

***therascreen*[®] BRAF Pyro[®] Kit** **Handbuch**



Version 2



In-vitro-Diagnostikum



971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,
DEUTSCHLAND

R2



1074213DE



QIAGEN Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in biologischen Proben. Unsere fortschrittlichen und qualitativ hochwertigen Produkte und Leistungen sind ein Garant für Erfolg – von der Probenvorbereitung bis hin zum Ergebnis.

QIAGEN setzt neue Maßstäbe in folgenden Bereichen:

- Reinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleinsäure- und Protein-Assays
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Arbeit zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie unter www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erklärung	4
Testprinzip	5
Mitgelieferte Materialien	7
Kit-Inhalt	7
Zusätzlich benötigtes Material	9
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	11
Sicherheitshinweise	11
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	13
Lagerung und Handhabung der Proben	13
Verfahren	14
DNA-Isolierung	14
■ Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System	15
■ Protokoll 2: PCR unter Verwendung der Reagenzien des <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kits	18
■ Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads	21
■ Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24	23
■ Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System	28
■ Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs	31
Interpretation der Ergebnisse	34
Interpretation der Analyseergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen	34
Fehlerbehebung	38
Qualitätskontrolle	42
Anwendungseinschränkungen	42
Leistungsmerkmale	43
Literatur	48
Symbole	49
Kontakt	49
Anhang A: Konfigurieren von <i>therascreen</i> BRAF Pyro Assays	50
Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs	53
Bestellinformationen	55

Verwendungszweck

Der *therascreen* BRAF Pyro Kit ist ein Nukleinsäuresequenz-basierter In-vitro-Nachweistest, der auf Pyrosequencing[®] beruht und zum quantitativen Nachweis von Mutationen in den Codons 600 und 464 bis 469 des humanen BRAF-Gens in genomischer DNA aus humanen Gewebeproben dient.

Die mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit ermittelten Informationen sollen Ärzten bei der Auswahl von Krebspatienten helfen, die wahrscheinlich auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen. Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Nur zur Verwendung mit dem PyroMark[®] Q24 System bestimmt. Das PyroMark Q24 System umfasst folgende Komponenten:

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

Das Produkt darf nur von Fachpersonal wie z. B. technischen Angestellten 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* BRAF Pyro Kit dient zum quantitativen Nachweis von Mutationen in Codon 600 von Exon 15 und den Codons 464 bis 469 von Exon 11 des humanen BRAF-Gens (siehe Abbildung 1).

Exon 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA G T G AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
Exon 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCTGAT GGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT GGA TCT GGA TCATTT GGA ACA GTCTACAAGGGAAAGTGGCATG

Abbildung 1. Genomischer Kontext der sequenzierten Regionen des humanen BRAF-Gens (Ensembl-ID ENSG00000157764). Die Codons 600, 464, 466 und 469 sind durch Umrahmungen gekennzeichnet.

Der Kit umfasst zwei Assays: einen Assay zum Nachweis von Mutationen im Codon 600 und einen weiteren Assay zum Nachweis von Mutationen in den Codons 464 bis 469 (Abbildung 2). Die beiden Regionen werden mittels PCR separat amplifiziert und über die definierte Region sequenziert. Die Sequenzen

um die definierten Positionen herum dienen bei der Quantifizierung und Qualitätsbewertung der Analyse als Normalisierungs- und Referenz-Peaks.

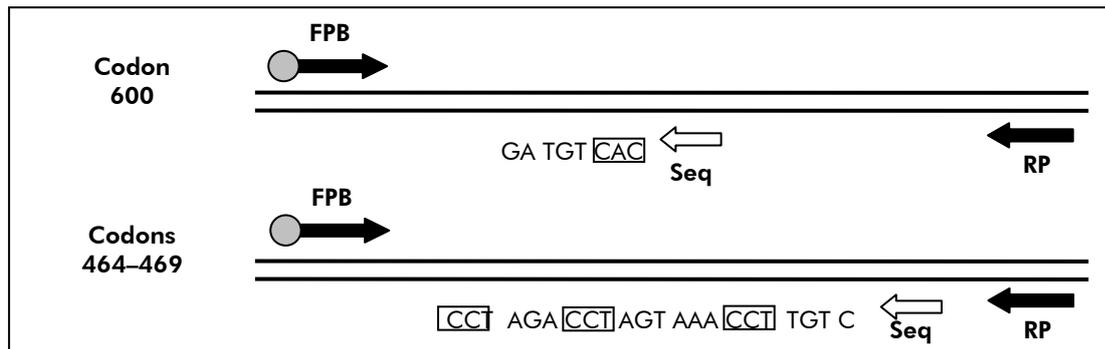


Abbildung 2. Schematische Darstellung des BRAF-Assays. Bei der dargestellten Sequenz handelt es sich um die Sequenz, die in einer Wildtyp-Probe analysiert wurde. **FPB**: Forward-PCR-Primer (B steht für Biotinylierung); **RP**: Reverse-PCR-Primer; **Seq**: Sequenzierungs-Primer.

Beide Assays werden rückwärts sequenziert.

Das Produkt enthält für jeden Assay ein PCR-Primer-Gemisch und einen Sequenzierungs-Primer. Die Primer werden in Lösung ausgeliefert. Jedes Fläschchen enthält 24 µl des jeweiligen Primers oder Primer-Gemisches.

