

Mai 2016

therascreen[®] RAS Extension Pyro[®] Kit Handbuch



Version 1

IVD

In-vitro-Diagnostikum

Zum Nachweis von Mutationen in den Exons 3 und 4 des humanen KRAS-Onkogens und in den Exons 2, 3 und 4 des humanen NRAS-Onkogens

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DEUTSCHLAND

R2

MAT

1085873DE

Sample to Insight





Inhalt

Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Erklärung	5
Testprinzip	7
Kontrollen	8
Mitgelieferte Materialien	9
Kit-Inhalt	9
Zusätzlich benötigtes Material	11
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	14
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	14
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	15
Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Proben	16
Verfahren	18
DNA-Isolierung	18
Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System	18
Protokoll 2: PCR unter Verwendung der PCR-Reagenzien des <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	21
Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads	24
Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24	27
Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System	32
Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs	35
Interpretation der Ergebnisse	40

Repräsentative Ergebnisse	45
Fehlerbehebung.....	48
Qualitätskontrolle.....	50
Anwendungseinschränkungen	50
Leistungsmerkmale	51
Leerwertgrenze und Nachweisgrenze	51
Mutationen GGT > TGT und GGT > GTT in NRAS-Codon 13	53
Linearität	54
Präzision	55
Bewertung der diagnostischen Leistung	58
Literatur	62
Symbole	63
Kontakt.....	64
Anhang A: Konfigurieren des <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Assays.....	65
Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs	71
Bestellinformationen	73

Verwendungszweck

Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ist ein diagnostischer In-vitro-Test auf Basis von Pyrosequencing® Technologie zum quantitativen Nachweis von Mutationen in den Codons 59, 61, 117 und 146 des humanen KRAS-Onkogens und in den Codons 12, 13, 59, 61, 117 und 146 des humanen NRAS-Onkogens. Der Test wird an DNA durchgeführt, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) humanem Gewebe mit metastasiertem Kolorektalkarzinom (mCRC) extrahiert wurde.

Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit dient zur Identifizierung von mCRC-Patienten, die von einer Therapie mit Panitumab und Cetuximab profitieren könnten (1).

Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit ist ausschließlich zur Verwendung mit dem PyroMark® Q24 System vorgesehen. Das PyroMark Q24 System umfasst folgende Komponenten:

- Das PyroMark Q24 Gerät oder das PyroMark Q24 MDx Gerät
- Die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation oder die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation
- Die PyroMark Q24 Software (Version 2.0) oder die PyroMark Q24 MDx Software (Version 2.0)

Das *therascreen* RAS Extension Pyro Kit darf nur von Fachpersonal wie z. B. technischen Assistenten oder Ärzten verwendet werden, die für die Anwendung in-vitro-diagnostischer und molekularbiologischer Verfahren sowie des PyroMark Q24 Systems geschult wurden.

Zusammenfassung und Erklärung

Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit dient zur quantitativen Bestimmung von Mutationen in den Exons 3 und 4 des humanen KRAS-Gens und in den Exons 2, 3 und 4 des humanen NRAS-Gens. Der Kit umfasst 8 Assays (siehe Abbildung 1):

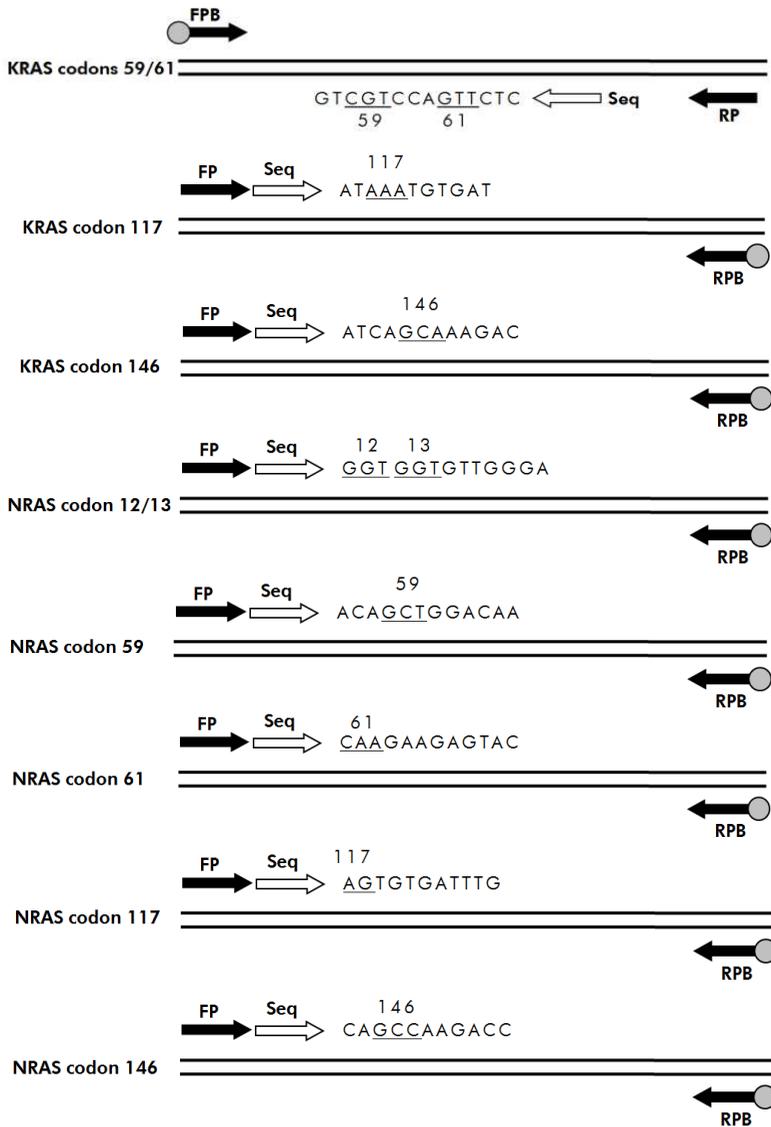


Abbildung 1. Assays des therascreen RAS Extension Pyro Kits.

Die 8 Regionen werden mittels PCR separat amplifiziert und über die definierte Region sequenziert. Die Mutationen in der Zielregion führen zu charakteristischen Mustern im Pyrogramm (Pyrogram®), die sich von denen der Wildtyp-Proben unterscheiden lassen. Die Mutationen, die mit der PyroMark Q24 Software analysiert werden können, sind in Tabelle 15 zusammengefasst (Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays). Die Assays für die KRAS-Codons 117 und 146 und NRAS-Codons 12/13, 59, 61, 117 und 146 werden vorwärts sequenziert, wogegen der Assay für KRAS-Codon 59/61 rückwärts sequenziert wird. Das Produkt enthält für jeden Assay ein PCR-Primer-Gemisch und einen Sequenzierungs-Primer. Die Primer liegen in Lösung vor; jedes Fläschchen enthält 24 µl Primer bzw. Primer-Gemisch.

Testprinzip

Der Arbeitsablauf des Assay-Verfahrens ist in Abbildung 2 veranschaulicht. Die Primer werden nach der PCR zur Reaktion mit der Zielregion eingesetzt und die Amplifikate werden auf Streptavidin Sepharose® High Performance Beads immobilisiert. Einzelstrang-DNA wird hergestellt und die zugehörigen Sequenzierungs-Primer werden im Rahmen des Annealings mit der DNA hybridisiert. Anschließend werden die Proben auf dem PyroMark Q24 analysiert, und zwar unter Verwendung von Assaykonfigurationsdateien und einer Laufdatei.

Die Einstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) kann für den Nachweis unterschiedlicher Mutationen nach dem Lauf angepasst werden (siehe „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 34 sowie „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays“ auf Seite 65).

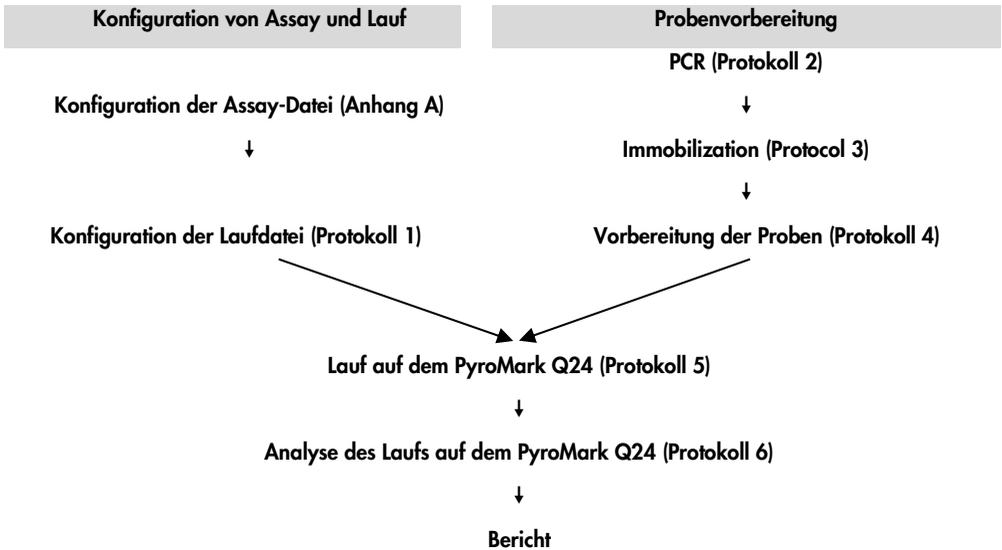


Abbildung 2. Arbeitsablauf des Verfahrens mit dem therascreen RAS Extension Pyro Kit.

Kontrollen

Dem Kit liegt unmethylierte Kontroll-DNA als Positivkontrolle für PCR- und Sequenzierungs-Reaktionen bei. Diese Kontroll-DNA hat in den mit diesem Kit sequenzierten Regionen einen Wildtyp-Genotyp. Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit Kontroll-DNA mit. Diese wird für die Interpretation der Ergebnisse und die Identifizierung schwacher Mutationen benötigt (siehe „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 34).

Darüber hinaus sollte in jeder PCR-Konfiguration für mindestens einen Assay eine Negativkontrolle (ohne Template-DNA) mitgeführt werden.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

Packung 1/2

therascreen RAS Extension Pyro Kit	(24)
Katalog-Nr.	971590
Anzahl der Präparationen	24
Seq Primer KRAS 59/61	24 µl
Seq Primer KRAS 117	24 µl
Seq Primer KRAS 146	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13	24 µl
Seq Primer NRAS 59	24 µl
Seq Primer NRAS 61	24 µl
Seq Primer NRAS 117	24 µl
Seq Primer NRAS 146	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61	24 µl
PCR Primer KRAS 117	24 µl
PCR Primer KRAS 146	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13	24 µl
PCR Primer NRAS 59	24 µl
PCR Primer NRAS 61	24 µl
PCR Primer NRAS 117	24 µl
PCR Primer NRAS 146	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad® Konzentrat), 10x	1.2 ml
H ₂ O	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA (Unmethylierte Kontroll-DNA), 10 ng/µl	3 x 100 µl

Packung 2/2

Puffer und Reagenzien	Volumen
PyroMark Binding Buffer (PyroMark Bindungspuffer)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark Annealing-Puffer)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark Denaturierungslösung)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (PyroMark Waschpuffer), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Enzymgemisch)	2 vials
Substrate Mixture (Substratgemisch)	2 vials
dATP α S	2 x 1180 μ l
dCTP	2 x 1180 μ l
dGTP	2 x 1180 μ l
dTTP	2 x 1180 μ l
therascreen <i>RAS Extension Pyro Kit Handbook</i> (English)	1 pc

* Enthält Natriumhydroxid

Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen, die vom Hersteller des jeweiligen Produkts bereitgestellt werden.

