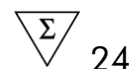


therascreen[®] EGFR Pyro[®]-kit – Håndbog



Version 1



Til in vitro-diagnostisk brug



REF 971480

HB 1061827DA

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R3 **MAT** 1061827DA



QIAGEN prøve- og analyseteknologier

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyseteknologier, der muliggør isolation og påvisning af indholdet i enhver biologisk prøve. Vore avancerede høj kvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder inden for:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nucleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyseteknologier

Vor opgave er at bringe Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. For yderligere information, se www.qiagen.com.

Indhold

Tilsligtet anvendelse	5
Opsummering og forklaring	5
Procedureprincip	6
Medfølgende materialer	8
Kit-indhold	8
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	10
Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger	11
Sikkerhedsinformationer	11
Generelle forholdsregler	12
Opbevaring og håndtering af reagenser	13
Håndtering og opbevaring af prøver	13
Procedure	14
DNA-isolation	14
Protokoll	
■ 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i <i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	18
■ 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler	21
■ 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24	23
■ 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet	27
■ 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel	30
Fortolkning af resultater	34
Fortolkning af analyseresultater og påvisning af lavniveau-mutationer	34
Fejludbedringsvejledning	39
Kvalitetskontrol	42
Begrænsninger	43
Brugsegenskaber	44
Tomgrænse og påvisningsgrænse	44
Linearitet	47
Præcision	47

Diagnostisk evaluering	48
Referencer	53
Symboler	54
Kontaktoplysninger	54
Bilag A: Opsætning af <i>therascreen</i> EGFR Pyro-analyser	55
Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere	60
Bestillingsinformation	61

Tilsigtet anvendelse

therascreen EGFR Pyro-kittet er en *in vitro* nucleinsyresekvensbaseret påvisningstest baseret på Pyrosequencing[®] til kvantitativ påvisning af mutationer i exons 18, 19, 20 og 21 i det humane EGFR-gen i genomisk DNA udledt af humane vævsprøver.

therascreen EGFR Pyro-kittet er beregnet til at give lægen oplysninger, der kan hjælpe denne med at identificere de cancerpatienter, der med størst sandsynlighed vil få fordel af anti-EGFR-behandling. Til *in vitro*-diagnostisk brug.

Kun til brug på PyroMark[®] Q24-systemet. Der findes følgende PyroMark Q24-systemer:

- PyroMark Q24-instrumentet og PyroMark Q24 MDx-instrumentet.
- PyroMark Q24 Vacuum-arbejdsstationen og PyroMark Q24 MDx Vacuum-arbejdsstationen.
- PyroMark Q24-software (version 2.0) og PyroMark Q24 MDx-software (version 2.0).

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, f.eks. teknikere og læger med kvalifikationer inden for *in vitro*-diagnostiske procedurer, molekylærbiologiske teknikker samt PyroMark Q24-systemet.

Opsummering og forklaring

therascreen EGFR Pyro-kittet giver mulighed for kvantitative målinger af mutationer i codon 719, 768, 790 og 858–861 samt sletninger og komplekse mutationer i exon 19 i det humane EGFR-gen.

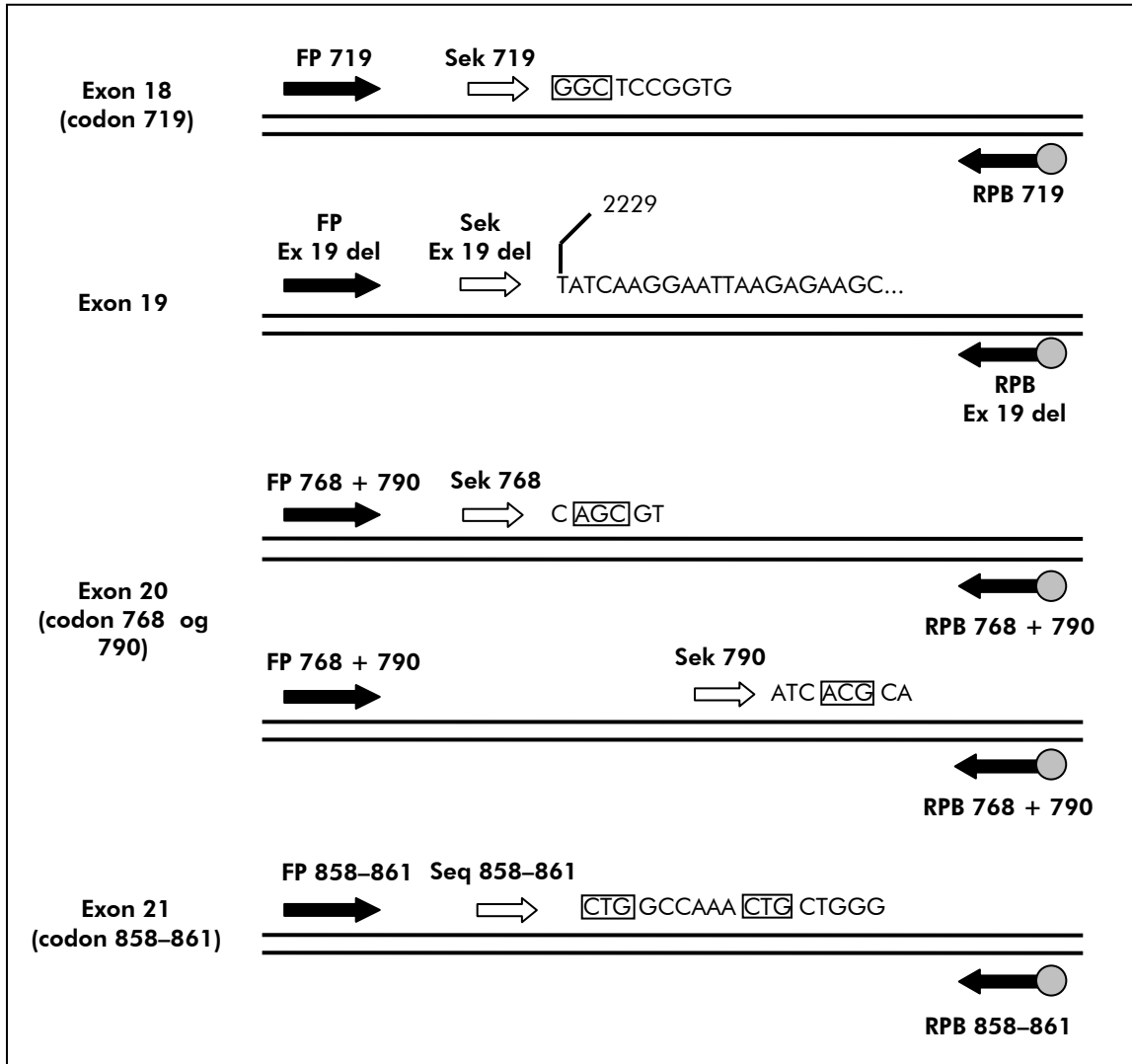
Kittet består af fire PCR-analyser (figur 1) til påvisning af:

- Mutationer i codon 719 (exon 18)
- Mutationer i codon 768 og 790 (exon 20)
- Mutationer i codon 858 til 861 (exon 21)
- Sletninger og komplekse mutationer i exon 19

De fire regioner forstærkes separat ved hjælp af PCR og sekventeres i hele den definerede region. Amplikonet, der dækker codon 768 og 790, opdeles i to sekventeringsreaktioner. Sekvenserne omkring de definerede positioner fungerer som normaliserings- og referencespidser til kvantificering og kvalitetsvurdering af analysen.

Alle analyser sekventeres fremad.

Produktet består af en PCR-primerblanding og sekventeringsprimere til hver analyse. Primerne leveres i en opløsning. Hvert hætteglas indeholder 24 µl af hver primer eller primerblanding.



Figur 1. Illustration af EGFR-analysen. Den afbildede sekvens er den analyserede sekvens for en vildtypeprøve. **FP:** Forward-PCR-primere; **RPB:** Reverse-PCR-primere (B står for biotinylering); **Sekv.:** Sekventeringsprimere.

Procedureprincip

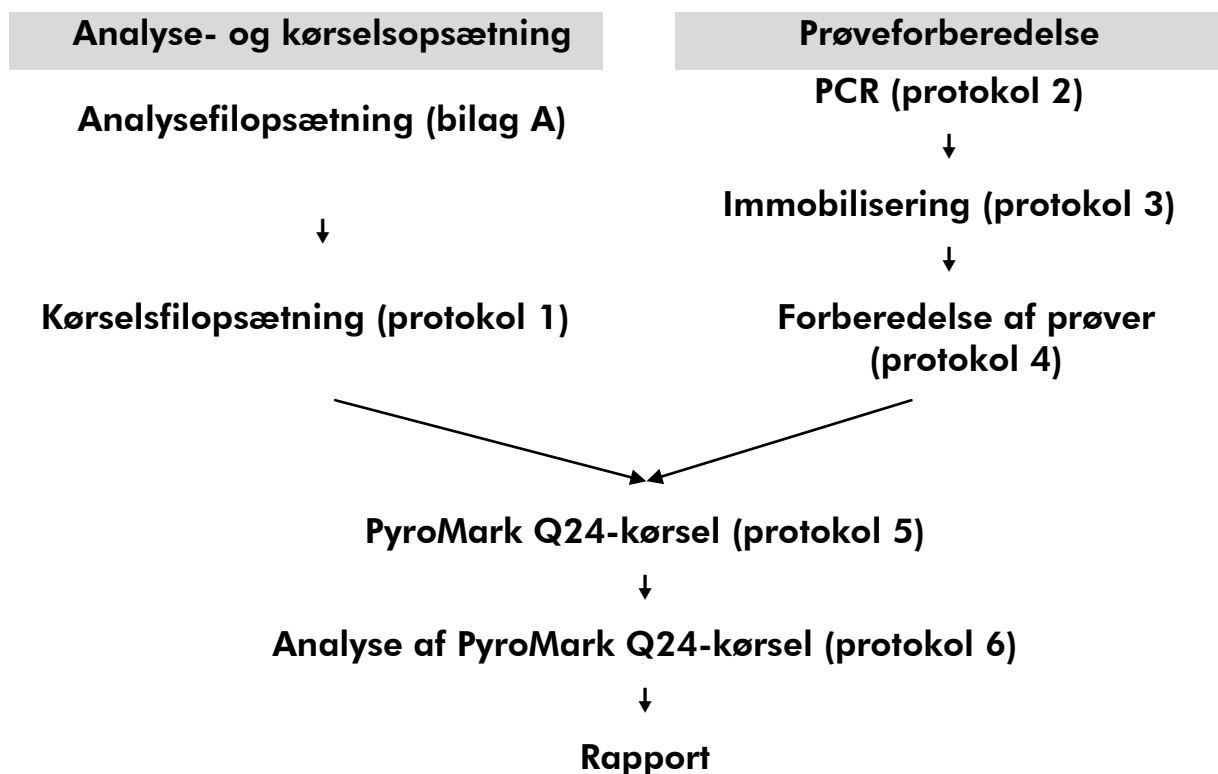
Rutediagrammet nedenfor illustrerer analyseproceduren. Efter PCR ved hjælp af primere rettet mod exon 18, 19, 20 og 21 immobiliseres ampliconerne på Streptavidin Sepharose® High Performance-kugler. Der forberedes enkeltstrenget DNA, og de tilsvarende sekventeringsprimere afhædtes til DNA'et. Prøverne analyseres herefter på PyroMark Q24-systemet ved hjælp af en kørselsopsætningsfil og en kørselsfil.

Det anbefales dog at bruge EGFR Plug-in Report til at analysere kørslen. EGFR Plug-in'en Report fås ved henvendelse via e-mail til pyro.plugin@qiagen.com.

Kørslen kan dog også analyseres ved hjælp af det integrerede analyseværktøj i PyroMark Q24-systemet. "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) kan herefter tilpasses med henblik på påvisning af forskellige sletninger i exon 19 og af sjældne mutationer i de andre exoner efter kørslen (se "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel", side 30).

