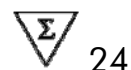


Vejledning til PyroMark KRAS Kit



Version 1



Det CE- og IVD-mærkede PyroMark KRAS Kit muliggør kvantitativ måling af mutationer i codon 12, 13 og 61 i det humane gen K-ras. Det giver klinikere information, som letter udvælgelsen af de patienter med kolorektal cancer, der sandsynligvis har mere gavn af behandling med EGFR-hæmmere.

Til in vitro-diagnostik



971450



1056444DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R2

MAT

1056444DA



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN er den førende producent af innovative prøve- og analyseteknologier, der muliggør isolation og detektion af indholdet i enhver form for biologisk prøve. Vores avancerede kvalitetsprodukter og -service sikrer vellykkede analyser fra prøvetagning til resultat.

QIAGEN sætter standarden i:


- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- MikroRNA-forskning og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyseteknologier

Vores mission er at give kunden redskaberne til at opnå stor succes og gennembrud. Læs mere på www.qiagen.com.










Indhold

Indhold af kittet	4
Symbolforklaring	4
Forsendelse og opbevaring	5
Anvendelse	5
Anvendelsesbegrænsninger	6
Teknisk support	6
Kvalitetskontrol	7
Sikkerhed	7
Indledning	8
Princip og procedure	8
Performance-egenskaber	9
Udstyr og reagenser der ikke medfølger	14
Vigtige bemærkninger	15
Generelle forholdsregler	15
Prøvemateriale	15
Isolering af DNA	15
Kontroller	16
Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx	17
Protokol 2: PCR med anvendelse af HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit og PyroMark KRAS Kit	19
Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance-perler	22
Protokol 4: Forberedelse af prøver inden Pyrosequencing på PyroMark Q24 MDx	24
Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24 MDx	27
Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24 MDx-kørsel	29
Fejlfinding	34
Bilag A: Opsætning af PyroMark KRAS-analyser	36
Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og kar	38
Litteratur	39
Bestilling	40

Indhold af kittet

PyroMark KRAS Kit	(24)
Katalognr.	971450
Antal reaktioner	24
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
wt KRAS Control DNA	100 µl
Mutant KRAS Control DNA	100 µl
Vejledning	 1

Symbolforklaring

 <N>	Indeholder reagenser til <N> test
	Anvendes inden
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Indhold
	Nummer



Temperaturbegrænsninger



Producent



Se information i vejledningen



Vigtig bemærkning

Forsendelse og opbevaring

PyroMark KRAS Kit forsendes på tøris og bør opbevares ved -20 °C efter levering. Gentagen optøning og nedfrysning (>5 x) bør undgås. PyroMark KRAS Kit er stabilt indtil udløbsdatoen, når det opbevares under disse betingelser.

Anvendelse

Der er kraftigt fokus på mutationsanalyse af K-ras i Europa, fordi Den Europæiske Union har autoriseret betinget markedsføring af panitumumab og cetuximab til behandling af metastaserende koloncancer hos patienter med ikke-muteret (vildtype) K-ras-gen. Det betyder, at panitumumab og cetuximab kun kan indgives til patienter, som er blevet screenet for mutation af K-ras.

Analysen er beregnet til at hjælpe læger med at identificere de patienter med kolorektal cancer, der sandsynligvis har mere gavn af behandling med EGFR-hæmmere såsom panitumumab og cetuximab. Den er beregnet som supplement til andre prognostiske faktorer, der anvendes i øjeblikket, til at udvælge egnede patienter til behandling med EGFR-hæmmere baseret på patientens mutationsstatus i codon 12, 13 og 61 i K-ras-genet. Patientens mutationsstatus skal tages i betragtning sammen med andre sygdomsfaktorer, for at lægen kan bestemme behandlingen. Mutationsstatus af K-ras må ikke være eneste grundlag for en behandlingsbeslutning for en cancerpatient.

Produktet er beregnet til kvantitativ måling af mutationer i codon 12, 13 og 61 i det humane gen K-ras. Produktet består af 2 analyser: En til detektion af mutationer i codon 12 og 13, og en anden til detektion af mutationer i codon 61. Begge analyser indeholder specifikke PCR-primere og en sekvensprimer.

Anvendelsesbegrænsninger

Resultater fra dette produkt skal tolkes i sammenhæng med alle relevante kliniske og laboratoriemæssige fund.

Produktet må kun anvendes af ansatte, der er specielt instrueret og uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer og i PyroMark Q24 MDx System.

Der er udført valideringsstudier af DNA, der er ekstraheret fra formalinfikserede, paraffinindstøbte tumorprøver.

Materialer til oprensning af DNA, PCR-amplifikation og forberedelse af prøver til Pyrosequencing® analyser medfølger ikke. Produktet er blevet valideret med produkter til oprensning af DNA og PCR-reagenser fra QIAGEN. Brug de anbefalede produkter til PCR-amplifikation og oprensning af DNA som specificeret på side 14 og 15.

Produktet er kun beregnet til brug på PyroMark Q24 MDx System.

Det er nødvendigt at følge brugervejledningen nøje for at få optimale resultater. Fortynding af reagenserne på anden vis end det er beskrevet i denne vejledning, anbefales ikke og vil resultere i tab af ydeevne.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på alle komponenters æsker og etiketter. Anvend ikke produkter, der er udløbet eller har været opbevaret forkert.

Teknisk support

Hos QIAGEN er vi stolte af at kunne levere teknisk support af høj kvalitet. De ansatte på vores afdelinger for teknisk service er erfarne videnskabsfolk med omfattende praktisk og teoretisk ekspertise i prøve- og analyseteknologier samt anvendelse af produkter fra QIAGEN. Kontakt os, hvis du har spørgsmål om eller problemer med PyroMark KRAS Kit eller produkter fra QIAGEN generelt.

QIAGENS kunder er en vigtig kilde til information om avanceret eller specialiseret anvendelse af vores produkter. Denne information er også til gavn for andre videnskabsmænd og for forskerne hos QIAGEN. Derfor opfordrer vi dig til at kontakte os, hvis du har forslag til produktets ydeevne eller nye applikationer og teknikker.

Teknisk support og flere oplysninger findes under Technical Support Center på www.qiagen.com/Support. Eller ring til en af QIAGEN-afdelingerne for teknisk service eller den lokale forhandler (se bagsiden eller gå ind på www.qiagen.com).

Kvalitetskontrol

Hvert lot med PyroMark KRAS Kit testes i overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede system for kvalitetskontrol mod forudbestemte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Sikkerhed

Bær altid egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller under arbejdet med kemikalier. Der er flere oplysninger på de relevante Material Safety Data Sheets (MSDS) (sikkerhedsdatablade). Sikkerhedsdatabladene ligger online i et kompakt PDF-format på www.qiagen.com/support/MSDS.aspx, hvor du kan finde, se og udskrive MSDS'et for hvert QIAGEN-kit og kittenes komponenter.

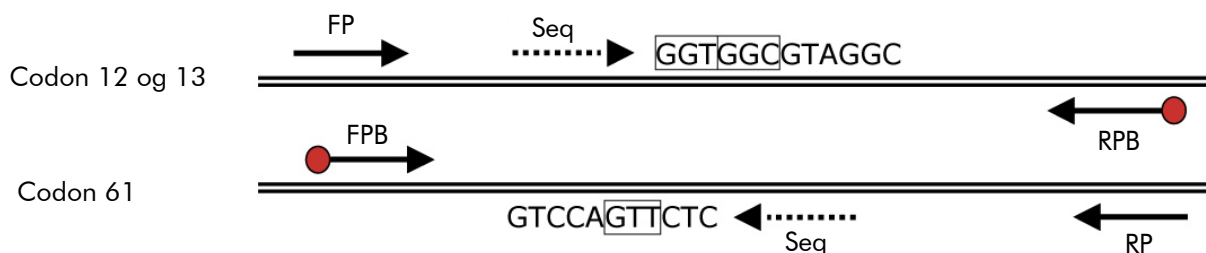
Nødinformation 24 timer i døgnet

Medicinsk nødinformation på engelsk, fransk og tysk kan fås 24 timer i døgnet fra:

Die Beratungsstelle bei Vergiftungen (Giftinformationscenter) Mainz, Tyskland
Tlf.: +49-6131-19240

Indledning

Det CE- og IVD-mærkede PyroMark KRAS Kit er beregnet til kvantitativ måling af mutationer i codon 12, 13 og 61 i det humane gen K-ras. Produktet består af 2 analyser: En til detektion af mutationer i codon 12 og 13, og en anden til detektion af mutationer i codon 61. De to regioner amplificeres separat ved PCR og sekventeres gennem den definerede region. Sekvenser, der omgiver de definerede positioner, fungerer som normalisering og reference-peaks til kvantificering og vurdering af analysens kvalitet.



Figur 1. Illustration af KRAS-analysen. Den angivne sekvens er den analyserede sekvens i en normal prøve. **FP** og **FPB**: Forward PCR-primere (B indikerer biotinylering). **RP** og **RPB**: Reverse PCR-primere (B indikerer biotinylering). **Seq**: Sekvensprimere.

