


***therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit**

Handbuch

Version 1


 24



Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Zur Verwendung mit dem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM Instrument bestimmt



 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4  1063321DE



QIAGEN Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

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

QIAGEN setzt neue Maßstäbe in folgenden Bereichen:

- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleinsäure- und Proteinassays
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

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

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| Verwendungszweck | 5 |
| Zusammenfassung und Erklärung | 5 |
| Testprinzip | 6 |
| Mitgelieferte Materialien | 9 |
| Kit-Inhalt | 9 |
| Zusätzlich benötigtes Material | 10 |
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 11 |
| Sicherheitshinweise | 11 |
| Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen | 11 |
| Lagerung und Handhabung der Reagenzien | 12 |
| Lagerung und Handhabung der Proben | 13 |
| Verfahren | 13 |
| Bestimmung des für die EGFR-Analyse erforderlichen Tumorzellenanteils | 13 |
| DNA-Isolierung | 14 |
| Protokolle | |
| ■ Probenbestimmung | 15 |
| ■ Nachweis von EGFR-Mutationen | 18 |
| ■ Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration | 21 |
| Interpretation der Ergebnisse | 31 |
| Analyse der Daten aus der Probenbestimmung | 31 |
| Analyse der EGFR-Mutationsdaten | 35 |
| Fehlerbehebung | 45 |
| Qualitätskontrolle | 47 |
| Einschränkungen | 47 |
| Leistungsmerkmale | 48 |
| Cut-off-Werte | 48 |
| Nachweisgrenze (LOD: Limit of Detection) | 48 |
| Präzision | 49 |
| Reproduzierbarkeit | 50 |
| Effekt der DNA-Aufgabekonzentration | 50 |
| Störsubstanzen | 51 |

| | |
|--|-----------|
| Literatur | 51 |
| Symbole | 52 |
| Kontakt | 52 |
| Anhang: Weitere Informationen zu Mutationen | 53 |
| Bestellinformationen | 55 |

Verwendungszweck

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist ein In-vitro-Diagnostiktest zur Detektion von 29 somatischen Mutationen im krebsrelevanten EGFR-Gen und ermöglicht die qualitative Bestimmung des Mutationsstatus.

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung an DNA-Proben verwendet werden, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome extrahiert wurden. Die Ergebnisse sind zur Unterstützung bei der Identifizierung von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen vorgesehen, die von einer Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren profitieren könnten.

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist für den Gebrauch als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung

Beim *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit handelt es sich um ein gebrauchsfertiges Kit für den Nachweis von 29 somatischen Mutationen im krebsrelevanten EGFR-Gen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf dem Rotor-Gene Q System.

Der auf Scorpions®- und ARMS®-Technologie beruhende *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ermöglicht den Nachweis der folgenden Mutationen vor einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA.

- 19 Deletionen in Exon 19 (Das Vorhandensein jeder der 19 Deletionen kann nachgewiesen werden, zwischen den einzelnen Varianten kann jedoch nicht unterschieden werden.)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (das Vorhandensein von G719S, G719A oder G719C kann nachgewiesen werden, zwischen diesen kann jedoch nicht unterschieden werden)
- S768I
- 3 Insertionen in Exon 20 (Das Vorhandensein jeder der 3 Insertionen kann nachgewiesen werden, zwischen den einzelnen Varianten kann jedoch nicht unterschieden werden.)

Die angewendeten Methoden sind hochgradig selektiv und können je nach DNA-Gesamtmenge zum Nachweis eines geringen prozentualen Anteils der Mutation vor einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA verwendet werden. Dank diesem Maß an Selektivität und dieser Nachweisgrenze ist dieses Verfahren weitaus präziser als andere Technologien, wie z. B. die DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen.

Testprinzip

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit verwendet für den Nachweis von Mutanten mittels Echtzeit-PCR zwei Technologien: ARMS und Scorpions.

ARMS

ARMS (Amplification Refractory Mutation System) dient zur allel- oder mutationsspezifischen Amplifikation. Mit der *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) kann äußerst genau zwischen einer Übereinstimmung und einer Nichtübereinstimmung am 3'-Ende eines PCR-Primers unterschieden werden. Spezifische mutierte Sequenzen werden selbst in Proben, bei denen die Mehrzahl der Sequenzen die Mutation nicht aufweist, selektiv amplifiziert. Wenn der Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz. Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, wird die Amplifikation nur im Hintergrund auf niedrigem Niveau durchgeführt.