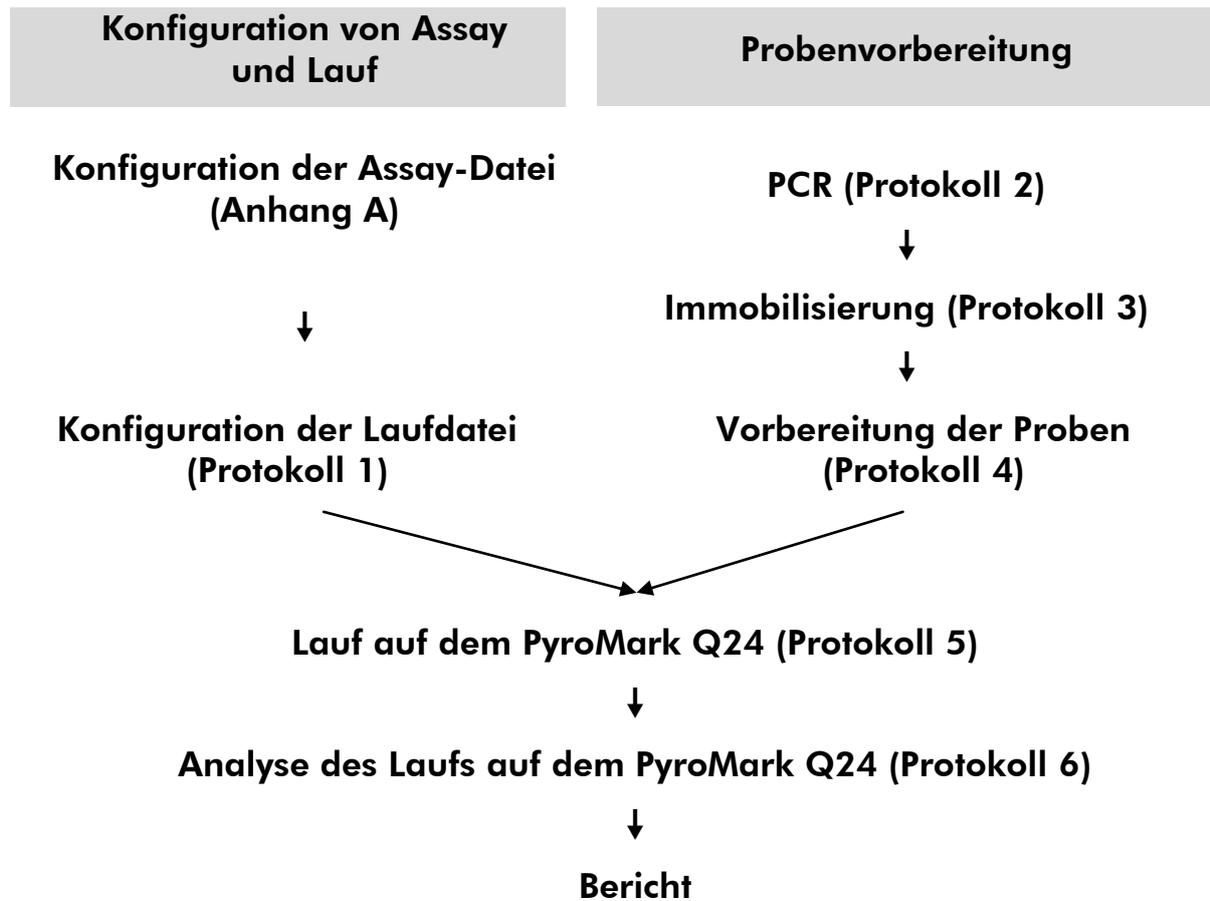
Testprinzip

Im Arbeitsablauf auf Seite 6 wird das Assay-Verfahren veranschaulicht. Nach der PCR mit Primern für das Codon 600 und die Codons 464 bis 469 werden die Amplifikate auf Streptavidin Sepharose® High Performance Beads immobilisiert. Einzelstrang-DNA wird hergestellt und die zugehörigen Sequenzierungs-Primer werden mit der DNA hybridisiert (Annealing). Anschließend werden die Proben auf dem PyroMark Q24 analysiert, und zwar unter Verwendung einer Laufkonfigurationsdatei und einer Laufdatei.

Zur Analyse des Laufs sollte der BRAF Plug-in Report verwendet werden. Der BRAF Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden. Der Lauf kann jedoch auch mit Hilfe des im PyroMark Q24 System integrierten Analyse-Tools analysiert werden. Die Einstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) kann für den Nachweis seltener Mutationen nach dem Lauf angepasst werden (siehe „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 31).

Hinweis: Der Arbeitsablauf wurde im Vergleich zur vorherigen Version des *therascreen BRAF Pyro Kit Handbuchs* (Version 1, Juli 2011) geringfügig verändert. Weitere Informationen finden Sie unter „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 21, „Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24“ auf Seite 23 und „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 31.

Arbeitsablauf des *therascreen* BRAF Pyro Verfahrens



Kontrollen

Dem Kit liegt unmethylierte Kontroll-DNA als Positivkontrolle für PCR- und Sequenzierungs-Reaktionen bei. Diese Kontroll-DNA weist in den Regionen, die mit diesem Kit sequenziert werden, einen Wildtyp-Genotyp auf und wird für die Interpretation der Ergebnisse und die Identifizierung schwacher Mutationen benötigt (siehe „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 34). Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA mit.

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

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

therascreen BRAF Pyro Kit (Packung 1/2)

<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	(24)
Katalog-Nr.	971470
Anzahl der Reaktionen	24
Seq Primer BRAF 600	24 μ l
Seq Primer BRAF 464–469	24 μ l
PCR Primer BRAF 600	24 μ l
PCR Primer BRAF 464–469	24 μ l
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 μ l
CoralLoad [®] Concentrate, 10x (CoralLoad [®] Konzentrat, 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/ μ l (Unmethylierte Kontroll-DNA, 10 ng/ μ l)	100 μ l

therascreen Puffer und Reagenzien (Packung 2/2)

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

* 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.

- Kit zur DNA-Isolierung (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 14)
- (Einstellbare) Pipetten*
- Sterile Pipettenspitzen (mit Filtern zur PCR-Einrichtung)
- Tisch-Mikrozentrifuge*
- Thermocycler* und entsprechende PCR-Röhrchen
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, Katalog-Nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (Katalog-Nr. 9001513 oder 9001514)*[†]
- PyroMark Q24 Software (Katalog-Nr. 9019063 oder 9019062)[†]
- PyroMark Q24 Platte (Katalog-Nr. 979301)[†]
- PyroMark Q24 Kartusche (Katalog-Nr. 979302)[†]
- PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation (Katalog-Nr. 9001515 oder 9001517)*[†]
- Plattenmischer* für die Immobilisierung auf Beads
- Heizblock* (bis 80 °C)
- PCR-Platten mit 24 Kavitäten oder Streifen
- Streifendeckel
- 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 %)[‡]

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

[†] 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.

[‡] Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe, wie z. B. Methanol oder Methylethylketon, enthält.

Empfohlene Plattenmischer

Zur Verwendung mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit werden die in Tabelle 1 dargestellten Plattenmischer empfohlen.

Tabelle 1. Plattenmischer, die zur Verwendung mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit empfohlen werden

Hersteller	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer comfort (Basic)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Empfohlene Platten mit 24 Kavitäten

Zur Verwendung mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit werden die in Tabelle 2 aufgeführten Platten mit 24 Kavitäten empfohlen.

Tabelle 2. Platten mit 24 Kavitäten, die zur Verwendung mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit empfohlen werden

Hersteller	Produkt	Katalognummer
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheitshinweise

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.

Die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise gelten für einzelne Komponenten des *therascreen* BRAF Pyro Kits.

PyroMark Denaturation Solution



Achtung! Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden. Nur im Originalbehälter aufbewahren. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

PyroMark Enzyme Mixture



Enthält: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Gefahr! Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI KONTAKT oder Beunruhigung: GIFTZENTRALE oder Arzt anrufen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

PyroMark Substrate Mixture



Enthält: acetic acid. Achtung! Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Hinweis: Achten Sie stets auf folgende Punkte:

- Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen im Benutzerhandbuch genau befolgt werden. Eine Verdünnung der Reagenzien, die von den in diesem Handbuch beschriebenen Anweisungen abweicht, ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt.
- Der Arbeitsablauf wurde im Vergleich zu Version R1 des *therascreen BRAF Pyro Kit Handbuchs* geringfügig verändert (siehe „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 21, „Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24“ auf Seite 23 und „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 31).
- Die Bestandteile dieses Produkts sind ausreichend für 24 Reaktionen in bis zu 5 unabhängigen Läufen.
- Verwenden Sie sterile Pipettenspitzen mit Filtern (zur PCR-Konfiguration).
- 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* BRAF Pyro Kit wird in zwei Packungen versandt. Der *therascreen* BRAF 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 -30 bis -15 °C gelagert werden.

Die *therascreen* Puffer und Reagenzien (Packung 2/2), wozu Puffer, Enzymgemisch, Substratgemisch, dATP α S, 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 -30 bis -15 °C gelagert werden. Gefrorene Reagenzien dürfen maximal 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Hinweis: Nukleotide dürfen nicht eingefroren werden.

Der *therascreen* BRAF Pyro Kit ist bei Aufbewahrung gemäß den hier genannten Lagerungsbedingungen bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Lagerung und Handhabung der Proben

Alle Proben müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden.

Das Probenmaterial besteht aus humaner DNA, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben extrahiert wurde.

Verfahren

DNA-Isolierung

Die Funktionalität des Systems wurde unter Verwendung des EZ1[®] DNA Tissue Kits und des QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kits zur Extraktion von humaner DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben getestet.

Die in Tabelle 3 aufgeführten QIAGEN[®] Kits werden zur Verwendung mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit für die Aufreinigung von DNA aus den aufgeführten Arten humaner Proben empfohlen. Die DNA-Reinigung ist gemäß den Anweisungen in den jeweiligen Kit-Handbüchern durchzuführen.

Tabelle 3. Kits zur DNA-Reinigung, die zur Verwendung mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit empfohlen werden

Probenmaterial	Kit zur Nukleinsäure-Isolierung	Katalognummer (QIAGEN)
In Paraffin eingebettetes Gewebe	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

* Befolgen Sie das Protokoll für die Verwendung von in Paraffin eingebettetem Gewebe. Der EZ1 DNA Tissue Kit muss in Verbindung mit der EZ1 Advanced (Katalog-Nr. 9001410 oder 9001411) und der EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (Katalog-Nr. 9018298), mit der EZ1 Advanced XL (Katalog-Nr. 9001492) und der EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (Katalog-Nr. 9018700) oder mit der BioRobot[®] EZ1 (Katalog-Nr. 9000705, nicht mehr erhältlich) und der EZ1 DNA Paraffin Section Card (Katalog-Nr. 9015862) verwendet werden.

Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Bei Bedarf kann die Leerwertgrenze (LOB) dadurch bestätigt werden, dass die Ergebnisse einer vollständigen Platte mit einer Wildtyp-Probe bestimmt werden. Detaillierte Informationen hierzu finden Sie in der CLSI-Richtlinie EP17-A „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline“.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Falls der BRAF Plug-in Report nicht installiert ist, konfigurieren Sie den Assay manuell (siehe „Anhang A: Konfigurieren von *therascreen* BRAF Pyro Assays“ auf Seite 50). Dies darf vor der Durchführung des *therascreen* BRAF Pyro Assays nur einmal vorgenommen werden. Ist der BRAF Plug-in Report bereits installiert, sind in der Navigationsansicht der PyroMark Q24 Software unter dem Pfad „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ vordefinierte Assay-Konfigurationen verfügbar. Der BRAF Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden.

Verfahren

1. **Klicken Sie in der Symbolleiste auf .**

Eine neue Laufdatei wird erstellt.

2. **Geben Sie die Laufparameter ein (siehe „Laufparameter“ auf Seite 16).**
3. **Richten Sie die Platte ein, indem Sie den Kavitäten, die den zu analysierenden Proben entsprechen, Assays für das Codon 600 sowie für die Codons 464 bis 469 zuweisen.**

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

Hinweis: Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA mit (siehe „Kontrollen“ auf Seite 6).

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 Probenkonfiguration verwendet werden (siehe „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 21).

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 28.

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 Sie für den Lauf verwenden, die Gerätemethode aus. Weitere Informationen hierzu finden Sie in den beiliegenden Gebrauchsanweisungen der Produkte.
„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) und „Reagent ID“ (Reagenz-ID):	Optional: Geben Sie die Chargennummer des zu verwendenden <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kits ein. Diese ist auf dem Produktetikett angegeben. Hinweis: Wir empfehlen, sowohl die Reagenz-ID als auch die Kit-ID einzugeben, damit unerwartete Probleme mit Reagenzien besser 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 einer Kavität stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl:

- Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Kavität 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 die Kavität.

Die Kavitäten 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 Reagenzien des *therascreen* BRAF Pyro Kits

Dieses Protokoll dient zur PCR-Amplifikation einer Region, die Codon 600 enthält, und einer separaten PCR-Amplifikation einer Region, die die Codons 464 bis 469 enthält. Die Amplifikationen werden mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit durchgeführt.

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

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 Konzentrat, 10x	2,5
PCR-Primer BRAF-Codon 600 oder PCR-Primer BRAF-Codons 464–469	1,0
Wasser (im Lieferumfang enthalten)	4,0
Gesamtvolumen	20,0

3. 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.

4. 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 mit (siehe „Kontrollen“ auf Seite 6).

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

			Kommentare
Erste Aktivierung:	15 Minuten	95 °C	In diesem Heizschritt wird die HotStarTaq DNA-Polymerase aktiviert.
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 21 fort.

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 (GE Healthcare) 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.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Der Arbeitsablauf wurde im Vergleich zur vorherigen Version des *therascreen BRAF Pyro Kit Handbuchs* (Version 1, Juli 2011, Schritt 2) geringfügig verändert.

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 10 % mehr Master-Mix her als insgesamt für alle durchzuführenden Reaktionen benötigt wird.

Tabelle 7. Master-Mix zur DNA-Immobilisierung

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	1
PyroMark Bindungspuffer	40
Wasser (im Lieferumfang enthalten)	29
Gesamtvolumen	70

Hinweis: Dieses Protokoll ist für Streptavidin Sepharose High Performance mit Chargennummer 10057037 oder höher vorgesehen. Bei Verwendung von Streptavidin Sepharose High Performance Beads mit einer Chargennummer unter 10057037 muss das Volumen der Beads pro Probe auf 2 µl erhöht und das Wasservolumen entsprechend reduziert werden.

3. **Geben Sie 70 μ l des Master-Mix in die Kavitäten einer PCR-Platte mit 24 Kavitäten oder von Streifen (wie in der Laufkonfiguration festgelegt, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 15).**
4. **Geben Sie 10 μ l biotinyliertes PCR-Produkt aus Protokoll 2 in jede Kavität, die Master-Mix enthält (wie in der Laufkonfiguration festgelegt, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 15).**

Hinweis: Das Gesamtvolumen pro Kavität soll nach der Zugabe des Master-Mix und des PCR-Produkts 80 μ l betragen.

5. **Verschließen Sie die PCR-Platte (bzw. die Streifen) mit Streifen-deckeln.**

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass zwischen den Kavitäten 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.**

Hinweis: Bereiten Sie während dieses Vorgangs die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation für die Probenvorbereitung vor (siehe *PyroMark Q24 User Manual*).

7. **Fahren Sie anschließend direkt mit „Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24“ auf Seite 23 fort.**

Hinweis: Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Der Bindungsschritt an die Beads sollte möglichst direkt nach dem Schütteln erfolgen.

Wenn seit dem Schütteln der Platte (bzw. der Streifen) mehr als 1 Minute vergangen ist, schütteln Sie sie vor der Bindung an die Beads erneut 1 Minute lang.

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 2 verschiedenen Sequenzierungs-Primer hinzu. Gehen Sie dabei je nach Analyseregion (Codon 600 oder Codons 464 bis 469) nach dem in der Laufkonfiguration für die Platte festgelegten Schema vor (siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 15).
- Der Arbeitsablauf wurde im Vergleich zur vorherigen Version des *therascreen BRAF Pyro Kit Handbuchs* (Version 1, Juli 2011, Schritt 18) geringfügig verändert. Die Abkühlzeit der Proben nach dem Aufheizen auf 80 °C darf nicht verkürzt werden.
- Führen Sie wie im *PyroMark Q24 User Manual* beschrieben regelmäßige Funktionsprüfungen der Filternadeln durch und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Setzen Sie einen PyroMark Q24 Plattenhalter auf einen vorgeheizten Heizblock mit 80 °C zur Verwendung in Schritt 17. Lassen Sie einen zweiten PyroMark Q24 Plattenhalter bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) zur Verwendung in Schritt 18 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.

Verfahren

1. **Verdünnen Sie eine ausreichende Menge jedes Sequenzierungs-Primers (Seq.-Primer BRAF 600 oder Seq.-Primer BRAF 464–469) 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.

Tabelle 8. Beispiel zur Verdünnung der Sequenzierungs-Primer

Komponente	Volumen/ Reaktion (μl)	Volumen für 9 + 1 Reaktionen (μl)
Seq.-Primer BRAF 600 oder Seq.-Primer BRAF 464–469	0,8	8
PyroMark Annealing-Puffer	24,2	242
Gesamtvolumen	25	250

2. **Geben Sie 25 μl des verdünnten Sequenzierungs-Primers in jede Kavität der PyroMark Q24 Platte (gemäß der Laufkonfiguration, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 15).**

Hinweis: 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. **Stellen Sie die PCR-Platte (bzw. die Streifen) aus Protokoll 3 und die PyroMark Q24 Platte auf die Arbeitsfläche (siehe Abbildung 3).**

Vergewissern Sie sich, dass die Sepharose-Beads in der PCR-Platte aufgelöst sind.

Hinweis: Achten Sie dabei darauf, dass die Platte die gleiche Ausrichtung wie beim Laden der Proben hat.