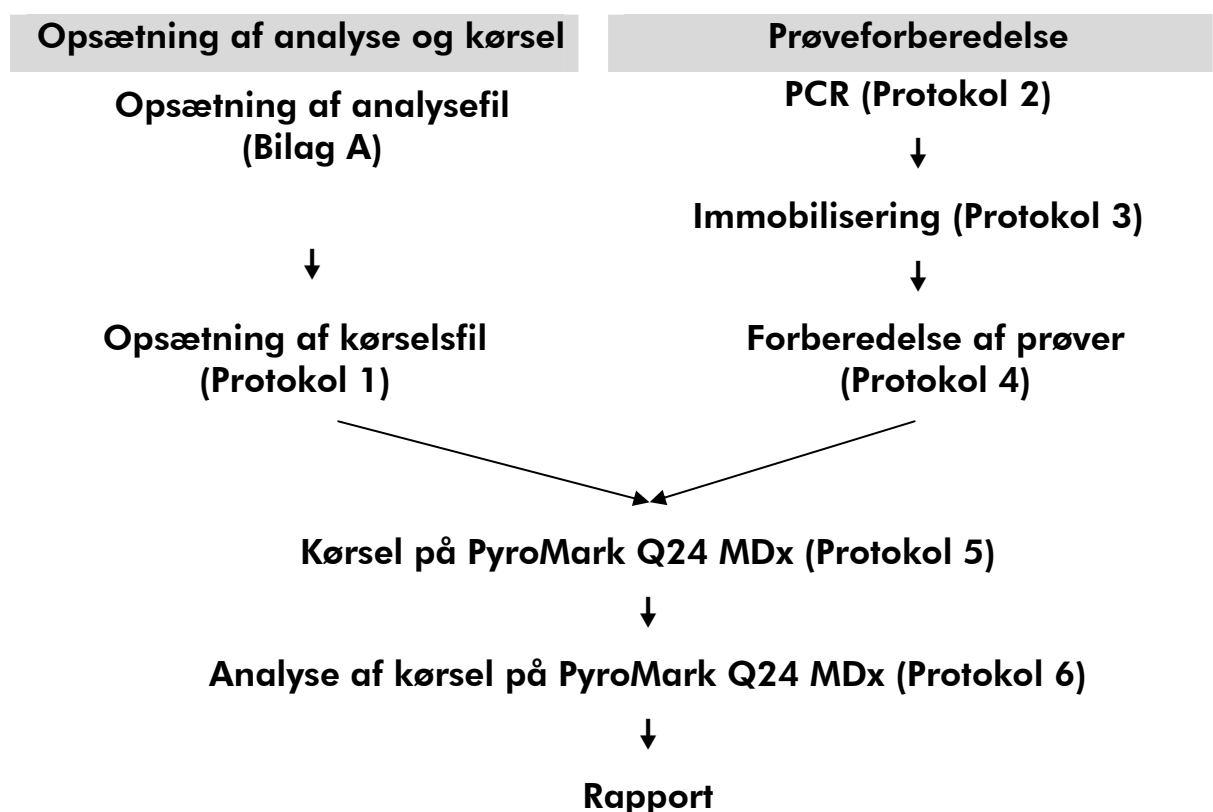
i Codon 12 og 13 sekventeres forward, codon 61 sekventeres reverse.

Produktet består af en blanding af PCR-primere og en sekvensprimer i hver analyse. Primerne leveres som en opløsning. Hver ampul indeholder 24 µl af hver primer eller primerblanding.

Princip og procedure

Arbejdsgangen på side 9 illustrerer analyseproceduren. Efter PCR med primere, der retter sig mod codon 12/13 og codon 61, immobiliseres amplikonerne på Streptavidin Sepharose High Performance-perler. Enkeltstrenget DNA forberedes, og de tilsvarende sekvensprimere hybridiseres (annealing) til DNA'et. Prøverne analyseres derefter på PyroMark Q24 MDx ved hjælp af en fil til opsætning af kørslen og en kørselsfil. "Sequence to Analyze" (sekvens til analyse) kan justeres til detektion af sjældne mutationer efter kørslen (se "Protokol 6: Analyse af PyroMark Q24 MDx-kørsel", side 29 og Bilag A, side 36).

Arbejdsgang for PyroMark KRAS-proceduren



Performance-egenskaber

Blindgrænse og detektionsgrænse

Blindgrænsen (LOB) og detektionsgrænsen (LOD) er fastsat for en række mutationer ved hjælp af blandinger af plasmider, der ligner dem, der leveres med kittet. Der blev anvendt to metoder afhængigt af mutationstypen.

- **Mutationer, der resulterer i forekomst af en peak i en ellers blind position:** LOB og LOD blev bestemt i overensstemmelse med anbefalingerne i NCCLS Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (protokol for bestemmelse af detektions- og kvantifikationsgrænser; godkendte retningslinjer). α - og β -fejl (hhv. falsk positiv og falsk negativ) blev sat til 5 %.
- **Mutationen GGT → GTT i codon 12:** Denne mutation resulterer i ændringer, der involverer enkelte og dobbelte peaks, og som ikke giver et lineært respons ved lave niveauer af mutation. Denne position gav en LOB, der konsekvent var 0 % enheder ($n = 72$). Det laveste signal, der indikerer tilstedeværelse af en mutation i denne position, var sat til 1 % enheder, hvilket klart ligger over det konsekvente baseline-niveau på 0 % enheder. Ved analysering af en prøve, der indeholdt mutation af 7 % enheder, gav 95 % af resultaterne ($n = 89$) et signal, der kunne anses som positivt.

(≥ 1 % enheder). Derfor blev LOD for denne mutation sat til 7 % enheder, og alle prøver, der giver et signal over 1 % enheder, blev anset som positive for denne mutation.

Tabel 1. Fastsat LOB og LOD for specifikke mutationer

Mutation	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
Codon 12 (GGT)			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	i.r.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
Codon 13 (GGC)			
GAC	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA) som analyseret i reverse retning (TTG)			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, som findes online hos Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

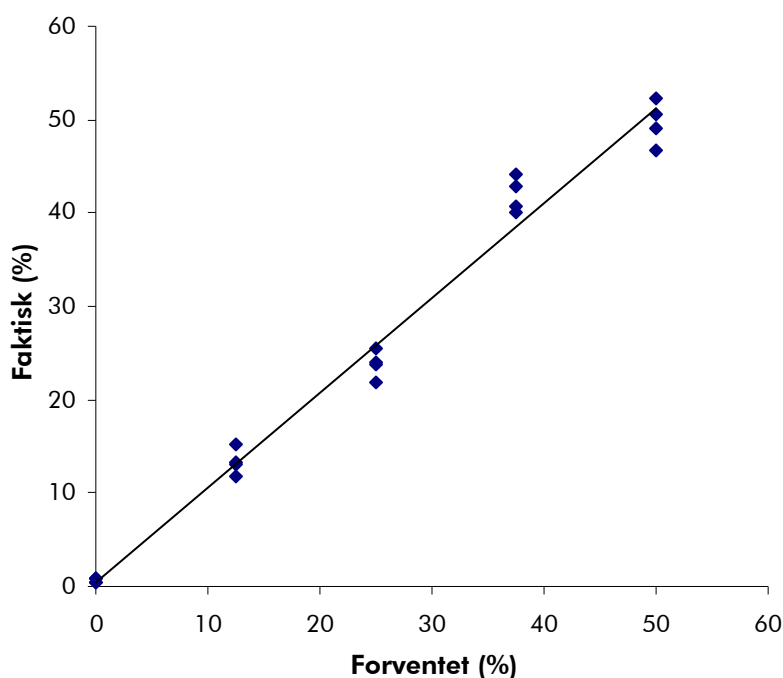
i.r.: ikke relevant.

i Værdierne blev baseret på kørsler, hvor signalet var over 60 RLU, som på rutinemæssig vis blev taget fra 10 ng DNA, der var isoleret fra formalinfikseret, paraffinindstøbt væv. Det anbefales, at metodens ydeevne bekræftes på laboratoriet.

Linearitet

Lineariteten blev målt i henhold til dokument EP6-A fra Clinical and Laboratory Standards Institute, "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Evaluering af lineariteten af kvantitative måleprocedurer: En statistisk tilgang; godkendte retningslinjer).

Normale og muterede sekvenser blev blandet proportionelt for at give følgende niveauer af mutation: 0, 12,5, 25, 37,5 og 50 %. Fire replikater af blandingerne blev placeret i et vilkårligt mønster på en plade og analyseret. Resultatet af mutationen GGT → TGT i codon 12 blev analyseret med Analyse-it® software v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) og er vist i figur 2.



Figur 2. Linearitet af mutation GGT → TGT i codon 12.

Den overordnede repeterbarhed var 1,64 % enheder, og resultaterne var lineære inden for tilladt ikke-linearitet på 3 %. Lignende resultater blev opnået for mutationen GGC → GAC i codon 13.