Bemærk: Rutediagrammet er ændret en smule i forhold til revision R1 af *therascreen* EGFR Pyro Kit-håndbogen (se "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24", side 23).

Rutediagram for *therascreen* EGFR Pyro-procedure



Kontroller

Kittet indeholder umetyleret kontrol-DNA som positiv kontrol til PCR og sekventeringsreaktioner. Dette kontrol-DNA har en vildtype genotype i de regioner, der sekventeres med dette kit, og er påkrævet med henblik på korrekt fortolkning af resultaterne og identifikation af lavniveau-mutationer (se "Fortolkning af resultater", side 34). Medtag en prøve med umetyleret kontrol-DNA for hver analyse i hver enkelt pyrosekventeringskørsel.

Hertil kommer, at en negativ kontrol (uden skabelon-DNA) skal medtages i PCR-opsætningen af mindst én analyse.


Medfølgende materialer

Kit-indhold

therascreen EGFR Pyro-kit (æske 1/2)

<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	(24)
Katalognr.	971480
Antal reaktioner	24
Sekvenseringsprimer EGFR 719	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR Ex 19 Del	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR 768	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR 790	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR 858–861	24 µl
PCR-primer EGFR 719	24 µl
PCR-primer EGFR Ex19 Del	24 µl
PCR-primer EGFR 768+790	24 µl
PCR-primer EGFR 858–861	24 µl
PyroMark PCR-masterblanding, 2x	2 x 850 µl
CoralLoad®-koncentrat, 10x	1,2 ml
H ₂ O	5 x 1,9 ml
Umethyleret kontrol-DNA, 10 ng/µl	100 µl

therascreen -buffere og -reagenser (æske 2/2)

therascreen-buffere og -reagenser		
PyroMark-bindingsbuffer		2 x 10 ml
PyroMark-afhædningsbuffer		2 x 10 ml
PyroMark-denatureringsopløsning*		2 x 250 ml
PyroMark-vaskebuffer, 10x		2 x 25 ml
Enzymblanding		2 hætteglas
Substratblanding		2 hætteglas
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
Håndbog		1

* Indeholder natriumhydroxid.

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

- DNA-isolationskit (se "DNA-isolation", side 14)
- Pipetter (justerbare)*
- Sterile pipettespidser (med filtre til PCR-opsætning)
- Bordmikrocentrifuge*
- Termocykler* og egnede PCR-rør
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalognr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (katalognr. 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24-software (katalognr. 9019063 eller 9019062)†
- PyroMark Q24-plade (katalognr. 979301)†
- PyroMark Q24-beholder (katalognr. 979302)†
- PyroMark Q24-vakuumarbejdsstation (katalognr. 9001515 eller 9001517)*†
- Varmeblok*, som kan nå op på 80 °C
- 24-brønds PCR-plade eller strips
- Strip-hætter
- Rektificeret vand (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende).
Bemærk: Der medfølger tilstrækkeligt vand i kittet til PCR, DNA-immobilisering og til at opløse enzyblandingen og substratblandingen. Der skal bruges yderligere rektificeret vand til fortynding af PyroMark-vaskebufferen 10x.
- Ethanol (70%)‡

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

† CE-IVD-mærket i henhold til EU-direktiv 98/79/EF. De øvrige produkter på listen er ikke CE-IVD-mærkede i henhold til EU-direktiv 98/79/EF.

‡ Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer som f.eks. metanol eller methylethylketon.

Anbefalede plademiksere

De i tabel 1 viste plademiksere anbefales til brug sammen med *therascreen* EGFR Pyro-kittet.

Tabel 1. Plademiksere anbefalet til brug med *therascreen* EGFR Pyro-kittet

Producent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer komfort (grundenhed)	5355 000.011
	Thermoblock til mikrotiterplader	5363 000.012
	Adapterplade til 96 x 0,2ml PCR-rør til isætning i blokke til mikrotiterplader	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag® Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger

Til in vitro-diagnostisk brug

Sikkerhedsinformationer

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er). Disse er tilgængelige online i det praktiske og kompakte PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive et SDS til hvert enkelt QIAGEN-kit og samtlige kitkomponenter.

Følgende farer og forholdsregler gælder for komponenterne i *therascreen* EGFR Pyro-kittet.

PyroMark Denaturation Solution



Advarsel! Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Kan ætse metaller. Absorber udslip for at undgå materielskade. Opbevares kun i den originale beholder. Bær beskytteshandsker/ beskyttelsestøj/ øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.

PyroMark Enzyme Mixture



Indeholder: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Fare! Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenskade. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. VED eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til GIFTINFORMATION eller en læge. Forurenede tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Bær beskytteshandsker/ beskyttelsestøj/ øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.

PyroMark Substrate Mixture



Indeholder: acetic acid. Advarsel! Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp. Forurenede tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Bær beskytteshandsker/ beskyttelsestøj/ øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.

Generelle forholdsregler

Bemærk: Brugeren skal altid være opmærksom på følgende:

- Håndbogen skal følges fuldstændigt for at opnå optimale resultater. Det anbefales ikke at fortynde reagenserne, undtagen som det er beskrevet i denne håndbog, da det vil medføre tab af ydelse.
- Rutediagrammet er ændret en smule (se "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24", side 23) i forhold til revision R1 af *therascreen* EGFR Pyro Kit-håndbogen.
- Komponenterne i dette produkt er tilstrækkelige til at udføre 24 reaktioner i op til 5 uafhængige kørsler.
- Brug sterile pipettespidser med filtre (til PCR-opsætning).

- Positive materialer (prøver, positive kontroller og amplikoner) skal opbevares og ekstraheres separat fra alle andre reagenser og tilsættes reaktionsblandingen på et separat sted.
- Alle komponenter skal omhyggeligt optøs til stuetemperatur (15–25 °C), inden analysen startes.
- Efter optøning skal komponenterne blandes (ved gentagen pipettering op og ned eller ved pulsvortexing) og centrifugeres kortvarigt.
- Mislykkede resultater kan ikke bruges som udgangspunkt for vurdering af mutationsstatus.

Opbevaring og håndtering af reagenser

therascreen EGFR Pyro-kittet forsendes i to æsker. *therascreen* EGFR Pyro-kittet (æske 1/2) forsendes på tøris. PyroMark PCR-masterblandingen, CoralLoad-koncentratet, det umethylerede kontrol-DNA og samtlige primere skal opbevares ved –30 til –15 °C efter modtagelsen.

therascreen buffere og reagenser (æske 2/2), der indeholder buffere, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP og dTTP (reagenserne til Pyrosequencing[®] analyse) forsendes på køleelementer. Disse komponenter skal opbevares ved 2–8 °C efter modtagelse. For at minimere aktivitetstab anbefales det at opbevare både enzymblandingen og substratblandingen i de leverede hætteglas.

Rekonstituerede enzym- og substratblandinger er stabile i mindst 10 dage ved 2–8 °C. Rekonstituerede enzym- og substratblandinger kan nedfryses og opbevares i hætteglassene ved –30 til –15 °C. Frosne reagenser bør ikke udsættes for mere end tre optønings- og indfrysningscyklusser.

Bemærk: Nucleotider må ikke fryses.

therascreen EGFR Pyro-kittet er stabilt indtil udløbsdatoen ved opbevaring under disse betingelser.

Håndtering og opbevaring af prøver

Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Prøvematerialet er humant DNA ekstraheret fra blod eller fra formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) prøver.

Prøver fra personer i heparinbehandling må ikke bruges. Blodprøver, der er opsamlet i rør tilsat heparin som antikoagulationsmiddel, må ikke bruges. Heparin påvirker PCR.

Procedure

DNA-isolation

Systemets ydeevne er fastlagt ved hjælp af EZ1[®] DNA Tissue-kit og QIAamp[®] DNA FFPE Tissue-kit til ekstrahering af humant DNA fra formalinfikserede, paraffinindlejrede tumorprøver. Ydelsen for QIAamp DSP DNA Blood Mini-kitsystemet er fastlagt ved hjælp af blodprøver fra raske donorer tilsat tumorceller.

De QIAGEN[®] kit, der er vist i tabel 2, anbefales til oprensning af DNA fra de angivne humane prøvetyper til brug med *therascreen* EGFR Pyro-kittet. DNA-oprensningen skal udføres i henhold til instruktionerne i kit-håndbøgerne.

Tabel 2. DNA-oprensningskit anbefalet til brug med *therascreen* EGFR Pyro-kit

Prøvemateriale	Isolationskit til nucleinsyre	Katalognummer (QIAGEN)
Paraffinindlejret væv	QIAamp DNA FFPE Tissue-kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue-kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini-kit [†]	61104

* Følg protokollen for brug med paraffinindstøbt væv. EZ1 DNA Tissue-kit skal bruges sammen med EZ1 Advanced (kat. nr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat. nr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat. nr. 9001492) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat. nr. 9018700) eller med BioRobot[®] EZ1 (kat. nr. 9000705 – fås ikke længere) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat. nr. 9015862).

[†] CE-IVD-mærket i henhold til EU-direktiv 98/79/EF.

Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet

Vigtig anvisning før start

- Hvis det er nødvendigt, kan LOB bekræftes ved hjælp af en vildtypeprøve, så der opnås en hel plade resultater. Yderligere oplysninger fås i CLSI's retningslinje EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".

Ting, der skal gøres før start

- Hvis EGFR Plug-in'en Report ikke er blevet installeret, skal der oprettes en analyseopsætning (se bilag A, side 55). Dette må kun gøres én gang før kørsel af *therascreen* EGFR Pyro-analyserne første gang. I tilfælde af at EGFR Plug-in'en Report er blevet installeret, er der adgang til prædefinerede analyseopsætninger i genvejsbrowseren i PyroMark Q24-softwaren ved at følge stien "Example Files/PyroMark Setups/EGFR". EGFR Plug-in'en Report fås ved henvendelse via e-mail til pyro.plugin@qiagen.com.

Procedure

1. Klik på på værktøjslinjen.

Der oprettes en ny kørselsfil.

2. Angiv kørselsparametrene (se "Kørselsparametre", side 17).

3. Klargør pladen ved at tilføje analyser for de fem forskellige sekvenseringsreaktioner i de brønde, der svarer til de prøver, som skal analyseres.

Bemærk: En negativ kontrolprøve (uden skabelon-DNA) skal medtages i PCR-opsætningen af mindst én analyse.

Bemærk: Medtag en prøve med umethyleret kontrol-DNA for hver analyse i hver enkelt pyrosekventeringskørsel (se "Kontroller", side 11).

4. Når kørslen er konfigureret og klar til at køre på PyroMark Q24-systemet, skal der udskrives en liste over de påkrævede volumener enzymblanding, substratblanding og nucleotider samt pladeopsætningen. Vælg "Pre Run Information" (Information før kørsel) i menuen "Tools" (Funktioner), og klik på , når rapporten vises.

5. Luk kørselsfilen, og kopiér den til en USB-nøgle (leveres med systemet) ved hjælp af Windows® Stifinder.

Bemærk: Den udskrevne information før kørsel kan bruges som skabelon for prøveopsætningen (se "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 21).

Se "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 27 for at køre pladen på PyroMark Q24.

Kørselsparametre

Run name (Kørselsnavn):	Navnet på kørslen angives, når filen gemmes. Hvis filen omdøbes, ændres navnet på kørslen også.
Instrument method (Instrumentmetode):	Vælg instrumentmetode ud fra den beholder, der skal bruges til kørslen. Se instruktionerne til produkterne.
Plate ID (Plade-id):	Valgfrit: Angiv id'et for PyroMark Q24-pladen.
Bar code (Stregkode):	Valgfrit: Angiv et stregkodennummer for pladen. Hvis der er en stregkodelæser tilsluttet computeren, kan du også placere markøren i feltet "Barcode" (Stregkode) ved at klikke i feltet og herefter scanne stregkoden.
Kit and Reagent ID (Kit og reagens-id):	Valgfrit: Angiv lotnummeret for det <i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit, der skal bruges. Lotnummeret fremgår af etiketten på produktet. Bemærk: Vi anbefaler at angive både reagens-id og kit-id, så eventuelle uventede problemer med reagenserne kan spores.
Run note (Kørselsbemærkning):	Valgfrit: Angiv en bemærkning om indholdet af eller formålet med kørslen.