Abbildung 3. Position der PCR-Platte (bzw. der Streifen) und der PyroMark Q24 Platte in der Vakuum-Arbeitsstation

4. Legen Sie Unterdruck an den Saugkopf an, indem Sie den Vakuumschalter öffnen.
5. Senken Sie die Filternadeln des Vakuum-Saugkopfes vorsichtig in die PCR-Platte (bzw. die Streifen) ab, um die Beads mit dem immobilisierten Template anzusaugen. Lassen Sie die Nadeln 15 Sekunden lang in dieser Position. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf vorsichtig wieder an.
Hinweis: Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Wenn seit dem Schütteln der Platte (bzw. der Streifen) 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.
6. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 40 ml 70 %igem Ethanol (siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 5 Sekunden lang.
7. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 40 ml Denaturierungslösung (siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 5 Sekunden lang.
8. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 50 ml Waschpuffer (siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 10 Sekunden lang.
9. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 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°)

10. Halten Sie den Vakuum-Saugkopf über die PyroMark Q24 Platte und schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf („Off“).
11. Setzen Sie die Beads in der PyroMark Q24 Platte frei, indem Sie die Filternadeln in den verdünnten Sequenzierungs-Primer absenken und den Saugkopf vorsichtig seitlich bewegen.
Hinweis: Achten Sie darauf, dass Sie die Oberfläche der PyroMark Q24 Platte nicht mit den Filternadeln zerkratzen.
12. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit hochreinem Wasser (Abbildung 3) und schütteln Sie den Saugkopf 10 Sekunden lang.
13. Spülen Sie die Filternadeln, indem Sie sie in hochreines Wasser (siehe Abbildung 3) eintauchen und Unterdruck anlegen. Spülen Sie die Filternadeln mit 70 ml hochreinem Wasser.
14. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 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).
15. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf („Off“) und bringen Sie den Saugkopf in die Parkposition (P).
16. 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 auf Seite 53).
17. Erhitzen Sie die PyroMark Q24 Platte mit den Proben unter Verwendung des vorgewärmten PyroMark Q24 Plattenhalters 2 Minuten lang bei 80 °C.

- 18. 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.**
- 19. Fahren Sie anschließend mit „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 28 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 15), enthält Informationen zu den Volumina von Nukleotiden, Enzym und Substratpuffer, die für einen bestimmten Lauf benötigt werden.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Schalten Sie das PyroMark Q24 System am Hauptschalter an der Geräterückseite ein.

Verfahren

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

Hinweis: Nicht im Vortexer mischen!

Hinweis: 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.**

[§] Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Material Safety Data Sheets, MSDS) entnehmen, die vom Hersteller des jeweiligen Produkts bereitgestellt werden.

5. **Beladen Sie die PyroMark Q24 Kartusche mit den entsprechenden Volumina an Nucleotiden sowie Enzym- und Substratgemisch, wie in Abbildung 5 dargestellt.**

Stellen Sie sicher, dass keine Luftblasen aus der Pipette in die Kartusche gelangen.



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 Nucleotide (**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.**
Hinweis: Der USB-Stick darf erst herausgezogen werden, wenn der Lauf abgeschlossen ist.
11. **Wählen Sie im Hauptmenü (mit Hilfe der Tasten \blacktriangle und \blacktriangledown) die Option „Run“ und drücken Sie „OK“.**
12. **Wählen Sie mit Hilfe der Tasten \blacktriangle und \blacktriangledown die Laufdatei aus.**
Hinweis: 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 31.**

Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs

In diesem Protokoll wird die Mutationsanalyse eines abgeschlossenen BRAF-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. **Für die Analyse des Laufs stehen zwei Methoden zur Auswahl: Wenn Sie mit dem BRAF Plug-in Report arbeiten, fahren Sie mit Schritt 5 fort. Wenn Sie die AQ-Analyse des PyroMark Q24 Systems verwenden, fahren Sie mit Schritt 6 fort.**

Hinweis: Wir empfehlen dringend, für die Interpretation der Ergebnisse den BRAF Plug-in Report zu verwenden. Der BRAF Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden. Mit diesem Report wird sichergestellt, dass die jeweiligen Nachweisgrenzen (siehe Tabelle 9) und die verschiedenen zu analysierenden Sequenzen („Sequences to Analyze“) für den automatischen Nachweis aller Mutationen verwendet werden.

Hinweis: Die komplexen Mutationen in den BRAF-Codons 600 und 469 können mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software nicht analysiert werden. Wir empfehlen, für die Analyse der komplexen Mutationen in den Codons 600 und 469 den BRAF Plug-in Report zu verwenden.

Hinweis: Einige der untersuchten Mutationen in Codon 600 sowie die Mutationen G469A und G469S können bei einem Mutationsgrad unter 10 % u. U. nicht genau unterschieden werden.

5. **Bei Verwendung des BRAF Plug-in Reports:**
Um einen Bericht zu erstellen, wählen Sie im Menü „Reports“ (Berichte) die Option „AQ Add On Reports/BRAF“ (AQ-Zusatzberichte/BRAF) aus (siehe Abbildung 6).

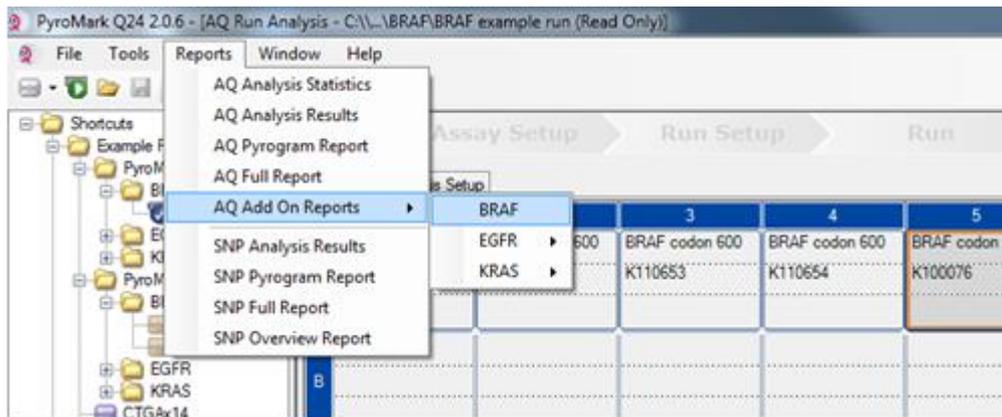


Abbildung 6. Menü „BRAF Plug-in Report“

Es werden automatisch die Kavitäten für alle Mutationen analysiert, für die in Tabelle 9 Nachweisgrenzen angegeben sind. Die Ergebnisse werden in einer Übersichtstabelle zusammengefasst (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	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	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. BRAF Plug-in Report

6. 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 Kavitäten



Analyse der ausgewählten Kavität

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

7. **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. Bei der Assay-Konfiguration sollte als „Required peak height for passed quality“ (Erforderliche Peakhöhe für bestandene Qualität) der Wert 30 festgelegt werden (siehe Anhang A und *PyroMark Q24 User Manual*).

Hinweis: 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.

Erneute Analyse von Proben, bei denen keine Mutation vom Typ GTG → GAG nachgewiesen wurde oder die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) erhalten haben

Die häufigste Mutation im BRAF-Onkogen ist GTG → GAG in Nukleotid 1799 (zweite Base von Codon 600). Daher ist die Standardeinstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz), die unter „Assay Setup“ (Assay-Konfiguration) festgelegt wird, für diese Mutation bestimmt (siehe „Anhang A: Konfigurieren von theascreen BRAF Pyro Assays“ auf Seite 50).

Wir empfehlen, alle Proben, bei denen mit der Standardeinstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) keine Mutation nachgewiesen wurde, sowie Proben, die die Qualitätsbewertungen „Check“ oder „Failed“ erhalten haben oder Peaks enthalten, die nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen, unbedingt neu zu analysieren. Die Qualitätsbewertungen „Check“ und „Failed“ weisen möglicherweise auf eine seltene Mutation hin, die von der Standardeinstellung „Sequence to Analyze“ nicht abgedeckt wird, was zu Abweichungen der Peakhöhe führen kann.

Um die Analyse zu wiederholen und Mutationen in Nukleotid 1798 oder 1799 von Codon 600 zu untersuchen, ändern Sie unter „Analysis Setup“ (Analysekonfiguration) die Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) zu einer der zusätzlichen Sequenzen, die unter „Anhang A: Konfigurieren von theascreen BRAF Pyro Assays“ auf Seite 50 aufgeführt sind. 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 im humanen BRAF-Gen in Codon 600 und den Codons 464 bis 469 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.