Intermediær unøjagtighed

Bestemmelsen af lineariteten af mutationen GGT → TGT i codon 12 blev gentaget af 3 operatører på 3 forskellige dage med forskellige kombinationer af PyroMark Q24 MDx-instrument og PyroMark Gold Q24 Reagents. Resultaterne af de 3 kørsler er vist i tabel 2.

Tabel 2. Intermediær unøjagtighed

Forventet	Kørsel 1		Kørsel 2		Kørsel 3		Sammendrag	
	Middel	SA	Middel	SA	Middel	SA	Middel	SA
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

Alle værdier er anført i % enheder. SA: standardafvigelse.

Værdierne for den intermediære unøjagtighed (SA) var derfor 0,6-2,0 % enheder i det målte område på 0-50 %.

Diagnostisk sensitivitet og specificitet

PyroMark KRAS Kit er blevet evalueret i et studie. Sammenlignet med DxS Therascreen®: K-RAS Mutation Kit, 100 prospektive tumorprøver af kolorektal cancer blev analyseret for mutationer i codon 12 og 13.

DNA til testning blev isoleret med EZ1 DNA Tissue Kit, og analyser blev udført med PyroMark KRAS Kit på PyroMark Q24 MDx og med Therascreen: K-RAS Mutation Kit på ABI PRISM® 7900HT SDS.

Af de 100 prøver, der blev analyseret, kunne mutationsstatus bestemmes i 91 prøver med DxS-analysen. Med Pyrosequencing-analysen var det muligt at bestemme mutationsstatus i 94 prøver for codon 12 og 13.

Ved at udelukke prøver, der mislykkedes med det ene eller begge kit, var der en korrelation på 100 % med PyroMark KRAS Kit sammenlignet med Therascreen: K-RAS Mutation Kit. Den diagnostiske sensitivitet af PyroMark KRAS Kit var 100 %, og den diagnostiske specificitet var 100 % (tabel 3).

Tabel 3. Resultaterne af de analyserede, prospektive tumorprøver af kolorektal cancer for codon 12 og 13

		Therascreen: K-RAS Mutation Kit		
		Mutant	wt	Total
PyroMark KRAS Kit	Mutant	33	0	33
	wt	0	57	57

Analyse af codon 61

De samme 100 prøver blev analyseret for mutationer i codon 61 med PyroMark KRAS Kit. Kun en prøve afgav en mislykket kvalitetsvurdering for analysen af codon 61. Denne prøve mislykkedes også med både PyroMark- og Therascreen-analyserne for codon 12 og 13, hvilket angiver, at DNA'et var af for dårlig kvalitet. Den højere succesrate for analysen af codon 61 angiver, at den er mindre afhængig af DNA'ets kvalitet end både PyroMark- og Therascreen-analyserne af codon 12 og 13. Siden Therascreen-analysen ikke tester for mutationer i codon 61, er en direkte sammenligning af analyserne ikke mulig.

Mutationer i codon 61 blev detekteret i 4 ud af de 99 prøver. Tre indeholdt hyppige mutationer (CAC, CAT, CTA) i codon 61, mens den fjerde prøve indeholder mutationer i både codon 60 (GGT → GGA) og codon 61 (CAA → AAA).

Udstyr og reagenser der ikke medfølger

Bær altid egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller under arbejdet med kemikalier. Der er flere oplysninger på de relevante Material Safety Data Sheets (MSDS) (sikkerhedsdatablade), som kan fås hos produktleverandørerne.

- DNA isolationskit (se "Isolering af DNA", side 15)
- Pipetter (justerbare)*
- Sterile pipettespidser med filtre
- Mikrocentrifuge (til laboratoriebrug)*
- PCR-reagenser (PyroMark KRAS Kit blev valideret med HotStarTaq® Plus Master Mix Kit, katalognr. 203643, 203645 eller 203646)
- PCR-maskine* (thermal cycler) og passende PCR-rør
- Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Healthcare, katalognr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 MDx (katalognr. 9001513)*†
- PyroMark Q24 MDx Software (katalognr. 9019063)†
- PyroMark Q24 Plate (katalognr. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (katalognr. 979302)†
- PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (katalognr. 9001515 eller 9001517)*†
- PyroMark Gold Reagents (katalognr. 971802)†
- PyroMark Binding Buffer (katalognr. 979306)†
- PyroMark Denaturation Solution (katalognr. 979307)†
- PyroMark Wash Buffer, koncentrat (katalognr. 979308)†
- PyroMark Annealing Buffer (katalognr. 979309)†
- Plademixer* til immobilisering til perler
- Varmeplade* der kan blive 80 °C
- PCR-plade eller -strip med 24 brønde
- Låg til strip
- Vand af høj renhedsgrad (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende)
- Ethanol (70 %)

* Sørg for at instrumenterne er blevet kontrolleret og kalibreret i overensstemmelse med producentens anbefalinger.

† CE- og IVD-mærket i henhold til Rådets direktiv 98/79/EF. Alle andre anførte produkter er ikke CE- og IVD-mærket ifølge Rådets direktiv 98/79/EF.

Vigtige bemærkninger

Generelle forholdsregler

- ① Vær altid opmærksom på følgende:
 - Anvend sterile pipettespidser med filtre.
 - Positive materialer (prøver, positive kontroller og amplikon) skal opbevares og ekstraheres separat fra alle andre reagenser og tilsættes til reaktionsblandingen på en fysisk adskilt facilitet.
 - Optø alle komponenter grundigt ved stuetemperatur (15-25 °C), inden analysen påbegyndes.
 - Når komponenterne er optøet, skal de blandes (ved at pipettere op og ned eller anvende pulserende vortex) og centrifugeres kort.

Prøvemateriale

- ① Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

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

- ① Prøver fra personer, der får heparinbehandling, må ikke anvendes. Blodprøver, der er taget i rør med heparin som antikoagulans, må ikke anvendes. Heparin påvirker PCR.

Isolering af DNA

Kittene fra QIAGEN, der er vist i tabel 4, anbefales til oprensning af DNA fra de humane prøvetyper, der er angivet til brug med PyroMark KRAS Kit. Oprens DNA'et i henhold til vejledningerne til kittene.


Tabel 4. Kit til oprensning af DNA anbefales til brug med PyroMark KRAS Kit


Prøvemateriale	Kit til isolering af nukleinsyre	Katalognummer (QIAGEN)
Paraffinindstøbt væv	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1® DNA Tissue Kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Ifølge protokollen til anvendelse med paraffinindstøbt væv. EZ1 DNA Tissue Kit er beregnet til anvendelse sammen med EZ1 Advanced (katalognr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (katalognr. 9001492 eller 9001493) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9018700), eller med BioRobot® EZ1 (katalognr. 9000705, kan ikke længere fås) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9015862).

† CE- og IVD-mærket i henhold til Rådets direktiv 98/79/EF.


Kontroller

 To positive kontroller er inkluderet i produktet. Disse fungerer som kontroller for PCR- og sekventeringsreaktioner. wt KRAS Control DNA indeholder den normale K-ras-sekvens, og Mutant KRAS Control DNA indeholder mutationer i alle 3 codoner. Begge kontroller har baseudskiftning i codon 15 og codon 59 for at adskille dem fra genomisk DNA. Kontrollerne kan enten inkluderes separat i analysen eller blandes i foretrukne forhold. Sekvenserne af kontrollerne er vist i tabel 5.

 For at analysere Mutant KRAS Control DNA indstilles "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) til **NGTGRCGTAGGYA** for at rette den mod første base i codon 12 (se Bilag A, side 36).

Tabel 5. Sekvenser af kontrollerne

Kontrol	Codon 12	Codon 13	Codon 15	Codon 59	Codon 61
Normal	GGT	GGC	GGT	GTA	CAA
Muteret	TGT	GAC	GGT	GTA	CAC

 Derudover skal en negativ kontrol (uden DNA-skabelon) altid inkluderes.

Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx

Vigtigt inden start

- Hvis det er nødvendigt, kan LOB bekræftes med en normal prøve eller medfølgende wt KRAS Control DNA for at generere en hel plade af resultater. Der er flere oplysninger i NCCLS Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (protokol for bestemmelse af detektions- og kvantifikationsgrænser; godkendte retningslinjer).

Skal gøres inden start

- Lav en analyseopsætning som beskrevet i Bilag A. Dette skal kun gøres en gang inden kørsel af PyroMark KRAS-analysen første gang (se Bilag A, side 36).

Procedure

1. Klik på på værktøjslinjen.

En ny kørselsfil oprettes.

2. Indtast kørselsparametrene (se "Kørselsparametre" nedenfor).

3. Opsæt pladen ved at føje analyser for både codon 12/13 og codon 61 til brønde, der svarer til de prøver, der skal analyseres. En negativ prøve (uden DNA) og medfølgende wt KRAS Control DNA og Mutant KRAS Control DNA anbefales som kontroller.


4. Når kørslen er opsat og klar til at blive kørt på PyroMark Q24 MDx: Udskriv en liste over nødvendige volumener enzymblanding, substratblanding og nukleotider samt pladeopsætningen. Vælg "Pre Run Information" (information inden kørsel) på menuen "Tools" (værktøj), og klik på , når rapporten åbner. Luk kørselsfilen og kopier den til en USB-nøgle (leveret med systemet) via Windows® Explorer.