Scorpions

Der Nachweis der Amplifikation wird mit Hilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionelle Moleküle, die einen PCR-Primer enthalten, der kovalent mit einer Sonde verbunden ist. Der Fluorophor in dieser Sonde interagiert mit einem Quencher, der auch in die Sonde eingebunden ist und die Fluoreszenz reduziert. Wenn sich die Sonde während der PCR an das Amplifikat bindet, wird der Fluorophor vom Quencher getrennt. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsröhrchen.

Kit-Zusammenstellung

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthält acht Assays:

- ein Kontroll-Assay (Ctrl)
- sieben Mutations-Assays

Alle Reaktionsgemische enthalten Reagenzien für den Nachweis der Zielsequenzen, die mit FAM™ gekennzeichnet sind, sowie einen internen Kontroll-Assay, der mit HEX™ gekennzeichnet ist. Mit dem internen Kontroll-Assay kann nachgewiesen werden, ob Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die FAM-Amplifikation kann die konkurrierende Amplifikation der internen Kontrolle verdrängen, und die

interne Kontrolle dient lediglich dem Nachweis, dass es sich beim Ausbleiben einer FAM-Amplifikation tatsächlich um ein negatives Ergebnis und nicht etwa um eine fehlgeschlagene PCR-Reaktion handelt.

Verfahren

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit beruht auf einem zweischrittigen Verfahren. Im ersten Schritt wird der Kontroll-Assay durchgeführt, um die Gesamt-DNA in einer Probe zu bestimmen. Im zweiten Schritt werden sowohl der Mutations- als auch der Kontroll-Assay durchgeführt, um zu bestimmen, ob mutierte DNA vorliegt.

Assays:

Kontroll-Assay

Der mit FAM gekennzeichnete Kontroll-Assay dient zur Bestimmung der Gesamt-DNA in einer Probe. Dieser Assay amplifiziert eine Region von Exon 2 des EGFR-Gens. Bekannte EGFR-Polymorphismen werden aufgrund der Konzeption von Primer und Sonde vermieden.

Zur Bestimmung der in einer Probe enthaltenen Gesamt-DNA sollte unbedingt das zusätzliche Kontrollreaktionsgemisch (Ctrl) verwendet werden, das im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthalten ist. Der Kontroll-Assay amplifiziert eine Region von Exon 2 des EGFR-Gens. Die Proben sollten ausschließlich mit dem Kontroll-Assay bestimmt werden, wobei die EGFR-Positivkontrolle (PC) als Positivkontrolle und nukleasefreies Wasser (H₂O) als Nicht-Template-Kontrolle (NTC) zu verwenden sind.

Hinweis: Die DNA-Bestimmung sollte auf Grundlage der PCR erfolgen und kann von der auf Extinktionsmessungen basierenden Quantifizierung abweichen. Ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch (Ctrl) ist enthalten, mit dem vor der Analyse mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit die Qualität und Quantität der DNA in den Proben bestimmt werden kann.

Mutationsassays

Jeder Mutationsassay enthält eine FAM-markierte Scorpions-Sonde sowie einen ARMS-Primer zur Unterscheidung zwischen der Wildtyp-DNA und einer spezifischen mutierten DNA.

Kontrollen

Hinweis: Alle Versuchsläufe müssen die folgenden Kontrollen enthalten.

Positivkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 1 bis 8 eine Positivkontrolle enthalten sein. Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthält eine EGFR-Positivkontrolle

(PC), die in der Positivkontrollreaktion als Template zum Einsatz kommt. Mit den Ergebnissen der Positivkontrolle wird sichergestellt, dass der Kit die angegebenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

Negativkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 9 bis 16 eine Negativkontrolle („Nicht-Template-Kontrolle“, NTC) enthalten sein. Die Nicht-Template-Kontrolle besteht aus nukleasefreiem Wasser (H₂O), das für die Nicht-Template-Kontrolle als „Template“ dient. Die Nicht-Template-Kontrolle dient dazu, mögliche Kontaminationen nachzuweisen, die u. U. bei der Laufkonfiguration eingeschleppt wurden, sowie zur Bestimmung der Zuverlässigkeit der internen Kontrollreaktion.