Reagenzien

- Kit zur DNA-Isolierung (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 18)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, Katalog-Nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Hochreines Wasser (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm oder gleichwertiges Produkt)
- **Hinweis:** Im Lieferumfang des Kits ist ausreichend Wasser für die PCR, DNA-Immobilisierung und zum Auflösen des Enzym- und des Substratgemisches enthalten. Zur Verdünnung des PyroMark Waschpuffers (10x) wird zusätzliches hochreines Wasser benötigt.
- Ethanol (70 %)*

Verbrauchsmaterialien

- Sterile Pipettenspitzen (mit Filtern zur PCR-Einrichtung)
- PCR-Platten mit 24 Wells (Vertiefungen) (siehe „Empfohlene Platten mit 24 Wells“, Seite 13)
- Klebefolie
- PyroMark Q24 Plate (Platte) (Katalog-Nr. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (Kartusche) (Katalog-Nr. 979302)†

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe, wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon, enthält.

† CE-IVD-gekennzeichnet, entspricht der EU-Richtlinie 98/79/EG. Alle anderen aufgeführten Produkte sind nicht gemäß der EU-Richtlinie 98/79/EG CE-IVD-gekennzeichnet.

Geräte

- (Einstellbare) Pipetten*
- Tisch-Mikrozentrifuge*
- Thermocycler* und entsprechende PCR-Röhrchen
- PyroMark Q24 MDx oder PyroMark Q24 Software (Katalog-Nr. 9001513 oder 9001514)*
- PyroMark Q24 MDx oder PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Vakuum-Arbeitsstation) (Katalog-Nr. 9001515, 9001516, 9001518 oder 9001519)*
- Plattenmischer* für die Immobilisierung auf Beads (siehe „Empfohlene Plattenmischer“ auf Seite 12)
- Heizblock* (bis 80 °C)

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

Empfohlene Plattenmischer

Zur Verwendung mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit werden die in Tabelle 1 aufgeführten Orbitalplattenmischer empfohlen.

Tabelle 1. Zur Verwendung mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit empfohlene Plattenmischer

Hersteller	Produkt	Katalog-Nr.
Eppendorf	ThermoMixer® C (Basic)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96 (Thermoblock für PCR-Platten mit 96 Wells)	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Empfohlene Platten mit 24 Wells

Zur Verwendung mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit werden die in Tabelle 2 aufgeführten Platten mit 24 Wells (Vertiefungen) empfohlen.

Tabelle 2. Zur Verwendung mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit empfohlene Platten mit 24 Wells

Hersteller	Produkt	Katalog-Nr.
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate (PCR-Platte), 24 Wells	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate (PCR-Mikrotiterplatte mit 24 Wells)	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 Wells, durchsichtige Röhren	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame (PCR-Platten ohne Rahmen)	G030

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter **www.qiagen.com/safety** verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Achten Sie stets auf folgende Punkte:

- Die Bestandteile dieses Produkts reichen aus, um für jeden Assay 24 Reaktionen durchzuführen.
- Verwenden Sie sterile Pipettenspitzen (mit Filtern zur PCR-Vorbereitung).
- Lagern und extrahieren Sie positive Materialien (Proben, Positivkontrollen und Amplifikate) getrennt von allen anderen Reagenzien und geben Sie sie in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzu.
- Lassen Sie vor der Durchführung eines Assays alle Komponenten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig auftauen.
- Mischen Sie nach dem Auftauen die Komponenten (durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch kurzes Mischen im Vortexer) und zentrifugieren Sie sie kurz.
- Fehlgeschlagene Ergebnisse stellen keine Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus dar.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit wird in 2 Packungen versandt. Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit selbst (Packung 1/2) wird auf Trockeneis versandt. PyroMark PCR-Master-Mix, CoralLoad Konzentrat, unmethylierte Kontroll-DNA und alle Primer müssen direkt nach dem Empfang bei -15 bis -25°C gelagert werden.

Die Pyro Puffer und Reagenzien (Packung 2/2), wozu Puffer, Enzymgemisch, Substratgemisch, dATPaS, dCTP, dGTP und dTTP (die für Pyrosequenzierungs-Analysen erforderlichen Reagenzien) gehören, werden auf Kühlelementen versandt. Diese Komponenten müssen direkt nach dem Empfang bei 2 bis 8°C gelagert werden. Um den Verlust der Aktivität so gering wie möglich zu halten, empfiehlt es sich, das Enzymgemisch und das Substratgemisch in den mitgelieferten Fläschchen aufzubewahren.

Rekonstituiertes Enzym- und Substratgemisch ist bei 2 bis 8°C mindestens 10 Tage lang haltbar. Rekonstituiertes Enzym- und Substratgemisch kann eingefroren und in den Originalfläschchen bei -15 bis -25°C gelagert werden. Gefrorene Reagenzien dürfen maximal 6-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Hinweis: Nukleotide dürfen nicht eingefroren werden.

Bei Lagerung unter diesen Bedingungen ist der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit bis zum Ablauf des angegebenen Verfallsdatums stabil.

Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden.

Das Probenmaterial muss humane genomische DNA sein, die aus FFPE-Gewebe extrahiert wurde. Zur Sicherstellung der Probenqualität müssen die Proben gemäß Pathologie-Standardverfahren transportiert werden.

Tumorproben sind heterogen, daher stimmen die Daten einer Tumorprobe nicht unbedingt mit den Daten anderer Abschnitte desselben Tumors überein. Tumorproben können auch nicht tumoröses Gewebe enthalten. Bei DNA aus nicht tumorösem Gewebe ist davon auszugehen, dass sie keine Mutationen enthält, die mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit nachgewiesen werden können.

Vorbereitung von Gewebeproben

Hinweis: Verwenden Sie trockene Skalpelle. Dieser Schritt darf nicht in einer Laminar-Flow-Sterilbank oder einem Abzug durchgeführt werden.

- Überführen Sie das Tumorgewebe für jede Probe mit einem frischen Skalpell von den Schnitten in gekennzeichnete Mikrozentrifugenröhrchen.

So bereiten Sie Gewebeproben für die DNA-Extraktion vor

- Fixieren Sie die Gewebeproben unter Verwendung von Standardmaterialien und -methoden in 10 % neutralgepuffertem Formalin (NBF), und betten Sie die Gewebeproben in Paraffin ein. Schneiden Sie mit einem Mikrotom 5- μ m-Serienschnitte von einem Paraffinblock ab, und ziehen Sie diese auf einen Objektträger aus Glas auf.

-
- Lassen Sie einen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbten Schnitt von einem Spezialisten (z. B. Pathologen) auf Tumorgehalt und -fläche untersuchen. Kennzeichnen Sie den angefärbten Objektträger, um das Tumorgewebe von dem normalen Gewebe zu unterscheiden. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.
 - Verwenden Sie Schnitte mit mehr als 20 % Tumorgehalt nach Fläche zur Verarbeitung ohne Makrodissektion (siehe nächster Punkt).
 - Bei Schnitten mit weniger als 20 % Tumorgehalt nach Fläche müssen ein oder mehrere Schnitte einer Makrodissektion unterzogen werden. Nicht tumoröses Gewebe wird verworfen.
 - Bei Schnitten mit einer Fläche unter 4 mm² verarbeiten Sie zwei oder mehr Schnitte, um die Gesamtumorfläche auf mindestens 4 mm² zu erhöhen (gilt sowohl für Proben mit als auch ohne Makrodissektion). Nicht tumoröses Gewebe wird verworfen.
 - Entfernen Sie mit einem frischen sterilen Skalpell überschüssiges Paraffin von den Gewebeabschnitten.

Lagerung

Lagern Sie FFPE-Blöcke und Objektträger bei Raumtemperatur. Objektträger können vor der DNA-Extraktion bis zu 4 Wochen lang bei Raumtemperatur gelagert werden.

Genomische DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2 bis 8 °C und anschließend vor dem Gebrauch bis zu 8 Wochen lang bei -15 bis -25 °C gelagert werden.

Verfahren

DNA-Isolierung

Der unten in Tabelle 3 aufgeführte QIAGEN Kit wird für die Aufreinigung von DNA aus den angegebenen humanen Proben zur Verwendung mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit empfohlen. Befolgen Sie beim Arbeiten mit diesem Kit die im Benutzerhandbuch des jeweiligen Kits enthaltenen Anweisungen zur DNA-Aufreinigung.

Tabelle 3. Kits zur DNA-Aufreinigung, die zur Verwendung mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit empfohlen werden

Probenmaterial	Kit zur Nukleinsäure-Isolierung	Katalog-Nr.
In Paraffin eingebettetes Gewebe	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Konfigurieren Sie den Assay wie in „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays“ auf Seite 65 beschrieben. Diese Konfiguration muss nur einmal vor der ersten Durchführung des RAS Extension Pyro Assays vorgenommen werden.
- Proben mit hohen Signalintensitäten sollten nicht in die Wells neben den Nicht-Template-Kontrollen und in Wells mit geringer zu erwartender Signalintensität gegeben werden. Dies könnte zu Signalvermischung (Crosstalk) zwischen den Wells führen, wobei das Signal eines Wells im benachbarten Well gemessen wird.

Verfahren

1. Klicken Sie in der Symbolleiste auf .
2. Eine neue Laufdatei wird erstellt.

Geben Sie die Laufparameter ein (siehe „Laufparameter“ auf Seite 19).

3. Richten Sie die Platte ein, indem Sie den Wells für alle 8 Assays des theascreen RAS Extension Pyro Kits Assays zuweisen, die den zu analysierenden Proben entsprechen.

Hinweis: In jeder PCR-Konfiguration muss für mindestens einen Assay eine Negativkontrolle (ohne Template-DNA) mitgeführt werden.

Hinweis: Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA als Wildtyp-Kontrolle mit (siehe Abbildung 2 auf Seite 8).

4. Wenn der Lauf fertig konfiguriert und für die Durchführung auf dem PyroMark Q24 System bereit ist, drucken Sie eine Liste der für das Enzymgemisch, das Substratgemisch und die Nukleotide benötigten Volumina sowie die Plattenanordnung aus. Wählen Sie im Menü „Tools“ (Extras) die Option „Pre Run Information“ (Informationen vor dem Lauf). Wenn der Bericht angezeigt wird, klicken Sie auf .
5. Schließen Sie die Laufdatei und kopieren Sie sie über den Windows® Explorer auf einen USB-Stick (im Lieferumfang enthalten).

