

therascreen[®] GIST RapidScreen Pyro[®]- kit-håndbog



Version 1

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2 **MAT** 1075556DA



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 højkvalitetsprodukter 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

Vores opgave er at sætte dig i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. Ønskes yderligere information, henvises til www.qiagen.com.

Indhold

Tilsigtet anvendelse	5
Opsummering og forklaring	5
Procedureprincip	7
Kontroller	8
Medfølgende materialer	9
Kit-indhold	9
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	10
Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger	13
Sikkerhedsinformationer	13
Generelle forholdsregler	13
Opbevaring og håndtering af reagenser	14
Håndtering og opbevaring af prøver	14
Procedure	14
DNA-isolation	14
Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet	16
Protokol 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kittet	19
Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler	22
Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24	24
Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet	28
Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel	30
Fortolkning af resultater	34
Fortolkning af analyseresultater og påvisning af lavniveau-mutationer	34
Fejlfindingsvejledning	38
Kvalitetskontrol	41
Begrænsninger	41
Brugsegenskaber	41
Tomgrænse og påvisningsgrænse	41

Linearitet	43
Præcision	44
Diagnostisk evaluering	45
Referencer	47
Symboler	48
Kontaktoplysninger	48
Bilag A: Opsætning af <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-analyser	49
Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere	53
Bestillingsinformation	54

Tilsigtet anvendelse

therascreen GIST RapidScreen Pyro-kittet er en nucleinsyresekvensbaseret in vitro-påvisningstest baseret på Pyrosequencing®-teknologi til kvantitativ påvisning af mutationer i exon 9 i det humane *KIT*-gen og i exon 18 i det humane *PDGFRA*-gen i genomisk DNA udledt af humane vævsprøver.

therascreen GIST RapidScreen Pyro-kittet er beregnet til at give klinikere oplysninger, der kan hjælpe dem med administration af patienter, der er diagnosticeret med gastrointestinal stromal tumor (GIST), og som med stor sandsynlighed vil have fordel af lægemidler rettet mod signalvejene, f.eks. imatinib. 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.

Dette produkt er ikke beregnet til brug med prøver fra lungevæv.

Opsummering og forklaring

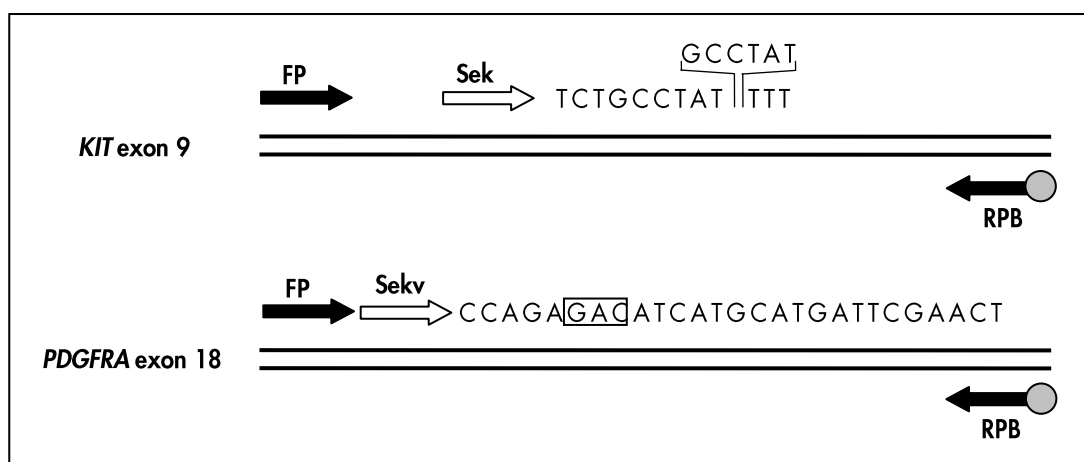
therascreen GIST RapidScreen Pyro-kittet bruges til kvantitative målinger af mutationer i *KIT* exon 9 og *PDGFRA* exon 18 (se figur 1). Påvisning af mutationer i *KIT* exon 9 gør det muligt at anvende en passende dosis imatinib, og påvisning af mutationer i *PDGFRA* exon 18 er med til at udelukke mindre sensitive eller resistente genotyper (1-3).

<i>KIT</i> exon 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
<i>PDGFRA</i> exon 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGCATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

Figur 1. Genomisk kontekst for de sekventerede regioner af de humane *KIT*- og *PDGFRA*-gener (Ensembl-id'er ENSG00000157404 og ENSG00000134853). Codon 503 i *KIT*-genet og codon 842 i *PDGFRA*-genet er angivet med firkanter.

Kittet består af to analyser: én til påvisning af mutationer i *KIT* exon 9 og den anden til påvisning af mutationer i *PDGFRA* exon 18 (se figur 2). De to regioner forstærkes separat ved hjælp af PCR og sekventeres i hele den definerede region. Sekvenserne omkring de definerede positioner fungerer som normaliserings- og referencespidser til kvantificering og kvalitetsvurdering af analysen.

Bemærk: Begge analyser sekvenseres forfra.



Figur 2. Illustration af *KIT*/*PDGFRA*-analyserne. Den afbildede sekvens er den analyserede sekvens for en vildtypeprøve. Positionen og sekvensen for 6 bp-duplikationen i *KIT* exon 9 er angivet. Firkanten angiver codon 842 i *PDGFRA* exon 18. **FP:** Forward-PCR-primere; **RPB:** Reverse-PCR-primere (B står for biotinylering); **Sekv.:** Sekventeringsprimere.

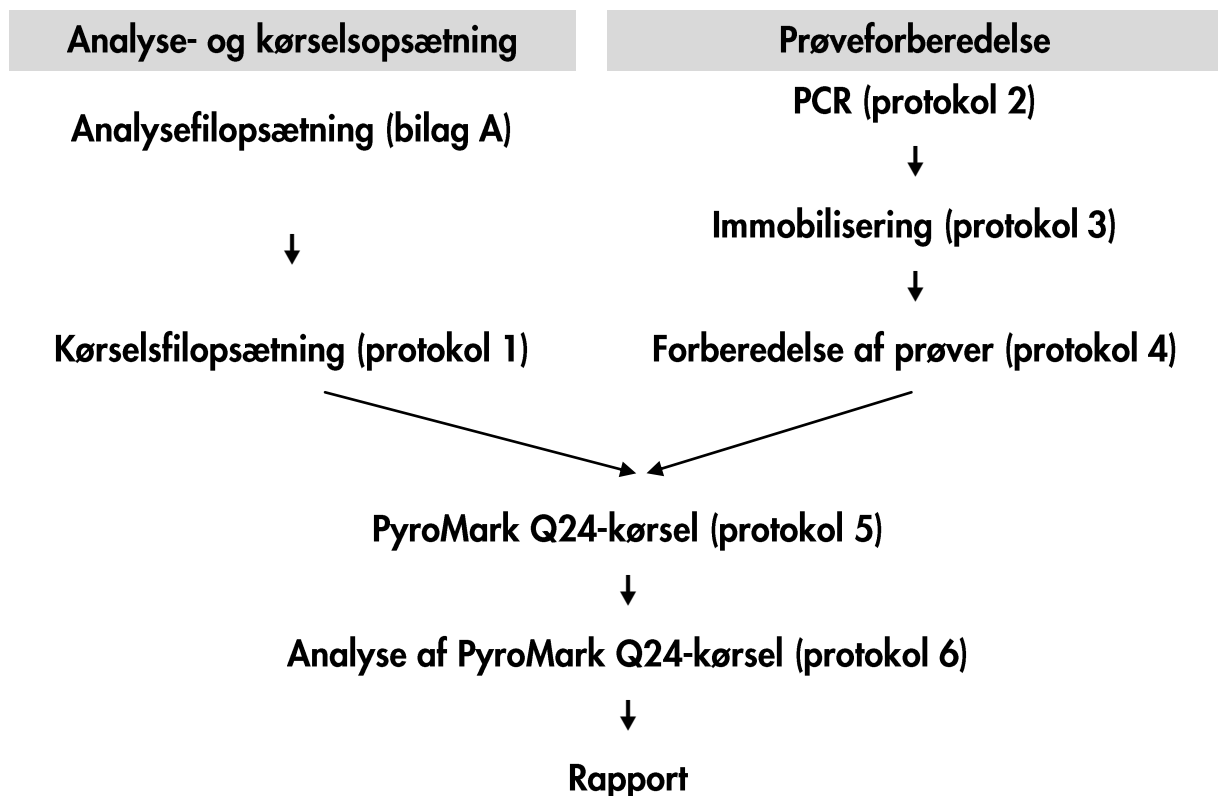
Produktet består af en PCR-primerblanding og en sekventeringsprimer til hver analyse. Primerne leveres i en opløsning. Hvert hætteglas indeholder 32 µl af hver primer eller primerblanding.