Interne Kontrollreaktion

Jedes Reaktionsgemisch enthält neben der Zielreaktion eine interne Kontrolle. Eine fehlgeschlagene Kontrollreaktion zeigt an, dass entweder Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch-negativen Ergebnissen führen können oder dass der Bediener bei der Vorbereitung dieses Röhrchens einen Fehler begangen hat.

Wenn das Fehlschlagen der internen Kontrollreaktion auf eine PCR-Hemmung zurückzuführen ist, kann der Effekt der Inhibitoren u. U. durch Verdünnen der Probe verringert werden; allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die Ziel-DNA verdünnt wird. Die FAM-Amplifikation kann die konkurrierende Amplifikation der internen Kontrolle verdrängen, so dass der C_T-Wert (HEX) der internen Kontrolle außerhalb des zulässigen Bereichs liegen könnte. Die FAM-Ergebnisse sind für diese Proben weiterhin gültig.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

| therascreen EGFR RGQ PCR Kit | | | (24) |
|---|---|------------------|---------------|
| Katalog-Nr. | | | 870111 |
| Anzahl der Reaktionen | | | 24 |
| Rot | Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsgemisch) | Ctrl | 2 x 600 µl |
| Lila | T790M Reaction Mix (T790M- Reaktionsgemisch) | T790M | 600 µl |
| Orange | Deletions Reaction Mix (Deletionsreaktionsgemisch) | Del | 600 µl |
| Rosa | L858R Reaction Mix (L858R- Reaktionsgemisch) | L858R | 600 µl |
| Grün | L861Q Reaction Mix (L861Q- Reaktionsgemisch) | L861Q | 600 µl |
| Gelb | G719X Reaction Mix (G719X- Reaktionsgemisch) | G719X | 600 µl |
| Grau | S768I Reaction Mix (S768I- Reaktionsgemisch) | S768I | 600 µl |
| Blau | Insertions Reaction Mix (Insertionsreaktionsgemisch) | Insertionen | 600 µl |
| Braun | EGFR Positive Control (EGFR- Positivkontrolle) | PC | 300 µl |
| Türkis | Taq DNA Polymerase (Taq- DNA-Polymerase) | Taq | 138 µl |
| Weiß | Nuclease-Free Water (Nukleasefreies Wasser) | H ₂ O | 2 x 1,9 ml |
| therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook (Handbuch in Englisch) | | | 1 |

Zusätzlich benötigtes Material

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

- Kit zur DNA-Isolierung (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 14)
- Xylen
- Ethanol (96–100 %)*
- 1,5-ml- oder 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (für die Lyse)
- 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (für die Elution) (erhältlich von Brinkmann [Safe-Lock, Katalog-Nr. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, Katalog-Nr. 0030 120.086] oder Sarstedt [Sicherheitsverschluss, Katalog-Nr. 72.690])[†]
- Spezielle (einstellbare) Pipetten[‡] zur Probenvorbereitung
- Spezielle (einstellbare) Pipetten[‡] zur Herstellung des PCR-Master-Mix
- Spezielle (einstellbare) Pipetten[‡] zur Dispensierung von Template-DNA*
- DNase-, RNase- und DNA-freie Pipettenspitzen mit Filtern (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern)
- Thermomixer, beheizter Orbitalinkubator, Wärmeblock oder Wasserbad zur Inkubation bei 90 °C[‡]
- Tischzentrifuge[‡] mit Rotor für 2-ml-Reaktionsröhrchen
- Vortexer
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument^{‡§} mit den Fluoreszenzkanälen „Cycling Green“ und „Cycling Yellow“ (für den Nachweis von jeweils FAM und HEX)
- Rotor-Gene Q Software, Version 2.0.2 oder höher
- Röhrchenstreifen und Deckel, 0,1 ml, zur Verwendung mit einem 72-Kavitäten-Rotor (Katalog-Nr. 981103 oder 981106)

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

[†] Dies ist keine vollständige Liste von Anbietern.

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

[§] Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument, falls zutreffend.

In manchen Ländern auch unter dem Namen Rotor-Gene Q MDx bekannt.