Hinweis: Die ausgedruckten Informationen vor dem Lauf können als Vorlage für die Probenvorbereitung verwendet werden (siehe „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 24).

Hinweis: Informationen zur Durchführung des Laufs auf dem PyroMark Q24 System finden Sie unter „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 32.

Laufparameter

- **„Run name“ (Laufname):** Dem Lauf wird beim Speichern der Datei ein Name zugewiesen. Eine Umbenennung der Datei führt somit auch zur Umbenennung des Laufs.
- **„Instrument method“ (Gerätemethode):** Wählen Sie je nach Kartusche, die für den Lauf verwendet wird, die Gerätemethode aus (siehe Gebrauchsanleitung des jeweiligen Produkts).
- **„Plate ID“ (Platten-ID, optional):** Geben Sie die ID der PyroMark Q24 Platte ein.

- **„Bar code“ (Barcode , optional):** Geben Sie den Barcode der Platte manuell ein oder, falls Ihr Computer über einen integrierten Barcodeleser verfügt, setzen Sie den Mauscursor in das Textfeld „Barcode“ (durch Klicken in das Feld) und lesen Sie den Barcode ein.
- **„Kit ID“ (Kit-ID, optional) und „Reagent ID“ (Reagenz-ID, optional):** Geben Sie die Chargennummer des zu verwendenden theascreen RAS Extension Pyro Kits ein. Diese ist auf dem Produktetikett angegeben.
Hinweis: Wir empfehlen die Eingabe beider Chargennummern, damit unerwartete Probleme mit dem theascreen RAS Extension Pyro Kit zurückverfolgt werden können.
- **„Run note“ (Laufanmerkung, optional):** Geben Sie eine Anmerkung mit Informationen zum Inhalt oder Zweck des Laufs ein.

Zuweisen von Assay-Dateien

Für die Zuweisung eines Assays zu einem Well stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl:

- Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Well und wählen Sie im Kontextmenü die Option „Load Assay“ (Assay laden).
- Wählen Sie in der Navigationsansicht den Assay aus und ziehen Sie den Assay mit der Maus auf den Well.

Die Wells sind je nach zugewiesenem Assay farbig markiert.

Eingeben von Proben-IDs und Anmerkungen

Wählen Sie zum Eingeben einer Proben-ID oder Anmerkung die entsprechende Zelle aus und geben Sie den gewünschten Text ein.

Um eine Proben-ID oder Anmerkung zu bearbeiten, wählen Sie entweder die Zelle aus (der aktuelle Inhalt wird markiert) oder doppelklicken Sie auf die Zelle.

Protokoll 2: PCR unter Verwendung der PCR-Reagenzien des *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Dieses Protokoll ist für die PCR-Amplifikation mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit von 8 separaten Regionen in den Exons 3 und 4 des humanen KRAS-Gens und in den Exons 2, 3 und 4 des humanen NRAS-Gens vorgesehen.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Die HotStarTaq® DNA-Polymerase im PyroMark PCR-Master-Mix muss 15 Minuten lang bei 95 °C aktiviert werden.
- Bereiten Sie alle Reaktionsgemische vor. Führen Sie dies in einem Bereich durch, der von den Bereichen für die DNA-Reinigung, Zugabe des Template zur PCR, Analyse von PCR-Produkten und Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse getrennt ist.
- Verwenden Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen Einwegspitzen mit hydrophoben Filtern.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Bevor Sie die Röhrchen mit den PCR-Primern öffnen, zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhrchen absetzt.
- Passen Sie die Konzentration der Kontrolle und der Proben-DNA bei Bedarf auf 0,4 bis 2 ng/µl an.

Verfahren

1. Lassen Sie alle benötigten Komponenten auftauen (siehe Tabelle 4).
Mischen Sie diese vor der Verwendung gründlich.
2. Stellen Sie gemäß Tabelle 4 für jeden Satz von PCR-Primern ein Reaktionsgemisch her.

Das Reaktionsgemisch enthält mit Ausnahme der Probe normalerweise alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Stellen Sie eine größere Menge an Reaktionsgemisch her als insgesamt für alle durchzuführenden PCR-Assays benötigt wird.

Tabelle 4. Herstellung des Reaktionsgemisches für jedes PCR-Primer-Gemisch

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 or PCR Primer KRAS 117 or PCR Primer KRAS 146 or PCR Primer NRAS 12/13 or PCR Primer NRAS 59 or PCR Primer NRAS 61 or PCR Primer NRAS 117 or PCR Primer NRAS 146	1
Wasser (H ₂ O, im Lieferumfang enthalten)	4
Gesamtvolumen	20

- Mischen Sie das Reaktionsgemisch gründlich und geben Sie 20 µl in jedes PCR-Röhrchen.

Die PCR-Röhrchen müssen nicht auf Eis gelagert werden, da die HotStarTaq DNA-Polymerase bei Raumtemperatur inaktiv ist.

- Geben Sie 5 µl Template-DNA (2 bis 10 ng genomische DNA) in die einzelnen PCR-Röhrchen (siehe Tabelle 5) und mischen Sie sie gründlich.

Hinweis: In jeder PCR-Konfiguration sollte für mindestens einen Assay eine Negativkontrolle (ohne Template-DNA) mitgeführt werden.

Hinweis: Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA als Wildtyp-Kontrolle mit (siehe „Kontrollen“ auf Seite 8).

Tabelle 5. Vorbereitung der PCR

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)
Reaktionsgemisch	20
Proben-DNA	5
Gesamtvolumen	25

5. Programmieren Sie den Thermocycler gemäß den Anweisungen des Herstellers und unter Verwendung der in Tabelle 6 aufgeführten Parameter.

Tabelle 6. Optimiertes Zyklusprotokoll

	Zeit	Temperatur	Kommentare
Erste Aktivierung:	15 Minuten	95°C	HotStarTaq DNA polymerase is activated by this heating step
3-Schritt-Zyklus:			
Denaturierung	20 Sekunden	95°C	
Annealing	30 Sekunden	53°C	
Verlängerung	20 Sekunden	72°C	
Anzahl der Zyklen	42	–	
Letzte Verlängerung:	5 Minuten	72°C	

6. Setzen Sie die PCR-Röhrchen in den Thermocycler und starten Sie das Zyklusprogramm.
7. Fahren Sie nach der Amplifikation mit „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 24 fort.
- Die PCR-Proben können bis zu 3 Tage lang bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads

Dieses Protokoll dient zur Immobilisierung der Template-DNA auf Streptavidin Sepharose High Performance vor der Analyse mit dem PyroMark Q24 System.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Lassen Sie vor Beginn alle benötigten Reagenzien und Lösungen auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) temperieren.
- Schalten Sie den PyroMark Q24 mindestens 30 Minuten vor einem geplanten Lauf am Hauptschalter an der Geräterückseite ein.
- Setzen Sie einen PyroMark Q24 Plattenhalter auf einen vorgeheizten Heizblock mit 80 °C. Lassen Sie einen zweiten PyroMark Q24 Plattenhalter bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) stehen.
- Der PyroMark Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor. Verdünnen Sie diesen vor der ersten Verwendung zu einer 1x-Arbeitslösung, indem Sie 225 ml hochreines Wasser zu 25 ml 10x PyroMark Waschpuffer geben (Endvolumen beträgt somit 250 ml).

Hinweis: Die PyroMark Waschpuffer-Gebrauchslösung (1x) ist bei 2 bis 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil.

- Bereiten Sie die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation für die Probenvorbereitung vor (siehe PyroMark Q24 User Manual).

Verfahren

1. Schwenken Sie die Flasche mit Streptavidin Sepharose High Performance vorsichtig, bis eine homogene Lösung vorliegt.
2. Stellen Sie gemäß Tabelle 7 einen Master-Mix zur Immobilisierung der DNA her.

Stellen Sie eine größere Menge her als insgesamt für alle durchzuführenden Reaktionen benötigt wird (Menge für die tatsächliche Anzahl an Reaktionen + Menge für eine weitere Reaktion).

Tabelle 7. Master-Mix zur DNA-Immobilisierung

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)
PyroMark Binding Buffer (PyroMark Bindungspuffer)	40
Wasser (H ₂ O, im Lieferumfang enthalten)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Gesamtvolumen	70

3. Geben Sie 70 µl des Master-Mix in die Wells einer PCR-Platte mit 24 Wells (wie in der Laufkonfiguration festgelegt, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 18).

Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Stellen Sie die Homogenität des Master-Mix sicher, indem Sie diesen häufig mithilfe einer Pipette oder durch Impuls-Vortexen mischen. Der Master-Mix darf nicht zentrifugiert werden.

-
4. Geben Sie 10 µl biotinyliertes PCR-Produkt aus Protokoll 2 in jeden Well mit Master-Mix wie in der Laufkonfiguration festgelegt, (siehe „Protokoll 2: PCR unter Verwendung der PCR-Reagenzien des theascreen RAS Extension Pyro Kit“ auf Seite 21).

Das Gesamtvolumen pro Well soll nach der Zugabe des Master-Mix und des PCR-Produkts 80 µl betragen.

5. Verschließen Sie die PCR-Platte mit Klebefolie.

Stellen Sie sicher, dass zwischen den Wells keine Flüssigkeit verschleppt wird.

6. Schütteln Sie die PCR-Platte bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) 5 bis 10 Minuten lang bei 1400 U/min.

Fahren Sie während des Vorgangs unverzüglich mit „Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24“ auf Seite 27 fort.

Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24

Dieses Protokoll dient zur Vorbereitung einsträngiger DNA und zum Annealing des Sequenzierungs-Primers an das Template vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Bevor Sie die Röhren mit den Sequenzierungs-Primern öffnen, zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhren absetzt.
- Geben Sie die verschiedenen Sequenzierungs-Primer hinzu. Gehen Sie dabei je nach Analyseregion nach dem in der Laufkonfiguration für die Platte festgelegten Schema vor (siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 18).
- Führen Sie wie im PyroMark Q24 User Manual beschrieben regelmäßige Funktionsprüfungen der Filternadeln durch und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus.

Verfahren

1. Verdünnen Sie eine ausreichende Menge jedes Sequenzierungs-Primers in PyroMark Annealing-Puffer (siehe Tabelle 8).

Stellen Sie eine größere Menge an verdünnten Sequenzierungs-Primern her als insgesamt für alle zu sequenzierenden Proben benötigt wird (Menge für die tatsächliche Anzahl an Proben + Menge für eine weitere Probe).

Es darf nicht mehr Sequenzierungs-Primer verdünnt und gelagert werden, als tatsächlich benötigt wird.

Tabelle 8. Beispiel zur Verdünnung der Sequenzierungs-Primer

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)	Volumen für 9+1 Reaktionen (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 oder		
Seq Primer KRAS 117 oder		
Seq Primer KRAS 146 oder		
Seq Primer NRAS 12/13 oder	0.8	8
Seq Primer NRAS 59 oder		
Seq Primer NRAS 61 oder		
Seq Primer NRAS 117 oder		
Seq Primer NRAS 146		
Gesamtvolumen	25	250

2. Geben Sie 25 µl des verdünnten Sequenzierungs-Primers in jeden Well der PyroMark Q24 Platte (gemäß der Laufkonfiguration, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 18).