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, sollte die Probe erneut analysiert werden.

Interpretation der Ergebnisse

Interpretation der Analyseergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen

Wir empfehlen dringend, zu Vergleichszwecken und als Hintergrundkontrolle in jedem Lauf unmethylierte Kontroll-DNA mitzuführen. Die gemessene Häufigkeit in der Kontrollprobe darf nicht größer sein als die Leerwertgrenze (LOB).

Alle Proben müssen in Bezug auf die Nachweisgrenze (LOD, siehe Tabelle 9) untersucht und wie folgt interpretiert werden.

- Mutationshäufigkeit < LOD: keine Mutation nachgewiesen
- Mutationshäufigkeit \geq LOD und \leq LOD + 3 Prozenteinheiten: potenzielle schwache Mutation

Hinweis: Wenn Sie mit dem BRAF Plug-in Report (siehe Schritt 5 von „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 28) arbeiten und dieser Fall eintritt, wird eine Warnung ausgegeben.

Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird, sollten für die Mutation nur dann als positiv betrachtet werden, wenn das Ergebnis durch die Wiederholung der Analyse in Doppelbestimmung mit einer Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA bestätigt werden kann. Die Ergebnisse beider Bestimmungen müssen \geq LOD sein und sich von der Kontrollprobe unterscheiden. Anderenfalls ist die Probe als „No mutation detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) einzustufen.

- Mutationshäufigkeit > LOD + 3 Prozenteinheiten: Mutation

Bei Verwendung des BRAF Plug-in Report erfolgt dies automatisch.

Hinweis: Wir empfehlen, für die Interpretation der Ergebnisse den BRAF 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: Einige der untersuchten Mutationen in Codon 600 sowie die Mutationen G469A und G469S können bei einem Mutationsgrad unter 10 % u. U. nicht genau unterschieden werden.

Hinweis: Eine gemessene Frequenz über der Leerwertgrenze in der Kontrollprobe zeigt an, dass im jeweiligen Lauf ein ungewöhnlich hoher Hintergrund vorhanden ist, der die Allelquantifizierung insbesondere für schwache Mutationen beeinträchtigen kann. In diesem Fall sind gemessene Häufigkeiten im Bereich zwischen LOD (Tabelle 9) und LOD + 3 Prozenteinheiten keine Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus. Es wird empfohlen, Proben mit einer potenziell schwachen Mutation erneut zu analysieren.

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

Tabelle 9. Leerwertgrenze und Nachweisgrenze für bestimmte Mutationen

Nukleinsäure- substitution	Aminosäure- substitution	LOB (Prozent- ein- heiten)	LOD (Prozent- ein- heiten)	COSMIC- ID* (V46)
Codon 600 (GTG), wie beim reversen Assay (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Codon 469 (GGA), wie beim reversen Assay (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Codon 466 (GGA), wie beim reversen Assay (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Codon 464 (GGA), wie beim reversen Assay (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* 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 Abbildungen 8 bis 10 zeigen repräsentative Pyrogramm-Ergebnisse.

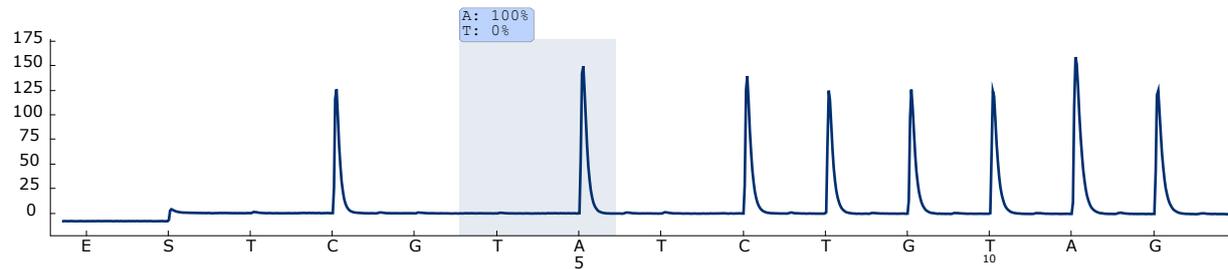


Abbildung 8. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp in Codon 600 mit CWCTGTAGC für „Sequence to Analyze“

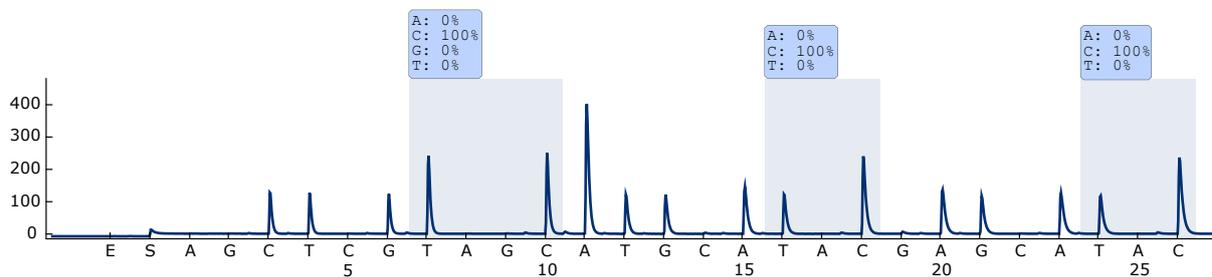


Abbildung 9. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp in den Codons 464 bis 469 mit CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA für „Sequence to Analyze“

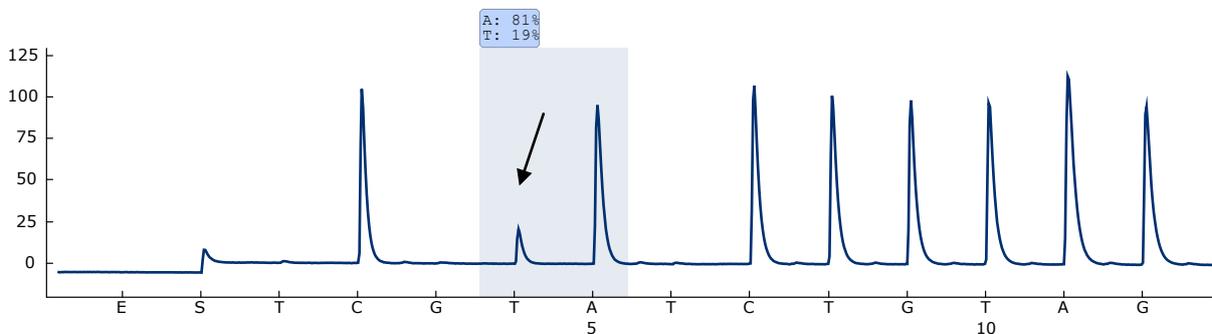


Abbildung 10. Pyrogramm einer Probe mit einer Mutation vom Typ GTG → GAG (V600E) in Base 2 von Codon 600 (Nukleotid 1799, durch einen Pfeil gekennzeichnet) mit CWCTGTAGC für „Sequence to Analyze“.

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 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 Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Hinweis: Informationen zur allgemeinen Fehlerbehebung des Geräts finden Sie im *PyroMark Q24 User Manual*.

Kommentare und Vorschläge

Signale in der Nicht-Template-Kontrolle (Negativkontrolle)

- | | |
|--|---|
| a) Signalübersprechen („Crosstalk“) zwischen Kavitäten | Das Signal einer Kavität wird in einer benachbarten Kavität erfasst. Proben mit hohen Signalintensitäten sollten nicht in die Kavitäten neben den Nicht-Template-Kontrollen gegeben werden. |
| b) PCR-Kontamination | Verwenden Sie sterile Pipettenspitzen mit Filtern. Lagern und extrahieren Sie Materialien wie Proben, Kontrollen und Amplifikate getrennt von PCR-Reagenzien. |

Schlechte oder unerwartete Sequenz

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a) Genomische DNA schlechter Qualität | Genomische DNA schlechter Qualität kann dazu führen, dass die PCR fehlschlägt. Analysieren Sie PCR-Proben anhand eines elektrophoretischen Verfahrens (z. B. mit dem QIAxcel® Advanced System oder mittels Agarosegel-Elektrophorese). |
|---------------------------------------|--|

Kommentare und Vorschläge

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

- a) Geringe Peakhöhe Fehler bei der PCR-Konfiguration oder Proben-
vorbereitung 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 von
therascreen BRAF Pyro Assays“ auf Seite 50) und
wiederholen Sie die Analyse des Laufs.
- 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.