Procedureprincip

Rutediagrammet nedenfor illustrerer analyseproceduren. Efter PCR ved hjælp af primere rettet mod *KIT* exon 9 og *PDGFRA* exon 18 immobiliseres ampliconerne på Streptavidin Sepharose® High Performance-kugler. Der forberedes enkeltstregen DNA, og de tilsvarende sekventeringsprimere afhædres til DNA'et. Prøverne analyseres herefter på PyroMark Q24 ved hjælp af filer til analyseopsætning og en kørselsfil.

Det anbefales at bruge GIST RapidScreen Plug-in'en Report til at analysere kørslen. GIST RapidScreen 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 tilpasses med henblik på påvisning af sjældne mutationer efter kørslen (se "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel", side 30, og "Bilag A: Opsætning af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser", side 49).

Rutediagram til *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-procedure



Kontroller

Kittet indeholder umethyleret 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 30). Medtag en prøve med umethyleret 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 GIST RapidScreen Pyro-kit (æske 1/2)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kit (24)	(24)
Katalognr.	971510
Antal reaktioner	24
Seq Primer KIT exon 9 (Sekventeringsprimer KIT exon 9)	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (Sekventeringsprimer PDGFRA exon 18)	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (PCR-primerblanding KIT exon 9)	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (PCR-primerblanding PDGFRA exon 18)	32 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (PyroMark PCR-masterblanding, 2x)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (CoralLoad®-koncentrat, 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (umethyleret kontrol-DNA, 10 ng/µl)	100 µl

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

therascreen-pyrobuffere og -reagenser	
PyroMark Binding Buffer (PyroMark-bindingsbuffer)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark-afhærdningsbuffer)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark-denatureringsopløsning)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (PyroMark-vaskebuffer, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (enzymblanding)	1 hætteglas
Substrate Mixture (substratblanding)	1 hætteglas
dATP α S	1 180 μ l
dCTP	1 180 μ l
dGTP	1 180 μ l
dTTP	1 180 μ l
therascreen <i>GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (engelsk)	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 flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Reagenser

- DNA-isolationskit (se "DNA-isolation", side 14)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalognr. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)

- 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 enzymblandingen og substratblandingen. Der skal bruges yderligere rektificeret vand til fortynding af PyroMark-vaskebufferen 10x

- Ethanol (70 %)*

Forbrugsstoffer

- Sterile pipettespidser (med filtre til PCR-opsætning)
- PCR-plader med 24 brønde (se "Anbefalede 24-brønds plader", side 12)
- Klæbende folie

Udstyr

- Pipetter (justerbare)[†]
- Bordmikrocentrifuge[†]
- Termocykler[†] og egnede PCR-rør
- PyroMark Q24 (katalognr. 9001513 eller 9001514)^{†‡}
- PyroMark Q24-software (katalognr. 9019063 eller 9019062)[‡]
- PyroMark Q24-plade (katalognr. 979201)[‡]
- PyroMark Q24-beholder (katalognr. 979202)[‡]
- PyroMark Q24-vakuumarbejdsstation (katalognr. 9001515 eller 9001517)^{†‡}
- Plademikser[†] til immobilisering af kugler (se "Anbefalede plademiksere", side 12)
- Varmeblok[†], som kan nå op på 80 °C

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

[†] Sørg for, 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.

Anbefalede 24-brønds plader

De 24-brønds plader, der er vist i tabel 1, anbefales til brug sammen med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet.

Tabel 1. 24-brønds plader anbefales til brug sammen med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet

Producent	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

Anbefalede plademiksere

De orbitale plademiksere, der er vist i tabel 2, anbefales til brug sammen med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet.

Tabel 2. Plademiksere anbefalet til brug med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet

Producent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer comfort (grundenhed)	5355 000.011
	Thermoblock for MTPs	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)

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 flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er). Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN®-kit og hver kitkomponent.

Følgende farer og forholdsregler gælder for komponenterne i *therascreen* GIST RapidScreen 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.

Generelle forholdsregler

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

therascreen Pyro-buffere og -reagenser (æske 2/2), der indeholder buffere, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP og dTTP (reagenserne til pyrosekventeringsanalyse) 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 -15 °C til -30 °C. Frosne reagenser bør ikke udsættes for mere end 6 optønings- og indfrysingscykluser.

Bemærk: Nucleotider må ikke fryses.

therascreen GIST RapidScreen Pyro-kittet er stabilt indtil kittets udløbsdato 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, paraffinindlejrte 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 3, anbefales til oprensning af DNA fra de angivne humane prøvetyper til brug med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet. DNA-oprensningen skal udføres i henhold til instruktionerne i kit-håndbøgerne.

Tabel 3. DNA-oprensningskit anbefalet til brug med *therascreen* GIST RapidScreen 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-kittet skal bruges sammen med EZ1 Advanced (katalognr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (katalognr. 9001492) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9018700) eller med BioRobot® EZ1 (katalognr. 9000705 – fås ikke længere) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (katalognr. 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 GIST RapidScreen Plug-in'en Report ikke er blevet installeret, skal der oprettes en analyseopsætning (se "Bilag A: Opsætning af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser", side 49). Dette må kun gøres én gang før kørsel af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyserne første gang. I tilfælde af at GIST RapidScreen 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/GIST". GIST RapidScreen 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 både KIT exon 9 og PDGFRA exon 18 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 umetyleret kontrol-DNA for hver analyse i hver enkelt pyrosekventeringskørsel ("Kontroller", side 8).
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.**

Den udskrevne information før kørsel kan bruges som skabelon til prøveopsætningen (se "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 22).