- DNase-, RNase- und DNA-freie Mikrozentrifugenröhrchen zum Ansetzen von Master-Mixes
- Ladeblock für 72 x 0,1-ml-Röhrchen, Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette (QIAGEN, Katalog-Nr. 9018901)

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Sicherheitshinweise

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

24-Stunden-Giftnotruf

Hilfe bei chemischen Notfällen oder Unfällen ist 24 Stunden täglich unter folgender Telefonnummer erhältlich:

CHEMTREC

USA und Kanada ■ Tel.: 1-800-424-9300

Außerhalb USA und Kanada ■ Tel.: +1 703 527-3887 (R-Gespräche akzeptiert)

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Achten Sie stets auf folgende Punkte:

- Verwenden Sie DNase-, RNase- und DNA-freie Pipettenspitzen mit Filtern und achten Sie darauf, dass die Pipetten gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibriert wurden.
- Lagern und extrahieren Sie positive Materialien (sowohl Proben als auch Positivkontrollen) getrennt von allen anderen Reagenzien und geben Sie sie in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzu.
- Lassen Sie vor der Durchführung eines Assays alle Komponenten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig auftauen.
- Mischen Sie nach dem Auftauen die Komponenten (durch 10-maliges Umschwenken jedes Röhrchens) und zentrifugieren Sie sie kurz.

Hinweis: Äußerste Vorsicht ist geboten, um die Kontamination von PCR-Reaktionen mit synthetischem Kontrollmaterial zu vermeiden. Wir empfehlen, zum Ansetzen von Reaktionsgemischen und Hinzufügen von DNA-Templates verschiedene Spezialpipetten zu verwenden. Die Herstellung und Dispensierung der Reaktionsgemische darf nicht in dem Bereich durchgeführt werden, in dem die Template-Zugabe erfolgt. Die Rotor-Gene Q Röhrchen dürfen nach Abschluss des PCR-Laufs nicht geöffnet werden. Auf diese Weise soll eine Kontamination mit PCR-Endprodukten im Labor verhindert werden.

Hinweis: Die Reagenzien sind für die manuelle Einrichtung validiert. Bei automatisierten Methoden ist die Anzahl der möglichen Reaktion u. U. niedriger, da ein Teil der Reagenzien zum Füllen des Totvolumens dieser automatisierten Systeme verloren geht.

Hinweis: Alle Reagenzien im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurden speziell für die Anwendung mit den angegebenen Tests formuliert. Alle in einem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus diesem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vorgesehen. Die Reagenzien des Kits dürfen zur Gewährleistung einer optimalen Leistung nicht ausgetauscht werden.

Hinweis: Verwenden Sie ausschließlich die im Kit mitgelieferte *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*). Diese darf nicht mit der *Taq*-DNA-Polymerase aus anderen Kits desselben Typs oder eines anderen Typs oder mit der *Taq*-DNA-Polymerase anderer Hersteller ersetzt werden.

Hinweis: Die Reagenzien im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurden optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann. Des Weiteren wird von der Verwendung von Reaktionsvolumina unter 25 µl abgeraten, da dies das Risiko falsch-negativer Ergebnisse erhöht.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versandt und muss beim Empfang noch immer gefroren sein. Wenn der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit beim Empfang nicht gefroren ist, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde, die Lieferung keine Stückliste, kein Handbuch oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei –15 bis –25 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Der Kit ist bei Lagerung unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Wir empfehlen maximal 7 Einfrier-/Auftauzyklen durchzuführen.

Hinweis: Scorpions müssen (wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden und optimale Aktivität und Leistung sicherzustellen.

Hinweis: Die Proben sollten chargenweise zusammengefasst werden, um die Reagenzien im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit optimal zu nutzen. Werden die Proben einzeln getestet, hat dies einen höheren Verbrauch an Reagenzien zur Folge, wodurch die Anzahl der Proben, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, verringert wird.

Lagerung und Handhabung der Proben

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

Das Probenmaterial muss humane genomische DNA sein, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome extrahiert wurde. Zur Sicherstellung der Probenqualität müssen die Proben gemäß Pathologie-Standardverfahren transportiert werden.

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

Verfahren

Bestimmung des für die EGFR-Analyse erforderlichen Tumorzellenanteils

Für die EGFR-Analyse wird formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom benötigt. Die aus den Zellen dieses Tumorgewebes extrahierte DNA kann bezüglich der EGFR-Mutationen vom Wildtyp sein oder eine oder mehrere Mutationen enthalten.

