nicht ordentlich verschlossen. Daher trat während des qPCR-Laufs Verdunstung auf. |
| g) Ein Well der beiden Probenwells wurde nicht beladen | Vergewissern, dass sich in beiden Wells Probe befand. |

Kommentare und Vorschläge

Lauf infolge eines schwankenden Fluoreszenzsignals in Kontrollen und/oder Proben (in allen Rörhrchen) fehlgeschlagen

| | |
|--|--|
| Funktionsstörung im Zubehör des Rotor-Gene Q MDx Thermocyclers | Die Wartungsprotokolle des Geräts überprüfen. Der 72-Well-Rotor ist u. U. fehlerhaft. |
|--|--|

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Die Qualitätskontrolle des gesamten Kits wurde auf einem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler durchgeführt. Dieses Kit wird gemäß der Norm ISO 13485 hergestellt. Analysenzertifikate sind auf Anfrage unter www.qiagen.com/support erhältlich.

Anwendungseinschränkungen

Das Kit ist zur Anwendung im professionellen Bereich vorgesehen. Die Leistung des Systems wurde nur für in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE-)Brustkrebsgewebe überprüft.

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wurde nur für FFPE-Gewebe von östrogenrezeptorpositiven, HER2-negativen Hochrisiko-Brusttumoren mit Lymphknotenbefall validiert.

Das Produkt darf nur von Benutzern mit Qualifikationen wie z. B. MTA oder Ärzten verwendet werden, die für molekularbiologische und *in-vitro*-diagnostische Verfahren geschult worden sind.

Das Kit darf nur mit validierten, unter „Zusätzlich benötigtes Material“ auf Seite 13 aufgeführten Thermocyclern verwendet werden. Bei der Verwendung des Kits sind die Anweisungen im vorliegenden Handbuch zu beachten.

Alle im *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben Kit vorgesehen.

Die Verfallsdaten, die auf den Packungsetiketten aufgedruckt sind, müssen unbedingt beachtet werden. Komponenten mit abgelaufenem Verfallsdatum nicht verwenden.

Das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wurde nur zur Verwendung mit den folgenden Produkten validiert: Entparaffinierungslösung (Katalog-Nr. 19093) oder Xylen-Ethanol oder Histolemon-Ethanol, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404) und EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Katalog-Nr. 59824 oder 59826).

Nur Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (für die PCR) ist validiert worden.

Eine Verwendung dieses Produkts für einen anderen als den vorgesehenen Zweck und/oder eine Modifikation der Komponenten führt zum Erlöschen der Haftung von QIAGEN.

Jegliche Diagnosestellung muss unter Berücksichtigung anderer vorliegender klinischer bzw. Labordaten erfolgen.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.

Leistungsmerkmale

In diesem Abschnitt werden verschiedene Studien beschrieben. Bei allen in diesen Studien benutzten biologischen Proben wurde der Entparaffinierungsschritt vor der Extraktion von gDNA mit der QIAGEN Entparaffinierungslösung durchgeführt. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass Xylen bzw. Histolemon im Vergleich zu Entparaffinierungslösung nachweislich gleichwertig ist.

Leerwertgrenze

Die Leerwertgrenze (LoB, *limit of blank*) wurde auf Grundlage des Datenpunkts der unteren und oberen 95%-Perzentile der Ergebnisse von PMR 0- und PMR 100-Proben, ermittelt wie in CLSI/NCCLS EP17-A2 (14) beschrieben. Die getesteten Proben entsprechen künstlichen Proben, die unterschiedliche Kopienzahlen (100, 200, 500 und 750 Kopien) von Plasmiden ohne Zielsequenz (Ziel der anderen Sonde) und nicht umgesetzte gDNA enthalten. Die LoB-Ergebnisse beruhen auf 64 bzw. 63 Messungen der Sonden für ursprünglich methylierte Sequenzen und auf 64 bzw. 61 Messungen der Sonden für unmethylierte Sequenzen pro Charge mit zwei unterschiedlichen Kit-Pilotchargen. Die LoB-Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Zusammenfassung der LoB-Ergebnisse

| | PMR-0-Proben | | PMR-100-Proben | |
|----------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| | Gemessene LoB, PMR | End-LoB, PMR | Gemessene LoB, PMR | End-LoB, PMR |
| Charge 1 | 0 | | 99 | |
| Charge 2 | 0 | 0 | 98 | 98 |