Tilføj analysefiler

En analyse kan føjes til en brønd på en af følgende måder:

- Højreklik på brønden, og vælg "Load Assay" (Indlæs analyse) i genvejsmenuen
- Marker analysen i genvejsbrowseren, klik på den, og træk den til brønden.

En brønd har farve efter den analyse, der er anbragt i brønden.

Angiv prøve-id'er og bemærkninger

Der kan angives prøve-id'er eller bemærkninger ved at vælge den pågældende celle og indtaste teksten.

Eksisterende prøve-id'er eller bemærkninger kan redigeres ved at markere cellen (det aktuelle indhold markeres) eller dobbeltklikke på cellen.

Protokol 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i *therascreen* EGFR Pyro-kit

Denne protokol er til fire separate PCR-amplifikationer af regioner, der indeholder codon 719 (exon 18), codon 768 og 790 (exon 20), codon 858–861 (exon 21) eller sletninger og komplekse mutationer i exon 19 ved hjælp af *therascreen* EGFR Pyro-primere.

Vigtige anvisninger før start

- HotStarTaq[®] DNA-polymerasen i PyroMark-masterblandingen kræver et aktiveringstrin på **15 minutter ved 95 °C**.
- Alle reaktionsblandinger skal klargøres i et område, som er adskilt fra det område, der bruges til DNA-oprensning, tilføjelse af skabelon-DNA i PCR, PCR-produktanalyse eller klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse.
- Brug engangspidser med hydrofobiske filtre for at minimere krydskontaminering.

Ting, der skal gøres før start

- Inden rørene med PCR-primere åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- Juster evt. koncentrationen af kontrollen og prøve-DNA'et til 0,4–2 ng/μl.

Procedure

1. Optø alle nødvendige reagenser (se tabel 3).

Bland dem godt inden brug.

2. Klargør en reaktionsblanding for hvert PCR-primersæt i henhold til tabel 3.

Reaktionsblandingen indeholder som regel alle de komponenter, der er nødvendige ved PCR, undtagen prøven.

Klargør en større mængde reaktionsblanding end den, der er nødvendig for det samlede antal PCR-analyser, som skal udføres.

Tabel 3. Klargøring af reaktionsblanding til hver PCR-primerblanding

Komponent	Volumen/reaktion (µl)
PyroMark PCR-masterblanding, 2x	12,5
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5
PCR-primer EGFR 719 eller PCR-primer EGFR Ex19 Del eller PCR-primer EGFR 768 og 790 eller PCR-primer EGFR 858–861	1,0
Vand (H ₂ O, medfølgende)	4,0
Volumen i alt	20,0

3. Bland reaktionsblandingen grundigt, og dispenser 20 µl i hvert PCR-rør.

Det er ikke nødvendigt at opbevare PCR-rørene på is, da HotStarTaq-DNA-polymerasen er inaktiv ved stuetemperatur.

4. Tilføj 5 µl skabelon-DNA (2–10 ng genomisk DNA) i de enkelte PCR-rør (se tabel 4), og bland grundigt.

Bemærk: En negativ kontrolprøve (uden skabelon-DNA) skal medtages i PCR-opsætningen af mindst én analyse.

Bemærk: Medtag en prøve med umethyleret kontrol-DNA for hver analyse i hver enkelt pyrosekventeringskørsel (se "Kontroller", side 7).

Tabel 4. Klargøring af PCR

Komponent	Volumen/reaktion (µl)
Reaktionsblanding	20
Prøve-DNA	5
Volumen i alt	25

5. Programmér termocyklere i henhold til producentens instruktioner og de betingelser, der er skitseret i tabel 5.

Tabel 5. Optimeret cyklusprotokol

			Kommentarer
Første aktiveringstrin:	15 minutter	95 °C	HotStarTaq-DNA-polymerasen aktiveres med dette opvarmningstrin.
3-trinscyklus:			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Afhærdning	30 sekunder	53 °C	
Udvidelse	20 sekunder	72 °C	
Antal cyklusser	42		
Endelig udvidelse:	5 minutter	72 °C	

- 6. Anbring PCR-rørene i termocykleren, og start cyklusprogrammet.**
- 7. Efter forstærkning skal der fortsættes med "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 21.**

Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler

Denne protokol er til immobilisering af skabelon-DNA på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler (GE Healthcare) inden analyse på PyroMark Q24-systemet.

Ting, der skal gøres før start

- Lad de påkrævede reagenser og opløsninger nå stuetemperatur (15–25 °C) inden start.

Procedure

1. Ryst forsigtigt flasken med Streptavidin Sepharose High Performance fra side til side, til der opnås en homogen opløsning.
2. Klargør en masterblanding til DNA-immobilisering i henhold til tabel 6. Klargør et 10 % større volumen end det, der er nødvendigt for det samlede antal reaktioner, som skal udføres.

Tabel 6. Masterblanding til DNA-immobilisering

Komponent	Volumen/prøve (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark-bindingsbuffer	40
Vand (H ₂ O, medfølgende)	28
Volumen i alt	70

3. Tilsæt 70 µl masterblanding i brøndene på en PCR-plade eller strip med 24 brønde, som dette er defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15).
4. Tilsæt 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokol 2 i hver brønd med masterblanding, som dette er defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15).

Bemærk: Det samlede volumen pr. brønd skal være 80 µl efter tilsætning af masterblanding og PCR-produkt.

5. Forseg PCR-pladen (eller strips) med strip-hætter.

Bemærk: Kontrollér, at der ikke er risiko for lækage mellem brøndene.

- 6. Ryst PCR-pladen ved stuetemperatur (15–25 °C) i 5-10 minutter ved 1.400 o/min.**

Bemærk: Under dette trin skal PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen klargøres til prøveforberedelse som beskrevet i *PyroMark Q24 User Manual*.

- 7. Fortsæt straks til "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24", side 23.**

Bemærk: Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Opfangning af kuglerne skal ske umiddelbart efter omrystning.

Hvis der er gået mere end 1 minut, siden pladen (eller strips) blev rystet, rystes igen i 1 minut, før kuglerne opfanges.

Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24

Denne protokol er til klargøring af enkeltstrenget DNA og afhærdning af sekvenseringsprimeren til skabelonen inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24.

Vigtige anvisninger før start

- Inden rørene med sekvenseringsprimere åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- De 5 forskellige sekvenseringsprimere skal tilsættes i det mønster, der er defineret for pladen under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15), afhængigt af analyseregionen (codon 719 [exon 18], codon 768 og 790 [exon 20], codon 858–861 [exon 21] eller exon 19).
- Rutediagrammet er ændret en smule i forhold til revision R1 af *therascreen* EGFR Pyro Kit-håndbogen (trin 18). Undgå at afkorte nedkølingstiden efter opvarmning af prøverne til 80 °C.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i PyroMark Q24-håndbogen med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, når det er påkrævet.

Ting, der skal gøres før start

- Anbring én PyroMark Q24-pladeholder på en forvarmet varmeblok ved 80 °C til brug i trin 17. Lad en anden PyroMark Q24-pladeholder stå ved stuetemperatur (15–25 °C) til brug i trin 18.
- PyroMark-vaskebufferen leveres som 10x-koncentrat. Inden den bruges for første gang, skal den fortyndes til 1x-arbejdsløsning ved at tilsætte 225 ml rektificeret vand i 25 ml 10x PyroMark-vaskebuffer (endeligt volumen på 250 ml).

Bemærk: 1x PyroMark-vaskebufferopløsningen er stabil ved 2–8 °C indtil den anførte udløbsdato.

Procedure

1. **Fortynd en tilstrækkelig mængde sekvenseringsprimer (sekvenseringsprimer EGFR 719, sekvenseringsprimer EGFR 768, sekvenseringsprimer EGFR 790, sekvenseringsprimer EGFR 858–861 og sekvenseringsprimer EGFR Exon 19 Del) i PyroMark-afhærdningsbuffer som vist i tabel 7.**

Klargør et større volumen fortyndet sekvenseringsprimer end det, der skal bruges til det samlede antal prøver, som skal sekvenseres (antallet af prøver + én ekstra).

Tabel 7. Eksempel på fortynding af sekvenseringsprimere

Komponent	Volumen/prøve (μl)	Volumen til 9 + 1 reaktioner (μl)
Sekvenseringsprimer EGFR 719 eller Sekvenseringsprimer EGFR Ex 19 Del eller Sekvenseringsprimer EGFR 768 eller Sekvenseringsprimer EGFR 790 eller Sekvenseringsprimer EGFR 858–861	0,8	8
PyroMark- afhærdningsbuffer	24,2	242
Volumen i alt	25	250

- 2. Tilsæt 25 μ l fortyndet sekvenseringsprimer i hver brønd på PyroMark Q24-pladen i henhold til kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15).**

Bemærk: Lad én af PyroMark Q24-pladeholderne (leveres med PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen) være ved stuetemperatur (15–25 °C), og brug den som underlag under klargøring og flytning af pladen.

- 3. Anbring PCR-pladen (eller strips) fra protokol 3 og PyroMark Q24-pladen på arbejdsbordet (figur 2).**

Bemærk: Kontroller, at pladen vender samme vej, som da prøverne blev isat.



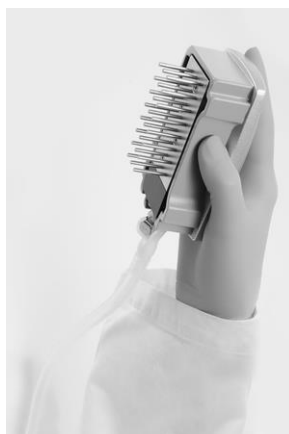
Figur 2. Placering af PCR-plade (eller strips) og PyroMark Q24-plade på vakuumarbejdsstationen.

4. Sæt vakuum på værktøjet ved at tænde for vakuum.
5. Sænk forsigtigt filterproberne på vakuumværktøjet ned i PCR-pladen (eller strips) for at opfange kuglerne, der indeholder immobiliseret skabelon. Hold proberne på plads i 15 sekunder. Vær forsigtig, når vakuumværktøjet samles op.

Bemærk: Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Opfangning af kuglerne skal ske umiddelbart efter omrystning.

Hvis der er gået mere end 1 minut, siden pladen (eller strips) blev rystet, rystes igen i 1 minut, før kuglerne opfanges.

6. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 40 ml 70 % ethanol (figur 2). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
7. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 40 ml denatureringsopløsning (figur 2). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
8. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 50 ml vaskebuffer (figur 2). Skyl filterproberne i 10 sekunder.
9. Løft vakuumværktøjet op og tilbage over 90° lodret i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (figur 3).



Figur 3. Illustration af vakuumpærktøjet løftet til over 90° lodret.

10. Hold vakuumpærktøjet over PyroMark Q24-pladen, og sluk for vakuumpæktakten på værktøjet (Off).
11. Frigør kuglerne i PyroMark Q24-pladen ved at sænke filterproberne ned i den fortyndede sekventeringsprimer og bevæge værktøjet forsigtigt fra side til side.
Bemærk: Pas på ikke at beskadige overfladen på PyroMark Q24-pladen ved at ridse den med filterproberne.
12. Overfør vakuumpærktøjet til beholderen med rektificeret vand (figur 2), og ryst det i 10 sekunder.
13. Vask filterproberne ved at sænke proberne ned i rektificeret vand (figur 2) og sætte vakuumpæ på. Skyl filterproberne med 70 ml rektificeret vand.
14. Løft vakuumpærktøjet op og tilbage over 90° lodret i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (figur 3).
15. Luk vakuumpæktakten på værktøjet (Off), og sæt vakuumpærktøjet i parkeringsstilling (P).
16. Sluk for vakuumpumpen.
Bemærk: Når arbejdsdagen er slut, skal flydende affald og eventuelle resterende opløsninger kasseres, og PyroMark Q24-vakuumpæarbejdsstationen skal kontrolleres for støv og spild. Se bilag B, side 60).
17. Opvarm PyroMark Q24-pladen med prøverne ved 80 °C i 2 minutter ved hjælp af den foropvarmede PyroMark Q24-pladeholder.
18. Fjern PyroMark Q24-pladen fra den varme pladeholder, og anbring den på den anden PyroMark Q24-pladeholder, som blev opbevaret ved stuetemperatur (15–25 °C), for at lade prøverne køle af til stuetemperatur i 10–15 minutter.
19. Fortsæt med "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 27.

Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet

Denne protokol beskriver klargøring og isætning af PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-beholderen samt start og afslutning af en kørsel på PyroMark Q24. Detaljeret information om opsætning af en kørsel findes i *PyroMark Q24 User Manual*.

Vigtig anvisning før start

- Rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), der findes i menuen "Tools" (Funktioner; se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15), indeholder information om den mængde nucleotider samt de enzym- og substratbufferne, som er nødvendige til en bestemt kørsel.

Ting, der skal gøres før start

- Tænd for PyroMark Q24. Tænd/sluk-knappen er placeret bag på instrumentet.

Procedure

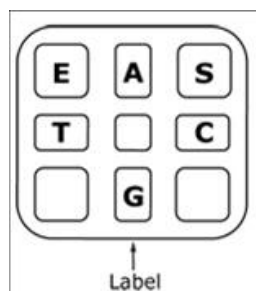
1. **Opløs hver af de frysetørrede enzym- og substratblandinger i 620 μ l vand (H_2O , medfølger).**
2. **Bland ved at slynge hætteglasset forsigtigt rundt.**

Bemærk: Må ikke vortexes!

Bemærk: For at sikre, at blandingen er helt opløst, skal den stå ved stuetemperatur (15–25 °C) i 5–10 minutter. Sørg for, at opløsningen ikke er uklar, før PyroMark Q24-beholderen fyldes op. Hvis reagenserne ikke skal bruges med det samme, skal reagenshætteglassene lægges på is* eller sættes i køleskab.

3. **Lad reagenserne og PyroMark Q24-beholderen nå stuetemperatur (20–25 °C).**
4. **Anbring PyroMark Q24-beholderen, så etiketten vender ind mod dig.**
5. **Isæt PyroMark Q24-beholderen med de korrekte mængder nucleotider samt enzym- og substratblandinger som vist i figur 4.**
Sørg for, at der ikke overføres nogen luftbobler fra pipetten til beholderen.

* Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.



Figur 4. Illustration af PyroMark Q24-beholderen set oppefra. Forklaringerne svarer til etiketten på reagenshætteglassene. Tilføj enzymblanding (**E**), substratblanding (**S**) og nucleotider (**A**, **T**, **C**, **G**) i overensstemmelse med den volumeninformation, der er oplyst i rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), som findes i menuen "Tools" (Funktioner) ved kørselsopsætningen.

6. **Åbn beholderåbningen, og isæt den fyldte reagensbeholder. Etiketten skal vende udad. Skub beholderen helt ind, og tryk den derefter nedad.**
7. **Kontrollér, at linjen er synlig foran beholderen, og luk lågen.**
8. **Åbn pladeholderrammen, og sæt pladen på varmeblokken.**
9. **Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**
10. **Sæt USB-nøglen (med kørselsfilen) i USB-porten på instrumentets forside.**
Bemærk: Tag ikke USB-nøglen ud, før kørslen er afsluttet.
11. **Vælg "Run" (Kør) i hovedmenuen (ved hjælp af skærmknapperne ▲ og ▼) og tryk på "OK".**
12. **Vælg kørselsfilen ved hjælp af skærmknapperne ▲ og ▼.**
Bemærk: For at se indholdet af en mappe markeres mappen, og der trykkes på "Select" (Vælg). For at vende tilbage til det foregående billede trykkes på "Back" (Tilbage).
13. **Når kørselsfilen er valgt, trykkes på "Select" (Vælg) for at starte kørslen.**
14. **Når kørslen er afsluttet, og instrumentet bekræfter, at kørselsfilen er gemt på USB-nøglen, trykkes på "Close" (Luk).**
15. **Fjern USB-nøglen.**
16. **Åbn instrumentlåget.**
17. **Åbn beholderåbningen, og tag reagensbeholderen ud ved at løfte den op og trække den ud.**
18. **Luk lemmen.**
19. **Åbn den ramme, der holder pladen, og tag pladen ud fra varmeblokken.**
20. **Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**
21. **Kassér pladen, og rengør beholderen i henhold til instruktionerne i produktarket til beholderen.**

22. Analysér kørslen i henhold til "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel", side 30.

Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel

Denne protokol beskriver mutationsanalyse for en afsluttet EGFR-kørsel ved hjælp af PyroMark Q24-software.

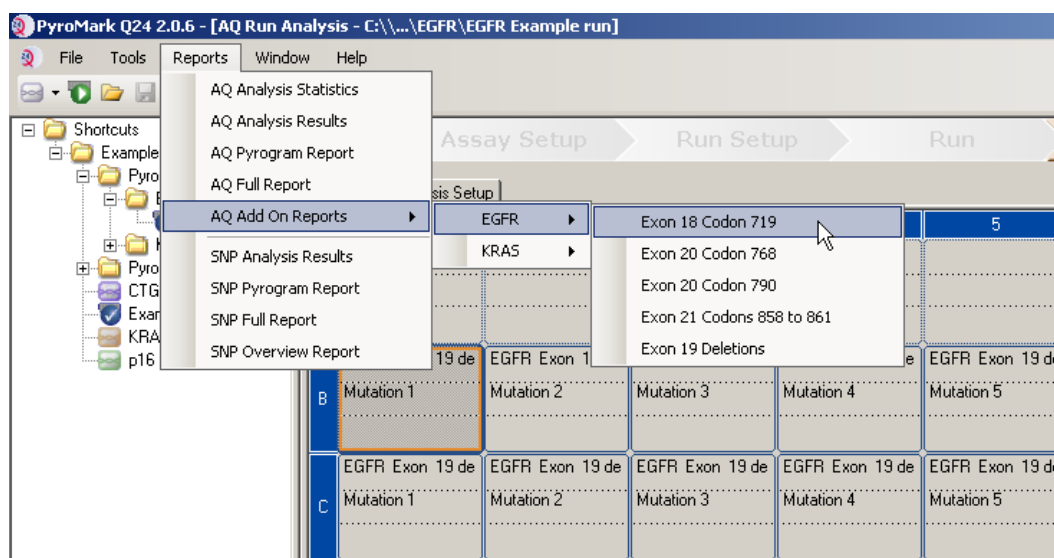
Procedure

1. Sæt USB-nøglen med den behandlede kørselsfil i USB-porten på computeren.
2. Flyt kørselsfilen fra USB-nøglen til den ønskede placering på computeren ved hjælp af Windows Stifinder.
3. Åbn kørselsfilen i AQ-tilstand i PyroMark Q24-softwaren ved enten at vælge "Open" (Åbn) i menuen "File" (Filer) eller dobbeltklikke på filen (✓) i genvejsbrowseren.
4. Der findes 2 metoder til analyse af kørslen. Hvis der skal bruges EGFR Plug-in Report, skal du gå til trin 5. Hvis der skal bruges den integrerede AQ-analyse i PyroMark Q24-systemet, skal du gå til trin 6.

Bemærk: Vi anbefaler på det kraftigste, at man bruger EGFR Plug-in'en Report til fortolkning af resultaterne. EGFR Plug-in'en Report fås ved henvendelse via e-mail til pyro.plugin@qiagen.com. Denne rapport sikrer, at de respektive LOD-værdier og forskellige "Sequences to Analyze" (Sekvenser, der skal analyseres) bruges til automatisk at påvise alle mutationer og sletninger, herunder identifikation af 20 forskellige sletninger og komplekse mutationer i exon 19.

5. Sådan bruges EGFR Plug-in Report:

SVælg "AQ Add On Reports/EGFR" (AQ-tilføjelsesrapporter/EGFR) og "Exon 18 Codon 719" eller "Exon 19 Deletions" (Exon 19-sletninger) eller "Exon 20 Codon 790" eller "Exon 21 Codon 858 to 961" under "Reports" (Rapporter) i menuen (figur 5).



Figur 5. Skærmen AQ Run Analysis (AQ-kørselsanalyse).

Brøndene analyseres automatisk for samtlige mutationer, hvor der er angivet en LOD i tabel 8. Resultaterne præsenteres i en oversigtstabel (figur 6) efterfulgt af de detaljerede resultater, som inkluderer pyrogrammer og analysekvalitet.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	del E746-A750	
A2	B105072	Wildtype			
A3	B116390	Mutation	26.6	delL747-P753insS	
A4	B116389	Wildtype			
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	delK745-E749	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	del E746-A750	
A7	WT control	Wildtype			
A8	NTC	Failed Analysis			⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

Figur 6. Tabellen med resultatoversigt.

6. Sådan bruges AQ-analysen:

Klik på en af analyseknapperne for at analysere EGFR-kørslen og få et overblik over resultaterne.



Analysér alle brønde.



Analysér den markerede brønd.

Analyseresultaterne (allelfrekvenser) og kvalitetsvurderingen vises over den variable position i Pyrogram[®]-sporingen. Yderligere oplysninger om analyse af en kørsel findes i *PyroMark Q24 User Manual*.

Vælg "AQ Full Report" (Fuld AQ-rapport) eller "AQ Analysis Results" (AQ-analyseresultater) i menuen "Reports" (Rapporter) for at oprette en rapport.

Bemærk: "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) som defineret i analyseopsætningen fokuserer som standard på de oftest forekommende mutationer i codon 719, 768, 790, 858 og 861 og den oftest forekommende sletning i exon 19 (se bilag A, side 55). Hvis en prøve indeholder en sjældnere forekommende mutation, kan "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) ændres, så mutationsstatus også analyseres ved denne position som beskrevet i bilag A.

Opdaterede hyppigheder for mutationer i det humane EGFR-gen er gjort tilgængelige online af Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Bemærk: For at opnå pålidelige resultater, anbefaler vi enkelte spidshøjder på over 20 RLU for codon 768-analyse og over 30 RLU for de resterende fire analyser. Indstil henholdsvis 20 eller 30 RLU som "Required peak height for passed quality" (Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) under analyseopsætningen (se PyroMark Q24-håndbogen og bilag A).

Bemærk: For at sikre korrekt kvantificering for codon 719 og codon 790 skal histogramøjernes højde justeres under analyseopsætningen (se bilag A, side 55).

Bemærk: Brug rapporten "AQ Analysis Results" (AQ-analyseresultater) til dokumentation og fortolkning af allelekvantificering. De viste antal i pyrogrammet er afrundede og viser ikke den nøjagtige kvantificering.

Bemærk: Pyrogrammet skal altid sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. De målte spidser skal svare til højden af søjlerne i histogrammet.

Ny analyse af prøver, hvor der ikke blev påvist mutationer med standardkvalitetsvurderingen "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) eller med "Check" (Kontrollér) eller "Failed"

Vi anbefaler på det kraftigste, at alle prøver, hvor der ikke blev påvist mutationer med standardindstillingen for "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), samt prøver, hvor kvalitetsvurderingen endte med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt), analyseres igen. Kvalitetsvurderingerne "Check" (Kontrollér) og "Failed" (Ikke godkendt) kan indikere, at der er en mutation i en anden position, som resulterer i uventede referencespidser.

Analysen kan gentages for sjældnere forekommende mutationer ved at gå til "Analysis Setup" (Analyseopsætning) og ændre "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) til varianter, der er beskrevet i bilag A eller

varianter af andre sjældne eller uventede mutationer. Klik på "Apply" (Anvend), og klik derefter på "To All" (På alle), når vinduet "Apply Analysis Setup" (Anvend analyseopsætning) vises.