Se "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 28 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):	Optional (Valgfrit): Angiv id'et for PyroMark Q24-pladen.
Bar code (Stregkode):	Optional (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):	Optional (Valgfrit): Angiv lotnummeret for det <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kit, æske 1 og æske 2, der skal bruges. Lotnummeret fremgår af etiketten på produktet. Bemærk: Det anbefales at angive begge lotnumre, så eventuelle uventede problemer med <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kittet kan spores.
Run note (Kørselsbemærkning):	Optional (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* GIST RapidScreen Pyro-kittet

Denne protokol er til PCR-forstærkninger af en region, der indeholder *KIT* exon 9, og en separat PCR-forstærkning af en region, der indeholder *PDGFRA* exon 18, ved hjælp af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet.

Vigtige anvisninger før start

- HotStarTaq[®] DNA-polymerasen i PyroMark PCR-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 i PCR, PCR-produktanalyse eller klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse.
- Brug engangsspidser 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 4).**
Bland dem godt inden brug.
- 2. Klargør en reaktionsblanding for hvert PCR-primersæt i henhold til tabel 4.**
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 4. Klargøring af reaktionsblanding til hver PCR-primerblanding

Komponent	Volumen/reaktion
PyroMark PCR-masterblanding, 2x	12,5 µl
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5 µl
PCR-primer KIT exon 9 eller PCR-primer PDGFRA exon 18	1 µl
Vand (H ₂ O, medfølger)	4 µl
Volumen i alt	20 µl

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 (tabel 5), 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 8).

Tabel 5. Klargøring af PCR

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

5. Programmér termocyklere i henhold til producentens instruktioner og de betingelser, der er skitseret i tabel 6.

Tabel 6. 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 termocyklere, og start cyklusprogrammet.
7. Efter forstærkning skal der fortsættes med "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 22.

PCR-prøverne kan opbevares ved 2-8 °C i op til 3 dage.

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.
- Tænd for PyroMark Q24 minimum 30 minutter før start af en kørsel. Tænd/sluk-knappen er placeret bag på instrumentet.
- Anbring én PyroMark Q24-pladeholder på en forvarmet varmeblok ved 80 °C. Lad en anden PyroMark Q24-pladeholder stå ved stuetemperatur (15-25 °C).
- PyroMark-vaskebufferen leveres som 10x-koncentrat. Inden den bruges for første gang, skal den fortyndes til 1x-arbejdsopløsning 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.
- Klargør PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen til prøveforberedelse som beskrevet i PyroMark Q24-brugervejledningen.

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 7.**
Klargør et større volumen end det, der skal bruges til det samlede antal reaktioner, som skal udføres (antallet af reaktioner + én ekstra).

Tabel 7. Masterblanding til DNA-immobilisering

Komponent	Volumen/prøve
PyroMark Binding Buffer (PyroMark-bindingsbuffer)	40 µl
Streptavidin Sepharose High Performance	1 µl
Vand (H ₂ O, medfølger)	29 µl
Volumen i alt	70 µl

Bemærk: Denne protokol gælder for Streptavidin Sepharose High Performance med lotnummer 10057037 eller højere. Hvis der bruges Streptavidin Sepharose High Performance-kugler med et lotnummer, der er lavere end 10057037, skal antallet af kugler pr. prøve øges til 2 µl, mens vandmængden reduceres tilsvarende.

- 3. Tilsæt 70 µl masterblanding i brøndene på en PCR-plade med 24 brønde som defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 16).**

Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Kontrollér homogeniteten af masterblandingen ved hyppig blanding med brug af en pipette eller pulsvortexing. Centrifuger ikke masterblandingen ned.

- 4. Tilsæt 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokol 2 i hver brønd med masterblanding som defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 2: PCR ved hjælp af de PCR-reagenser, der medfølger i *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet", side 19).**

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

- 5. Forsegl PCR-pladen med brug af klæbende folie.**

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.**

Under dette trin fortsættes der med det samme med "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24", side 24.

Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekventeringsanalyse på PyroMark Q24

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

Vigtige anvisninger før start

- Inden rørene med sekventeringsprimere åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- De 2 forskellige sekventeringsprimere skal tilsættes i det samme mønster, der er defineret for pladen under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 16), afhængigt af analyseregionen (*KIT* exon 9 eller *PDGFRA* exon 18).
- Undgå at afkorte nedkølingstiden for prøverne efter opvarmning til 80 °C.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen* med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, når det er påkrævet.

Procedure

- 1. Fortynd en tilstrækkelig mængde sekventeringsprimer, sekventeringsprimer *KIT* exon 9 og sekventeringsprimer *PDGFRA* exon 18, i PyroMark-afhærdningsbuffer som vist i tabel 8.**

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

Fortynd og gem ikke mere sekventeringsprimer.

Tabel 8. Eksempel på fortynding af sekventeringsprimere

Komponent	Volumen/prøve	Volumen til 9 + 1 reaktioner
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark- afhærdningsbuffer)	24,2 µl	242 µl
Seq Primer KIT exon 9 (Sekventeringsprimer KIT exon 9) eller	0,8 µl	8 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (Sekventeringsprimer PDGFRA exon 18)		
Volumen i alt	25 µl	250 µl

- 2. Tilsæt 25 µl fortyndet sekventeringsprimer i hver brønd på PyroMark Q24-pladen i henhold til kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 16).**

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. Tænd for vakuumpumpen i PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen.**
- 4. Anbring PCR-pladen fra protokol 3 og PyroMark Q24-pladen på vakuumarbejdsstationen (figur 3).**

Inspicer PCR-pladen, og kontrollér, at der er Sepharosekugler i opløsningen. Kontroller, at PCR-pladen vender samme vej, som da prøverne blev isat.



Figur 3. Placering af PCR-plade og PyroMark Q24-plade på vakuumarbejdsstationen.

5. Sæt vakuum på værktøjet ved at åbne på vakuumkontakten.
6. Sænk langsomt filterproberne på vakuumværktøjet ned i PCR-pladen for at opfange kuglerne, der indeholder immobiliseret skabelon. Hold proberne på plads i 15 sekunder. Vær forsigtig, når vakuumværktøjet samles op.

Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Opfangning af kugler skal ske umiddelbart, når rystningen er færdig. Hvis der er gået mere end 1 minut, siden pladen blev rystet, rystes igen i 1 minut, før kuglerne opfanges.

Inspicer PCR-pladen for fuldstændig optagelse af alle prøver af vakuumværktøjet.

7. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 40 ml 70 % ethanol (beholder 1, figur 3). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
8. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 40 ml denatureringsopløsning (beholder 2, figur 3). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
9. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 50 ml vaskebuffer (beholder 3, figur 3). Skyl filterproberne i 10 sekunder.
10. Løft vakuumværktøjet op og tilbage over 90° lodret i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (figur 4).



Figur 4. Illustration af vakuumpærktøjet løftet til over 90° lodret.

11. Hold vakuumpærktøjet over PyroMark Q24-pladen, og sluk for vakuumpærktøjet (Off).
12. Frigør kuglerne i PyroMark Q24-pladen ved at sænke filterproberne ned i den fortyndede sekventeringsprimer og bevæge vakuumpærktøjet forsigtigt fra side til side.
Pas på ikke at beskadige overfladen på PyroMark Q24-pladen ved at ridse den med filterproberne.
13. Overfør vakuumpærktøjet til beholderen med rektificeret vand (beholder 4, figur 3), og ryst det i 10 sekunder.
14. Vask filterproberne ved at sænke proberne ned i rektificeret vand (beholder 5, figur 3) og sætte vakuumpærktøjet på. Skyl filterproberne med 70 ml rektificeret vand.
15. Løft vakuumpærktøjet op og tilbage over 90° lodret i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (figur 4).
16. Luk vakuumpærktøjet (Off), og sæt vakuumpærktøjet i parkeringsstilling (P).
17. Sluk for vakuumpumpen.
Når arbejdsdagen er slut, skal flydende affald og eventuelle resterende opløsninger kasseres, og PyroMark Q24-vakuumpærktøjet skal kontrolleres for støv og spild. Se "Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere", side 53.
18. Opvarm PyroMark Q24-pladen med prøverne ved 80 °C i 2 minutter ved hjælp af den foropvarmede PyroMark Q24-pladeholder.
19. 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.
20. Fortsæt med "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 28.

Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet

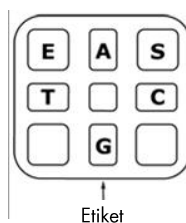
Denne protokol beskriver klargøring og isætning af PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-beholderen samt start og afslutning af en kørsel på PyroMark Q24. Detaljeret information om opsætning af en kørsel findes i *PyroMark Q24 User Manual*.

Vigtige anvisninger før start

- Rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), der findes i menuen "Tools" (Funktioner) (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 16), indeholder information om den mængde nucleotider, enzym og substratbuffer, som er nødvendig til en bestemt kørsel.
- Brug engangsspidser uden hydrofobiske filtre til isætning i beholderen, så beholderen kan fungere korrekt.

Procedure

- 1. Opløs hver af de frysetørrede enzym- og substratblandinger i 620 µl vand (H₂O, medfølger).**
- 2. Bland ved at slynge hætteglasset forsigtigt rundt.**
Må ikke vortexes!
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 5.**
Sørg for, at der ikke overføres nogen luftbobler fra pipetten til beholderen.



Figur 5. 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.
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 ▼.
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 GIST RapidScreen-kørsel ved hjælp af PyroMark Q24-software.

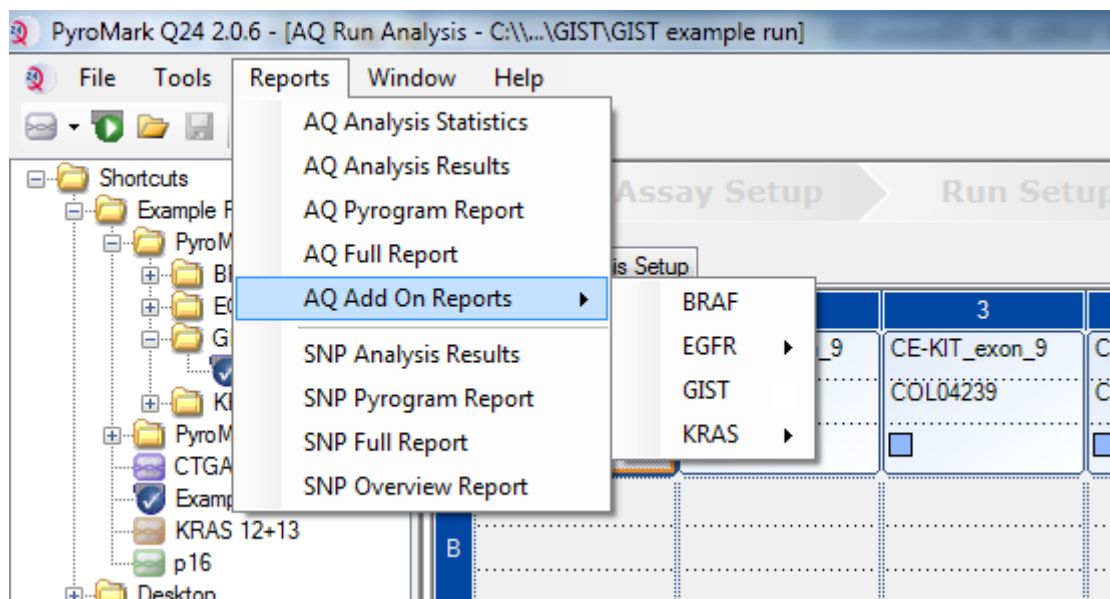
Procedure

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 GIST RapidScreen Plug-in'en Report bruges, skal du gå til trin 5. Hvis den integrerede AQ-analyse i PyroMark Q24-softwaren bruges, skal du gå til trin 6.

Bemærk: Vi anbefaler på det kraftigste, at GIST RapidScreen Plug-in'en Report bruges til dokumentation og fortolkning af resultaterne. GIST RapidScreen Plug-in'en Report fås ved henvendelse via e-mail til pyro.plugin@qiagen.com. Denne rapport sikrer, at de respektive LOD-værdier (tabel 9) og forskellige "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) bruges til automatisk at påvise alle mutationer.

Bemærk: To komplekse mutationer i *PDGFRA* exon 18 (2526_2538>G og 2524_2526 GAC>TAT) kan ikke analyseres ved hjælp af AQ-analysen i PyroMark Q24-softwaren. Det anbefales at bruge GIST RapidScreen Plug-in'en Report til analyse af komplekse *PDGFRA* exon 18-mutationer

5. Sådan bruges GIST RapidScreen Plug-in'en Report:
Vælg "AQ Add On Reports/GIST" (AQ-tilføjelsesrapporter/GIST) i menuen "Reports" (Rapporter) for at oprette en rapport (se figur 6).



Figur 6. GIST RapidScreen Plug-in Report-menu.

Brøndene analyseres automatisk for samtlige mutationer, hvor der er angivet en LOD i tabel 9. Resultaterne præsenteres i en oversigtstabel (se figur 7) efterfulgt af de detaljerede resultater, som inkluderer pyrogrammer og analysekvalitet.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		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.

Figur 7. GIST RapidScreen Plug-in'en Report.

6. Sådan bruges AQ-analysen:
Klik på en af analyseknapperne for at analysere kørslen og få et overblik over resultaterne.



Analysér alle brønde.



Analysér den markerede brønd.

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

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

Bemærk: For at opnå pålidelige resultater anbefaler vi enkelte spidshøjder på over 30 RLU. "Required peak height for passed quality" (Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) skal indstilles til 30 RLU under analyseopsætningen (se "Bilag A: Opsætning af theascreen GIST RapidScreen Pyro-analyser" og *PyroMark Q24-brugervejledningen*).

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 standard-kvalitetsvurderingen "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) eller med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt)

Standardanalyseindstillingen for "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) som defineret i analyseopsætningen fokuserer på 6 bp-duplikationen i *KIT* exon 9 og den hyppigste punktmutation i codon 842 (GAC>GTC) i *PDGFRA* exon 18 (se bilag A, side 49). Hvis en prøve indeholder en sjældnere forekommende mutation i *PDGFRA* exon 18, kan "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), ændres, så mutationsstatus for denne mutation analyseres som beskrevet i bilag A.

To komplekse mutationer i *PDGFRA* exon 18 (2526_2538>G og 2524_2526GAC>TAT) kan ikke analyseres ved hjælp af AQ-analysen i PyroMark Q24-softwaren. Det anbefales at bruge GIST RapidScreen Plug-in'en Report til analyse af komplekse *PDGFRA* exon 18-mutationer

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 sjælden mutation, som der ikke fokuseres på med standardindstillingen for "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres), hvilket 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.