Halten Sie einen der PyroMark Q24 Plattenhalter (im Lieferumfang der PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation enthalten) auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) und verwenden Sie diesen als Auflage beim Vorbereiten und Bewegen der Platte.

3. Schalten Sie die Vakuumpumpe der PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation ein.
4. Stellen Sie die PCR-Platte aus Protokoll 3 und die PyroMark Q24 Platte in die Vakuum-Arbeitsstation (Abbildung 3).

Vergewissern Sie sich, dass die Sepharose-Beads in der PCR-Platte aufgelöst sind. Achten Sie dabei darauf, dass die Platte die gleiche Ausrichtung wie beim Laden der Proben hat.



Abbildung 3. Position der PCR-Platte und der PyroMark Q24 Platte in der Vakuum-Arbeitsstation

5. Legen Sie Unterdruck an den Saugkopf an, indem Sie das Vakuum einschalten.
6. Senken Sie die Filternadeln des Vakuum-Saugkopfes langsam in die PCR-Platte ab, um die Beads mit dem immobilisierten Template anzusaugen. Lassen Sie die Nadeln 15 Sekunden lang in dieser Position. Gehen Sie beim Anheben des Vakuum-Saugkopfes mit Vorsicht vor.

Hinweis: Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Der Bindungsschritt an die Beads sollte möglichst direkt nach dem Schütteln erfolgen. Wenn seit dem Schütteln der Platte mehr als 1 Minute vergangen ist, schütteln Sie sie vor der Bindung an die Beads erneut 1 Minute lang.

Vergewissern Sie sich, dass alle Proben in der PCR-Platte vom Vakuum-Saugkopf aufgenommen wurden.

7. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 40 ml 70 %igem Ethanol (Reservoir 1, siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 5 Sekunden lang.

8. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 40 ml Denaturierungslösung (Reservoir 2, siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 5 Sekunden lang.
9. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 50 ml Waschpuffer (Reservoir 3, siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 10 Sekunden lang.
10. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf an und schwenken Sie ihn über einen Winkel von 90° über die Senkrechte hinaus. Halten Sie ihn 5 Sekunden lang in dieser Position, um die Flüssigkeit aus den Filternadeln ablaufen zu lassen (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4. Saugkopf über die Senkrechte hinaus geschwenkt (über 90°)

11. Halten Sie den Vakuum-Saugkopf über die PyroMark Q24 Platte und schalten Sie das Vakuum aus.
12. Setzen Sie die Beads in der PyroMark Q24 Platte frei, indem Sie die Filternadeln in den verdünnten Sequenzierungs-Primer absenken und den Vakuum-Saugkopf vorsichtig hin und her bewegen.
Hinweis: Achten Sie darauf, dass Sie die Oberfläche der PyroMark Q24 Platte nicht mit den Filternadeln zerkratzen.
13. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit hochreinem Wasser (Reservoir 4, siehe Abbildung 3) und schütteln Sie ihn 10 Sekunden lang.

-
14. Spülen Sie die Filternadeln, indem Sie sie in das Reservoir mit hochreinem Wasser (Reservoir 5, siehe Abbildung 3) eintauchen und Unterdruck anlegen. Spülen Sie die Filternadeln mit 70 ml hochreinem Wasser.
 15. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf an und schwenken Sie ihn über einen Winkel von 90° über die Senkrechte hinaus. Halten Sie ihn 5 Sekunden lang in dieser Position, um die Flüssigkeit aus den Filternadeln ablaufen zu lassen (siehe Abbildung 4).
 16. Schalten Sie den Vakuum-Saugkopf aus und bringen Sie ihn in die Parkposition (P).
 17. Schalten Sie die Vakuumpumpe aus.

Hinweis: Am Ende jedes Arbeitstags sind der Flüssigabfall und alle verbleibenden Lösungen zu entsorgen und die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation ist auf Staub und verschüttete Flüssigkeit zu untersuchen. (siehe „Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs“ auf Seite 71).

18. Erhitzen Sie die PyroMark Q24 Platte mit den Proben unter Verwendung des vorgewärmten PyroMark Q24 Plattenhalters 2 Minuten lang bei 80 °C.
19. Nehmen Sie die PyroMark Q24 Platte vom heißen Plattenhalter herunter und stellen Sie sie auf den zweiten PyroMark Q24 Plattenhalter, der bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) stehen gelassen wurde, um die Proben 10 bis 15 Minuten lang auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen.

Fahren Sie anschließend direkt mit „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 32 fort.

Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System

In diesem Protokoll wird die Vorbereitung und das Laden der PyroMark Gold Q24 Reagenzien in die PyroMark Q24 Kartusche sowie das Starten und Beenden eines Laufs auf dem PyroMark Q24 beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung zur Konfiguration eines Laufs finden Sie im *PyroMark Q24 User Manual*.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Der Bericht mit den Informationen vor dem Lauf, der bei der Konfiguration des Laufs über das Menü „Tools“ (Extras) aufgerufen wird (siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 18), enthält Informationen zu den Volumina von Nukleotiden, Enzym und Substratpuffer, die für einen bestimmten Lauf benötigt werden.
- Laden Sie die Kartusche mit Einwegspitzen (ohne hydrophobe Filter), um die korrekte Funktion der Kartusche zu gewährleisten.

Verfahren

1. Lösen Sie die gefriergetrockneten Enzym- und Substratgemische in 620 µl Wasser auf (H₂O, im Lieferumfang enthalten).
2. Mischen Sie die Lösungen durch vorsichtiges Umschwenken des Fläschchens.

Hinweis: Nicht im Vortexer mischen!

Um sicherzustellen, dass das Gemisch vollständig aufgelöst ist, lassen Sie es 5 bis 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) stehen. Achten Sie darauf, dass die Lösung vor dem Befüllen der PyroMark Q24 Kartusche keine Trübung aufweist. Wenn die Reagenzien nicht direkt verwendet werden, lagern Sie die Reagenzfläschchen auf Eis oder in einem Gefrierschrank.

3. Die Reagenzien und die PyroMark Q24 Kartusche müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden (20 bis 25 °C).
4. Drehen Sie das Etikett der PyroMark Q24 Kartusche zu sich hin.

5. Beladen Sie die PyroMark Q24 Kartusche mit den entsprechenden Volumina an Nukleotiden sowie an Enzym- und Substratgemisch, wie in Abbildung 5 dargestellt. Stellen Sie sicher, dass keine Luftblasen aus der Pipette in die Kartusche gelangen. Make sure that no air bubbles are transferred from the pipet to the cartridge.

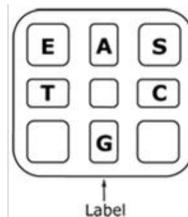


Abbildung 5. Grafische Darstellung der PyroMark Q24 Kartusche in der Draufsicht.

Die Buchstaben entsprechen denen auf den Etiketten der Reagenzfläschchen. Geben Sie Enzymgemisch (**E**), Substratgemisch (**S**) und Nukleotide (**A**, **T**, **C**, **G**) gemäß den Volumenangaben im Bericht mit den Informationen vor dem Lauf zu, der bei der Konfiguration des Laufs über das Menü „Tools“ (Extras) aufgerufen wird.

6. Öffnen Sie die Kartuschenverriegelung und setzen Sie die gefüllte Reagenzkartusche so ein, dass das Etikett nach außen zeigt. Setzen Sie die Kartusche vollständig ein und drücken Sie sie dann nach unten.
7. Vergewissern Sie sich, dass die Linie vorne an der Kartusche sichtbar ist und schließen Sie die Verriegelung.
8. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und stellen Sie die Platte auf den Heizblock.
9. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.
10. Stecken Sie den USB-Stick (auf dem die Laufdatei gespeichert ist) in den USB-Anschluss vorne am Gerät.
- Der USB-Stick darf erst herausgezogen werden, wenn der Lauf abgeschlossen ist.

-
11. Wählen Sie im Hauptmenü (mit Hilfe der Tasten ▲ und ▼) die Option „Run“ (Lauf) und drücken Sie „OK“.
 12. Wählen Sie mit Hilfe der Tasten ▲ und ▼ die Laufdatei aus.
Um den Inhalt eines Ordners anzuzeigen, wählen Sie den Ordner aus und drücken Sie „Select“ (Auswählen). Um zur vorherigen Ansicht zurückzukehren, drücken Sie „Back“ (Zurück).
 13. Drücken Sie nach Auswahl der Laufdatei „Select“ (Auswählen), um den Lauf zu starten.
 14. Nachdem der Lauf abgeschlossen ist und das Gerät bestätigt hat, dass die Laufdatei auf dem USB-Stick gespeichert wurde, drücken Sie „Close“ (Schließen).
 15. Ziehen Sie den USB-Stick heraus.
 16. Öffnen Sie den Gerätedeckel.
 17. Öffnen Sie die Kartuschenverriegelung und entnehmen Sie die Reagenzkartusche, indem Sie sie anheben und dann herausziehen.
 18. Schließen Sie die Verriegelung.
 19. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und nehmen Sie die Platte vom Heizblock.
 20. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.
 21. Entsorgen Sie die Platte und reinigen Sie die Kartusche gemäß den Anweisungen im der Kartusche beiliegenden Produktblatt.
 22. Analysieren Sie den Lauf gemäß „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 34.

Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs

In diesem Protokoll wird die Mutationsanalyse eines abgeschlossenen *therascreen* RAS Extension Pyro Laufs mit der PyroMark Q24 Software beschrieben.

Verfahren

1. Stecken Sie den USB-Stick, auf dem die Laufdatei gespeichert ist, in den USB-Anschluss des Computers.
2. Verschieben Sie die Laufdatei über den Windows Explorer vom USB-Stick zum gewünschten Speicherort auf dem Computer.
3. Öffnen Sie die Laufdatei im AQ-Modus der PyroMark Q24 Software, indem Sie entweder im Menü „File“ (Datei) die Option „Open“ (Öffnen) auswählen oder in der Navigationsansicht auf die Datei doppelklicken (✓).
4. Wählen Sie im Menü „Reports“ (Berichte) die Option „AQ Add On Reports/ RAS Extension“ (AQ-Zusatzberichte/RAS Extension), um mit dem RAS Extension Plug-In Report einen Plug-in-Bericht zu erstellen (siehe Abbildung 6).

Hinweis: Mutationen in KRAS-Codon 61 müssen darüber hinaus mit einem separaten KRAS Plug-in analysiert werden, indem im Menü „Reports“ (Berichte) die Option „AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61“ (AQ-Zusatzberichte/KRAS/Codon 61) ausgewählt wird.