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

For at køre pladen på PyroMark Q24 MDx henvises til "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24 MDx", side 27.

Kørselsparametre

Run name (kørselsnavn):	Det navn, som kørslen får, når filen gemmes. Hvis filen omdøbes, ændres kørselsnavnet også.
Instrument method (instrumentmetode):	Vælg instrumentmetoden i overensstemmelse med de reagenser og kassetter, der skal anvendes til kørslen. Se vejledningen til produkterne.
Plate ID (plade-id):	Valgfrit: Indtast id'et på PyroMark Q24 Plate.
Bar code (stregkode):	Valgfrit: Indtast et stregkodennummer for pladen, eller hvis en stregkodescanner er tilsluttet computeren, placeres musemarkøren i tekstboksen "Barcode" (stregkode) (ved at klikke i boksen), og stregkoden scannes.
Reagent ID (reagens-id):	Valgfrit: Indtast lotnummeret på de PyroMark Gold Q24 Reagents, der skal anvendes. Lotnummeret står på produktets etiket.  Vi anbefaler at indtaste reagens-id'et, så eventuelle, uventede problemer med reagenserne kan spores.
Run note (bemærkning til kørsel):	Valgfrit: Skriv en bemærkning om indholdet af eller formålet med kørslen.

Tilføj analysefiler

En analyse kan føjes til en brønd ved enten at:

- Højreklikke på brønden og vælge "Load Assay" (indlæs analyse) fra kontekstmenuen.
- Vælge en analyse i genvejsbrowseren og klikke og trække analysen hen til brønden.

En brønd farvekodes i overensstemmelse med den analyse, der indlæses for den pågældende brønd.

Indtast prøve-id'er og bemærkninger

Et prøve-id eller en bemærkning indtastes ved at vælge cellen og skrive teksten.

Et prøve-id eller en bemærkning redigeres ved enten at vælge cellen (det aktuelle indhold vil blive valgt) eller dobbeltklikke på cellen.

Protokol 2: PCR med anvendelse af HotStarTaq Plus Master Mix Kit og PyroMark KRAS Kit

Denne protokol er til PCR-amplifikation af en region, der indeholder codon 12 og codon 13, og en separat PCR-amplifikation af en region, der indeholder codon 61 ved hjælp af PyroMark KRAS Kit.



Vigtigt inden start

- HotStarTaq Plus DNA Polymerase kræver aktivering i **5 min ved 95 °C** (se *HotStarTaq Plus PCR hYndbog*).
- Opsæt alle reaktionsblandinger i et andet område end det, der anvendes til oprensning af DNA, og tilsæt DNA-skabelon til PCR, PCR-analyse eller forberedelse af prøver inden Pyrosequencing-analyse.
- Anvend spidser til engangsbrug med hydrofobe filtre for at minimere krydskontamination.

Skal gøres inden start

- Inden rørene med PCR-primere åbnes, skal de centrifugeres kort for at samle indholdet i bunden af rørene.
- Juster koncentrationen af DNA-prøven til 0,4-2 ng/μl, hvis det er nødvendigt.

Procedure

- 1. Optø primer-opløsninger og skabelon-nukleinsyre.**
Bland godt inden brug.
- 2. Forbered en reaktionsblanding for hvert sæt PCR-primere ifølge tabel 6.**

Reaktionsblandingen indeholder typisk alle de komponenter, der er nødvendige for PCR, undtagen prøven.

Forbered en volumen af reaktionsblandingen, der er større end den, der er nødvendig til det totale antal PCR-analyser, der skal udføres.

Tabel 6. Forberedelse af reaktionsblanding til hver blanding PCR-primere

Komponent	Volumen/reaktion
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, 2x	12,5 µl
PCR Primer KRAS 12/13 eller PCR Primer KRAS 61	1 µl
Vand af høj renhedsgrad	6,5 µl
Total volumen	20 µl

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

Det er ikke nødvendigt at have PCR-rørene på is, eftersom HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase er inaktivt ved stuetemperatur.

4. Tilsæt 5 µl DNA-skabelon (2-10 ng genomisk DNA) til hvert PCR-rør (se tabel 7) og bland grundigt.



En negativ kontrol (uden DNA-skabelon) skal altid inkluderes.



Inkluder reaktioner med wt KRAS Control DNA og Mutant KRAS Control DNA som positive kontroller (se "Kontroller", side 16).

Tabel 7. Forberedelse af PCR

Komponent	Volumen/reaktion
Reaktionsblanding	20 µl
DNA-prøve	5 µl
Total volumen	25 µl

5. Programmer PCR-maskinen (thermal cycler) i henhold til producentens vejledning og med anvendelse af de betingelser, der er beskrevet i tabel 8.

Tabel 8. Protokol for optimeret cyklus

			Bemærkninger
Indledende aktivering:	5 min	95 °C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase aktiveres under denne opvarmning.
Cyklus i 3 trin:			
Denaturation	20 s	95 °C	
Hybridisering (annealing)	30 s	53 °C	
Ekstension	20 s	72 °C	
Antal cykler	40		
Endelig ekstension:	5 min	72 °C	

6. Sæt PCR-rørene i PCR-maskinen og start programmet.
7. Efter amplifikation fortsættes med "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance-perler".

Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance-perler

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

Skal gøres inden start

- Lad alle nødvendige reagenser og opløsninger få stuetemperatur (15-25 °C) inden start.

Procedure

1. Ryst forsigtigt flasken med Streptavidin Sepharose High Performance, indtil opløsningen er ensartet.
2. Forbered en mastermix til immobilisering af DNA i henhold til tabel 9. Forbered en volumen, der er 10 % større end den, der er nødvendig til det totale antal reaktioner, der skal udføres.

Tabel 9. Mastermix til immobilisering af DNA

Komponent	Volumen/prøve
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl
PyroMark Binding Buffer	40 µl
Vand af høj renhedsgrad	28 µl
Total volumen	70 µl

3. Tilsæt 70 µl mastermix til brøndene i en PCR-plade eller -strip med 24 brønde som defineret under opsætning af kørslen (se "Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx", side 17).
4. Tilsæt 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra Protokol 2 til hver brønd med mastermix som defineret under opsætning af kørslen (se "Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx", side 17).

i Den totale volumen pr. brønd skal være 80 µl efter tilsætning af mastermix og PCR-produkt.

5. Luk PCR-pladen (eller PCR-strip'en) med lågene.

i Sørg for at lækage mellem brøndene ikke er mulig.

6. Omryst PCR-pladen ved stuetemperatur (15-25 °C) i 5-10 min ved 1400 rpm.

ⓘ Mens dette foregår, forberedes PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation til prøveforberedelse som beskrevet i *Brugervejledning til PyroMark Q24*.

7. Fortsæt straks med "Protokol 4: Forberedelse af prøver inden Pyrosequencing på PyroMark Q24 MDx".

ⓘ Sepharose-perler bundfælder hurtigt. Perlerne skal opsamles med det samme efter omrystning.

Protokol 4: Forberedelse af prøver inden Pyrosequencing på PyroMark Q24 MDx

Denne protokol er til forberedelse af enkeltstrenget DNA og hybridisering af sekvensprimeren til skabelonen inden Pyrosequencing-analysen på PyroMark Q24 MDx.



Vigtigt inden start

- Inden rørene med sekvensprimer åbnes, skal de centrifugeres kort for at samle indholdet i bunden af rørene.
- Tilsæt de 2 forskellige sekvensprimere på samme måde, som blev defineret for pladen under opsætning af kørslen (se "Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx", side 17), afhængigt af den region, der skal analyseres (codon 12 og 13, eller codon 61).

Skal gøres inden start

- Sæt PyroMark Q24 Plate Holder på en varmeplade ved 80 °C til brug i trin 17.

Procedure

1. **Fortynd en tilstrækkelig mængde af hver sekvensprimer, Seq Primer KRAS 12/13 og Seq Primer KRAS 61, i PyroMark Annealing Buffer som vist i tabel 10.**

Forbered en volumen af fortyndet sekvensprimer, som er større end den volumen, der er nødvendig til det samlede antal prøver, der skal sekventeres (til det samlede antal prøver + en ekstra).

Tabel 10. Eksempel på fortynding af sekvensprimere

Komponent	Volumen/prøve	Volumen til 9 + 1 reaktioner
Seq Primer KRAS 12/13 eller Seq Primer KRAS 61	0,8 µl	8 µl
PyroMark Annealing Buffer	24,2 µl	242 µl
Total volumen	25 µl	250 µl

2. Tilsæt 25 μ l fortyndet sekvensprimer til hver brønd i PyroMark Q24 Plate i henhold til opsætning af kørslen (se "Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx", side 17).