Opdaterede hyppigheder for mutationer i det humane *KIT/PDGFR*A er gjort tilgængelige online af Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Bemærk: Kontrollér, at tærskelværdien for enkelt spidshøjde er indstillet til 30 RLU efter ændring af "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).

Bemærk: Der kan være yderligere sjældne eller uventede mutationer i den sekventerede region og disse kan analyseres ved hjælp af den alternative "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) med hensyntagen til uventede mutationer.

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 eller lig med tomgrænsen (LOB). De værdier for tomgrænse (LOB) og påvisningsgrænse (LOD), der er angivet i håndbøgerne, kan bruges til bestemmelse af tilstedeværelsen af en mutation. Disse værdier blev opnået ved hjælp af plasmidblandinger, der bærer vildtypen eller den relevante mutantsekvens.

Efter en analyse med PyroMark Q24-softwaren eller Plug-in'en Reports viste der sig at være 3 mulige resultater.

- Mutationshyppighed $< LOD$: Mutationen blev ikke registreret
- Mutationshyppighed $> LOD + 3$ procentenheder: Mutation
- Mutationshyppighed $\geq LOD$ og $\leq LOD + 3$ procentenheder: Potentiel lavniveau-mutation

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

Området fra LOD til LOD + 3 procentenheder giver mulighed for sensitiv påvisning af lavniveau-mutationer under optimale forhold. En målt hyppighed over LOB i den umethylerede kontrolprøve antyder et højere baggrundsniveau end normalt i den pågældende kørsel, hvilket kan påvirke allelekvantificeringen især i tilfælde af lave mutationsniveauer. Resultater med advarslen "Potentiel lavniveau-mutation" skal derfor evalueres omhyggeligt.

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 det umethylerede kontrol-DNA. Resultatet af begge duplikater skal rapportere den samme mutation med værdier $\geq LOD$, og kontrolprøven skal rapportere "No mutation detected" (Ingen mutation påvist). I modsat fald skal prøven vurderes som "No mutation detected" (Ingen mutation påvist).

En forøget baggrund for en mutation kan påvises ved at sammenligne de LOB-værdier, der er angivet i håndbogen, med de målinger, der opnås med det umethylerede kontrol-DNA. Prøver med en rapporteret potentiel lavniveau-mutation kan vurderes som "Mutation not detected" (Mutationen ikke påvist) uden gentagelse, hvis den målte hyppighed for det umethylerede kontrol-DNA

er højere end den LOB-værdi, der er angivet i håndbogen, for den relevante mutation. Der er derfor 3 forskellige mulige scenarier med rapporterede potentielle lavniveau-mutationer.

1. Målingshyppighed med umethyleret kontrol-DNA > LOB for denne mutation: Prøven kan vurderes som "Mutation not detected" (Mutationen ikke påvist) uden gentagelse.
2. Der kunne ikke reproducere identiske resultater i duplikeret form: Vurder prøven som "Mutation not detected" (Mutationen ikke påvist).
3. Reproduceret i duplikeret form med samme resultat og vildtypeprøve < LOB for den relevante mutation: Mutation påvist.

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. Pyrogrammer skal undersøges for forekomsten af uventede spidser. Hvis de målte spidser ikke svarer til højden af søjlerne i histogrammet, og dette ikke kan forklare med sjældne eller uventede mutationer, anbefales det at køre prøven igen. Det mislykkede resultat kan ikke bruges som udgangspunkt for vurdering af mutationsstatus. For en gyldig mutation er en ændring i spidshøjden altid relateret til en tilsvarende ændring i højden på en anden spids. En ændring i højden på en enkelt spids skal ikke vurderes som indikation for en mutation.

Bemærk: Det anbefales at bruge GIST RapidScreen 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: Beslutning om behandling af cancerpatienter må ikke baseres udelukkende på mutationsstatusen i *KIT* exon 9 og *PDGFRA* exon 18.

Tabel 9. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer

Nukleinsyresubstitution	Aminosyre-substitution	LoB (procent-enheder)	LoD (procent-enheder)	COSMIC ID* (v58)
KIT exon 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
PDGFRA exon 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 eller [‡]	D842_H845del eller [‡]	2,2	5,2	737 eller [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

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

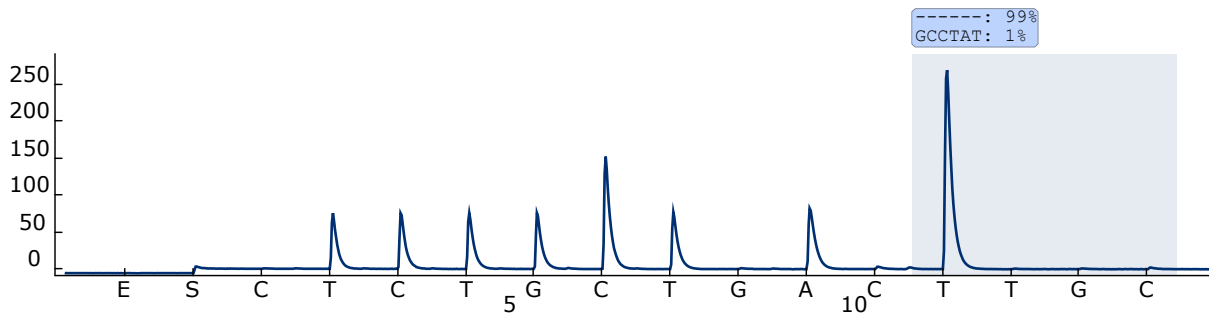
[†] Mutationerne 2524G>T og 2524_2526GAC>TAT og 2526_2537del12 og 2527_2538del12 resulterer hhv. i samme aminosyreændring.

[‡] Mutationerne 2524_2535del12 og 2526_2537del12 resulterer i samme nukleinsyreændring.

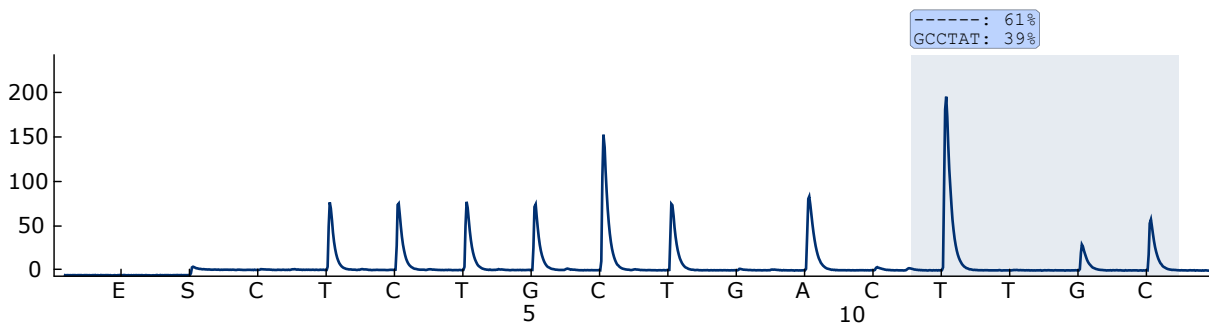
[§] Mutationen 2526_2538>G og 2524_2526GAC>TAT kan ikke analyseres i AQ-tilstand i PyroMark Q24-softwaren.