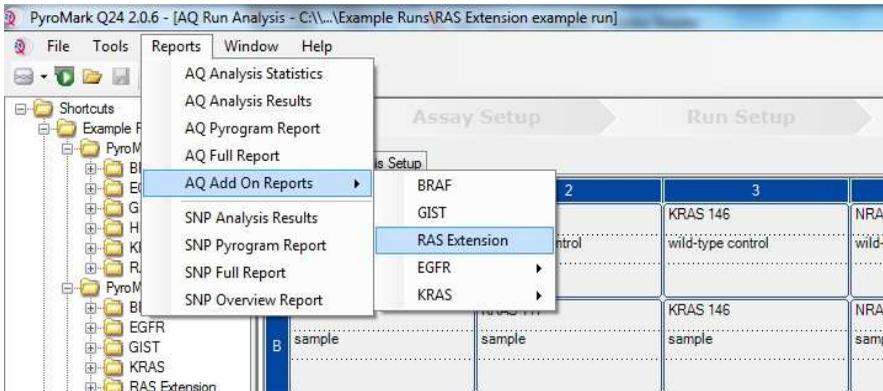


Abbildung 6. Menü mit dem RAS Extension Plug-in Report

Es werden automatisch die Wells für alle Mutationen analysiert, für die in Tabelle 9 auf Seite 43 Nachweisgrenzen angegeben sind. Die Ergebnisse werden in einer Übersichtstabelle zusammengefasst (siehe Abbildung 7) im Anschluss folgen die detaillierten Ergebnisse, wie z. B. Pyrogramme und Informationen zur Analysequalität.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Abbildung 7. RAS Extension Plug-in Report

5. Bei Verwendung der AQ-Analyse:

Klicken Sie auf eine der beiden Analyse-Schaltflächen, um den Lauf zu analysieren und eine Übersicht der Ergebnisse anzuzeigen.



Analyse aller Wells



Analyse des ausgewählten Wells

Die Analyseergebnisse (Allelfrequenzen) und die Qualitätsbewertung werden über der variablen Position im Pyrogramm angezeigt. Weitere Informationen zur Analyse eines Laufs finden Sie im *PyroMark Q24 User Manual*.

Um einen Bericht zu erstellen, wählen Sie im Menü „Reports“ (Berichte) die Option „AQ Full Report“ (Vollständiger AQ-Bericht) oder „AQ Analysis Results“ (AQ-Analyseergebnisse).

Hinweis: Zur Erzielung zuverlässiger Ergebnisse empfehlen wir einzelne Peaks mit einer Höhe über 30 RLU zu verwenden. Legen Sie bei der Assay-Konfiguration für „Required peak height for passed quality“ (Erforderliche Peakhöhe für bestandene Qualität) den Wert 30 RLU fest und stellen Sie sicher, dass der A-Peak-Reduktionsfaktor für die Analyse von NRAS-Codon 61 auf den Wert 0,86 eingestellt ist; siehe „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays“ auf Seite 65 und das *PyroMark Q24 User Manual* (PyroMark Q24 Benutzerhandbuch).

Für die Dokumentation und Interpretation der Allelquantifizierung sollte der Bericht „AQ Analysis Results“ (AQ-Analyseergebnisse) verwendet werden. Die Zahlen im Pyrogramm sind gerundet und geben somit nicht die genaue Quantifizierung an.

Hinweis: Das Pyrogramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Die gemessenen Peaks sollten mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 40.

Erneute Analyse von Proben, bei denen mit der Standardeinstellung unter „Sequence to Analyze“ keine Mutation nachgewiesen wurde oder die die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) erhalten haben.

Die unter „Analysis Setup“ (Analysekonfiguration) festgelegte Standardeinstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) ist für die häufigsten Punktmutationen von *therascreen* RAS Extension Pyro Assays geeignet.

Wir empfehlen, alle Proben, bei denen mit der Standardeinstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) keine Mutation nachgewiesen wurde, sowie Proben mit den Qualitätsbewertungen „Check“ oder „Failed“ unbedingt manuell neu zu analysieren. Die Qualitätsbewertungen „Check“ und „Failed“ weisen möglicherweise auf eine Mutation hin, die von der Standardeinstellung „Sequence to Analyze“ nicht abgedeckt wird, was zu unerwarteten Referenz-Peaks führen kann.

Um die Proben erneut zu analysieren und andere Mutationen nachzuweisen, ändern Sie unter „Analysis Setup“ (Analyse-Konfiguration) die Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu

analysierende Sequenz) auf die in Tabelle 16 und Tabelle 17 von Anhang A beschriebenen Varianten oder Varianten für andere seltene oder unerwartete Mutationen. Klicken Sie auf „Apply“ (Übernehmen). Wenn das Fenster „Apply Analysis Setup“ (Analysekonfiguration übernehmen) angezeigt wird, klicken Sie auf „To All“ (Für alle).

Die aktualisierten Mutationsfrequenzen in humanen EGFR- und NRAS-Genen sind auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ verfügbar.

Hinweis: Vergewissern Sie sich nach der Änderung von „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz), dass der Schwellenwert für die einzelne Peakhöhe auf 30 RLU eingestellt ist, und stellen Sie sicher, dass der A-Peak-Reduktionsfaktor für die Analyse von NRAS-Codon 61 auf 0,86 gesetzt ist (siehe „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays“).

Hinweis: Es können seltene oder unerwartete Mutationen in der sequenzierten Region vorhanden sein, die unter Berücksichtigung unerwarteter Mutationen mit einer anderen Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) analysiert werden können.

Hinweis: Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene oder unerwartete Mutationen zurückgeführt werden können, ist das Ergebnis nicht als Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus geeignet. Es wird empfohlen die Probe erneut zu analysieren.

Interpretation der Ergebnisse

Interpretation der Analyseergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen

Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit Kontroll-DNA mit. Diese wird für die Interpretation der Ergebnisse und die Identifizierung schwacher Mutationen und als Kontrolle für Hintergrundkonzentrationen benötigt. Die gemessene Häufigkeit in der Kontrollprobe darf nicht größer sein als die Leerwertgrenze (LOB). Anhand der in den Handbüchern angegebenen Werte für die Leerwertgrenze (LOB: Limit of Blank) und die Nachweisgrenze (LOD: Limit of Detection) lässt sich bestimmen, ob eine Mutation vorliegt. Diese Werte wurden mit Plasmidgemischen aus dem Wildtyp bzw. der entsprechenden mutierten Sequenz gewonnen.

Nach der Analyse mit der PyroMark Q24 Software oder den Plug-in-Berichten sind drei Ergebnisse möglich. Weitere Informationen zu den Nachweisgrenzen finden Sie in Tabelle 9.

- Mutationshäufigkeit $< \text{LOD}$: Mutation nicht nachgewiesen
- Mutationshäufigkeit $> \text{LOD} + 3$ Prozenteinheiten: Mutation
- Mutationshäufigkeit $\geq \text{LOD}$ und $\leq \text{LOD} + 3$ Prozenteinheiten: potenzielle schwache Mutation

Hinweis: Wenn Sie mit dem RAS Extension Plug-in Report arbeiten (siehe Schritt 5 von „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 34) und dieser Fall eintritt, wird eine Warnung ausgegeben.

Der Bereich zwischen LOD und $\text{LOD} + 3$ Prozenteinheiten ermöglicht unter optimalen Bedingungen die sensitive Detektion niedriggradiger Mutationen. Eine gemessene Häufigkeit über der Leerwertgrenze (LOB) in der unmethylierten Kontrollprobe zeigt an, dass im

jeweiligen Lauf ein ungewöhnlich hoher Hintergrund vorhanden ist, der die Allelquantifizierung insbesondere für schwache Mutationen beeinträchtigen kann. Daher sind Ergebnisse mit der Warnmeldung „potenzielle schwache Mutation“ sorgfältig zu evaluieren.

Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird, sollten nur dann als mutationspositiv betrachtet werden, wenn das Ergebnis durch die Wiederholung der Analyse in Doppelbestimmung mit der unmethylierten Kontroll-DNA bestätigt werden kann. Die Ergebnisse beider Bestimmungen müssen für dieselbe Mutation Werte \geq LOD ausgeben und das Ergebnis für die Kontrollprobe muss „No mutation detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) lauten. Anderenfalls ist die Probe als „No mutation detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) einzustufen.

Ob ein erhöhter Hintergrund für eine Mutation vorliegt, lässt sich durch den Vergleich der im Handbuch angegebenen Werte für die Leerwertgrenze mit den mit der unmethylierten Kontroll-DNA ermittelten Messwerten feststellen. Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird, können ohne Wiederholung als „Mutation nicht nachgewiesen“ eingestuft werden, wenn die gemessene Häufigkeit für die unmethylierte Kontroll-DNA über der im Handbuch angegebenen Leerwertgrenze (LOB) für die betreffende Mutation liegt. Es gibt also drei verschiedene mögliche Szenarien, in denen potenzielle schwache Mutationen angegeben werden.

1. Die gemessene Häufigkeit bei der unmethylierten Kontroll-DNA liegt über der Leerwertgrenze für diese Mutation: Die Probe kann ohne Wiederholung als „Mutation nicht nachgewiesen“ eingestuft werden.
2. Das Ergebnis kann in Doppelbestimmung nicht reproduziert werden: Die Probe ist als „Mutation nicht nachgewiesen“ einzustufen.

3. Das Ergebnis wurde in Doppelbestimmung reproduziert und die Häufigkeit für die unmethylierte Kontroll-DNA lag für die betreffende Mutation unter der Leerwertgrenze (LOB): Mutation nachgewiesen.

Hinweis: Das Pyrogramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Die gemessenen Peaks sollten mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen. Die Pyrogramm-Diagramme sollten auf unerwartete Peaks geprüft werden. Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene oder unerwartete Mutationen zurückgeführt werden können, sollte die Probe erneut analysiert werden. Ein fehlgeschlagenes Ergebnis stellt keine Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus dar. Bei einem gültigen Mutationsergebnis geht eine Änderung der Peakhöhe stets mit einer entsprechenden Änderung der Höhe eines anderen Peaks einher. Eine Änderung in der Höhe eines einzelnen Peaks sollte nicht als Hinweis auf eine Mutation betrachtet werden.

Hinweis: Wir empfehlen, für die Interpretation der Ergebnisse den RAS Extension Plug-in Report zu verwenden. Für eine Untersuchung von Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wurde, empfehlen wir, die Probe in der Anwendungssoftware zusätzlich manuell zu analysieren (z. B. zum Vergleich mit der Mutationshäufigkeit der Kontrollprobe).

Hinweis: Eine Therapieentscheidung für Krebspatienten darf nicht ausschließlich auf Grundlage des KRAS- und NRAS-Mutationsstatus getroffen werden.

Tabelle 9. Leerwertgrenze (LOB) und Nachweisgrenze (LOD) für bestimmte Mutationen

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

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

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic verfügbar ist.

† Niedrigster Mutationsgrad in einer Probe, der eine gemessene Häufigkeit \geq LOD ergibt.

Repräsentative Ergebnisse

Die Abbildung 8 bis Abbildung 15 zeigen repräsentative Pyrogramm-Ergebnisse.