Kommentare und Vorschläge

- d) Warnung über hohe Peakhöhenabweichung für eine Verteilung
- Das Pyrogramm sollte genau 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.
- e) Warnmeldung „High peak height deviation“ (Hohe Peakhöhenabweichung) wird für Verteilung 6 des Codon-600-Assays und CAYCTGTAGC für „Sequence to Analyze“ angezeigt.
- Das Pyrogramm sollte genau mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Wenn das Hintergrundrauschen bei Verteilung T6 unter dem erwarteten Wert liegt und die verbleibenden gemessenen Peaks mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen, können sowohl die Warnmeldung als auch die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) ignoriert werden.
- f) Warnmeldung „High peak height deviation“ (Hohe Peakhöhenabweichung) wird für Verteilung 3 oder 5 des Codon-600-Assays und CVCTGTAGC für „Sequence to Analyze“ angezeigt.
- Das Pyrogramm sollte genau mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Wenn das Hintergrundrauschen bei Verteilung G3 oder T4 unter dem erwarteten Wert liegt und die verbleibenden gemessenen Peaks mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen, können sowohl die Warnmeldung als auch die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) ignoriert werden.

Kommentare und Vorschläge

- g) Warnmeldung „The sequence contains less reference peaks than required“ (Die Sequenz enthält nicht genügend Referenz-Peaks) wird für Codon-600-Assay mit CVCTGTAGC für „Sequence to Analyze“ angezeigt.
- Wenn die gemessenen Peaks mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen, kann sowohl die Warnmeldung als auch die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) ignoriert 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 Positivkontrollen (unmethylierte Kontroll-DNA)

- a) Unzureichendes Enzym- oder Substratgemisch in allen Kavitäten
- 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 *therascreen* Reagenzien gemäß den Anweisungen unter „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 28 vor.

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|---|--|
| c) Fehler bei der PCR oder Probenvorbereitung | Fehler, die vor der Pyrosequenzierungs-Analyse bei der PCR-Konfiguration, Programmierung des PCR-Cyclers oder Probenvorbereitung auftreten, können dazu führen, dass die Signale ausbleiben. Führen Sie wie im <i>PyroMark Q24 User Manual</i> beschrieben Funktionsprüfungen der Filternadeln durch und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus. Wiederholen Sie die PCR und Pyrosequenzierungs-Analyse. |
|---|--|

Qualitätskontrolle

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

Anwendungseinschränkungen

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 Angaben in der CLSI-Richtlinie EP17-A „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline“ (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.

Mutationen (GTG → GGG) und (GTG → GCG) in Codon 600 sowie (GGA → GAA) in Codon 464

Für diese Mutationen lagen entweder die Leerwertmessungen durchgängig nahe bei 0 Prozenteinheiten ($n = 72$), was eine nicht-Gaußsche Verteilung ergibt, oder die Messung von Proben mit schwachen Mutationen ergab eine nicht-Gaußsche Verteilung. Die Nachweisgrenze 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 10 in Klammern angegebenen Mutationsgrad ergaben 95 % der Ergebnisse ($n = 72$) ein Signal, das als positiv eingestuft werden kann (\geq Nachweisgrenze).

Tabelle 10. Leerwertgrenze und Nachweisgrenze für bestimmte Mutationen

Nukleinsäure- substitution	Aminosäure- substitution	LOB (Prozent- ein- heiten)	LOD (Prozent- ein- heiten)	COSMIC- ID* (V46)
Codon 600 (GTG), wie beim reversen Assay (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Codon 469 (GGA), wie beim reversen Assay (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Codon 466 (GGA), wie beim reversen Assay (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Codon 464 (GGA), wie beim reversen Assay (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* 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.

Hinweis: Diese Werte basieren auf Läufen, in denen als Template für die PCR-Amplifikation Plasmidgemische aus dem Wildtyp oder der jeweiligen mutierten Sequenz verwendet wurden.

Hinweis: Es wird empfohlen, die Leistungsdaten der Methode im Labor zu bestätigen.

Linearität

Die Linearität wurde unter Verwendung von Plasmidgemischen aus dem Wildtyp oder der mutierten Sequenz für die Mutation V600E (GTG → GAG) in Codon 600 des BRAF-Gens bestimmt. Die Plasmide wurden in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt, um vier Mutationsgrade (5, 10, 30 und 50 %) zu erhalten. Jedes Gemisch wurde mit drei verschiedenen Chargen des *therascreen* BRAF Pyro Kits in drei Pyrosequenzierungs-Läufen mit jeweils drei Replikaten analysiert.

Die Ergebnisse (n = 9 für jeden Mutationsgrad) wurden unter Verwendung der Analyse-it® Software v2.21 gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline“ analysiert und sind für die Mutation V600E (GTG → GAG) in Codon 600 in Abbildung 11 dargestellt.

Die Ergebnisse waren bei einer zulässigen Nichtlinearität von 5 Prozenteinheiten über den getesteten Mutationsgradbereich von 5 bis 50 % linear.

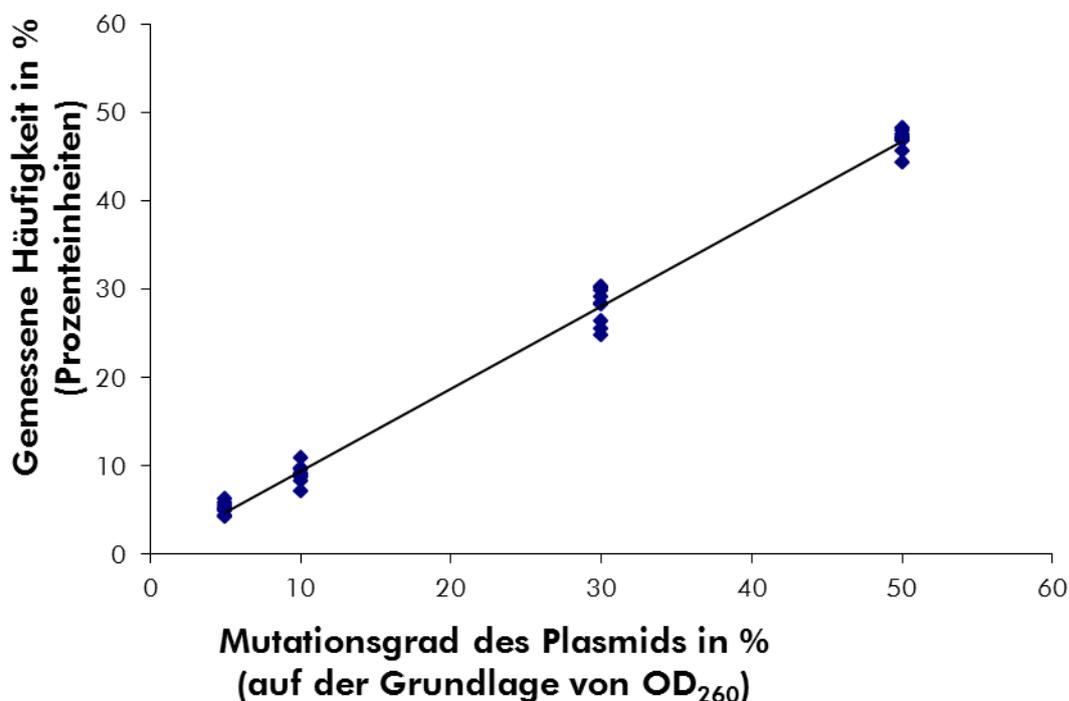


Abbildung 11. Linearität für die Mutation V600E (GTG → GAG) in Codon 600

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* BRAF Pyro Kits). Die Laborpräzision (Intra-Labor-Variabilität) wurde an drei verschiedenen Tagen in drei Läufen in einem Labor mit verschiedenen Bedienern, PyroMark Q24 Systemen und Chargen des *therascreen* BRAF Pyro Kits bestimmt. Die Reproduzierbarkeit (Inter-Labor-Variabilität) wurde von jeweils zwei Läufen in einem internen und externen Labor und unter Verwendung verschiedener Chargen des *therascreen* BRAF Pyro Kits berechnet.