Bemærk: Sørg for, at tærskelværdien for enkelt spidshøjde og histogram søjlernes højde justeres i overensstemmelse med ændringen efter ændring af "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) (se bilag A, side 55).

Bemærk: Hvis de målte spidser ikke svarer til højden af søjlerne i histogrammet, og dette ikke kan forklares med sjældne eller uventede mutationer, kan resultatet ikke bruges som basis for en vurdering af mutationsstatus. Det anbefales at køre prøven igen.

Fortolkning af resultater

Fortolkning af analyseresultater og påvisning af lavniveau-mutationer

Det anbefales på det kraftigste, at medtage umethyleret kontrol-DNA i hver enkelt kørsel til sammenligning og kontrol af baggrundsniveauer. Den målte hyppighed for kontrolprøven skal være lavere end end lig med tomgrænsen (LOB).

Alle prøver skal undersøges for så vidt angår påvisningsgrænsen (LOD, se tabel 8) og fortolkes som følger.

- Mutationshyppighed $<$ LOD: Vildtype
- Mutationshyppighed \geq LOD og \leq LOD + 3 procentenheder: Potentiel lavniveau-mutation

Bemærk: Hvis der anvendes Plug-in Report (se trin 5 under "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel", side 30), vises der en advarsel, hvis dette sker.

Prøver med en rapporteret potentiel lavniveau-mutation må kun betragtes som positive for mutationen, hvis de kan bekræftes ved at gentage kørslen i duplikeret form sammen med en prøve med umethyleret kontrol-DNA. Resultatet af begge duplikater skal være \geq LOD og forskelligt fra kontrolprøven. I modsat fald skal prøven vurderes som vildtype.

- Mutationshyppighed $>$ LOD + 3 procentenheder: Mutation

Hvis der anvendes EGFR Plug-in Report, gøres dette automatisk.

Bemærk: Det anbefales, at bruge EGFR Plug-in'en Report til fortolkning af resultaterne. Med henblik på en nærmere undersøgelse af prøver med en rapporteret, potentiel lavniveau-mutation, anbefaler vi, at prøven yderligere analyseres manuelt i applikationens software (f.eks. for at sammenligne med kontrolprøvens mutationshyppighed).

Bemærk: En målt hyppighed over LOB i kontrolprøven antyder et højere baggrundsniveau end normalt i den pågældende kørsel, hvilket kan påvirke allelekvantificeringen især i tilfælde af lave mutationsniveauer. I dette tilfælde må de målte hyppigheder i området fra LOD (tabel 8) til LOD + 3 procentenheder ikke anvendes som grundlag for vurderingen af mutationsstatus. Det anbefales et køre prøver med en potentiel lavniveau-mutation igen.

Bemærk: Beslutninger om behandling af cancerpatienter må aldrig baseres udelukkende på EGFR-mutationsstatus.

Tabel 8. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer

Mutation	Aminosyre-substitution	LOB (procentenheder)	LOD (procentenheder)	COSMIC-id* (V47)
Sletninger af Exon 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online hos Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] LOD for disse sletninger i exon 19 blev bestemt ved at lægge seks standardafvigelse af tomme målinger til LOB-værdien.

Tabellen fortsættes på næste side

Tabel 8. Fortsat

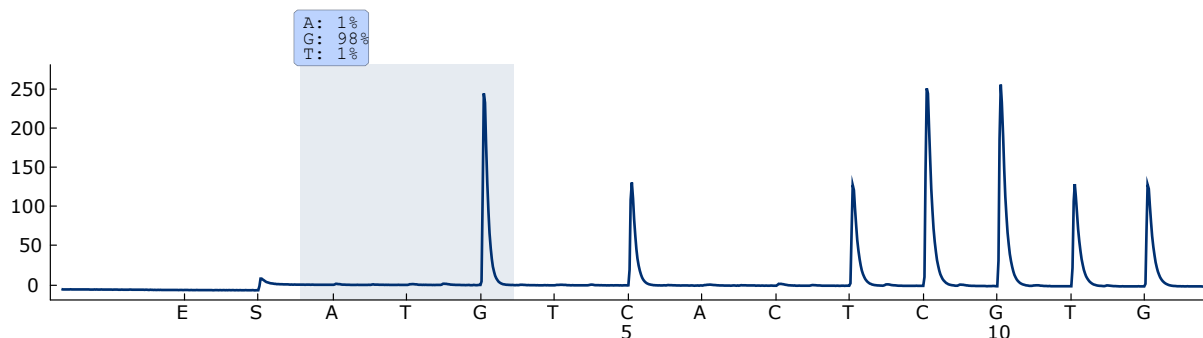
Mutation	Aminosyre- substitution	LOB (procenten- heder)	LOD (procenten- heder)	COSMIC- id* (V47)
Exon 18 codon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Exon 20 codon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Exon 20 codon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Exon 21 codon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Exon 21 codon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online hos Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

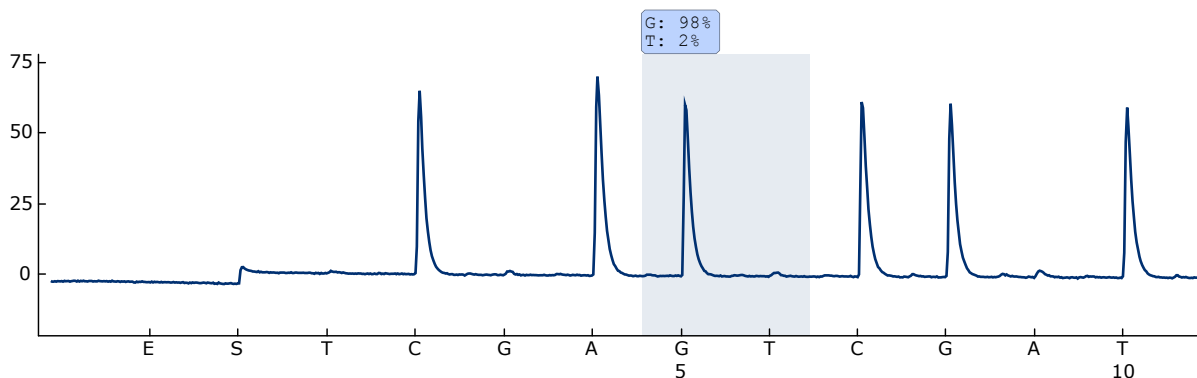
[‡] Laveste mutationsniveau i en prøve, der resulterer i en målt hyppighed \geq LOD.

Repræsentative resultater

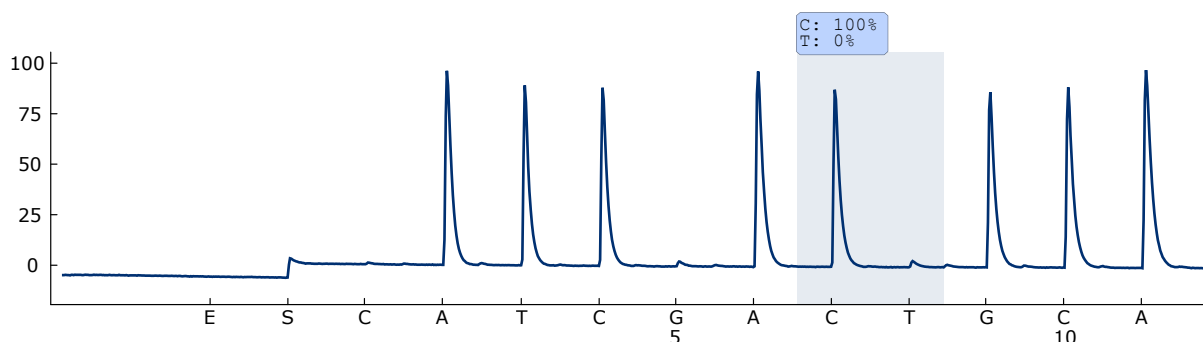
Figur 7–14 viser repræsentative pyrogramresultater.



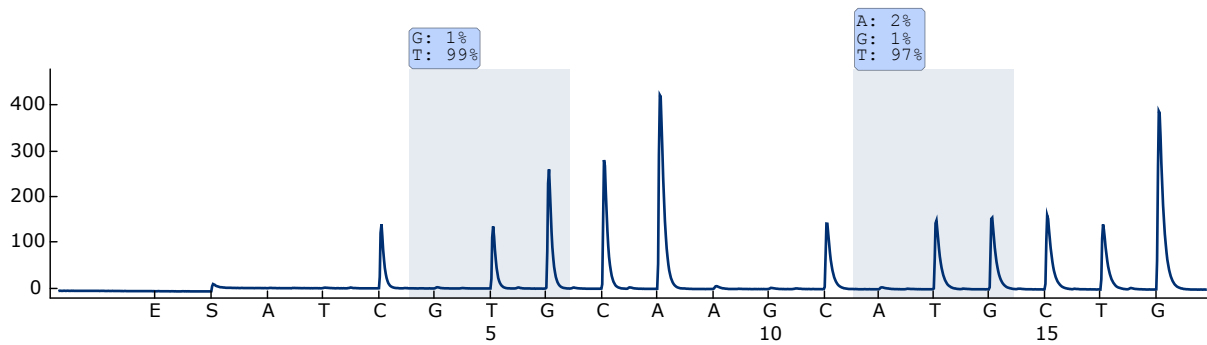
Figur 7. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype genotype i codon 719 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) DGCTCCGGTGC.



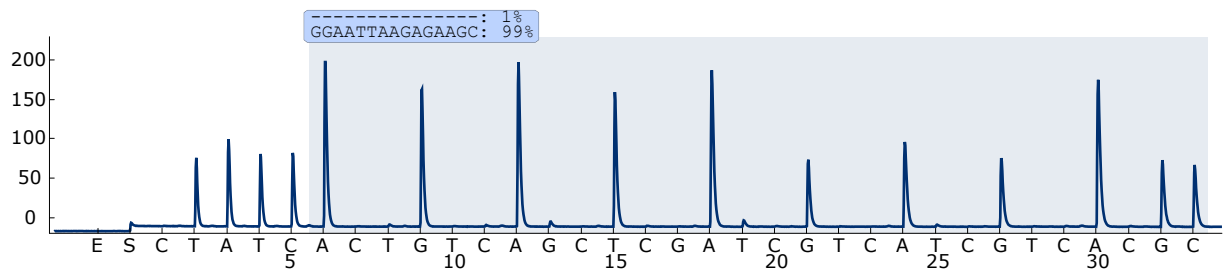
Figur 8. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype genotype i codon 768 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) CAKCGTG.



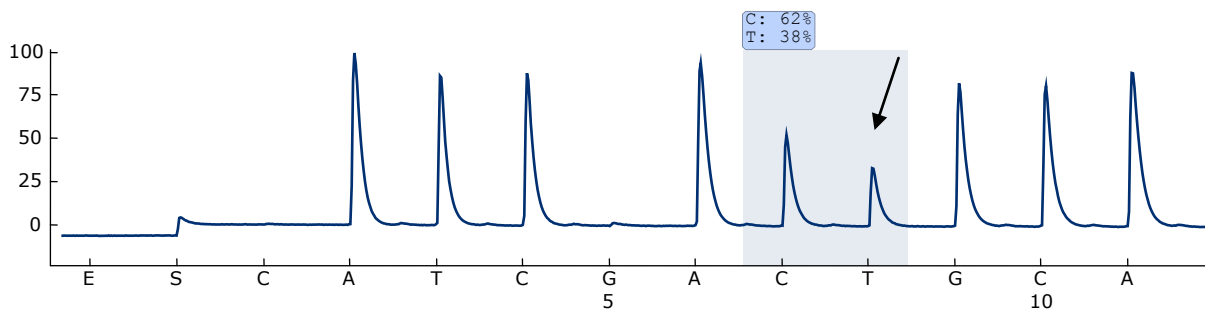
Figur 9. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype genotype i codon 790 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) ATCAYGCAG.