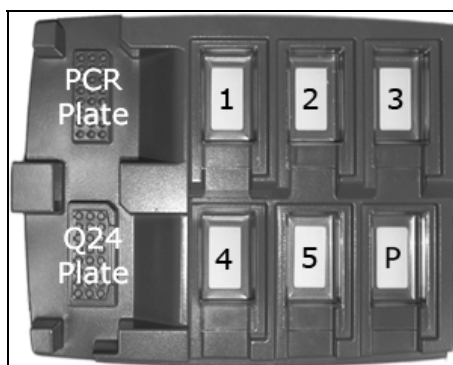


Behold en af PyroMark Q24 Plate Holders (leveres med PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation) ved stuetemperatur (15-25 °C), og brug den som støtte, når pladen skal forberedes og flyttes.

3. Sæt PCR-pladen (eller strip'en) fra Protokol 3 og PyroMark Q24 Plate på arbejdsbordet (se figur 3).



Sørg for at pladen vender på samme måde, som da prøverne blev indlæst.



Figur 3. Anbring PCR-pladen (eller strip'en) og PyroMark Q24 Plate på vakuum-arbejdsstationen.

4. Tilfør vakuum til værktøjet ved at åbne for vakuumkontakten.
5. Sænk forsigtigt filterproberne ned i PCR-pladen (eller strip'en) for at opsamle perlerne, der indeholder immobiliseret skabelon. Hold proberne nede i 15 s. Udvis forsigtighed, når værktøjet løftes.



Sepharose-perler bundfælder hurtigt. Hvis der er gået mere end 1 min, siden pladen (eller strip'en) blev omrystet, skal den omrystes igen i 1 min, inden perlerne opsamles.

6. Overfør værktøjet til karret med 70 % ethanol (kar 1). Skyl filterproberne i 5 s.
7. Overfør værktøjet til karret med denatureringsmiddel (kar 2). Skyl filterproberne i 5 s.
8. Overfør værktøjet til karret med vaskebuffer (kar 3). Skyl filterproberne i 10 s.
9. Løft værktøjet op og tilbage til en vinkel over 90° lodret i 5 s. for at tømme væsken ud af filterproberne (se figur 4).



Figur 4. Illustration af vakuumværktøjet løftet i en vinkel over 90° lodret.

10. Mens værktøjet holdes over PyroMark Q24 Plate, lukkes der for vakuumkontakten på værktøjet (Off [fra]).
 11. Frigør perlerne i pladen med sekvensprimere ved at ryste værktøjet forsigtigt fra side til side. Lad filterproberne hvile mod bunden af brøndene.
 12. Overfør værktøjet til det kar, der indeholder nukleasefrit vand (kar 4), og omryst værktøjet i 10 s.
 13. Vask filterproberne ved at sænke dem ned i nukleasefrit vand (kar 5) og tilføre vakuum. Skyl proberne med 70 ml nukleasefrit vand.
 14. Løft værktøjet op og tilbage til en vinkel over 90° lodret i 5 s. for at tømme væsken ud af filterproberne (se figur 4).
 15. Luk for vakuumkontakten på værktøjet (Off [fra]) og anbring værktøjet i parkeringsposition (P).
 16. Sluk for vakuumpumpen.
- ⓘ Ved arbejdsdagens slutning skal flydende affald og resterende opløsninger kasseres, og PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation skal undersøges for støv og spild, se Bilag B, side 38.
17. Opvarm PyroMark Q24 Plate med prøverne ved 80 °C i 2 min ved hjælp af den forvarmede PyroMark Q24 Plate Holder.
 18. Tag PyroMark Q24 Plate af pladeholderen og lad prøverne afkøle til stuetemperatur (15-25 °C) i mindst 5 min.
 19. Fortsæt med "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24 MDx".

Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24 MDx

Denne protokol beskriver, hvordan PyroMark Gold Q24 Reagents fyldes i PyroMark Q24 Cartridge, og hvordan en kørsel startes og afsluttes på PyroMark Q24 MDx. Der er detaljerede oplysninger om opsætning af en kørsel i *Brugervejledning til PyroMark Q24*.






Vigtigt inden start

- Rapporten Pre Run Information (information inden kørsel), som findes på menuen "Tools" (værktøj) under opsætning af kørslen (se "Protokol 1: Opsætning af kørsel på PyroMark Q24 MDx", side 17), indeholder information om den volumen af nukleotider, enzym og substratbuffer, der er nødvendig til en specifik analyse.

Procedure

1. Isæt PyroMark Q24 Cartridge med de korrekte volumener af nukleotider, enzym, og substratbuffere.
2. Åbn kassettelågen og sæt den fyldte reagenskassette ind med etiketten vendt udad. Skub kassetten helt ind og tryk den ned.
3. Sørg for at linjen foran på kassetten er synlig og luk lågen.
4. Åbn rammen til at holde plader, og sæt pladen på varmepladen.
5. Luk rammen til at holde plader og låget på instrumentet.
6. Sæt USB-nøglen (med kørselsfilen) i USB-porten foran på instrumentet.

 Tag ikke USB-nøglen ud, før kørslen er færdig.

7. Vælg "Run" (kør) på hovedmenuen (ved hjælp af knapperne  og  på skærmen) og tryk på "OK".
8. Vælg kørselsfilen med knapperne  og  på skærmen.
 Se indholdet i en mappe ved at vælge mappen og trykke på "Select" (vælg). Gå tilbage til den foregående visning ved at trykke på "Back" (tilbage).
9. Når kørselsfilen er valgt, trykkes på "Select" (vælg) for at starte kørslen.
10. Når kørslen er færdig, og instrumentet bekræfter, at kørselsfilen er blevet gemt på USB-nøglen, trykkes på "Close" (luk).
11. Tag USB-nøglen ud.
12. Åbn låget på instrumentet.
13. Åbn kassettelågen og tag reagenskassetten ud ved at løfte den op og trække den ud.

- 14. Luk lågen.**
- 15. Åbn rammen til at holde plader, og tag pladen af varmepladen.**
- 16. Luk rammen til at holde plader og låget på instrumentet.**
- 17. Kasser pladen og rens kassetten.**
- 18. Analyser kørslen ifølge "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24 MDx-kørsel".**

Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24 MDx-kørsel

Denne protokol beskriver mutationsanalysen af en færdig KRAS-kørsel med brug af PyroMark Q24 MDx Software.

Procedure

1. Sæt USB-nøglen (med den færdige kørselsfil) i computerens USB-port.
2. Flyt kørselsfilen fra USB-nøglen til den ønskede placering på computeren ved hjælp af Windows Explorer.
3. Åbn kørselsfilen i AQ-funktion i PyroMark Q24 MDx Software ved enten at vælge "Open" (åbn) på menuen "File" (fil) eller ved at dobbeltklikke på filen (✓) i genvejsbrowseren.
4. Klik på en af analyseknapperne for at analysere kørslen og få en oversigt over resultaterne.



Analyser alle brønde.



Analyser den valgte brønd.

Analyseresultaterne (allelfrekvenser) og kvalitetsvurderinger vises over den variable position i Pyrogram-sporet. Der er detaljerede oplysninger om analysering af en kørsel i *Brugervejledning til PyroMark Q24*.

5. En rapport kan genereres ved at vælge **Full Report (komplet rapport)** under "Reports for AQ runs" (rapporter for AQ-kørsler) på menuen.



De hyppigste mutationer i K-ras findes ved nukleotid 35 (anden base i codon 12). Derfor retter den almindelige "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering), som er defineret i Analysis Setup (opsætning af analyse), sig mod mutationer i denne position (se Bilag A, side 36). Hvis en prøve indeholder en mutation ved nukleotid 34 (første base i codon 12), kan "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) ændres til også at analysere mutationsstatus ved denne position, som beskrevet i Bilag A.

Opdaterede mutationsfrekvenser i det humane gen K-ras i codon 12/13 og codon 61 gives online af Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.



Vi anbefaler enkelte peak-højder på over 30 RLU for at få pålidelige resultater. 30 RLU bør indstilles som "required peak height for passed quality" (nødvendig peak-højde for godkendt kvalitet) i opsætning af analysen (se Bilag A og *Brugervejledning til PyroMark Q24*).

① Rapporten over AQ-analyseresultater bør anvendes som dokumentation på kvantificering af alleler. Tallene i Pyrogrammet er afrundede og viser ikke den præcise kvantificering.

① **Genanalyse af prøver uden detekteret mutation i nukleotid 35 eller med kvalitetsvurderingen "Check" (kontroller) eller "Failed" (mislykket)**

Vi anbefaler kraftigt at genanalysere alle prøver uden detekteret mutation i nukleotid 35 såvel som prøver, som fik kvalitetsvurderingen "Check" (kontroller) eller "Failed" (mislykket) med "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) rettet mod mutationer i nukleotid 34. Kvalitetsvurderingerne "Check" (kontroller) og "Failed" (mislykket) kan indikere en reference-peak ved en position, der ikke forventes for en mutation i nukleotid 35. En peak i hvilken som helst af de første 3 dispensationer viser, at der er en mutation i nukleotid 34.