Die Präzisionsergebnisse werden in Standardabweichungen der gemessenen Mutationshäufigkeiten in Prozenteinheiten angegeben (siehe Tabelle 11). Für die Mutation V600E (GTG → GAG) in Codon 600 betrug die Wiederholbarkeit 0,6 bis 2,1 Prozenteinheiten, die Laborpräzision 0,7 bis 1,8 Prozenteinheiten und die Reproduzierbarkeit 0,8 bis 2,1 Prozenteinheiten über den gemessenen Mutationsgradbereich von 5 bis 50 %.

Tabelle 11. Präzision für die Mutation V600E (GTG → GAG) in Codon 600*

Mutationsgrad des Plasmids in % [†]	Wiederholbarkeit		Laborpräzision		Reproduzierbarkeit	
	Mittel	SD	Mittel	SD	Mittel	SD
5	5,2	0,6	4,4	0,7	5,1	0,8
10	9,1	1,0	9,6	1,0	9,6	1,3
30	28,1	2,1	27,9	1,8	28,3	2,1
50	46,9	1,2	46,3	1,5	47,9	1,7

* Alle Werte sind in Prozenteinheiten angegeben. SD: Standardabweichung (n=9).

[†] Auf der Grundlage von OD₂₆₀-Messungen.

Bewertung der diagnostischen Leistung

Der *therascreen* BRAF Pyro Kit wurde im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung bewertet. Es wurde DNA von 100 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Tumorproben der Haut extrahiert und für die Mutationen in Codon 600 und den Codons 464 bis 469 analysiert.

Die DNA wurde unter Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits isoliert. Die Pyrosequenzierungs-Analyse wurde mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit auf dem PyroMark Q24 System und die Sanger-Sequenzierung auf dem ABI™ 3130 Genetic Analyzer durchgeführt.

Von den 100 analysierten Proben konnte der Mutationsstatus von Codon 600 und den Codons 464 bis 469 mit dem Sanger-Sequenzierung in allen Proben mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit, in 99 Proben bestimmt werden (siehe Tabelle 12 und Tabelle 13).

In vier der 100 Proben wurde mittels Sanger-Sequenzierung die Mutation V600E (GTG → GAG) nachgewiesen. Drei dieser Proben ergaben mit dem *therascreen* BRAF Pyro Kit identische Ergebnisse, wogegen die Pyrosequenzierungs-Analyse für Codon 600 bei einer der Proben aufgrund niedriger Peaks fehlschlug. Diese Probe zeigte in den Codons 464 bis 469 im Vergleich zu den anderen Proben zwar eine ausreichende, aber deutlich geringere Peakhöhe, was auf eine unzureichende DNA-Qualität hinweist. Mit beiden Methoden wurde keine der seltenen Mutationen in den Codons 464 bis 469 nachgewiesen.

Mit Ausnahme der Probe, die mit einer Methode fehlschlug, betrug die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen dem *therascreen* BRAF Pyro Kit und der Sanger-Sequenzierung sowohl für Codon 600 als auch die Codons 464 bis 469 100 % (siehe Tabellen 12 und 13).

Tabelle 12. Ergebnisse der analysierten Hauttumorproben für Codon 600

		Sanger-Sequenzierung			
		Mutante	Wildtyp	Unbekannt	Gesamt
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutante	3	0	0	3
	Wildtyp	0	96	0	96
	Unbekannt	1	0	0	1
	Gesamt	4	96	0	100

Tabelle 13. Ergebnisse der analysierten Hauttumorproben für die Codons 464 bis 469

		Sanger-Sequenzierung			
		Mutante	Wildtyp	Unbekannt	Gesamt
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutante	0	0	0	0
	Wildtyp	0	99	0	99
	Unbekannt	0	1	0	1
	Gesamt	0	99	0	100

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 Pyrosequenzierungs-Daten wurden mit dem BRAF Plug-in Report analysiert.

Literatur

QIAGEN unterhält eine umfangreiche und regelmäßig aktualisierte Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, die auf Grundlage von QIAGEN Produkte erstellt wurden. Mit Hilfe der zahlreichen Suchoptionen können Sie nach den gewünschten Beiträgen suchen – entweder mit der einfachen Stichwortsuche oder durch Angabe der Applikation, des Forschungsbereichs, des Titels etc.

Eine vollständige Liste der Referenzen finden Sie online in der Referenzdatenbank von QIAGEN unter www.qiagen.com/RefDB/search.asp. Sie können sich auch an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort wenden, um sie anzufordern.

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

	Kit enthält Reagenzien für <N> Tests
<N>	
	Verwendbar bis
IVD	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
REF	Katalognummer
LOT	Chargennummer
MAT	Materialnummer
COMP	Komponenten
CONT	Enthält
NUM	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
GTIN	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanleitung beachten

Kontakt

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support Center unter www.qiagen.com/support. 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 von *therascreen* BRAF Pyro Assays

Ist der BRAF Plug-in Report bereits installiert, sind in der Navigationsansicht der PyroMark Q24 Software unter dem Pfad „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ vordefinierte Assay-Konfigurationen für die Codons 600 und 464 bis 469 verfügbar. Die folgenden Schritte müssen in diesem Fall nicht durchgeführt werden. Der BRAF Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden.

Wir empfehlen, den BRAF Plug-in Report der manuellen Analyse vorzuziehen. Komplexe Mutationen können einer zu analysierenden Sequenz nicht manuell hinzugefügt werden und müssen mit dem Plug-in analysiert werden. 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 BRAF Plug-in Quick Guide überprüft werden.

Falls der BRAF Plug-in Report nicht installiert ist, muss die Assay-Datei vor der ersten Durchführung des *therascreen* BRAF Pyro Assays manuell konfiguriert werden. Konfigurieren Sie den BRAF-Assay für Codon 600 und die Codons 464 bis 469 wie nachfolgend beschrieben mit der PyroMark Q24 Software.

Verfahren

BRAF-Codon 600

A1. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und wählen Sie „New AQ Assay“ (Neuer AQ-Assay).

**A2. Geben Sie für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) die folgende Sequenz ein:
CWCTGTAGC**

Hinweis: Die häufigste Mutation im Codon 600 ist eine Mutation vom Typ GTG → GAG in Nukleotid 1799 (zweite Position).

Die Sequenz kann nach dem Lauf auch geändert werden, um Mutationen an anderen Positionen nachzuweisen.

Um eine Analyse auf Mutationen in Nukleotid 1798 (erste Position) durchzuführen, ändern Sie die Einstellung für „Sequence to Analyze“ zur folgenden Sequenz:

CAYTGTAGC

Um eine Analyse auf weitere, seltene Mutationen in Nukleotid 1799 durchzuführen, sollte auch die Sequenz **CVCTGTAGC** analysiert werden.

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass der Schwellenwert für die einzelne Peakhöhe auf 30 RLU eingestellt ist.

Hinweis: Die komplexen Mutationen im BRAF-Codon 600 können mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software unter Verwendung von „Sequence to Analyze“ nicht analysiert werden. Wir empfehlen, für die Analyse der komplexen Mutationen im Codon 600 den BRAF Plug-in Report zu verwenden.