Das für die Extraktion verwendete formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom kann auch normales, nicht tumoröses Gewebe enthalten, das bezüglich der EGFR-Mutationen vom Wildtyp ist. Die mutierte DNA kann durch die Wildtyp-DNA aus diesem Gewebe potenziell auf eine Konzentration verdünnt werden, die mit dem Kit nicht mehr nachweisbar ist. Es wird jedoch empfohlen, auch Proben mit niedrigem Tumoranteil zu testen, da die Möglichkeit besteht, dass hochgradige Mutationen nachgewiesen werden können und eine Therapieentscheidung für den Patienten getroffen werden kann.

Damit die Wahrscheinlichkeit, Mutationen nachzuweisen, möglichst groß ist, gehen Sie wie folgt vor:

- Färben Sie mindestens einen Gewebeschnitt von jeder Patientenprobe mit Hämatoxylin und Eosin.
- Stellen Sie sicher, dass der gefärbte Gewebeschnitt von einem Pathologen auf Tumore untersucht wird.
- Der Pathologe sollte möglichst mehrere Gewebeschnitte aus unterschiedlichen Teilen des FFPE-Blocks untersuchen.
- Alle Proben mit Tumoranteil können mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden.

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung ist mit dem QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit durchzuführen.

Führen Sie die DNA-Aufreinigung gemäß den Anweisungen im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* durch und beachten Sie dabei folgende Besonderheiten:

- Bringen Sie das FFPE-Gewebe auf Objektträgern aus Glas auf.
- Entfernen Sie mit einem frischen sterilen Skalpell überschüssiges Paraffin um die Gewebeabschnitte herum.
- Streichen Sie die Gewebeabschnitte für jede zu extrahierende Probe mit einem frischen Skalpell in Mikrozentrifugenröhrchen.
- Der Proteinase-K-Verdau muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Die aufgereinigte genomische DNA muss in 200 µl ATE-Puffer (im QIAamp DNA FFPE Tissue Kit enthalten) eluiert werden.
- Lagern Sie aufgereinigte genomische DNA bei –15 bis –30 °C.
- Wenn die entsprechenden Informationen vorliegen, sollten Gewebeschnitte neben dem mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitt verwendet werden, der den höchsten Tumorgehalt aufweist.

Hinweis: Alle Assays im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit erzeugen kurze PCR-Produkte. Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit funktioniert jedoch nicht bei stark fragmentierter DNA.

Protokoll: Probenbestimmung

Dieses Protokoll dient zur Bestimmung der gesamten in den Proben vorhandenen amplifizierbaren DNA.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit den Abschnitt „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 11.
- Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q Instrument ausreichend vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Sehen Sie dazu auch das Benutzerhandbuch des Instruments ein.
- Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) oder andere Gemische, die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*), indem Sie die Pipettenspitze nur kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze mit dem Enzym in Berührung kommt.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) Raumtemperatur (15 bis 25 °C) erreicht hat. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

1. **Tauen Sie das Kontrollreaktionsgemisch (CTRL), das nukleasefreie Wasser für die Nicht-Template-Kontrolle (NTC) und die EGFR-Positivkontrolle (PC) bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) auf. Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen 10-mal umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.**

- 2. Setzen Sie gemäß den Volumina in Tabelle 1 ausreichend Master-Mixes für die DNA-Proben, eine Positivkontrollreaktion und eine Nicht-Template-Kontrollreaktion an. Planen Sie Reagenzien für 1 zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.**

Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 1. Herstellung des Kontroll-Assay-Master-Mix*

| Komponente | Volumen/Reaktion (µl) |
|---------------------------------|-----------------------|
| Kontrollreaktionsgemisch (Ctrl) | 19,5 |
| Taq-DNA-Polymerase (Taq) | 0,5 |
| Gesamtvolumen | 20,0 |

* Stellen Sie beim Ansetzen des Master-Mix ausreichend Volumen für 1 zusätzliche Probe her.