Repræsentative resultater

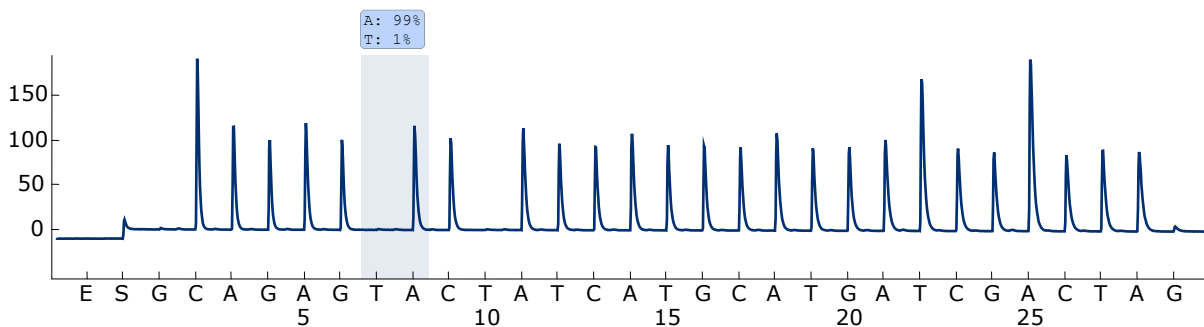
Figur 8-11 viser repræsentative pyrogramresultater.



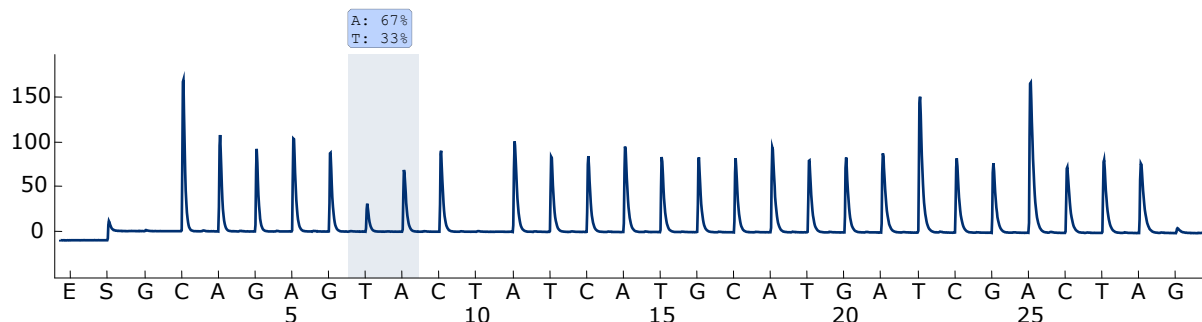
Figur 8. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype-genotype i *KIT* exon 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*, der fokuserer på 6 bp-duplikationen efter codon 503.



Figur 9. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en GCCTAT-duplikation efter codon 503 i *KIT* exon 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.



Figur 10. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med vildtype-genotype i *PDGFRA* exon 18 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT*, der fokuserer på mutationen GAC>GTC i codon 842 (nucleotid 2525).



Figur 11. Pyrogramsporing opnået efter analyse af en prøve med en GAC>GTC-mutation i codon 842 (nucleotid 2525) i PDGFRA exon 18 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning 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).

Se *PyroMark Q24-brugervejledningen* for at få generel fejlfindingsvejledning 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. |
| 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

- | | |
|------------------------------|--|
| 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). |
|------------------------------|--|

Kommentarer og forslag

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

- a) Lav spidshøjde
- Håndteringsfejl under PCR-opsætningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekventering kan resultere i lave spidser.
- Det er vigtigt, at prøverne optages helt af vakuumværktøjet. Sørg for, at vakuumværktøjet sænkes langsomt i prøverne, og at geometrien for den PCR-plade eller strips, der anvendes til immobilisering, gør det muligt at optage prøverne helt.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-vejledningen* 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 "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) i analyseopsætningen (se "Bilag A: Opsætning af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser", side 49), 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
- 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.

Høj baggrund

- a) Nucleotider opbevaret forkert
- Nucleotider skal opbevares ved 2-8 °C. Opbevaring ved -15 °C til -30 °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 reagenserne i overensstemmelse med instruktionerne i "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24-systemet", side 28.
- c) Mislykket PCR eller prøveklargøring
- Håndteringsfejl under PCR-opsætningen, programmering af PCR-cyklusanordningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekventering kan resultere i manglende signal. Udfør funktions-testen 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* GIST RapidScreen 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.

Vejledningen skal følges fuldstændigt for at opnå optimale PCR-resultater. Vær opmærksom på de udløbsdatoer, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug ikke forældede komponenter.

Brugsegenskaber

Tomgrænse og påvisningsgrænse

Tomgrænsen (LOB) og påvisningsgrænsen (LOD) er fastlagt for en række mutationer ved hjælp af blandinger af plasmider (tabel 10). LOB og LOD er fastlagt i henhold til anbefalingerne i CLSI's (Clinical and Laboratory Standards Institute) retningslinje EP17-A "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 *PDGFRA* exon 18 blev bestemt ved at lægge 3 standardafvigelser af tomme målinger til LOB-værdien. LOD-værdierne blev indstillet til mindst 3 procentenheder over 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.

Tabel 10. Fastlagt LOB og LOD for specifikke mutationer

Nukleinsyresubstitution	Aminosyre-substitution	LOB (procent-enheder)	LOD (procent-enheder)	COSMIC ID* (v58)
<i>KIT</i> exon 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<i>PDGFRA</i> exon 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 eller [‡]	D842_H845del eller [‡]	2,2	5,2	737 eller [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [‡]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

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

[†] Mutationerne 2524G>T og 2524_2526GAC>TAT og 2526_2537del12 og 2527_2538del12 resulterer hhv. i samme aminosyreændring.

[‡] Mutationerne 2524_2535del12 og 2526_2537del12 resulterer i samme nukleinsyreændring.

[§] LOD for disse sletninger i *PDGFRA* exon 18 blev bestemt ved at lægge 3 standardafvigelser af tomme målinger til LOB-værdien.

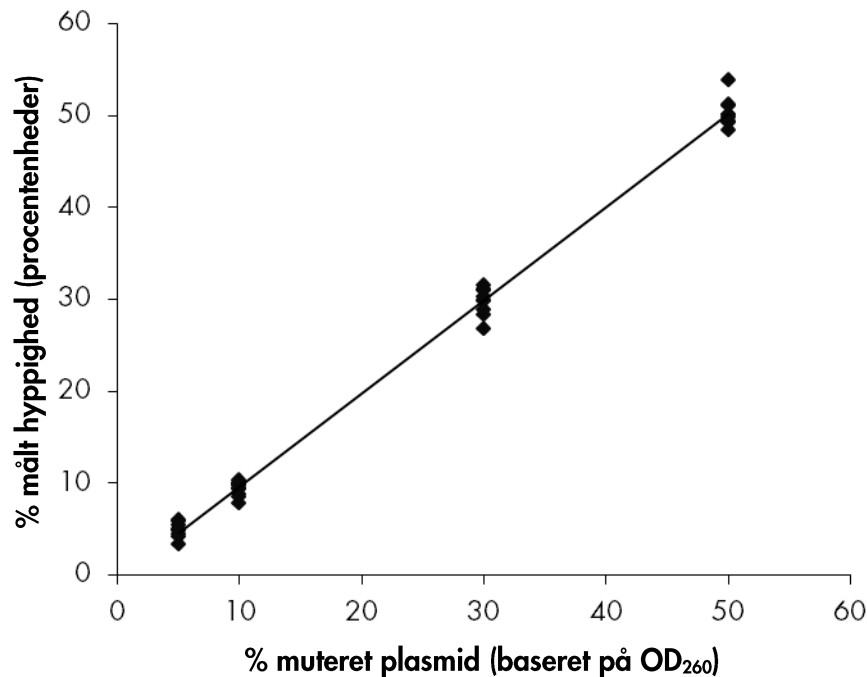
[¶] Mutationen 2526_2538>G kan ikke analyseres i AQ-tilstand i PyroMark Q24-softwaren.