**A3. Geben Sie für „Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge) Folgendes manuell ein:
TCGTATCTGTAG**

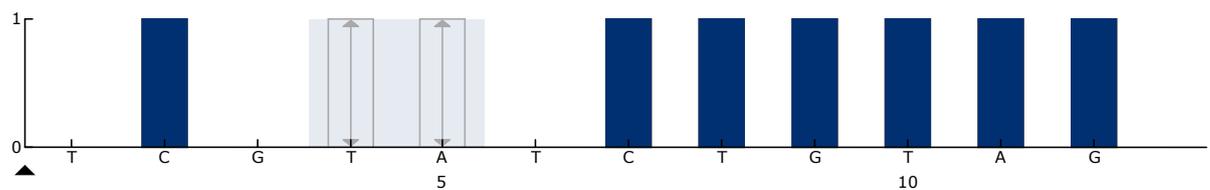


Abbildung 12. Histogramm für Codon 600 (Nukleotid 1799) mit CWCTGTAGC für „Sequence to Analyze“.

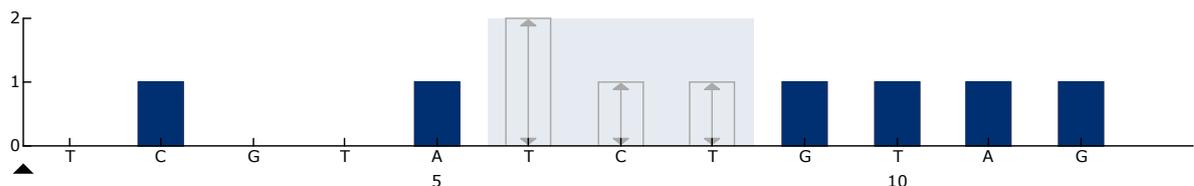


Abbildung 13. Histogramm für Codon 600 (Nukleotid 1798) mit CAYTGTAGC für „Sequence to Analyze“.

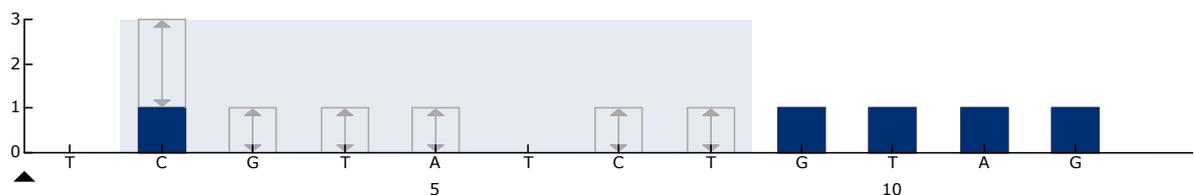


Abbildung 14. Histogramm für Codon 600 (Nukleotid 1799) mit CVCTGTAGC für „Sequence to Analyze“.

A4. 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.

A5. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und speichern Sie den Assay unter „BRAFcodon 600“.

BRAF-Codons 464 bis 469

A1. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und wählen Sie „New AQ Assay“ (Neuer AQ-Assay).

A2. Geben Sie für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) die folgende Sequenz ein:
CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

Hinweis: Die komplexe Mutation im BRAF-Codon 469 kann mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software unter Verwendung von „Sequence to Analyze“ nicht analysiert werden. Wir empfehlen, für die Analyse der komplexen Mutation im Codon 469 den BRAF Plug-in Report zu verwenden.

A3. Geben Sie für „Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge) Folgendes manuell ein:
AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAAC

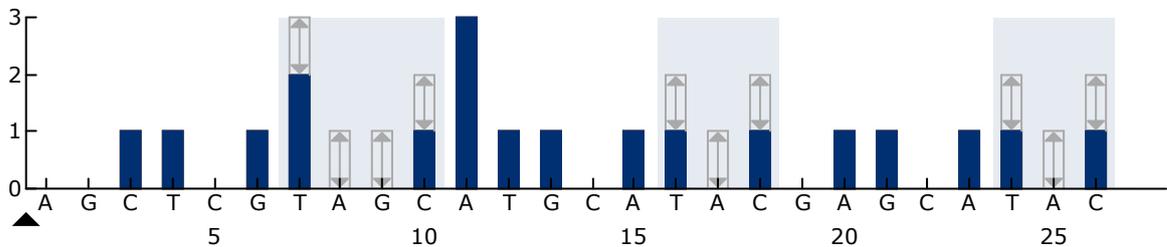


Abbildung 15. Histogramm für die Codons 464 bis 469 (Nukleotide 1391 [Codon 464], 1397 [Codon 466] und 1406 [Codon 469]).

A4. 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.

A5. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und speichern Sie den Assay unter „BRAFCodons 464-469“.

Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs

WARNUNG 	Gefährliche Chemikalien <p>Die für die Vakuum-Arbeitsstation verwendete Denaturierungslösung enthält Natriumhydroxid, das die Augen und die Haut reizt.</p> <p>Tragen Sie stets Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel.</p> <p>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.</p> <p>Bei der Abführung von Dämpfen und der Entsorgung von Abfällen müssen alle geltenden nationalen und regionalen Sicherheitsvorschriften und Gesetze eingehalten werden.</p>
---	---

* 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

B1. Stellen Sie sicher, dass am Vakuum-Saugkopf kein Unterdruck anliegt. Stellen Sie sicher, dass der Vakuumschalter geschlossen („Off“) und die Vakuumpumpe ausgeschaltet ist.

B2. Entsorgen Sie alle in den Reservoirs verbliebenen Reste an Lösungen.

B3. Spülen Sie die Reservoirs mit hochreinem Wasser aus oder ersetzen Sie sie, falls erforderlich.

B4. Entleeren Sie den Abfallbehälter.

Hinweis: Der Deckel kann abgenommen werden, ohne vorher die Schlauchverbindungen zu trennen.

B5. 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	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	Für 24 Reaktionen auf PyroMark Q24 Systemen: Seq.-Primer, PCR-Primer, Unmethylierte Kontroll-DNA, PyroMark PCR-Master-Mix, CoralLoad Konzentrat, PyroMark Bindungspuffer, PyroMark Annealing-Puffer, PyroMark Denaturierungslösung, PyroMark Waschpuffer, Enzymgemisch, Substratgemisch, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP und H ₂ O	971470
PyroMark Q24 MDx	Plattform für die sequenzbasierte Detektion zur Pyrosequenzierung von 24 Proben gleichzeitig	9001513
PyroMark Q24	Plattform für die sequenzbasierte Detektion zur Pyrosequenzierung von 24 Proben gleichzeitig	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuum-Arbeitsstation (220 V) zur Verarbeitung von 24 Proben gleichzeitig, vom PCR-Produkt bis hin zum Einzelstrang-Template	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuum-Arbeitsstation (220 V) zur Verarbeitung von 24 Proben gleichzeitig, vom PCR-Produkt bis hin zum Einzelstrang-Template	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Anwendungssoftware	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysesoftware	9019062
Zubehör		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatten mit 24 Kavitäten für die Sequenzierung	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartuschen zur Dispensierung von Nukleotiden und Reagenzien	979302

* Nur UK

† Alle anderen Länder

Produkt	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
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
Verwandte Produkte		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp MinElute® Säulen, Proteinase K, Puffer, Entnahmeröhrchen (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Für 48 Präparationen: Reagenz-kartuschen (Gewebe), Einweg-Filterspitzen, Einweg-Spitzenhalter, Probenröhrchen (2 ml), Elutionsröhrchen (1,5 ml), Puffer G2, Proteinase K	953034

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem Händler vor Ort angefordert werden.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

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

Bei registrierten Namen, Marken usw., die in diesem Dokument genannt werden, ist nicht davon auszugehen, dass sie gesetzlich nicht geschützt sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als registrierter Namen bzw. registrierte Marke gekennzeichnet sind.

Haftungsausschluss

Nicht zur Verwendung zur Bestimmung des Endometrioserisikos bestimmt.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des *therascreen* BRAF Pyro Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der *therascreen* BRAF Pyro Kit darf nur gemäß den Angaben im *therascreen* BRAF Pyro Kit Handbuch und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *therascreen* BRAF Pyro Kit Handbuch und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit 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 Kits 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 Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

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

© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