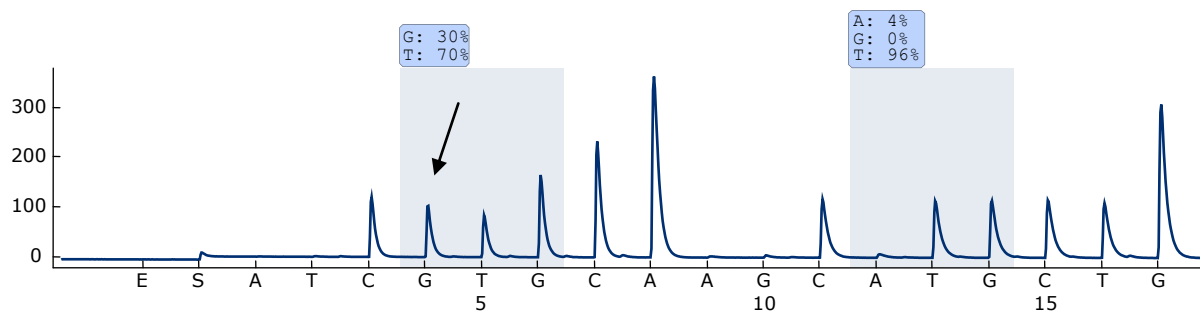
Figur 10. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype genotype i codon 858–861 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) CKGGCCAAACDGCTGGGT.



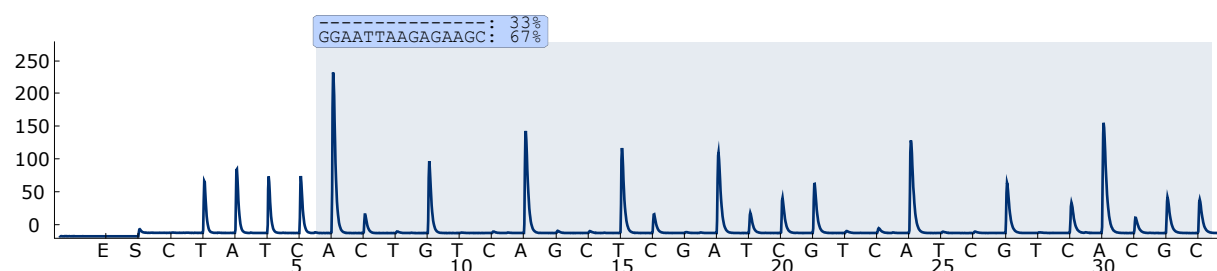
Figur 11. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype genotype i exon 19.



Figur 12. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en GGT → ATG-mutation i base 2 i codon 790 (angivet med en pil).



Figur 13. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en CTG → CGG-mutation i base 2 i codon 858 (angivet med en pil).



Figur 14. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en 2235del15-sletning i exon 19.

Fejludbedringsvejledning

Denne fejlfindingsguide kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vores Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Bemærk: Se *PyroMark Q24 User Manual* for at få en generel fejlfindingsguide for instrumentet.

Kommentarer og forslag

Der er signaler i kontrollen uden skabelon-DNA (negativ kontrol)

- | | |
|----------------------------|--|
| a) Krydstale mellem brønde | Signalet fra én brønd blev påvist i en brønd ved siden af. Undgå at placere prøver med høje signalintensiteter tæt på kontrolbrønde uden skabelon-DNA. |
|----------------------------|--|

Kommentarer og forslag

- b) PCR-kontaminering Brug sterile pipettespidser med filtre. Materialer som prøver, kontroller og amplikoner skal opbevares og ekstraheres separat fra PCR-reagenserne.

Der blev påvist en dårlig eller uventet sekvens

- a) Genomisk DNA af lav kvalitet Genomisk DNA af lav kvalitet kan få PCR til at mislykkes. Analysér PCR-prøverne ved hjælp af en elektroforeseteknik (f.eks. QIAxcel[®]-systemet eller agarose-gel-elektroforese).

Resultatet var "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt)

- a) Lav spidshøjde Håndteringsfejl under PCR-opsætningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekventering kan resultere i lave spidser. Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i PyroMark Q24-håndbogen med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, når det er påkrævet.
- I tilfælde af en "Check"-advarsel skal pyrogrammet omhyggeligt sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. Hvis de målte spidser svarer til højden på søjlerne i histogrammet, er resultatet gyldigt. I modsat fald anbefales det at køre prøven igen.
- b) Mutation ikke defineret i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres): Juster den sekvens, der skal analyseres, i analyseopsætningen (se bilag A, side 55), og analysér kørslen igen.
- c) Uventet, sjælden mutation Hvis kvalitetsvurderingen ender med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt), kan det skyldes et uventet spidsmønster. Dette kan indikere en uventet mutation, der ikke analyseres med den angivne "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres). Sådanne prøver bør analyseres manuelt ved hjælp af den alternative "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) med hensyntagen til uventede mutationer.

Kommentarer og forslag

- d) Advarsel om store afvigelser af spidshøjder ved dispensering x
Pyrogrammet skal omhyggeligt sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. I tilfælde af at de målte spidser ikke svarer til højden af søjlerne i histogrammet, og dette ikke kan forklares med sjældne mutationer, anbefales det at køre prøven igen.
- e) Advarslen "Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8" (Usikker/mislykket på grund af store afvigelser af spidshøjder ved dispensering: 8) vises i codon 790-analysen.
Baggrundsstøj ved dispensering T8 er under det forventede niveau. Justér histogramsøjleens højde til standardværdien (1,00, kan kun gøres ved brug af det integrerede analyseværktøj i PyroMark Q24-softwaren).
- f) Advarslen "Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10" (Usikker/mislykket på grund af store afvigelser af spidshøjder ved dispensering: 10) vises i codon 858–861-analysen.
En højniveau CTG>CGG-mutation i codon 858 (L858R) kan resultere i forøget baggrund i dispensationerne G-10 og A-12, og en hyppighed over LOD for mutationen ATG>CAG i codon 861 (L861Q). I dette tilfælde er det kun den rapporterede L585R-mutation, der er gyldig, og der kan ses bort fra advarslen og "Check" kvaliteten.
Bemærk: EGFR Plug-in'en Report rapporterer kun én mutation (dvs. mutationen med den højeste hyppighed).
- g) Advarslen "Uncertain due to high peak height deviation at dispensation: 23." (Usikker på grund af store afvigelser af spidshøjder ved dispensering: 23) vises, når sletningen 2235del15 rapporteres.
En højniveau 2235del15-sletning kan resultere i denne advarsel. I dette tilfælde er den rapporterede mutation gyldig, og der kan ses bort fra advarslen og "Check" kvaliteten.

Kommentarer og forslag

Høj baggrund

- | | |
|--|---|
| a) Nucleotider opbevaret forkert | Nucleotider skal opbevares ved 2–8 °C. Opbevaring ved –15 til –25 °C kan give anledning til en forøgelse af baggrunden. |
| b) Kort afkølingstid for prøver forud for pyrosekventeringsanalyse | Lad prøverne stå på en PyroMark Q24-pladeholder ved stuetemperatur i 10–15 minutter. Undgå at afkorte nedkølingstiden. |
| c) Kontaminering af beholder | Sørg for at gøre beholderen grundigt ren som beskrevet i produktarket. Opbevar beholderen beskyttet mod lys og støv. |

Der er ingen signaler i den positive kontrol (umethyleret kontrol-DNA)

- | | |
|---|---|
| a) Utilstrækkelig enzym- eller substratblanding i alle brønde | PyroMark Q24-beholderen skal fyldes i henhold til "Pre Run Information" (Information før kørsel) i menuen "Tools" (Funktioner). |
| b) Reagenser opbevaret eller fortyndet forkert | Klargør <i>therascreen</i> -reagenserne i overensstemmelse med instruktionerne i "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 27. |
| c) Mislykket PCR eller prøveklargøring | Håndteringsfejl under PCR-opsætningen, programmering af PCR-cyklusanordningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekventering kan resultere i manglende signal. Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i PyroMark Q24-håndbogen, og udskift filterproberne, når det er påkrævet. Gentag PCR og pyrosekventeringsanalysen. |

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *therascreen* EGFR Pyro-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af QIAGENS ydelsesundersøgelser.

Brugsegenskaber

Tomgrænse og påvisningsgrænse

Tomgrænsen (LOB) og påvisningsgrænsen (LOD) er fastlagt for en række mutationer ved hjælp af blandinger af plasmider (tabel 9). LOB og LOD er fastlagt i henhold til anbefalingerne i CLSI's (Clinical and Laboratory Standards Institute) retningslinje EP17A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". α - og β -fejl (hhv. falsk-positiv- og falsk-negativ-fejl) blev indstillet til 5 %. LOD for visse sjældne sletninger i exon 19 blev bestemt ved at lægge seks standardafvigelse af tomme målinger til LOB-værdien.

LOB-værdierne repræsenterer den målte hyppighed, der opnås med en vildtypeprøve. LOD-værdierne repræsenterer det laveste signal (målt hyppighed), der kan betragtes som positivt for den pågældende mutation.

Mutationen CTG → CGG i codon 858

For mutationen CTG → CGG i codon 858 havde målingerne af prøver med lave mutationsniveauer en ikke-gaussiansk fordeling. LOD blev derfor fastlagt ved hjælp af en anden metode i henhold til anbefalingerne i CLSI's retningslinje EP17-A. Det laveste signal, der indikerer tilstedeværelsen af en mutation (LOD) i denne position, blev angivet til 2 procentenheder over det respektive baseline-niveau som defineret af 95-percentilen for tomme målinger. Under analyse af en prøve med et mutationsniveau på 5,5 % gav 95 % af resultaterne (n = 72) et signal, der kan betragtes som positivt (\geq LOD, dvs. $\geq 2,6$ procentenheder).

Tabel 9. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer

Mutation	Aminosyre-substitution	LOB (procentenheder)	LOD (procentenheder)	COSMIC-id* (V47)
Sletninger af Exon 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online hos Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] LOD for disse sletninger i exon 19 blev bestemt ved at lægge seks standardafvigelse af tomme målinger til LOB-værdien.

Tabellen fortsættes på næste side

Table 9. Fortsat

Mutation	Aminosyre- substitution	LOB (procenten- heder)	LOD (procenten- heder)	COSMIC- id* (V47)
Exon 18 codon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Exon 20 codon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Exon 20 codon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Exon 21 codon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Exon 21 codon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online hos Sanger Institutes websted på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[‡] Laveste mutationsniveau i en prøve, der resulterer i en målt hyppighed \geq LOD.

Bemærk: Disse værdier er baseret på kørsler, hvor blandinger af plasmider, der bærer vildtype- eller den respektive mutantsekvens, blev brugt som skabelon til PCR-amplifikation.

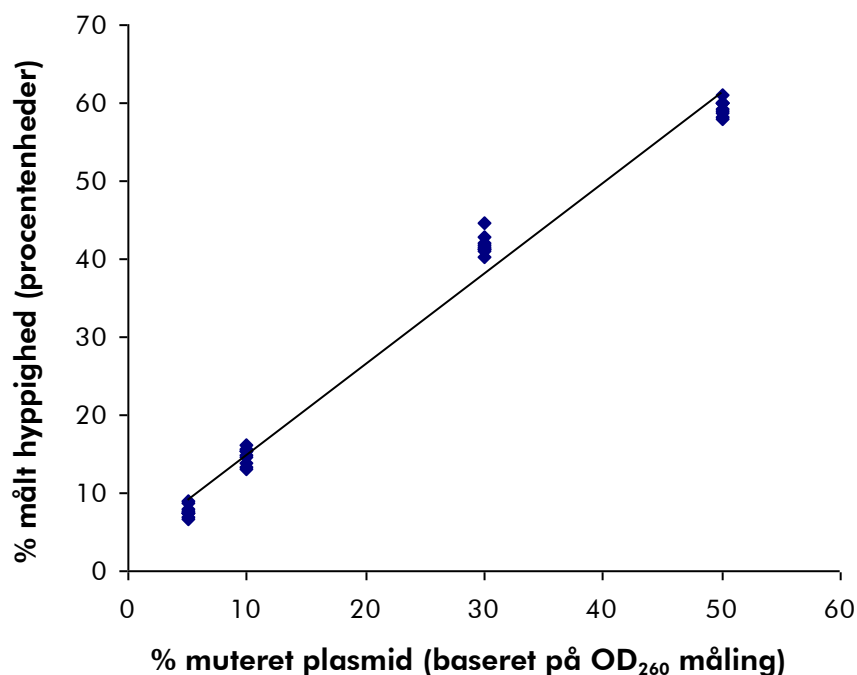
Bemærk: Det anbefales, at metodens egnethed bekræftes i laboratoriet.