Nachweisgrenze

Laut Probit-Ansatz in CLSI/NCCLS EP17-A2 (14) ist die Nachweisgrenze (LoD, *limit of detection*) der PMR-Wert, bei dem 95 % der Messungen den LoB-Wert überschreiten. Die LoD wurde für jede Sonde für die minimale gDNA-Ausgangsmenge von 200 ng und die empfohlene gDNA-Ausgangsmenge von 400 ng mit zwei unterschiedlichen Pilotchargen des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits ermittelt. Pro gemessener Ausgangsmenge (200 ng und 400 ng) und für jede Sonde wurden drei Proben getestet. Diese Proben wurden mit unterschiedlichen amplifizierbaren Gesamt-Kopienzahlen hergestellt, z. B. 50, 100 und 150 Kopien für eine gDNA-Ausgangsmenge von 200 ng und 100, 200 und 300 Kopien für eine gDNA-Ausgangsmenge von 400 ng. Für die LoD-Studie wurden daher insgesamt 60 Proben hergestellt. Die getesteten Proben entsprechen künstlichen Proben, die aus Mischungen von Plasmiden mit und ohne Zielsequenz und nicht umgesetzter gDNA hergestellt wurden (was für fünf unterschiedliche theoretische PMR-Werte pro Probe sorgt). Für jede Sonde und jede Ausgangsmenge wurde die LoD in mindestens 20 Messungen pro Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits für jeden PMR-Wert jeder Probe ermittelt. Die LoD für Proben mit niedrigem PMR liegt bei 4 und für Proben mit hohem PMR bei 92 (Tabelle 9).

Tabelle 9. Zusammenfassung der LoD-Ergebnisse

| Probe | Ausgangsmenge (ng) | Charge | LoD-Wert | Untere Grenze | Obere Grenze |
|----------------------|--------------------|----------|----------|---------------|--------------|
| Probe, niedriges PMR | 200 | Charge 1 | 3 | 3 | 5 |
| | 200 | Charge 2 | 3 | 3 | 4 |
| | 400 | Charge 1 | 3 | 2 | 6 |
| | 400 | Charge 2 | 4 | 3 | 6 |
| Probe, hohes PMR | 200 | Charge 1 | 92 | 92 | 92 |
| | 200 | Charge 2 | > 92 | n. z. | n. z. |
| | 400 | Charge 1 | 94 | 93 | 95 |
| | 400 | Charge 2 | 95 | 93 | 95 |

n. z.: nicht zutreffend.

DNA-Ausgangsmenge

Es wurden fünf unterschiedliche gDNA-Ausgangsmengen (50, 100, 200, 400 und 1000 ng) getestet, wobei jede sieben unterschiedliche PMR-Werte (0, 5, 10, 25, 40, 50 und 75) darstellt. Die maximale gDNA-Ausgangsmenge lag aus technischen Gründen bei 1000 ng. Eine größere Menge ist in der Realität schwer realisierbar. Der Bereich der gDNA-Ausgangsmengen, der für das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit akzeptabel war, wurde mit Deming-Regression, einer Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits und einem Rotor-Gene Q MDx Thermocycler festgelegt.

Die Studie zeigte:

- Die empfohlene gDNA-Ausgangsmenge für das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit ist 400 ng gDNA.
- Die akzeptable Mindestausgangsmenge liegt bei 200 ng gDNA und die Höchstmenge bei 1000 ng.
- Die gDNA-Mindestausgangsmenge sollte nur dann getestet werden, wenn die empfohlene Menge nicht realisierbar ist. Bei einer geringen Menge ist das Risiko eines ungültigen Ergebnisses (Markierung „low input“) und damit die Wahrscheinlichkeit einer notwendigen Testwiederholung erhöht. Die maximale gDNA-Ausgangsmenge wird empfohlen, wenn das PMR-Ergebnis für die Ausgangsmenge von 400 ng gDNA ungültig war, z. B. Markierung „low input“.

Linearität

Die Linearitätsstudie wurde gemäß CLSI/NCCLS EP6-A (15) durchgeführt. Die Linearität des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits wurde bei sieben Proben mit verschiedenen PMR-Werten (0, 5, 10, 25, 40, 50 und 75) von fünf verschiedenen gDNA-Ausgangsmengen (einschließlich 200, 400 und 1000 ng) ermittelt. Die Studie wurde von einem Bediener mit einer Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits auf einem Rotor-Gene Q MDx Thermocycler durchgeführt. Die Studie belegte Linearität bei Proben mit PMR-Werten zwischen 5 und 50 bei akzeptablen gDNA-Ausgangsmengen (z. B. 200–1000 ng).