Linearitet

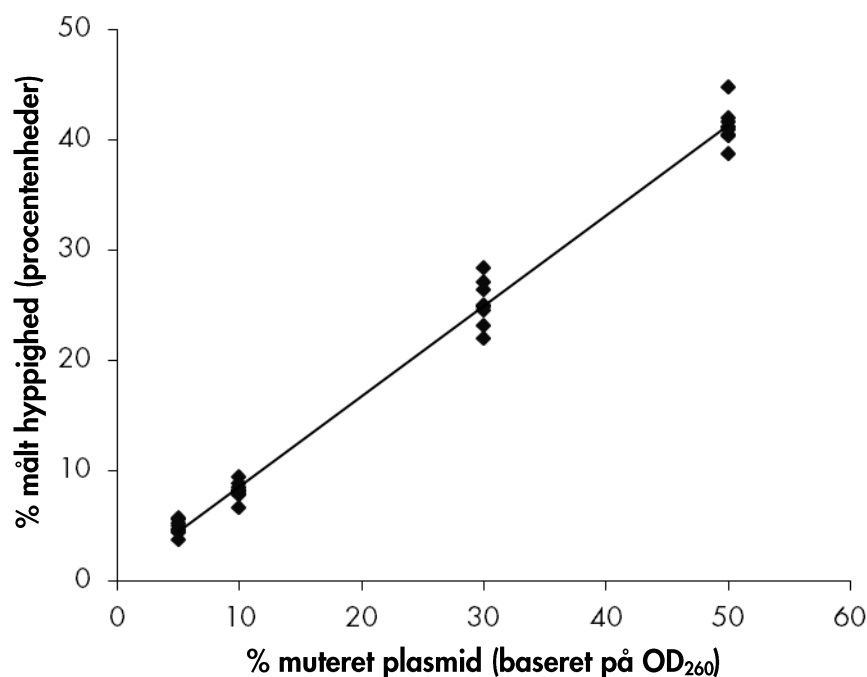
Lineariteten blev bestemt ved hjælp af blandinger af plasmider, der indeholdt vildtype- eller mutantsekvensen for duplikationen 1509_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9 og mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18. Disse plasmider blev blandet i forhold, der gav 4 mutationsniveauer (5, 10, 30 og 50 %). Hver af blandingerne blev analyseret med 3 forskellige lot af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet i 3 pyrosekventeringskørsler hver med 3 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 Analyse-it[®]-software v2.21 og vises i figur 12 og 13.

Resultaterne var lineære inden for en tilladt nonlinearitet på 5 procentenheder over analyseområdet for mutationsniveauet fra 5 til 50 %.



Figur 12. Lineariteten i duplikationen 1509_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9.



Figur 13. Lineariteten i mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18.

Præcision

Data for præcision gør det muligt at bestemme analysernes samlede variabilitet og blev opnået på 3 forskellige niveauer ved at analysere ovennævnte plasmidblandinger hver med 3 replikater.

Repeterbarhed (variabilitet inden for samme analyse og mellem batches) blev beregnet på basis af data til bestemmelse af linearitet (3 kørsler på samme dag med forskellige lot af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kit). Laboratorienøjagtighed (variabilitet inden for samme laboratorium) blev bestemt i 3 kørsler på ét laboratorium på 3 forskellige dage med forskellige operatører, PyroMark Q24-instrumenter og lot af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet. Reproducerbarhed (variabilitet mellem laboratorier) blev beregnet ud fra 2 kørsler henholdsvis på et internt og et eksternt laboratorium og ved hjælp af forskellige lot af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kit.

Den estimerede præcision udtrykkes som standardafvigelse i forhold til de målte mutationshyppigheder i procentenheder (tabel 11). Repeterbarhed, laboratorienøjagtighed og reproducerbarhed for duplikationen 1509_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9 var hhv. 0,8-1,6, 0,5-1,5 og 0,7-1,9 procentenheder i måleområdet for mutationsniveauet fra 5 til 50 %. Repeterbarhed, laboratorienøjagtighed og reproducerbarhed for mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18 var hhv. 0,6-1,9, 0,6-3,7 og 0,5-2,4 procentenheder i måleområdet fra 5 til 50 %.

Tabel 11. Præcision for duplikationen 1509_1510insGCCTAT i KIT exon 9*

% muteret plasmid [†]	Repeterbarhed		Laboratorienøjagtighed		Reproducerbarhed	
	Gns.	SD	Gns.	SD	Gns.	SD
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

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

† Baseret på OD₂₆₀-måling.

Tabel 12. Præcision for mutationen 2525A>T i PDGFRA exon 18[‡]

% muteret plasmid [§]	Repeterbarhed		Laboratorienøjagtighed		Reproducerbarhed	
	Gns.	SD	Gns.	SD	Gns.	SD
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

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

§ Baseret på OD₂₆₀-måling.

Diagnostisk evaluering

therascreen GIST RapidScreen Pyro-kittet blev evalueret i sammenligning med Sanger-sekventering. DNA blev ekstraheret fra 100 formalinfikserede paraffinindstøbte (FFPE) GIST-tumorprøver og analyseret for mutationer i *KIT* exon 9 og *PDGFRA* exon 18.

DNA blev isoleret ved hjælp af QIAamp DNA FFPE Tissue-kit. Analyserne blev udført med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet på PyroMark Q24. Sanger-sekventering blev udført på Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Ud af 100 prøver, der blev analyseret, kunne mutationsstatus bestemmes for alle *KIT* exon 9 (figur 13) og *PDGFRA* exon 18 (figur 14) med begge metoder.

Tabel 13. Resultater for de analyserede GIST-tumorprøver for *KIT* exon 9

<i>KIT</i> exon 9		Sanger-sekventering		
		Ingen mutation påvist	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	I alt
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kit	Ingen mutation påvist	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	I alt	92	8	100

Tabel 14. Resultater for de analyserede GIST-tumorprøver for *PDGFRA* exon 18

<i>PDGFRA</i> exon 18		Sanger-sekventering				I alt
		WT	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kit	Ingen mutation påvist	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	I alt	93	2	3	2	100

Bemærk: I samtlige kørsler, der blev brugt til bestemmelse af ydelseskaraktistika, var signalet over 30 RLU, der rutinemæssigt kan opnås med 10 ng DNA isoleret fra formalinfikseret, paraffinindstøbt (FFPE) væv. Pyrosekventeringsdata blev analyseret ved hjælp af GIST RapidScreen 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.







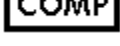

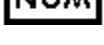





En fuldstændig referenceliste kan fås ved at besøge QIAGENS reference-database online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller ved at kontakte QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler.