- Mischen Sie den Master-Mix durch vorsichtiges 10-maliges Auf- und Abpipettieren gründlich. Geben Sie sofort 20 µl Master-Mix zum PCR-Röhrchenstreifen (nicht im Lieferumfang enthalten).**
Hinweis: Für die Probenbestimmung geben Sie Kontroll-Assay-Master-Mix in eine Positivkontrollkavität, in eine Negativkontrollkavität und in eine Kavität für jede Probe.
- Geben Sie sofort 5 µl nukleasefreies Wasser (H₂O) in das Nicht-Template-Kontrollröhrchen (PCR-Röhrchen Nr. 9) und verschließen Sie das Röhrchen mit dem Deckel. Geben Sie 5 µl Proben-DNA in die Probenröhrchen und verschließen Sie die Röhrchen mit dem Deckel. Geben Sie 5 µl EGFR-Positivkontrolle (PC) in das Positivkontrollröhrchen (PCR-Röhrchen 1) und verschließen Sie das Röhrchen mit dem Deckel.**
- Setzen Sie den PCR-Röhrchenstreifen in die entsprechenden Positionen des Rotors ein und stellen Sie durch eine Sichtprüfung sicher, dass alle Röhrchen das gleiche Volumen enthalten.**
Hinweis: Achten Sie darauf, dass die Röhrchenstreifen beim Einsetzen in den Rotor nicht umgedreht werden.
- Wenn der Rotor nicht voll ist, setzen Sie leere verschlossene Röhrchen in die unbesetzten Positionen ein.**
- Setzen Sie den 72-Kavitäten-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.**
- Informationen zum Erstellen des Temperaturprofils und Starten des Laufs finden Sie in der Rotor-Gene Q Systemeinrichtung (siehe „Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration“ auf Seite 21).**

Tabelle 2. Zyklusparameter

| Zyklen | Temperatur | Zeit | Datenerfassung |
|--------|------------|-------------|----------------|
| 1 | 95 °C | 15 Minuten | Keine |
| 40 | 95 °C | 30 Sekunden | Keine |
| | 60 °C | 60 Sekunden | Grün und gelb |

9. Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß den Anleitungen unter „Analyse der Daten aus der Probenbestimmung“ auf Seite 31.

Protokoll: Nachweis von EGFR-Mutationen

Dieses Protokoll ist für den Nachweis von EGFR-Mutationen vorgesehen. Nach einer erfolgreichen Probenbestimmung kann die Probe mit den EGFR-Mutationsassays getestet werden.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit den Abschnitt „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 11.
- Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q Instrument ausreichend vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Sehen Sie dazu auch das Benutzerhandbuch des Instruments ein.
- Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) oder andere Gemische, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Die Proben müssen in Chargen mit jeweils 7 Proben zusammengefasst werden (um einen Rotor mit 72 Kavitäten zu füllen), um das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit effizient zu nutzen. Bei kleineren Chargengrößen wird die Anzahl der Proben, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, verringert.
- Pipettieren Sie die *Taq*, indem Sie die Pipettenspitze nur kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze mit dem Enzym in Berührung kommt.
- Die Kontroll- und Mutations-Assays müssen für jede DNA-Probe auf denselben PCR-Lauf bezogen analysiert werden, um Variationen zwischen den einzelnen Läufen zu vermeiden.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Überprüfen Sie vor der Verwendung, dass die *Taq* Raumtemperatur erreicht hat (15 bis 25 °C). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

1. **Tauen Sie die Reaktionsgemische, das nukleasefreie Wasser für die Nicht-Template-Kontrolle (NTC) und die EGFR-Positivkontrolle (PC) bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) auf. Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen 10-mal umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.**
2. **Setzen Sie gemäß den Volumina in Tabelle 3 ausreichend Master-Mixes für die DNA-Proben, eine Positivkontrollreaktion und eine Nicht-Template-Kontrollreaktion an. Planen Sie Reagenzien für 1 zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.**

Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 3. Herstellung der Master-Mixe*

| Komponente | Volumen/Reaktion (µl) |
|---|-----------------------|
| Reaktionsgemisch | 19,5 |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (<i>Taq</i>) | 0,5 |
| Gesamtvolumen | 20,0 |

* Stellen Sie beim Ansetzen des Master-Mix ausreichend Volumen für 1 zusätzliche Probe her.

3. **Mischen Sie jeden Master-Mix durch vorsichtiges 10-maliges Auf- und Abpipettieren gründlich. Geben Sie sofort 20 µl Master-Mix zu jedem PCR-Röhrchenstreifen (nicht im Lieferumfang enthalten).**
4. **Geben Sie sofort 5 µl nukleasefreies Wasser (H₂O) in die PCR-Röhrchenstreifen der Nicht-Template-Kontrolle (PCR-Röhrchen 9 bis 16) und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln. Geben Sie**

jeweils 5 μ l Probe in die Probenröhrchen (PCR-Röhrchen 17 bis 72) und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln. Geben Sie 5 μ l EGFR-Positivkontrolle (PC) in die Positivkontrollröhrchen (PCR-Röhrchen 1 bis 8) und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln. Jede DNA-Probe muss sowohl mit dem Kontroll- als auch mit allen Mutations-Assays getestet werden. Die Anordnung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4. Anordnung von Kontroll- und Mutationsassays