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit

Die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit wurden im Rahmen einer Einzelstandort- und einer Multistandort-Präzisionsstudie gemäß CLSI/NCCLS EP5-A3 (16) ermittelt, siehe Tabelle 10 und Tabelle 11. Die Präzisionsstudien wurden mit drei biologischen Proben mit einem sehr niedrigen (9), einem niedrigen (16) und einem hohen PMR (77) durchgeführt. Im Rahmen der Einzelstandort-Präzisionsstudie wurden die Quellen der Variabilität von drei Bedienern an 23 nicht aufeinanderfolgenden Arbeitstagen mit drei unterschiedlichen Pilotchargen des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits und drei Rotor-Gene Q MDx Thermocyclern ermittelt. Bei jedem Lauf wurden zwei Messungen je Probe durchgeführt. An jedem Tag wurden zwei identische Läufe durchgeführt, die mindestens zwei Stunden Abstand hatten. Die Tageszeit der Läufe wurde variiert, und der Abstand zwischen zwei Läufen betrug mindestens zwei Stunden, um die Zufallsfaktoren zu erhöhen. Die Multistandort-Präzisionsstudie wurde an drei unterschiedlichen Standorten durchgeführt. Dort benutzte je ein einzelner Bediener eine einzige Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits auf einem einzelnen Rotor-Gene Q MDx Thermocycler. Bei jedem Lauf wurden fünf Messungen je Probe durchgeführt. An jedem Standort wurde abwechselnd Morgens oder Nachmittags ein Lauf pro Tag durchgeführt.

Tabelle 10. Zusammenfassung der Ergebnisse der Einzelstandort-Präzisionsstudie

| Probe | Quelle für Variabilität (%) | | | | | | Gesamt |
|--------------------|-----------------------------|------|--------|--------|----------|------|--------|
| | Intra-Lauf | Lauf | Charge | System | Bediener | Tag | |
| Sehr niedriges PMR | 12,29 | 4,20 | 0,00 | 12,54 | 0,00 | 9,49 | 20,39 |
| Niedriges PMR | 19,99 | 0,00 | 0,00 | 3,09 | 0,00 | 8,04 | 21,76 |
| Hohes PMR | 3,90 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,64 | 4,23 |

Tabelle 11. Zusammenfassung der Ergebnisse der Multistandort-Präzisionsstudie

| Probe | Quelle für Variabilität (%) | | | Gesamt |
|--------------------|-----------------------------|------|----------|--------|
| | Inter-Lauf | Tag | Standort | |
| Sehr niedriges PMR | 13,90 | 8,43 | 4,72 | 16,93 |
| Niedriges PMR | 28,72 | 0,00 | 0,00 | 28,72 |
| Hohes PMR | 4,25 | 0,00 | 1,77 | 4,61 |

Störsubstanzen

Die Studie zu Störsubstanzen wurde gemäß CLSI/NCCLS EP7-A2 (17) durchgeführt. Die Endkonzentration jeder Substanz, die im gesamten Arbeitsablauf der Probenvorbereitung verwendet wurde, wurde als Erstes bewertet (unter Berücksichtigung der Verdünnung in jedem Schritt). Mit Bezug auf die Relevanz der Endkonzentration jeder Substanz im Startgemisch für das *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit (d. h. in der bisDNA-Probe) wurden alle potenziellen Störsubstanzen mit einer Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits getestet. Die Ergebnisse lieferten keine Hinweise auf eine störende Wirkung der im Arbeitsablauf des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits verwendeten Substanzen (Tabelle 12).