Citerede referencer

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

 Σ	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> prøvepræparationer
 <N>	Anvendes inden
 IVD	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
 REF	Katalognummer
 LOT	Lot-nummer
 MAT	Materialenummer
 COMP	Komponenter
 CONT	Indeholder
 NUM	Antal
 GTIN	Globalt varenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Se de informationer, der er angivet i håndbogen
	Forsigtig

Kontaktoplysninger

Ønskes teknisk bistand og yderligere information, henvises til vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ring på 00800-22-44-6000, eller kontakt en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Bilag A: Opsætning af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser


Hvis GIST RapidScreen Plug-in'en Report er blevet installeret, er der adgang til prædefinerede analyseopsætninger for *KIT* exon 9 og *PDGFRA* exon 18 i genvejsbrowseren i PyroMark Q24-softwaren ved at følge stien "Example Files/PyroMark Setups/GIST". Det er ikke nødvendigt at udføre følgende trin. GIST RapidScreen Plug-in'en Report fås ved henvendelse til pyro.plugin@qiagen.com.

Vi anbefaler på det kraftigste, at GIST RapidScreen Plug-in'en Report bruges i stedet for manuel analyse. Komplekse mutationer af *PDGFRA* exon 18 kan ikke føjes manuelt til en "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) og skal analyseres ved hjælp af GIST RapidScreen Plug-in'en Report. 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 GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide.

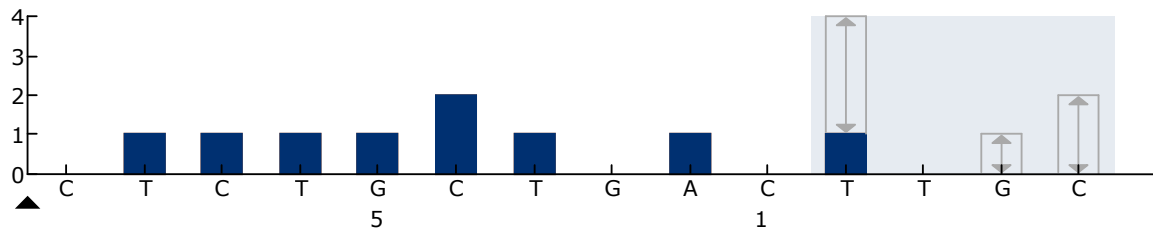
Hvis GIST RapidScreen Plug-in'en Report ikke er installeret, skal analysefilen konfigureres manuelt, inden *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analysen køres for første gang. Opsæt analysen for *KIT* exon 9 og *PDGFRA* exon 18 ved hjælp af PyroMark Q24-softwaren som beskrevet nedenfor.

Procedure


KIT exon 9

- A1.** Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2.** Indtast manuelt følgende "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge):
CTCTGCTGACTTGC
- A3.** Angiv følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres):
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA


6 bp-duplikationen GCCTAT efter codon 503 i *KIT* exon 9 påvises med brug af denne "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).



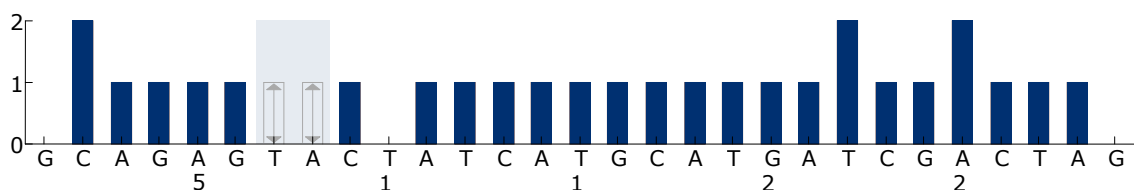
Figur 14. Histogram for *KIT* exon 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*, der fokuserer på 6 bp-duplikationen efter codon 503.

- 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 som "KIT exon 9".

PDGFRA exon 18

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

Den hyppigste mutation GAC>GTC i codon 842 (nucleotid 2525) i *PDGFRA* exon 18 påvises ved hjælp af denne "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).



Figur 15. Histogram for *PDGFRA* exon 18 med "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT*, der fokuserer på mutationen GAC>GTC i codon 842 (nucleotid 2525).

"Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres) kan ændres efter kørslen for yderligere at analysere, om der er mutationer i nucleotid 2524 (codon 842) samt 9 sletninger og komplekse mutationer inden for regionen codon 842 til 847.

For at analysere om følgende mutationer findes, skal "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal ændres) ændres i henhold til tabel 15.

Bemærk: Der kan ses bort fra advarslen "Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations" (Kvantificering kan være usikker: den variable position kræver mere end 5 dispenseringer) under analyseopsætningen.

Bemærk: Kontrollér, at tærskelværdien for enkelt spidshøjde er indstillet til 30 RLU.

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 som "PDGFRA exon 18".

Tabel 15. Almindelige mutationer påvist af *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kittet ved hjælp af forskellige "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres)

Nukleinsyreændring	Aminosyreændring	"Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres)
KIT exon 9		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTTAA*
PDGFRA exon 18		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCGAACTAT
2524_2535del12 eller [‡] 2526_2537del12	D842_H845del eller [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT

2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	–§
2524_2526GAC>TAT	D842Y†	–§


* Standard "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres).

† Mutationerne 2524G>T og 2524_2526GAC>TAT og 2526_2537del12 og 2527_2538del12 resulterer hhv. i samme aminosyresubstitution.

‡ Mutationerne 2524_2535del12 og 2526_2537del12 resulterer i samme nukleinsyre-substitution og analyseres af samme Sequence to Analyze. (Sekvens, der skal analyseres).

§ Mutationen 2526_2538>G og 2524_2526GAC>TAT kan ikke analyseres i AQ-tilstand i PyroMark Q24-softwaren.

Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere

ADVARSEL 	Sundhedsfarlige kemikalier Den denatureringsopløsning, der anvendes sammen med vakuumarbejdsstationen, indeholder natriumhydroxid, som virker irriterende på øjne og hud. Brug altid sikkerhedsbriller, handsker og en laboratoriekittel. 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 (MSDS'er) eller OSHA [*] -, ACGIH [†] - eller COSHH [‡] -dokumenter. Udluftning af gasser og bortskaffelse af affald skal ske ifølge alle gældende sundheds- og sikkerhedsregler og love.
--	--

* 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, Storbritannien)

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.**
Hætten kan tages af uden at afbryde slangen.
- B5. Hvis vakuumarbejdsstationen skal rengøres (f.eks. for støv eller spild), følges anvisningerne i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.**

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. nr.
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-kit (24)	Til 24 reaktioner på PyroMark Q24-systemer: Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP og H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekventering af 24 prøver	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekventering 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 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

* Kun Storbritannien.

† Resten af verden.

Produkt	Indhold	Kat. nr.
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Beholdere til dispensering af nucleotider og reagenser	979302
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), engangs-filterspidser, engangspidsholdere, 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.

Denne side er tom med vilje

Denne side er tom med vilje

Denne side er tom med vilje

Varemærker: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation); FrameStar® (4fitude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

Begrænset licensaftale for *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-kit

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun bruges i overensstemmelse med de protokoller, der følger med produktet og denne vejledning, og må kun bruges sammen med de komponenter, der findes 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 de protokoller, der følger med produktet, denne vejledning og yderligere protokoller, som kan fås på www.qiagen.com. Nogle af disse ekstra protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere til andre QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN stiller ingen garantier for dem og garanterer heller ikke for, at de ikke overtræder tredjeparters rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparters 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.

HB-1547-002 © 2013-2015 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

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