Linearitet

Lineariteten blev bestemt ved hjælp af blandinger af plasmider, der bærer vildtype- eller mutantsekvensen for mutationerne GGC>AGC i codon 719, ACG>ATG i codon 790, CTG>CGG i codon 858 og sletningerne 2235del15 og 2236del15 i exon 19. Disse plasmider blev blandet i forhold, der gav fire mutationsniveauer (5, 10, 30 og 50 %). Hver af blandingerne blev analyseret med tre forskellige lot af *therascreen* EGFR Pyro-kittet i tre pyrosekventeringskørsler hver med tre replikater.

Resultaterne (n=9 for hvert mutationsniveau) blev analyseret i henhold til CLSI's retningslinje EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" ved hjælp af softwaren Analyse-it® v2.21 og vises i figur 15 for sletningen 2235del15 i exon 19.

Resultaterne var lineære inden for en tilladt nonlinearitet på 5 procentenheder over analyseområdet for mutationsniveauet fra 5 til 50 %. Lignende resultater blev opnået for mutationerne GGC>AGC i codon 719, ACG>ATG i codon 790, CTG>CGG i codon 858 og sletningen 2236del15 i exon 19.



Figur 15. Linearitet for sletning 2235del15 i exon 19.

Præcision

Data for præcision gør det muligt at bestemme analysernes samlede variabilitet, og blev opnået på tre forskellige niveauer ved at analysere ovennævnte plasmidblandinger hver med tre replikater.

Repetérbarhed (variabilitet inden for samme analyse og mellem batches) blev beregnet på basis af data til bestemmelse af linearitet (tre kørsler på samme dag med forskellige lot af *therascreen* EGFR Pyro-kit). Laboratorienøjagtighed (variabilitet inden for samme laboratorium) blev bestemt i tre kørsler på ét laboratorium på tre forskellige dage med forskellige operatører, PyroMark Q24-instrumenter og lot af *therascreen* EGFR Pyro-kit. Reproducerbarhed (variabilitet mellem laboratorier) blev beregnet ud fra to kørsler henholdsvis på et internt og et eksternt laboratorium og ved hjælp af forskellige lot af *therascreen* EGFR Pyro-kit.

Den estimerede præcision udtrykkes som standardafvigelse i forhold til den målte mutationshyppighed i procentenheder (tabel 10). Repetérbarhed, laboratorienøjagtighed og reproducerbarhed for sletningen 2235del15 i exon 19 var henholdsvis 0,8–1,2, 0,7–2,9 og 0,7–1,8 procentenheder, over måleområdet for mutationsniveauet fra 5 til 50 %. Lignende resultater blev opnået for mutationerne GGC>AGC i codon 719, ACG>ATG i codon 790, CTG>CGG i codon 858 og sletningen 2236del15 i exon 19.

Tabel 10. Præcision for sletningen 2235del15 i exon 19*

% muteret plasmid [†]	Repetérbarhed		Laboratorienøjagtighed		Reproducerbarhed	
	Gns.	SD	Gns.	SD	Gns.	SD
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

* Alle værdier er anført som procentenheder. SD: Standardafvigelse (n=9).

[†] Baseret på OD₂₆₀ måling.

Diagnostisk evaluering

therascreen EGFR Pyro-kittet blev evalueret i sammenligning med Sanger-sekventering og *therascreen* EGFR RGQ-kittet. DNA blev ekstraheret fra 100 formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) tumorprøver fra ikke-småcellet lungecancer (NSCLC) og analyseret for mutationer i codon 719, 768, 790 og 858–861 og sletninger og komplekse mutationer i exon 19.

DNA blev isoleret ved hjælp af QIAamp DNA FFPE Tissue-kit. Analyserne blev udført med *therascreen* EGFR Pyro-kittet på PyroMark Q24, med *therascreen* EGFR RGQ-kittet på Rotor Gene-Q 5plex HRM series II, og Sanger-sekventering blev udført på ABI® 3130 Genetic Analyzer.

Af de 100 analyserede prøver kunne mutationsstatus bestemmes for alle codons og exon 19 i 97 prøver med alle tre metoder. For to prøver kunne mutationsstatus for codon 768 ikke bestemmes med pyrosekventering, og én prøve mislykkedes for de fleste codons med alle tre metoder, hvilket antydede, at DNA-kvaliteten var for lav til at muliggøre amplifikation.

T790M-resistensmutationen blev påvist i én prøve med alle tre metoder, mens L861Q-mutationen kun blev påvist med pyrosekventering i én prøve. Tretten, tolv og seksten sletninger og komplekse mutationer i exon 19 blev påvist henholdsvis med pyrosekventerings-, Rotor-Gene Q- og Sanger-sekventeringsanalyse. Tre af de exon 19-sletninger, der blev påvist med Sanger-sekventering, kunne ikke reproduceres hverken med pyrosekventering eller med Rotor-Gene Q-analyse. L858R-mutationen blev påvist i tre prøver med alle tre metoder, i to prøver med pyrosekventering og én af de andre metoder, i én prøve kun med pyrosekventering, og i én prøve kun med Rotor-Gene Q-analyse. Resultaterne er opsummeret i tabel 11–14 nedenfor.

Ingen af de tre metoder påviste mutationer i codon 719 og 768 i de 100 prøver.

Når prøver, der mislykkedes i et eller flere metoder udelukkes, viste *therascreen* EGFR Pyro-kittet og Sanger-sekventering en overensstemmelse på henholdsvis 100 %, 98 %, 99 % og 97 % i resultaterne for codon 790, 858, 861 og exon 19, mens *therascreen* EGFR Pyro-kittet og *therascreen* EGFR RGQ-kittet viste en overensstemmelse på henholdsvis 100 %, 97 %, 99 % og 99 % i resultaterne for codon 790, 858, 861 og exon 19 (tabel 11–14).

Tabel 11. Resultater for de analyserede hudtumorprøver for codon 790

		Sanger-sekventering			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	Mutant	1	0	1	2
	Vildtype	0	98	0	98
	Ukendt	0	0	0	0
	I alt	1	98	1	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ-kit			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	Mutant	1	0	1	2
	Vildtype	0	98	0	98
	Ukendt	0	0	0	0
	I alt	1	98	1	100

Table 12. Resulter for de analyserede hudtumorprøver for codon 858

		Sanger-sekventering			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	Mutant	4	2	0	6
	Vildtype	0	93	0	93
	Ukendt	0	0	1	1
	I alt	4	95	1	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ-kit			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	Mutant	4	2	0	6
	Vildtype	1	92	0	93
	Ukendt	0	1	0	1
	I alt	5	95	0	100

Table 13. Resulter for de analyserede hudtumorprøver for codon 861

		Sanger-sekventering			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	Mutant	0	1	0	1
	Vildtype	0	98	0	98
	Ukendt	0	1	0	1
	I alt	0	100	0	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ-kit			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit	Mutant	0	1	0	1
	Vildtype	0	98	0	98
	Ukendt	0	0	1	1
	I alt	0	99	1	100

Table 14. Resulter for de analyserede hudtumoprøver for codon 19

		Sanger-sekventering			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
therascreen EGFR Pyro-kit	Mutant	13	0	0	13
	Vildtype	3	84	0	87
	Ukendt	0	0	0	0
	I alt	16	84	0	100
		therascreen EGFR RGQ-kit			
		Mutant	Vildtype	Ukendt	I alt
therascreen EGFR Pyro-kit	Mutant	12	1	0	13
	Vildtype	0	86	1	87
	Ukendt	0	0	0	0
	I alt	12	87	1	100






Bemærk: I samtlige kørsler, der blev brugt til bestemmelse af ydelseskarakteristika, var signalet over 20 RLU for codon 768-analysen og over 30 RLU for de resterende fire analyser, der rutinemæssigt kan opnås med 10 ng DNA isoleret fra formalinfikseret, paraffinindstøbt (FFPE) væv. Pyrosekventeringsdata blev analyseret ved hjælp af EGFR Plug-in'en Report.

Referencer

QIAGEN opretholder en stor, opdateret online-database over videnskabelige publikationer, der benytter QIAGENS produkter. Omfattende søgemuligheder gør det nemt at finde de artikler, der er brug for, enten ved en enkel søgning på nøgleord eller ved at specificere anvendelse, forskningsområde, titel, etc.

En fuldstændig referenceliste kan fås ved at besøge QIAGENS reference-database online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakte QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler.

Symboler

 Σ	Indeholder tilstrækkelige reagenser til $\langle N \rangle$ prøvepræparationer
	Anvendes inden
IVD	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
REF	Katalognummer
LOT	Lot-nummer
MAT	Materialenummer
COMP	Komponenter
CONT	Indeholder
NUM	Antal
NaOH	Natriumhydroxid
GTIN	Globalt varenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Se de informationer, der er angivet i håndbogen

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, eller ring til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Bilag A: Opsætning af *therascreen* EGFR Pyro-analyser


I tilfælde af at EGFR Plug-in'en Report er blevet installeret, er der adgang til prædefinerede analyseopsætninger for codon 719, 768, 790 og 858–861 og exon 19 sletninger i genvejsbrowseren i PyroMark Q24-softwaren ved at følge stien "Example Files/PyroMark Setups/EGFR". Det er ikke nødvendigt at udføre følgende trin. EGFR Plug-in'en Report fås ved henvendelse via e-mail til pyro.plugin@qiagen.com.

Vi anbefaler på det kraftigste, at EGFR Plug-in Report bruges i stedet for manuel analyse. Komplekse mutationer kan ikke føjes manuelt til en "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) og skal analyseres ved hjælp af plug-in'en. Efter installation af plug-in'en og hver gang der installeres eller opgraderes software på computeren, skal det kontrolleres, at plug-in'en fungerer korrekt, som beskrevet i EGFR Plug-In Quick Guide.

Hvis EGFR Plug-in Report ikke er installeret, skal analysefilen konfigureres manuelt, inden *therascreen* EGFR Pyro-analysen køres for første gang. Opret analysen til sletning af EGFR codon 719, codon 768, codon 790, codon 858–861 og exon 19 ved hjælp af PyroMark Q24-softwaren som beskrevet nedenfor.

Procedure

EGFR codon 719

A1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).

A2. Angiv følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).

DGCTCCGGTGC

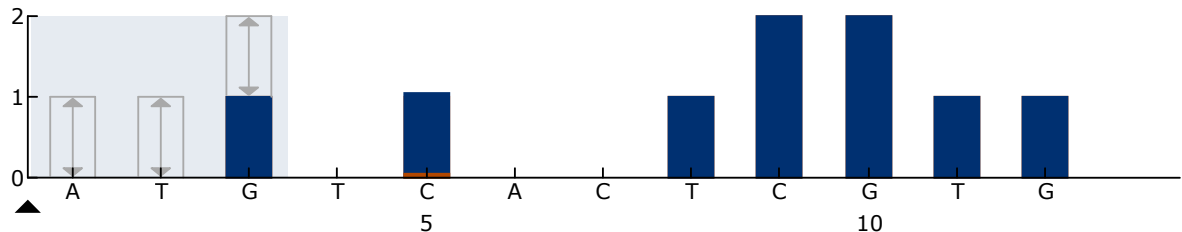
Bemærk: De hyppigste mutationer i codon 719 påvises i nucleotid 2155 ved hjælp af denne "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).

"Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) kan ændres efter kørslen for at analysere, om der er mutationer ved nucleotid 2156. For at kontrollere, om der er mutationer i nucleotid 2156, skal du ændre "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) til følgende sekvens:

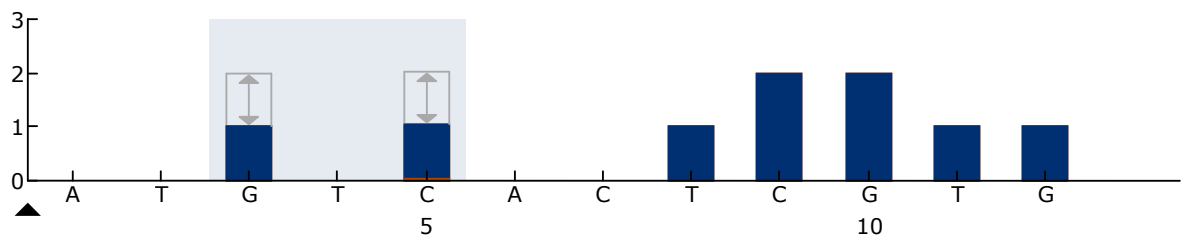
GSCTCCGGTGC

Bemærk: Kontrollér, at tærskelværdien for enkelt spidshøjde er indstillet til 30 RLU. Derudover skal du kontrollere, at histogram søjlernes højde er justeret korrekt (se instruktionerne nedenfor).

**A3. Indtast manuelt følgende "Dispensation Order"
(Dispensationsrækkefølge):
ATGTCACTCGTG**



Figur 16. Histogram for codon 719 (nucleotid 2155) med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) angivet til DGCTCCGGTGC. Det røde rektangel i bunden af søjlen ved dispensering C5 illustrerer justeringen af histogramssøjleens højde.




Figur 17. Histogram for codon 719 (nucleotid 2156) med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) angivet til GSCTCCGGTGC. Det røde rektangel i bunden af søjlen ved dispensering C5 illustrerer justeringen af histogramssøjleens højde.

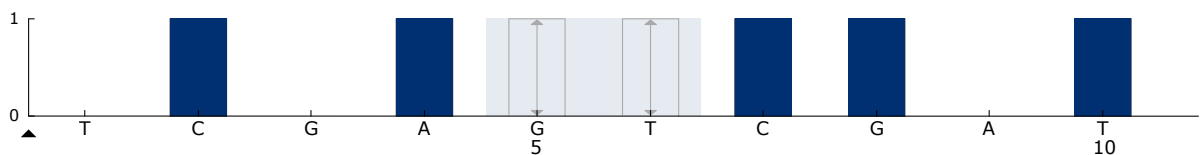
A4. Klik på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre), og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Tærskelværdi for spidshøjde – Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) til 30.

A5. I histogrammet skal du bevæge musemarkøren hen på den øverste del af søjlen ved dispensering C5 og klikke, men du holder "Ctrl" nede. Der vises et lille vindue med standardhøjden for histogramssøjlen (1.00). Øg niveauet til 1.04 for "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) DGCTCCGGTGC og til 2.04 "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) GSCTCCGGTGC.

A6. Klik på  på værktøjslinjen, og gem analysen under navnet "EGFR codon 719".

EGFR codon 768


- A1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Angiv følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).
CAKCGTG
- A3. Tilføj manuelt følgende "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge).
TCGAGTCGAT

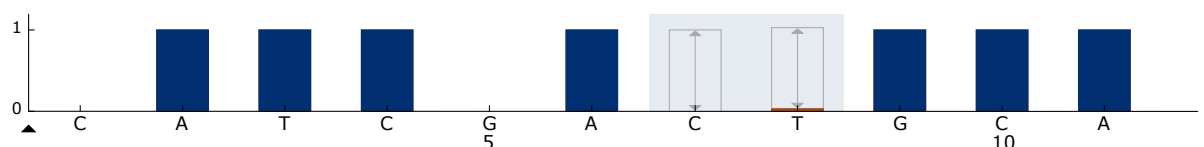


Figur 18. Histogram for codon 768 (nucleotid 2303) med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) angivet til CAKCGTG.

- A4. Klik på  på værktøjslinjen, og gem analysen under navnet "EGFR codon 768".

EGFR codon 790


- A1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Angiv følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres):
ATCAYGCAG
- A3. Tilføj manuelt følgende "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge):
CATCGACTGCA




Figur 19. Histogram for codon 790 (nucleotid 2369) med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) angivet til ATCAYGCAG. Det røde rektangel i bunden af søjlen ved dispensering T8 illustrerer justeringen af histogramssøjleens højde.

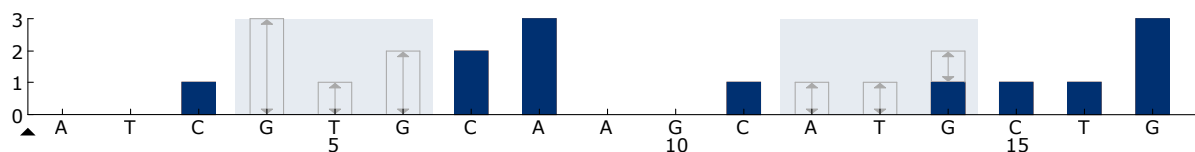
- A4. Klik på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre), og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality"

(Tærskelværdi for spidshøjde – Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) til 30.


- A5. I histogrammet skal du bevæge musemarkøren hen på den øverste del af søjlen ved dispensering T8 og klikke, men du holder "Ctrl" nede. Der vises et lille vindue med standardhøjden for histogrammsøjlen (1.00). Øg niveauet til 1.03.
- A6. Klik på  på værktøjslinjen, og gem analysen under navnet "EGFR codon 790".

EGFR codon 858–861


- A1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Angiv følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres):
CKGGCCAAACDGCTGGGT
- A3. Tilføj manuelt følgende "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge):
ATCGTGCAAGCATGCTG



Figur 20. Histogram for codon 858–861 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) angivet til CKGGCCAAACDGCTGGGT.

- A4. Klik på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre), og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Tærskelværdi for spidshøjde – Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) til 30.
- A5. Klik på  på værktøjslinjen, og gem analysen under navnet "EGFR codon 858–861".

EGFR Exon 19 del

- A1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Angiv følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres):
TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

Den oftest forekommende sletning i exon 19 er 2235del15. Hvis du vil analysere, om der er andre sletninger, skal "Sequence to Analyze"

(Sekvens, der skal analyseres) ændres i overensstemmelse med hver enkelt defineret sletning.

Brug vildtypesekvensen:

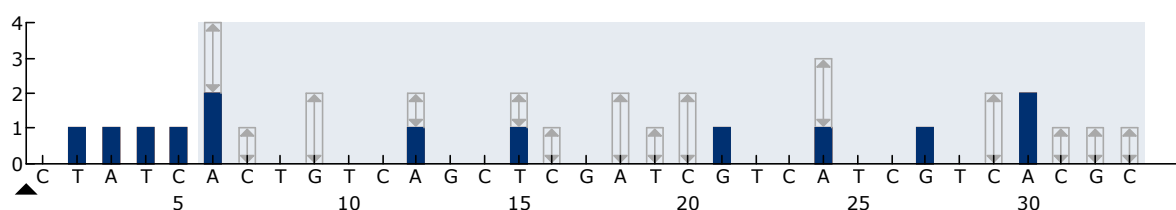
**TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA
ATCCTCGAT**, indsæt kantede parenteser, hvor sletningen starter og slutter.

For den sletning, der er den næstmest forekommende i exon 19 (2236del15), skal du ændre "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) til følgende:

TATCAAG[GAATTAAGAGAAGCA]ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

A3. Tilføj manuelt følgende "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge).

CTATCACTGTCAGCTCGATCGTCATCGTCACGC




Figur 21. Histogram for exon 19 del.

A4. Klik på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre), og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Tærskelværdi for spidshøjde – Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) til 30.

A5. Klik på  på værktøjslinjen, og gem analysen under navnet "EGFR Exon 19 del".

Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere

ADVARSEL 	Sundhedsfarlige kemikalier <p>Den denatureringsopløsning, der anvendes sammen med vakuum-arbejdsstationen, indeholder natriumhydroxid, som virker irriterende på øjne og hud.</p> <p>Brug altid sikkerhedsbriller, handsker og en laboratoriekittel.</p> <p>Den ansvarlige person (for eksempel laboratorielederen) skal træffe de nødvendige forholdsregler for at sikre, at den omgivende arbejdsplads er sikker, og at de, der betjener udstyret, ikke udsættes for sundhedsfarlige niveauer af giftige stoffer (kemiske eller biologiske) som defineret i de relevante sikkerhedsdatablade (SDS'er) eller OSHA*-, ACGIH[†]- eller COSHH[‡]-dokumenter.</p> <p>Udluftning af gasser og bortskaffelse af affald skal ske ifølge alle gældende sundheds- og sikkerhedsregler og love.</p>
--	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Arbejdssikkerheds- og Sundhedsadministrationen, USA)

[†] ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Amerikansk Konference for Statslige Industrihygiejnere, USA)

[‡] COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrol af sundhedskadelige stoffer, UK)

Sørg for at overholde alle nationale, regionale og lokale miljøbestemmelser for bortskaffelse af laboratorieaffald.

Vigtig anvisning før start

- Denne protokol kræver rektificeret vand (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, eller tilsvarende).

Procedure

- B1. Kontrollér, at der ikke sættes vakuum på vakuumværktøjet. Vakuumbkontakten skal være lukket (Off), og der skal være slukket for vakuumpumpen.**
- B2. Kasser eventuelle opløsninger, der er tilbage i beholderne.**
- B3. Skyl beholderne med rektificeret vand, eller udskift dem om nødvendigt.**
- B4. Tøm affaldsbeholderen.**
Bemærk: Hætten kan tages af uden at afbryde slangen.
- B5. Hvis vakuum-arbejdsstationen skal rengøres (f.eks. for støv eller spild), følges anvisningerne i *PyroMark Q24 User Manual*.**

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. nr.
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-kit (24)	Til 24 reaktioner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenseringsprimere, PCR-primere, umethyleret kontrol-DNA, PyroMark PCR-masterblanding, CoralLoad-koncentrat, PyroMark-bindingsbuffer, PyroMark-afhædningsbuffer, PyroMark-denatureringsopløsning, PyroMark-vaskebuffer, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP og H ₂ O	971480
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekvensering af 24 prøver	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekvensering af 24 prøver	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vakuumarbejdsstation (220 V) til parallel klargøring af 24 prøver fra PCR-produkt til enkeltstrenget skabelon	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbejdsstation (220 V) til parallel klargøring af 24 prøver fra PCR-produkt til enkeltstrenget skabelon	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Program	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysesoftware	9019062
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	Sekvensreaktionsplade med 24 brønde	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Beholdere til dispensering af nucleotider og reagenser	979302

* Kun Storbritannien.

† Resten af verden.

Produkt	Indhold	Kat. nr.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Genanvendelige filterprober til PyroMark-vakuumarbejdsstation Q96 og Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Til installationskontrol af systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Til ydelseskontrol af systemet	979304
Relaterede produkter		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-forberedelser: 50 QIAamp MinElute [®] -kolonner, proteinase K, buffere og indsamlingsrør (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Til 48 forberedelser: Reagensbeholdere (væv), engangsfilterspidser, engangsspidsholdere, prøverør (2 ml), vaskerør (1,5 ml), buffer G2, proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til 50 forberedelser: QIAamp Mini Spin-kolonner, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGEN Technical Services eller den lokale distributør.

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

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af *therascreen* EGFR Pyro-kittet accepterer følgende vilkår:

1. *therascreen* EGFR Pyro-kittet må kun bruges i overensstemmelse med *therascreen* EGFR Pyro-kit-håndbogen og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i *therascreen* EGFR Pyro-kit-håndbogen og yderligere protokoller, som fås på www.qiagen.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