Tabelle 12. Getestete Störsubstanzen

| Getestete Substanz | Endvolumen, getestet in 30 µl |
|--------------------------|-------------------------------|
| Entparaffinierungslösung | $1,4 \times 10^{-15}$ |
| Histolemon | $2,10 \times 10^{-20}$ |
| Ethanol (96–100%) | 0,50 |
| Bisulfitlösung | $7,2 \times 10^{-09}$ |
| DNA-Schutzpuffer | $2,26 \times 10^{-10}$ |
| BL-Puffer | $3,44 \times 10^{-08}$ |
| BW-Puffer | 0,1102 |
| BD-Puffer | 0,002 |

Kreuzkontamination

Kreuzkontaminationen zwischen negativen und positiven Proben wurden mit einer Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits und zwei Rotor-Gene Q MDx Thermocyclern untersucht. Es wurden sechs Bedingungen mit NTC und/oder Negativkontrolle als negative Proben mit oder ohne bisDNA-Probe getestet, wobei eine Probe mit niedrigem PMR als positive Probe diente. Es wurde eine Kreuzkontamination von 1,3 % festgestellt.

Zeitraumen

Der maximale zeitliche Abstand zwischen der Einrichtung der Platte und dem Start des qPCR-Laufs wurde mit einer Pilotcharge des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits und einer künstlichen Probe ermittelt. Bei der künstlichen Probe sorgt eine Mischung von Plasmiden mit und ohne Zielsequenz für ein mittleres PMR. Der maximal akzeptable zeitliche Abstand beträgt 24 Stunden; es wird jedoch empfohlen, den qPCR-Lauf mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit so schnell wie möglich nach der Platteneinrichtung zu starten (d. h. nach dem Laden aller zu testenden Proben).

Validierung des klinischen Cut-offs

Zur Validierung des klinischen Cut-offs des *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kits wurde eine prospektive Analyse an FFPE-Gewebe von 145 östrogenrezeptorpositiven, HER2-negativen Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen mit Lymphknotenbefall durchgeführt. In diese Studie wurden als Proben archivierte FFPE-Gewebe aufgenommen, die folgende Kriterien erfüllten:

- histologische Bestätigung eines invasiven Mammakarzinoms,
- primäre Tumorstadien pT1, pT2 und pT3,
- histologische Bestätigung eines Lymphknotenbefalls ($\geq N1$),
- adjuvante Standardchemotherapie auf Anthracyclinbasis,
- keine dosisdichte Therapie,
- keine andere primäre systemische Chemotherapie (keine zusätzlichen Taxane) bis auf Hormontherapie,

PMR jeder Probe wurde mit endgültigem Kitformat und gemäß Anweisungen im Handbuch ermittelt.

Das erkrankungsfreie Überleben (DFS) war der primäre Endpunkt und war definiert als Zeit von der primären Operation bis zum ersten dokumentierten DFS-Ereignis. Als Indexdatum für das Followup diente das Datum der ersten Operation. Zu DFS-Ereignissen gehörten Krebsrezidive (lokales Rezidiv oder entfernte Metastase), sekundäre und als lebensbedrohliche eingestufte Malignitäten und Tod jeglicher Ursache. Bei Patienten ohne Krebsrezidiv, die verstorben sind, wurden die konkurrierenden Risiken gemäß Fine und Gray analysiert (13).

Es wurde eine Analyse für das DFS-Followup durchgeführt, dessen Zeitraum nach 10 Jahren beendet wurde. Die Überlebenskurven wurden nach Inzidenzfunktion berechnet (13). Der vordefinierte Cut-off für PITX2 (PMR = 12) sorgt für eine statistisch signifikante Unterscheidung der beiden Gruppen mit Blick auf den primären Endpunkt DFS mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (zweiseitig; Alpha-Wert). Daher hat der mit dem *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit ermittelte Methylierungsgrad des PITX2-Promotors einen Vorhersagewert für Chemotherapie auf Anthracyclinbasis bei Hochrisikopatientinnen mit östrogenrezeptorpositivem (ER+), HER2-negativem (HER2-) Brustkrebs mit Lymphknotenbefall.

Literatur

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ β -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H., et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iHepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prosperi, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015) β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (no. 1 Supplement), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T., et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A., et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N., et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S., et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (supplement), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T., et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. European Patent 2011; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R., et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. Article ID 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; approved Guideline, first edition. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Approved Guideline, third edition. CLSI Document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

| Symbol | Bedeutung des Symbols |
|--|---|
|  | Kit enthält Reagenzien für <N> Reaktionen |
|  | Verwendbar bis |
|  | In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt |
|  | CE-Markierung der EU-Konformität |
|  | Katalognummer |
|  | Chargennummer |
|  | Materialnummer |
|  | Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer) |
|  | Zulässiger Temperaturbereich |
|  | R steht für Revision des Handbuchs, und n ist die Revisionsnummer |
|  | Hersteller |
|  | Gebrauchsanleitung beachten |
|  | Vor Sonneneinstrahlung schützen |
|  | Vorsicht |

Kontakt

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter **www.qiagen.com/Support**. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter **www.qiagen.com**).