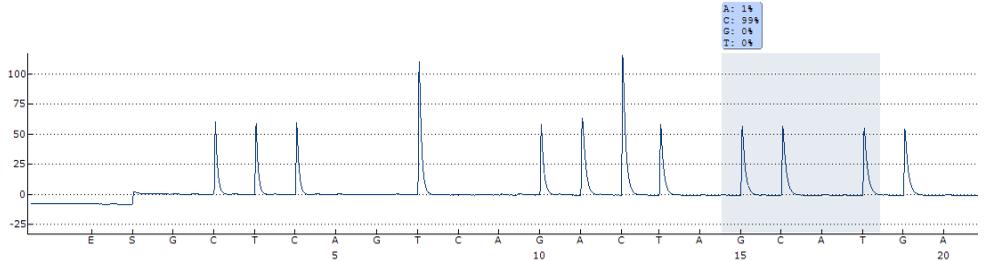


Abbildung 8. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem KRAS 59/61 Assay analysiert wurde.

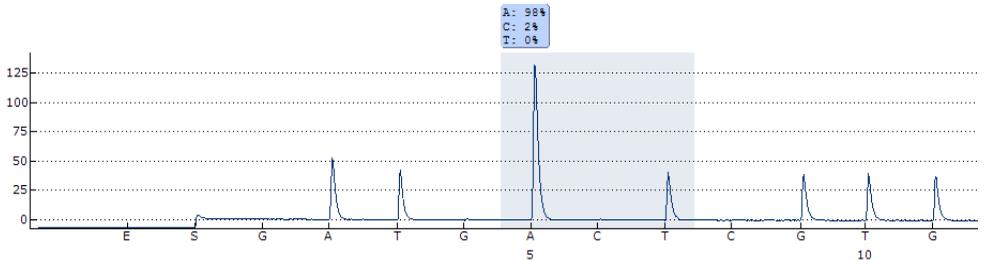


Abbildung 9. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem KRAS 117 Assay analysiert wurde.

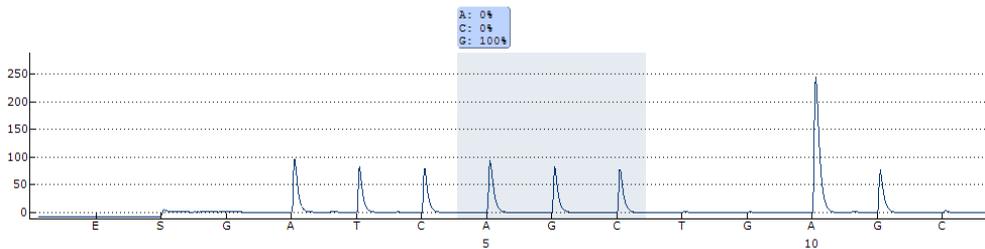


Abbildung 10. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem KRAS 146 Assay analysiert wurde.

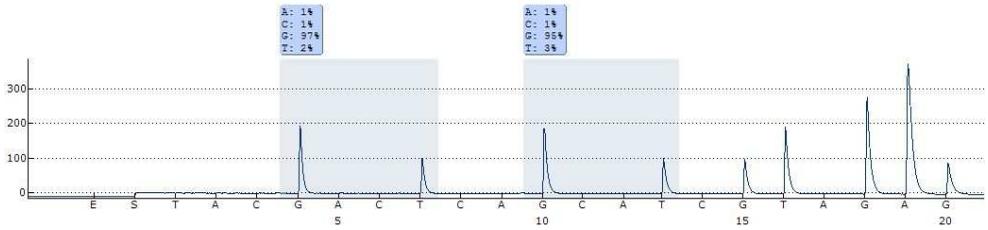


Abbildung 11. Pyrogram einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem NRAS 12/13 Assay analysiert wurde.

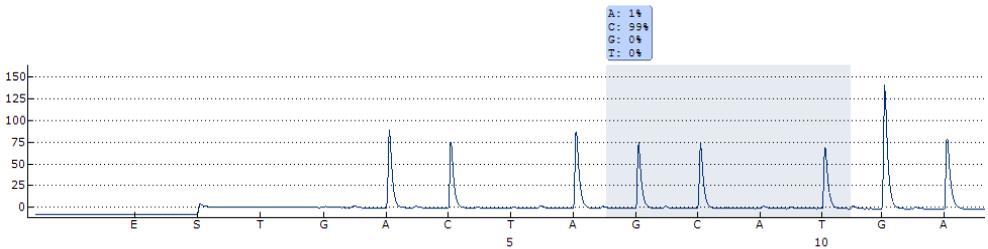


Abbildung 12. Pyrogram einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem NRAS 59 Assay analysiert wurde.

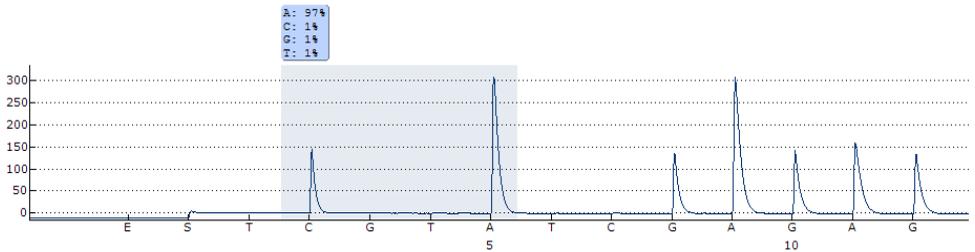


Abbildung 13. Pyrogram einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem NRAS 61 Assay analysiert wurde.

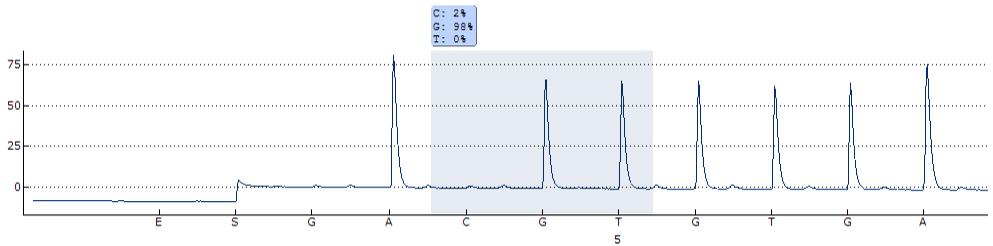


Abbildung 14. Pyrogram einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem NRAS 117 Assay analysiert wurde.

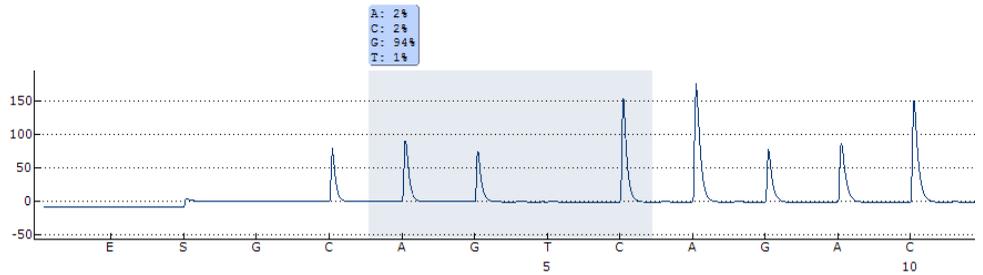


Abbildung 15. Pyrogram einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp, die mit dem NRAS 146 Assay analysiert wurde.

Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen) unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus steht Ihnen unser QIAGEN Technischer Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch haben sollten (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com). Das Team besteht aus erfahrenen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Comments and suggestions

Ergebnis „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen)

- a) Geringe Peakhöhe
- Fehler bei der PCR-Konfiguration oder Probenvorbereitung vor der Pyrosequenzierung können zu niedrigen Peaks führen.
- Die Proben müssen unbedingt komplett vom Vakuum-Saugkopf aufgenommen werden. Achten Sie darauf, dass der Vakuum-Saugkopf langsam in die Proben eingetaucht wird und dass die Anordnung der zur Immobilisierung verwendeten PCR-Platten oder -Streifen die vollständige Aufnahme der Proben zulässt.
- Führen Sie wie im *PyroMark Q24 User Manual* beschrieben regelmäßige Funktionsprüfungen der Filternadeln durch, und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus.
- Wenn die Warnung „Check“ (Überprüfen) angezeigt wird, vergleichen Sie das Pyrogramm mit dem Histogramm, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Wenn die gemessenen Peaks mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen, ist das Ergebnis gültig. Anderenfalls wird empfohlen, die Probe erneut zu analysieren.
- b) Mutation in „Sequence to Analyze“ nicht definiert
- Ändern Sie die Auswahl für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) in der Assay-Konfiguration (siehe „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays“ auf Seite 165 und wiederholen Sie die Analyse des Laufs. Mutationen, die nicht von den unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) eingestellten Sequenzen abgedeckt werden, können mit dem Mustersimulations-Tool identifiziert werden.

Comments and suggestions

-
- | | | |
|----|---|---|
| c) | Unerwartete seltene Mutation | Die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) kann durch ein unerwartetes Peakmuster verursacht werden. Dies weist möglicherweise auf eine unerwartete Mutation hin, die mit der Einstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) nicht analysiert wird. Diese Proben sollten mit der alternativen Einstellung unter „Sequence to Analyze“ analysiert werden, bei der unerwartete Mutationen berücksichtigt werden. Mutationen, die nicht von den unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) eingestellten Sequenzen abgedeckt werden, können mit dem Mustersimulations-Tool identifiziert werden. |
| d) | Warnung über hohe Peakhöhenabweichung für eine Verteilung | Das Pyrogramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene Mutationen zurückgeführt werden können, sollte die Probe erneut analysiert werden. |

Hoher Hintergrund

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Falsche Lagerung der Nukleotide | Bewahren Sie Nukleotide bei 2 bis 8 °C auf. Eine Lagerung bei –15 bis –25 °C kann zu einem erhöhten Hintergrund führen. |
| b) | Kurze Abkühlzeit der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse | Bewahren Sie die Proben 10 bis 15 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem PyroMark Q24 Plattenhalter auf. Die Abkühlzeit darf nicht verkürzt werden. |
| c) | Kontamination der Kartusche | Reinigen Sie die Kartusche gründlich wie im Produktblatt beschrieben. Bewahren Sie die Kartusche an einem vor Licht und Staub geschützten Ort auf. |

Keine Signale in der Positivkontrolle (unmethylierte Kontroll-DNA)

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Unzureichendes Enzym- oder Substratgemisch in allen Wells | Stellen Sie sicher, dass die PyroMark Q24 Kartusche gemäß den Angaben unter „Pre Run Information“ (Informationen vor dem Lauf) im Menü „Tools“ (Extras) beladen wird. |
| b) | Falsche Lagerung oder Verdünnung von Reagenzien | Bereiten Sie die Reagenzien gemäß den Anweisungen unter „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 15 und „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 32 vor. |
| c) | Fehler bei der PCR oder Probenvorbereitung | Reinigen Sie die Kartusche gründlich wie im Produktblatt beschrieben. Bewahren Sie die Kartusche an einem vor Licht und Staub geschützten Ort auf. |

Qualitätskontrolle

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

Anwendungseinschränkungen

Der Test ist für den Nachweis von 37 Mutationen im KRAS- bzw. NRAS-Gen bestimmt. Proben, für die das Ergebnis „Keine Mutation nachgewiesen“ angegeben wird, können KRAS- oder NRAS-Mutationen enthalten, die vom Assay nicht erkannt werden.