For at genanalysere og rette analysen mod mutationer i nukleotid 34 henvises der til "Analysis Setup" (opsætning af analyse). Skift "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) fra **GNTGRCGTAGGYA** til **NGTGRCGTAGGYA**. Tryk på knappen "Apply" (anvend) og klik på "To All" (for alle), når vinduet "Apply Analysis Setup" (anvend analyseopsætning) åbner.

① **Genkørsel af prøver mhp. detektion af mutationer på lavt niveau**

Det anbefales kraftigt, at en normal prøve inkluderes i hver kørsel mhp. sammenligning. Alle prøver, der viser en højere mutationsfrekvens end den tilsvarende position i den normale prøve, skal undersøges i forhold til tabellen over detektionsgrænser (se tabel 11, side 31). Prøverne kan også sammenlignes med hinanden for at afsløre usædvanligt høje mutationsfrekvenser.

Som vejledning skal prøver, der har en mistænkt mutation i området fra LOD (tabel 11) til LOD + 3 % enheder, genanalyseres i dobbeltbestemmelse sammen med en normal prøve i dobbeltbestemmelse. Hvis begge dobbeltbestemmelser giver samme resultat som den oprindelige analyse og er synligt anderledes end den normale kontrol, kan prøven anses som positiv for mutationen. Bemærk at behandlingsbeslutninger for cancerpatienter ikke alene må baseres på mutationsstatus af K-ras.

① I tilfælde af mistænkt GGT → GTT mutation kan et resultat over 1 % anses som positivt. Dette niveau kan variere betydeligt mellem replikater (se "Blindgrænse og detektionsgrænse", side 9).

Tabel 11. Fastsat LOB og LOD for specifikke mutationer

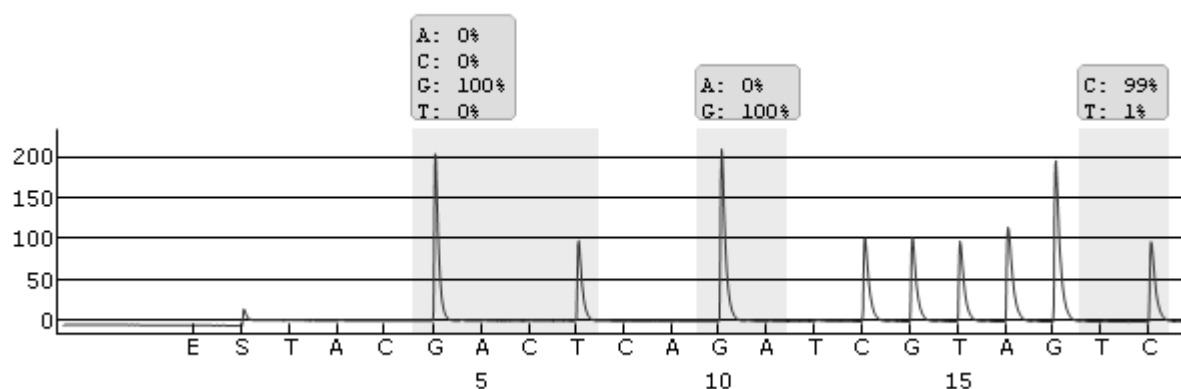
Mutation	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
Codon 12 (GGT)			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	i.r.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
Codon 13 (GGC)			
GAC	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA) som analyseret i reverse retning (TTG)			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, som findes online hos Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

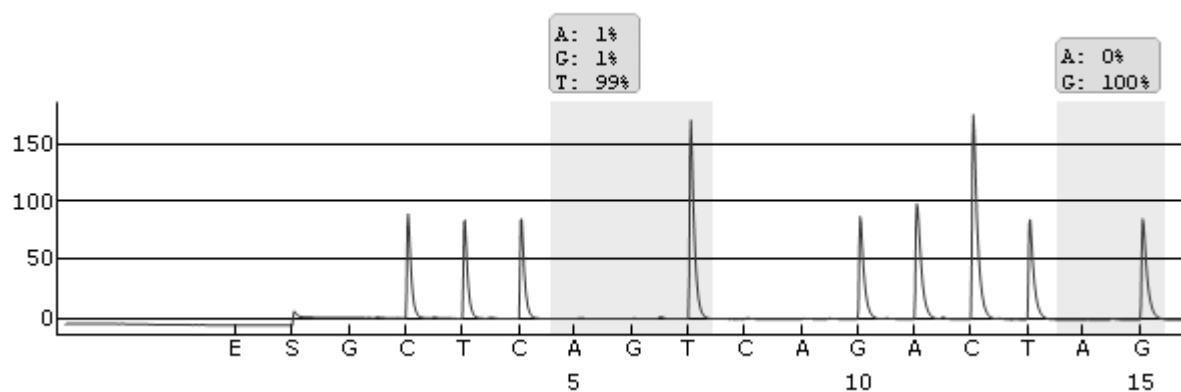
i.r.: ikke relevant.

Repræsentative resultater

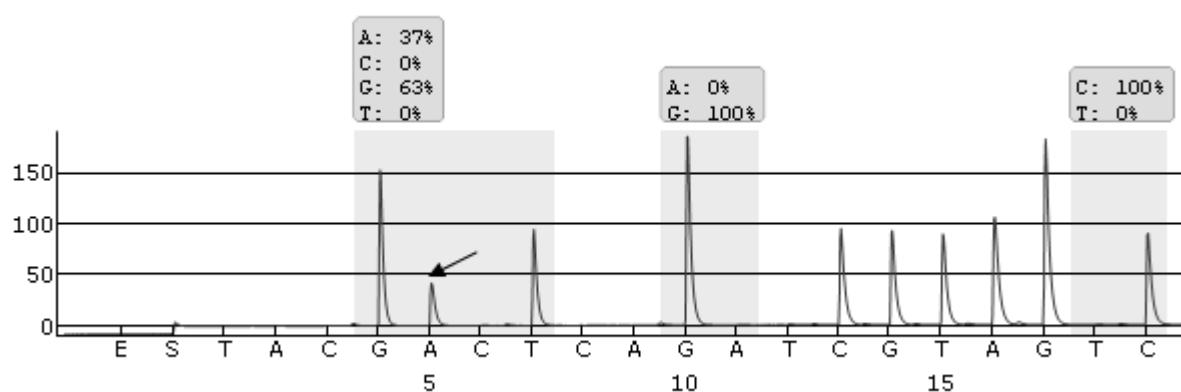
Repræsentative Pyrogram-resultater er vist i figur 5-10.



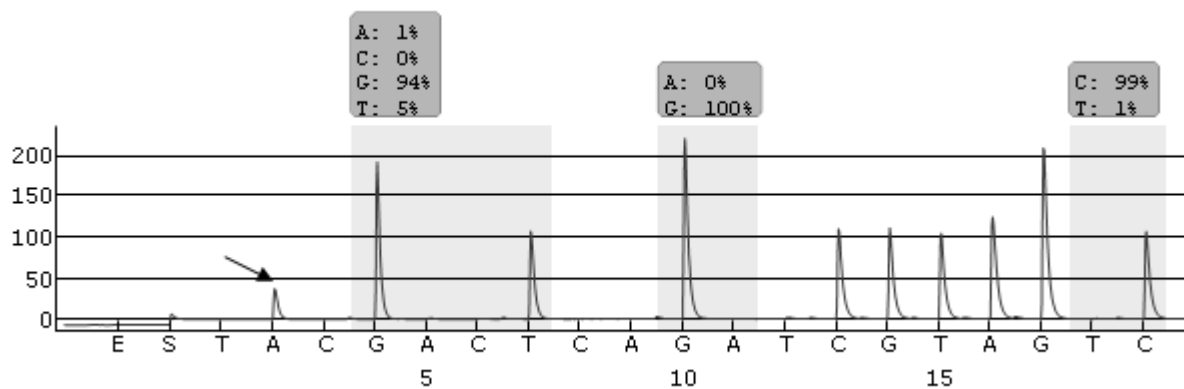
Figur 5. Pyrogram-spor opnået efter analyse af en prøve med en normal genotype i codon 12 og 13.



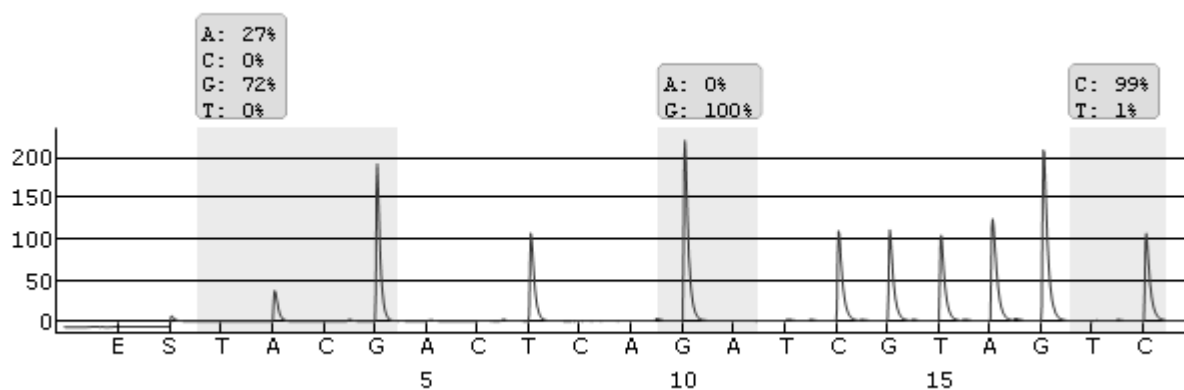
Figur 6. Pyrogram-spor opnået efter analyse af en prøve med en normal genotype i codon 61.