Bestellinformationen

| Produkt | Inhalt | Kat.-Nr. |
|---|---|----------|
| Das <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit dient zur Ermittlung des prozentualen Methylierungsverhältnisses (PMR) im PITX2-Promotor 2. | | |
| <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit (8) | Für 8 Reaktionen: PITX2 RGQ PCR Master Mix, PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix, PITX2 RGQ PCR Reference 50, PITX2 RGQ PCR Reference Low, PITX2 RGQ PCR Negative Control und PITX2 RGQ PCR NTC | 873211 |
| Rotor-Gene Q MDx Plattform, Software und Zubehör | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform | Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Laptop-Computer, Software, Zubehör: 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung, exklusive Installation und Schulung | 9002032 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Laptop-Computer, Software, Zubehör: einschließlich 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung, Installation und Schulung | 9002033 |

| Produkt | Inhalt | Kat.-Nr. |
|-------------------------------------|---|-----------------|
| Rotor-Gene AssayManager v2.1 | Software für Routinetests in Kombination mit den Rotor-Gene Q und Rotor-Gene Q MDX Thermocyclern | 9024203 |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionseinrichtung mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen | 9018901 |
| 72-Well Rotor | Dient zur Aufnahme der Röhrchenstreifen und Deckel, 0,1 ml; benötigt Adapter-Schließring 72-Well-Rotor | 9018903 |
| Locking Ring 72-Well Rotor | Dient zur Befestigung der Röhrchenstreifen und Deckel, 0,1 ml im 72-Well-Rotor | 9018904 |
| Rotor Holder | Freistehende Metallhalterung zum Einsetzen der Röhrchen und Rotor-Discs® in die Rotoren | 9018908 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 Streifen mit jeweils 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen | 981106 |
| Verwandte Produkte | | |
| QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50) | Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp MinElute-Säulen, Proteinase K, Puffer, Probensammelröhrchen | 60404 |
| Entparaffinierungslösung (16 ml) | 16 ml Entparaffinierungslösung | 19093 |

| Produkt | Inhalt | Kat.-Nr. |
|--------------------------------------|---|----------|
| EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200) | Für 200 DNA-Reaktionen: Bisulfitlösung, DNA-Schutzpuffer, MinElute DNA Spin-Säulen, Träger-RNA und Puffer | 59826 |
| EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50) | Für 50 DNA-Reaktionen: Bisulfitlösung, DNA-Schutzpuffer, MinElute DNA Spin-Säulen, Träger-RNA und Puffer | 59824 |

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Benutzerhandbuch. Diese stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom technischen Service von QIAGEN oder dem für Sie zuständigen Vertriebspartner angefordert werden.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Dieses Produkt ist als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen. QIAGEN Produkte dürfen ohne die schriftliche Genehmigung von QIAGEN nicht weiterverkauft, zum Weiterverkauf abgeändert oder zur Herstellung von zum Verkauf bestimmten Produkten verwendet werden.

Die Informationen in diesem Dokument können ohne Ankündigung geändert werden. QIAGEN übernimmt keine Haftung für mögliche Fehler in diesem Dokument. Dieses Dokument wurde zum Zeitpunkt der Veröffentlichung als vollständig und richtig erachtet. QIAGEN haftet keinesfalls für Schadensersatzansprüche jeglicher Art, die im Zusammenhang mit oder aufgrund der Verwendung dieses Produktes entstehen.

QIAGEN sichert zu, dass seine Produkte den angegebenen Spezifikationen entsprechen. In dem Fall, dass Produkte nicht wie zugesichert funktionieren, ist QIAGEN lediglich zum kostenfreien Austausch der Produkte verpflichtet. Darüber hinaus können vom Kunden keine weiteren Ansprüche geltend gemacht werden.

Marken: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], QIAxpert[®], EpiTect[®], MinElute[®], *therascreen*[®], Rotor-Disc[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™], NanoDrop[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan[®] (Roche Group).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das *therascreen* PITX2/2 RGQ PCR Kit Handbuch

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Nutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Gellendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Nov-17 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com