Ob Mutationen nachgewiesen werden, hängt von der Qualität der Proben und der Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe ab.

Das *therascreen* RAS Extension Pyro Kit wird im Rahmen eines PCR-Verfahrens (PCR, Polymerase Chain Reaction) eingesetzt. Wie bei allen PCR-Verfahren können Proben durch externe DNA-Quellen in der Umgebung und DNA aus der Positivkontrolle kontaminiert werden. Beachten Sie daher bei der Arbeit alle Vorsichtsmaßnahmen, um eine Kontamination der Proben und Reaktionsgemisch-Reagenzien zu vermeiden.

Alle diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

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

Leerwertgrenze und Nachweisgrenze

Die Leerwertgrenze (LOB: Limit of Blank) und die Nachweisgrenze (LOD: Limit of Detection) wurden für eine Reihe von Mutationen unter Verwendung von Plasmidgemischen bestimmt (siehe Tabelle 10). Die Bestimmung der Leerwert- und der Nachweisgrenze erfolgte gemäß den Empfehlungen der *CLSI-Richtlinie EP17-A „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline“* (NRAS-Codons 12, 13, 61 und KRAS-Codon 61) und *EP17-A2 „Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition“* (alle anderen Codons; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute). α - und β -Fehler (falsch-positive bzw. falsch-negative) waren dabei auf 5 % eingestellt. Die Leerwertgrenze entspricht der Häufigkeit, die mit einer Wildtyp-Probe ermittelt wurde. Die Nachweisgrenze entspricht dem niedrigsten Signal (gemessene Häufigkeit), das für die jeweilige Mutation als positiv eingestuft werden kann.

Tabelle 10. Leerwertgrenze (LOB) und Nachweisgrenze (LOD) für bestimmte Mutationen

Nucleic acid substitution	Amino acid substitution	LOB (% units)	LOD (% units)	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

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

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic verfügbar ist.

† Niedrigster Mutationsgrad in einer Probe, der eine gemessene Häufigkeit \geq LOD ergibt.

Mutationen GGT > TGT und GGT > GTT in NRAS-Codon 13

Die Leerwertmessungen (LOB) lagen für diese Mutationen meist bei 0 Prozenteinheiten, was zu einer nicht-Gaußschen Verteilung führte. Die Nachweisgrenze (LOD) wurde daher gemäß den Angaben in der CLSI-Richtlinie EP17-A anhand einer anderen Methode bestimmt: Das niedrigste Signal, das das Vorliegen einer Mutation an diesen Positionen anzeigt (Nachweisgrenze), war auf 2 Prozenteinheiten über dem jeweiligen Grundlinienniveau eingestellt, welches durch das 95. Perzentil der Leerwertmessungen definiert wurde. Bei der Analyse einer Probe mit dem in Tabelle 9 in Klammern angegebenen Mutationsgrad

ergaben 95 % der Ergebnisse (n = 72) ein Signal, das als positiv eingestuft werden kann (≥ Nachweisgrenze). Weitere Informationen zu den Leerwert-/Nachweisgrenzen finden Sie in Tabelle 10.

Hinweis: PCR- und Pyrosequenzierungs-Primer für die NRAS-Codons 12, 13 und 61 wurden ohne Änderungen vom *therascreen* NRAS Pyro Kit (Katalog-Nr. 971530) übernommen. Die Leistungsdaten für diese NRAS-Codons sind unverändert.

Linearität

Die Linearität wurde unter Verwendung von Plasmidgemischen aus dem Wildtyp oder der mutierten Sequenz für die Mutationen 176C>G in KRAS-Codon 59, 351A>T in KRAS-Codon 117, 436G>C in KRAS-Codon 146, 34G>A in NRAS-Codon 12, 37G>A in NRAS-Codon 13, 175G>A in NRAS-Codon 59, 182A>G in NRAS-Codon 61, 351G>C in NRAS-Codon 117 und 437C>T in NRAS-Codon 146 bestimmt. Die Plasmide wurden in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt, um 4 Mutationsgrade (5, 10, 30 und 50 %) zu erhalten. Jedes Gemisch wurde mit drei verschiedenen Chargen des *therascreen* RAS Extension Pyro Kits in 3 Pyrosequenzierungs-Läufen mit jeweils 3 Replikaten analysiert.

Die Ergebnisse (n = 9 für jeden Mutationsgrad) wurden unter Verwendung der Analyse-it® Software v2.21 gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A2 „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline“ analysiert. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Die Ergebnisse waren bei einer zulässigen Nichtlinearität von 5 Prozenteinheiten über den getesteten Mutationsgradbereich von 5 bis 50 % linear. Für alle mit dem Kit nachweisbaren Mutationen in den KRAS-Codons 59, 117, 146 und NRAS-Codons 12, 13, 59, 61, 117 und 146 wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

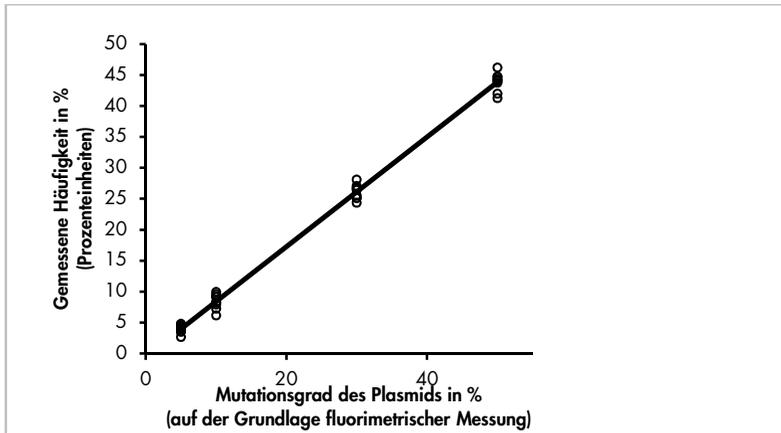


Abbildung 16. Linearität der Mutation 176C>G in KRAS-Codon 59.

Für alle hier nachweisbaren Mutationen in den KRAS-Codons 59, 117, 146 und NRAS-Codons 12, 13, 59, 61, 117 und 146 wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Präzision

Die Präzisionsdaten ermöglichen die Bestimmung der Gesamtvariabilität der Assays und wurden durch die Analyse der oben beschriebenen Plasmidgemische mit jeweils drei Replikaten mit drei verschiedenen Mutationsgraden erhalten.

Die Wiederholbarkeit (Intra-Assay- und Inter-Chargen-Variabilität) wurde auf der Grundlage der Daten berechnet, die für die Bestimmung der Linearität verwendet wurden (drei Läufe an demselben Tag unter Verwendung verschiedener Chargen des *therascreen* RAS Extension Pyro Kits). Die Laborpräzision (Intra-Labor-Variabilität) wurde an 3 verschiedenen Tagen in 3 Läufen in einem Labor mit verschiedenen Bedienern, PyroMark Q24 Geräten und *therascreen* RAS Extension Pyro Kits bestimmt. Die Reproduzierbarkeit (Inter-Labor-Variabilität) wurde von jeweils 2 Läufen in zwei unabhängigen Laboren und unter Verwendung verschiedener Chargen des *therascreen* RAS Extension Pyro Kits berechnet.

Die Präzisionsergebnisse werden in Standardabweichungen der gemessenen Mutationshäufigkeiten in Prozenteinheiten angegeben (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11. Präzision der Mutationen*

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

Mutationsgrad des Plasmids in % [†]	Wiederholbarkeit		Laborpräzision		Reproduzierbarkeit	
	Mittel	SD	Mittel	SD	Mittel	SD
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4
182A>G in NRAS codon 61						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
351G>C in NRAS codon 117						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
437C>T in NRAS codon 146						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

* Alle Werte sind in Prozenteinheiten angegeben. SD: Standardabweichung (n = 9 für Wiederholbarkeit und Laborpräzision, n = 12 für Reproduzierbarkeit).

† Auf der Grundlage fluorimetrischer Messungen; für 34G>A in NRAS-Codon 12 auf der Basis von OD₂₆₀.

Bewertung der diagnostischen Leistung

Der *therascreen* RAS Extension Pyro Kit wurde in 2 verschiedenen Studien im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung bewertet.

In einer ersten vorherigen Studie wurde der *therascreen* NRAS Pyro Kit im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung bewertet. Es wurde DNA aus 100 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Tumorproben des Knochenmarks extrahiert und auf Mutationen in den Codons 12/13 und Codon 61 analysiert.

Da die Assays für die NRAS-Codons 12/13 und 61 aus dem *therascreen* NRAS Pyro Kit unverändert in den *therascreen* RAS Extension Pyro Kit übernommen wurden, werden die Ergebnisse der Bewertung des *therascreen* NRAS Pyro Kits dargestellt.

In der zweiten Studie wurde DNA aus 110 formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) mCRC-Tumorproben extrahiert und auf Mutationen in den Codons 59, 61, 117 und 146 des humanen KRAS-Gens und in den Codons 59, 117 und 146 des humanen NRAS-Gens analysiert. Mit einer niedrigen Häufigkeit auftretende Mutationen wurden unter Verwendung von Plasmid-DNA analysiert, die mit Wildtyp-DNA aus FFPE-Proben versetzt wurde.

Die DNA wurde in beiden Studien mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit isoliert und dann mit den Assays aus dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit auf dem PyroMark Q24 System analysiert. Die Sanger-Sequenzierung wurde mit dem Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer durchgeführt.

Bewertung der NRAS-Codons 12, 13 und 61

Von den 100 Proben, die mittels Sanger-Sequenzierung analysiert wurden, konnte der Mutationsstatus sowohl für Codon 12/13 als auch für Codon 61 in 97 Proben bestimmt werden. In 4 der 100 Proben wurde mittels Sanger-Sequenzierung eine Mutation in Codon 12 oder Codon 13 nachgewiesen.

Der Mutationsstatus wurde in 2 der 100 Proben mit dem *therascreen* NRAS Pyro Kit reproduziert und es wurde keine Mutation nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12. zusammengefasst. In Codon 61 wurden keine Mutationen nachgewiesen.

Mit Ausnahme der Proben, die mit einer oder beiden Methoden fehlschlugen, betrug die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen dem *therascreen* NRAS Pyro Kit und der Sanger-Sequenzierung für die Codons 12/13 98 % und für Codon 61 100 % (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12. Ergebnisse der analysierten Proben für die NRAS-Codons 12, 13 und 61

		Sanger-Sequenzierung				Unbekannt
		Mutation in Codon 12/13	Mutation in Codon 61	Wildtyp	Unbekannt	
therascreen NRAS Pyro Kit	Mutation in Codon 12/13	2	–	–	–	2
	Mutation in Codon 61	–	–	–	–	–
	Wildtyp	2	–	90	3	95
	Unbekannt	–	–	3	–	3
	Gesamt	4	–	93	3	100

Bewertung der KRAS-Codons 59, 61, 117, 146 und NRAS-Codons 59, 117, 146

Es wurde DNA aus 110 formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) mCRC-Tumorproben extrahiert und auf Mutationen in den Codons 59, 61, 117 und 146 des humanen KRAS-Gens und in den Codons 59, 117 und 146 des humanen NRAS-Gens analysiert. Aufgrund der zu erwartenden geringen Häufigkeit in klinischen Proben wurden alle vom *therascreen* RAS Extension Kit nachweisbaren Mutationen in 56 zusätzlichen Proben unter Verwendung von Plasmid-DNA analysiert, die mit Wildtyp-DNA aus FFPE-Proben versetzt wurde. Es wurden alle Mutationen sowohl mit Pyrosequenzierung als auch mit Sanger-Sequenzierung nachgewiesen.