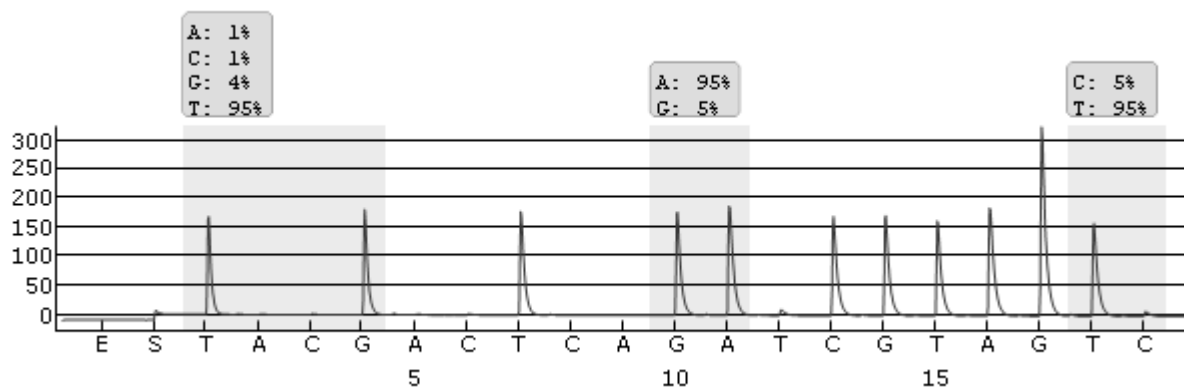
Figur 7. Pyrogram-spor opnået efter analyse af prøver med en GGT → GAT mutation i base 2 i codon 12 (nukleotid 35, angivet med en pil).



Figur 8. Pyrogram-spor opnået efter analyse af prøver med en GGT → AGT mutation i base 1 i codon 12 (nukleotid 34, angivet med en pil) med "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) GNTGRCGTAGGYA rettet mod base 2 i codon 12 (nukleotid 35). En gul farve angiver, at den pågældende sekvens er uventet og skal kontrolleres.




Figur 9. Pyrogram-spor og resultat opnået efter genanalyse af prøven i figur 8. Mutationen GGT → AGT blev genanalyseret med "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) NGTGRCGTAGGYA rettet mod base 1 i codon 12 (nukleotid 34).



Figur 10. Pyrogram-spor opnået efter analyse af Mutant KRAS Control DNA med "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) NGTGRCGTAGGYA rettet mod første base i codon 12.



Fejlfinding

Fejlfindingsvejledningen kan hjælpe med at løse eventuelle problemer, der måtte forekomme. Der er flere oplysninger på siden Frequently Asked Questions (ofte stillede spørgsmål) på vores tekniske support center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Videnskabsfolkene hos QIAGEN teknisk support er altid klar til at svare på eventuelle spørgsmål om enten informationen og protokollerne i denne vejledning eller om prøve- og analyseteknologier (kontaktoplysninger findes på bagsiden og på www.qiagen.com).


 Generel fejlfinding af instrumentet findes i *Brugervejledning til PyroMark Q24*.

Bemærkninger og forslag


Signaler i kontrollen uden skabelon (negativ kontrol)

- a) Forstyrrelse/"krydstale" mellem brønde  Signal fra en brønd detekteres i en tilstødende brønd. Undgå at anbringe prøver med høj signalintensitet ved siden af brønde med kontrol uden skabelon.
- b) PCR-kontamination  Anvend sterile pipettespidser med filtre. Opbevar og ekstraher materialer såsom prøver, plasmidkontroller og amplikon adskilt fra PCR-reagenser.


Dårlig eller uventet sekvens

- Dårlig kvalitet af genomisk DNA  Genomisk DNA af dårlig kvalitet kan medføre, at PCR mislykkes. Analyser PCR-prøver med en elektroforetisk teknik (f.eks. med QIAxcel[®] systemet eller agarosegelelektroforese).

Resultatet "Check" (kontroller) eller "Failed" (mislykket)



- Sjælden mutation ikke defineret i analyseopsætningen  Juster sekvensen til analysering i analyseopsætningen (se Bilag A, side 36), og genanalyser kørslen.

Høj baggrund


- Ukorrekt opbevaring af nukleotider  Opbevar nukleotider ved 2-8 °C. Opbevaring ved -20 °C kan forårsage en øgning af baggrunden.

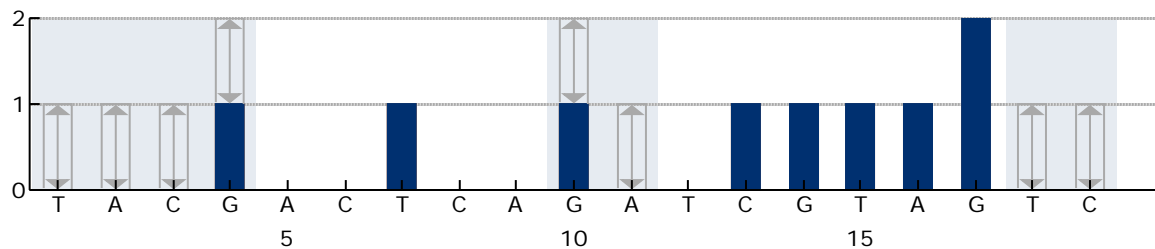
Bemærkninger og forslag

Ingen signaler i positive kontroller (wt KRAS Control DNA og Mutant KRAS Control DNA)


- | | |
|---|---|
| a) Utilstrækkelig enzym- eller substratblanding i alle brønde |  Sørg for at fylde PyroMark Q24 Cartridge i henhold til "Pre Run Information" (information inden kørsel) i menuen "Tools" (værktøj). |
| b) Ukorrekt opbevarede eller fortyndede reagenser |  Forbered PyroMark Gold Q24 Reagents i henhold til brugsanvisningen til reagenserne. |

Uventet peak i sporstof i den sidste variable position

- | | |
|--------------------------------------|--|
| Kontamination med kontrolplasmid-DNA |  Kontrolplasmiderne, wt KRAS Control DNA og Mutant KRAS Control DNA, indeholder en unik sekvensforskel, der kan bruges til at identificere signaler fra kontrollerne (se "Kontroller", side 16 og "Bilag A: Opsætning af PyroMark KRAS-analyser", side 36). Anvend sterile pipettespidser med filtre. Opbevar og ekstraher materialer såsom prøver, plasmidkontroller og ampikon adskilt fra PCR-reagenser. |
|--------------------------------------|--|



Figur 12. Histogram for codon 12 (nukleotid 34) og 13 (nukleotid 38) med "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering) som NGTGRCGTAGGYA.

5. Klik på fanen "Analysis Parameters" (analyseparametre) og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Tærskel for peak-højde - nødvendig peak-højde for godkendt kvalitet:) til 30.
6. Klik på  i værktøjslinjen og gem analysen som KRAScodon 12+13.

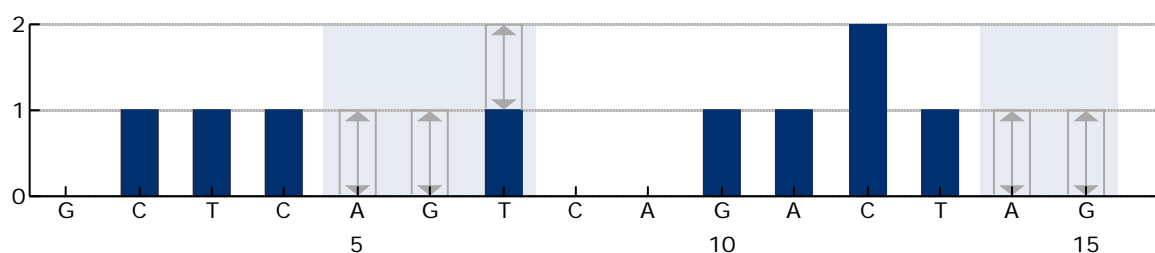
K-ras codon 61

7. Klik på  i værktøjslinjen og vælg "New AQ Assay" (ny AQ-analyse).
8. Indtast følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (sekvens til analysering).
CTCDTGACCTRC




Den variable position 2 (R) tillader diskrimination mellem signaler, der er udledt af plasmidkontrollerne (wt KRAS Control DNA og Mutant KRAS Control DNA) og signaler fra genomisk DNA. Hvor genomisk DNA vil resultere i et G, vil plasmidkontrollerne resultere i et A ved den variable position 2.

9. Tilføj manuelt følgende "Dispensation Order" (dispensationsrækkefølge).
GCTCAGTCAGACTAG



Figur 13. Histogram for codon 61 (nukleotid 183).