Von den insgesamt 166 analysierten Proben wurden bei 137 Proben (83 %) übereinstimmende Ergebnisse zwischen dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit und Sanger-Sequenzierung gefunden.

Die Fälle, in denen keine Übereinstimmung gefunden wurde, lassen sich durch die folgenden Faktoren erklären.

Bei 20 Proben schlug die Sanger-Sequenzierung für NRAS-Codon 59 aufgrund des hohen Hintergrunds fehl.

In 1 Probe konnte die Mutation in KRAS-Codon 59 und in 3 Proben die Mutation in KRAS-Codon 61 mittels Sanger-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Für alle 4 Mutationen wurde mittels Pyrosequenzierung eine niedrige Häufigkeit nachgewiesen (7,5 bis 13,1 %). Dies lässt sich auf die geringere Sensitivität der Sanger-Sequenzierung (15 bis 20 %) im Vergleich zur Pyrosequenzierung (5 %) zurückführen (2). Alle anderen gültigen Proben waren für beide Verfahren vom Wildtyp.

Eine Probe wurde mittels Pyrosequenzierung als unbekannt bewertet, da eine doppelte Mutation nachgewiesen wurde (KRAS 59–61).

Bei 4 mit Plasmid-DNA versetzten Proben wurde eine weitere A>G-Mutation an Position 350 der KRAS-Codierungssequenz nachgewiesen, die vom *therascreen* RAS Extension Pyro Kit nicht unterstützt wird. Die Mutationen wurden bei der manuellen Analyse nachgewiesen.

Tabelle 13. Ergebnisse der analysierten Proben für die KRAS-Codons 59, 61, 117, 146 und NRAS-Codons 59, 117, 146

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

WT: Wildtyp

- ^a Mit KRAS versetzte Proben, in denen Mutationen sowohl in KRAS-Codon 117 als auch in Codon 146 nachgewiesen wurden.
- ^b Mit NRAS versetzte Proben, in den Mutationen in den NRAS-Codons 59, 117 und 146 nachgewiesen wurden.
- * In einer Probe wurde zwar die Mutation in KRAS-Codon 146 nachgewiesen, das Ergebnis für NRAS-Codon 117 war jedoch ungültig

Die Sensitivität und Spezifität der Assays sind nach Codon in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14. Sensitivität und Spezifität für die KRAS-Codons 59, 61, 117, 146 und NRAS-Codons 59, 117, 146 Assays

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

Hinweis: Das Signal betrug in allen Läufen, die zur Bestimmung der Leistungsmerkmale durchgeführt wurden, über 30 RLU. Dazu wurden 10 ng DNA zugrunde gelegt, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe isoliert wurden. Die Pyrosequenzierungsdaten wurden mit dem RAS Extension Plug-in Report für die KRAS-Codons 59, 117 146 und NRAS-Codons 59, 117 und 146 analysiert.

Literatur

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023.
2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

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
	
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanleitung beachten

Symbol

Bedeutung des Symbols



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).

Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays

Ist der RAS Extension Plug-in Report bereits installiert, sind in der Navigationsansicht der PyroMark Q24 Software vordefinierte Assay-Konfigurationen für die KRAS-Codons 59/61, 117 und 146 und NRAS-Codons 12/13, 59, 61, 117 und 146 verfügbar. Der Pfad lautet „Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension“. Die folgenden Schritte müssen in diesem Fall nicht durchgeführt werden.

Der RAS Extension Plug-in Report kann von der entsprechenden Katalogseite auf **www.qiagen.com** auf der Registerkarte „Product Resources“ im Abschnitt „Protocol Files“ heruntergeladen werden.

Wir empfehlen, den RAS Extension Plug-in Report der manuellen Analyse vorzuziehen.

Die korrekte Funktionsweise des Plug-ins sollte sowohl nach der Installation des Plug-ins selbst als auch nach jeder Installation einer neuen Software oder Aktualisierung einer Software auf dem Computer gemäß dem RAS Extension Plug-In Quick Guide überprüft werden.

Falls der RAS Extension Plug-in Report nicht installiert ist, muss die Assay-Datei vor der ersten Durchführung des *therascreen* RAS Extension Pyro Assays manuell konfiguriert werden. Konfigurieren Sie den Assay für die KRAS-Codons 59/61, 117 und 146 und NRAS-Codons 12, 13, 59, 61, 117 und 146 wie nachfolgend beschrieben mit der PyroMark Q24 Software.

Verfahren

1. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und wählen Sie „New AQ Assay“ (Neuer AQ-Assay).

2. Die Sequenzen unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) sind für alle acht RAS Extension Pyro Assays in Tabelle 15 zusammengefasst. Geben Sie in das Feld
3. „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) die assay-spezifische Sequenz ein. Die Sequenz kann nach dem Lauf auch geändert werden, um Mutationen an anderen Positionen nachzuweisen (siehe „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 34).
4. Um zu prüfen, ob in anderen Nukleotiden Mutationen vorliegen, ändern Sie wie in Tabelle 15 angegeben die Sequenz unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz). Die Sequenz unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) kann nach dem Lauf geändert werden (sofern sie nicht gesperrt ist).

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass der Schwellenwert für die einzelne Peakhöhe auf 30 RLU eingestellt ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der A-Peak-Reduktionsfaktor auf 0,86 für die Analyse von NRAS-Codon 61 gesetzt ist.

5. Geben Sie unter „Dispensation Order“ manuell die assay-spezifische Verteilungsreihenfolge aus Tabelle 15 ein.

Hinweis: Drücken Sie nicht auf die Taste „Generate Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge erstellen). Die Werte sowohl für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) als auch für „Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge) müssen manuell eingegeben werden.

6. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Parameters“ (Analyseparameter) und erhöhen Sie den Wert für „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality“ (Peakhöhen-Schwellenwert – Erforderliche Peakhöhe für bestandene Qualität) auf 30.
7. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und speichern Sie den Assay unter „KRAS 59/61“, „KRAS 117“, „KRAS 146“, „NRAS 12/13“, „NRAS 59“, „NRAS 61“, „NRAS 117“ oder „NRAS 146“.

Tabelle 15. Assay-Setup: Werte für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) und „Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge) für die acht Assays des *therascreen* RAS Extension Pyro Kits

<i>therascreen</i> RAS Extension assay	Zu analysierende Sequenz	Verteilungsreihenfolge
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Tabelle 16. Häufige mit dem *therascreen* RAS Extension Pyro Kit nachgewiesene Mutationen im humanen KRAS-Gen mit der entsprechenden Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz)

Nukleinsäuresubstitution	Aminosäuresubstitution	Zu analysierende Sequenz	COSMIC-ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS codon 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
KRAS codon 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS codon 146 (GCA)			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404

Nukleinsäuresubstitution	Aminosäuresubstitution	Zu analysierende Sequenz	COSMIC-ID* (V70)
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ verfügbar ist.

Tabelle 17. Häufige mit dem theascreen RAS Extension Pyro Kit nachgewiesene Mutationen im humanen NRAS-Gen mit der entsprechenden Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz)

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

Nukleinsäuresubstitution	Aminosäuresubstitution	Zu analysierende Sequenz	COSMIC-ID* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS codon 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ verfügbar ist.

Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs



WARNUNG

Gefährliche Chemikalien

Die für die Vakuum-Arbeitsstation verwendete Denaturierungs-lösung enthält Natriumhydroxid, das die Augen und die Haut reizt.

Tragen Sie stets Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel.

Die verantwortliche Person (z. B. der Laborleiter) muss alle erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen ergreifen, um sicherzustellen, dass der Arbeitsbereich sicher ist. Die Bediener der Geräte dürfen keinen toxischen (chemischen oder biologischen) Stoffen ausgesetzt sein, die die in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern oder in den OSHA-*, ACGIH-† oder COSHH-‡ Dokumenten festgelegten Grenzwerte überschreiten.

Bei der Abführung von Dämpfen und der Entsorgung von Abfällen müssen alle geltenden nationalen und regionalen Sicherheitsvorschriften und Gesetze eingehalten werden.

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Vereinigte Staaten von Amerika)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Vereinigte Staaten von Amerika)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Vereinigtes Königreich)

Stellen Sie sicher, dass bei der Entsorgung von Laborabfällen alle geltenden nationalen und regionalen Umweltauflagen eingehalten werden.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Für dieses Protokoll wird hochreines Wasser benötigt.

Verfahren

1. Stellen Sie sicher, dass am Vakuum-Saugkopf kein Unterdruck anliegt. Stellen Sie sicher, dass der Vakuumschalter geschlossen („Off“) und die Vakuumpumpe ausgeschaltet ist.
2. Entsorgen Sie alle in den Reservoirs verbliebenen Reste an Lösungen.
3. Spülen Sie die Reservoirs mit hochreinem Wasser aus oder ersetzen Sie sie, falls erforderlich.
4. Entleeren Sie den Abfallbehälter.
5. Der Deckel kann abgenommen werden, ohne vorher die Schlauchverbindungen zu trennen.

Falls die Vakuum-Arbeitsstation gereinigt werden muss (z. B. von Staub oder verschütteter Flüssigkeit), gehen Sie bitte nach den Anweisungen im *PyroMark Q24 User Manual* vor.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Sequenzierungs-Primer, PCR-Primer, unmethylierte Kontroll-DNA, PyroMark PCR-Master-Mix, CoralLoad-Konzentrat, Puffer und Reagenzien	971590
PyroMark Q24 MDx	Plattform für die sequenzbasierte Detektion zur Pyrosequenzierung von 24 Proben gleichzeitig	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuum-Arbeitsstation zur Verarbeitung von 24 Proben gleichzeitig, vom PCR-Produkt bis hin zum Einzelstrang-Template	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Analysesoftware	9019063
Zubehör		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatten mit 24 Wells für die Sequenzierung	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartuschen zur Dispensierung von Nukleotiden und Reagenzien	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Wiederverwendbare Filternadeln für die PyroMark Vakuum-Arbeitsstation Q96 und Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Zur Überprüfung der Systeminstallation	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Zur Bestätigung der Systemleistung	979304

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Verwandte Produkte		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp MinElute®-Säulen, Proteinase K, Puffer, Probensammelröhrchen (2 ml)	56404

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. Diese stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor angefordert werden.

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

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender 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 Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Mai-16 HB-1882.002 © 2016 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

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