10. Klik på fanen "Analysis Parameters" (analyseparametre) og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Tærskel for peak-højde - nødvendig peak-højde for godkendt kvalitet:) til 30.
11. Klik på  i værktøjslinjen og gem analysen som KRAScodon 61.

Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og kar

ADVARSEL 	Farlige kemikalier <p>Det denatureringsmiddel, der anvendes med vakuum-arbejdsstationen, indeholder natriumhydroxid, som irriterer øjnene og huden.</p> <p>Bær altid beskyttelsesbriller, handsker og laboratoriekittel.</p> <p>Den ansvarlige (f.eks. laboratoriechefen) skal træffe de nødvendige foranstaltninger for at sikre, at arbejdspladsen er sikker, og at brugerne af instrumenterne ikke udsættes for farlige mængder af toksiske substanser (kemiske eller biologiske), som defineret på de relevante Material Safety Data Sheets (MSDS) (sikkerhedsdatablade) eller af OSHA,* ACGIH,[†] eller COSHH[‡] dokumenter.</p> <p>Ventilation af dampe og bortskaffelse af affald skal ske i overensstemmelse med alle nationale og lokale bestemmelser og love vedrørende sundhed og sikkerhed.</p>
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

[†] ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (USA)

[‡] COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Storbritannien)


Sørg for at overholde nationale og lokale miljøbestemmelser vedrørende bortskaffelse af laboratorieaffald.

Vigtigt inden start

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

Procedure

1. **Sørg for at der ikke er tilført vakuum til vakuumværktøjet. Sørg for at der er lukket for vakuumentilførslen (Off [fra]), og at vakuumpumpen er slukket.**
2. **Kasser eventuelle resterende opløsninger fra karrene.**
3. **Skyl karrene med vand af høj renhedsgrad eller udskift dem efter behov.**
4. **Tøm affaldsbeholderen.**

 Hætten kan tages af uden at frakoble slangen.

5. Hvis vakuum-arbejdsstationen skal rengøres (f.eks. på grund af støv eller spild), skal instrukserne i *Brugervejledning til PyroMark Q24* følges.

Litteratur

QIAGEN har en stor, opdateret, online database over videnskabelige publikationer, hvor produkter fra QIAGEN anvendes. Omfattende søgefunktioner gør det muligt at finde de artikler, man har brug for, enten ved en simpel søgning på nøgleord eller ved at specificere applikationen, forskningsområde, titel osv.

En komplet liste over referencer findes online i QIAGEN Reference Database på www.qiagen.com/RefDB/search.asp, eller den kan fås hos QIAGEN teknisk support eller den lokale forhandler.

Bestilling

Produkt	Indhold	Katalognr.
PyroMark KRAS Kit (24)	Til 24 reaktioner på PyroMark Q24 MDx: Sekvensprimere, PCR-primere, wt KRAS Control DNA, Mutant KRAS Control DNA	971450
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaseret detektionsplatform til parallel Pyrosequencing af 24 prøver	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuump-arbejdsstation (220 V) til forberedelse af 24 prøver til parallellanalyse, fra PCR-produkt til enkeltstrenget skabelon	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 MDx Software	Softwareprogram	9019063
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplade med 24 brønde til sekventering	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter til dispensering af nukleotider og reagenser	979302
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Til 5 x 24 prøver: Enzymblanding, substratblanding og nukleotid	971802
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Til binding af biotinylerede PCR-produkter til Sepharose-perler	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Til denaturering af dobbeltstrenget PCR-produkt til enkeltstrenget DNA-skabelon	979307
PyroMark Wash Buffer, koncentrat (200 ml)	Til vask af enkeltstrenget DNA	979308
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Til hybridisering af sekvensprimer til enkeltstrenget PCR-produkt og til Pyrosequencing	979309
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Genbrugelige filterprober til PyroMark Vacuum Workstation Q96 og Q24	979010

* Til resten af verden (ikke UK).

† Til UK.

Produkt	Indhold	Katalognr.
PyroMark Control Oligo	Til installationskontrol af systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Til bekræftelse af systemets ydeevne	979304
Relaterede produkter		
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (250)	Til 250 x 20 µl reaktioner: 3 x 0,85 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, der indeholder 250 enheder HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase i alt, 1 x 0,55 ml CoralLoad® koncentrat, 2 x 1,9 ml RNase-frit vand	203643
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (1000)	Til 1000 x 20 µl reaktioner: 12 x 0,85 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, der indeholder 1000 enheder HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase i alt, 4 x 0,55 ml CoralLoad koncentrat, 8 x 1,9 ml RNase-frit vand	203645
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (2500)	Til 2500 x 20 µl reaktioner: 25 ml HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, der indeholder 2500 enheder HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase i alt, 5,5 ml CoralLoad koncentrat, 2 x 20 ml RNase-frit vand	203646
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til forberedelse af 50 DNA-prøver: 50 QIAamp MinElute® cylindre, proteinase K, buffere, prøvetagningsrør (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Til forberedelse af 48 prøver: Reagenskassetter (væv), engangsspidser med filter, engangsholdere til spidser, prøverør (2 ml), elueringsrør (1,5 ml), buffer G2, proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til forberedelse af 50 prøver: QIAamp Mini Spin cylindre, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104

Opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser findes i de respektive brugsanvisninger eller brugervejledninger til kit fra QIAGEN. QIAGEN brugsanvisninger og brugervejledninger til kit kan ses på www.qiagen.com, eller anskaffes fra QIAGEN teknisk support eller den lokale forhandler.

Denne side er med vilje tom

Varemærker: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation eller tilknyttede virksomheder), Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose™ (GE Healthcare); Therascreen® (DxS Limited); Windows® (Microsoft Corporation).

Begrænset licensaftale

Ved brug af dette produkt tilkendegiver enhver køber eller bruger af PyroMark KRAS Kit at indgå på følgende betingelser:

1. PyroMark KRAS Kit må kun anvendes i overensstemmelse med *Vejledning til PyroMark KRAS Kit* og er kun til brug med komponenterne i kittet. QIAGEN giver ingen licens under nogen af virksomhedens intellektuelle ejendomme til at bruge eller inkorporere de vedlagte komponenter i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i *Vejledning til PyroMark KRAS Kit* og i yderligere protokoller, der findes på www.qiagen.com.
2. Udover de udtrykkeligt erklærede licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller anvendelsen af det ikke krænker tredjeparters rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er licenseret til engangsbrug og må ikke genbruges, omdannes eller videresælges.
4. QIAGEN ansvarsfraskriver sig specifikt enhver anden licens, udtrykt eller underforstået, end dem, der udtrykkeligt er beskrevet.
5. Køberen og brugeren af kittet accepterer ikke at foretage sig noget eller tillade andre at foretage sig noget, der kunne føre til eller lette nogen af de ulovlige handlinger ovenfor. QIAGEN kan gøre forbudene i denne begrænsede licensaftale gældende ved enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelsesudgifter og juridiske omkostninger, inklusive advokatsalærer, i enhver handling for at gøre denne begrænsede licensaftale eller nogen af virksomhedens rettigheder over intellektuel ejendom gældende, som er relateret til kittet og/eller dets komponenter.

Opdaterede licensbetingelser findes på www.qiagen.com.

© 2009 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

www.qiagen.com

Australien ■ Bestilling 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Teknisk 1-800-243-066

Belgien ■ Bestilling 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Teknisk 0800-79556

Brasilien ■ Bestilling 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Teknisk 0800-557779

Canada ■ Bestilling 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Teknisk 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Danmark ■ Bestilling 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Teknisk 80-885942

Finland ■ Bestilling 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Teknisk 0800-914413

Frankrig ■ Bestilling 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Teknisk 01-60-920-930 ■ Udvalg 01-60-920-928

Hong Kong ■ Bestilling 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Teknisk 800 930 425

Irland ■ Bestilling 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Teknisk 1800 555 061

Italien ■ Bestilling 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Teknisk 800-787980

Japan ■ Telefon 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Teknisk 03-6890-7300

Kina ■ Bestilling 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Teknisk 800-988-0325, 800-988-0327

Korea (Sydkorea) ■ Bestilling 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Teknisk 1544 7145

Luxembourg ■ Bestilling 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Teknisk 8002-2067

Mexico ■ Bestilling 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Teknisk 01-800-7742-639

Nederlandene ■ Bestilling 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Teknisk 0800-0229602

Norge ■ Bestilling 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Teknisk 800-18712

Schweiz ■ Bestilling 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Teknisk 055-254-22-12

Singapore ■ Bestilling 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Teknisk 65-67775366

Spanien ■ Bestilling 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Teknisk 91-630-7050

Storbritannien ■ Bestilling 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Teknisk 01293-422-999

Sverige ■ Bestilling 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Teknisk 020-798328

Tyskland ■ Bestilling 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Teknisk 02103-29-12400

USA ■ Bestilling 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Teknisk 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Østrig ■ Bestilling 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Teknisk 0800/28-10-11