| Assay | Kontrollen | | Probennummer | | | | | | |
|-------------|------------|-----|--------------|----|----|----|----|----|----|
| | PC | NTC | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Ctrl | 1 | 9 | 17 | 25 | 33 | 41 | 49 | 57 | 65 |
| T790M | 2 | 10 | 18 | 26 | 34 | 42 | 50 | 58 | 66 |
| Deletionen | 3 | 11 | 19 | 27 | 35 | 43 | 51 | 59 | 67 |
| L858R | 4 | 12 | 20 | 28 | 36 | 44 | 52 | 60 | 68 |
| L861Q | 5 | 13 | 21 | 29 | 37 | 45 | 53 | 61 | 69 |
| G719X | 6 | 14 | 22 | 30 | 38 | 46 | 54 | 62 | 70 |
| S768I | 7 | 15 | 23 | 31 | 39 | 47 | 55 | 63 | 71 |
| Insertionen | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 |

5. Setzen Sie den PCR-Röhrchenstreifen in die entsprechenden Positionen des Rotors ein und stellen Sie durch eine Sichtprüfung sicher, dass alle Röhrchen das gleiche Volumen enthalten.
Hinweis: Achten Sie darauf, dass die Röhrchenstreifen beim Einsetzen in den Rotor nicht umgedreht werden.
6. Wenn der Rotor nicht voll ist, setzen Sie leere verschlossene Röhrchen in die unbesetzten Positionen ein.
7. Setzen Sie den Rotor sofort in das Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.
8. Informationen zum Erstellen des Temperaturprofils und Starten des Laufs finden Sie in der Rotor-Gene Q Systemeinrichtung (siehe „Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration“ auf Seite 21).

Tabelle 5. Zyklusparameter

| Zyklen | Temperatur | Zeit | Datenerfassung |
|--------|------------|-------------|----------------|
| 1 | 95 °C | 15 Minuten | Keine |
| 40 | 95 °C | 30 Sekunden | Keine |
| | 60 °C | 60 Sekunden | Grün und gelb |

9. Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß den Anleitungen unter „Analyse der EGFR-Mutationsdaten“ auf Seite 35.



Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration

Dieses Protokoll wird in den Abschnitten „Protokoll: Probenbestimmung“ (auf Seite 15) und „Protokoll: Nachweis von EGFR-Mutationen“ (auf Seite 18) behandelt.

Verfahren

1. Erstellen Sie gemäß den folgenden Anweisungen ein Temperaturprofil.

| | |
|---|----------------------|
| Einrichtung der allgemeinen Assay-Parameter | Abbildungen 1 bis 3 |
| Erste Aktivierung des „Hot-Start“-Enzyms | Abbildung 4 |
| Amplifikation der DNA | Abbildungen 5 bis 7 |
| Einstellung der Fluoreszenzkanäle | Abbildungen 8 bis 12 |
| Starten des Laufs | Abbildung 13 |

Die Zyklusparameter können wie folgt zusammengefasst werden.

Tabelle 6. Zyklusparameter

| Zyklen | Temperatur | Zeit | Datenerfassung |
|--------|------------|-------------|----------------|
| 1 | 95 °C | 15 Minuten | Keine |
| 40 | 95 °C | 30 Sekunden | Keine |
| | 60 °C | 60 Sekunden | Grün und gelb |

Alle Angaben beziehen sich auf die Rotor-Gene Q Software, Version 2.0.2. Weitere Informationen zum Programmieren des Rotor-Gene Systems finden Sie im Benutzerhandbuch des Systems. In den folgenden Abbildungen sind diese Einstellungen schwarz umrahmt.

2. **Doppelklicken Sie auf dem Desktop des PCs, der mit dem Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument verbunden ist, auf das Symbol der Rotor-Gene Q Software, Version 2.0.2. Wählen Sie im daraufhin angezeigten Dialogfeld „New Run“ (Neuer Lauf) die Registerkarte „Advanced“ (Erweitert) aus.**
3. **Wählen Sie zum Erstellen einer neuen Vorlage „Empty Run“ (Leerer Lauf) und klicken Sie dann auf „New“ (Neu), um den „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) aufzurufen.**
4. **Wählen Sie 72-Well Rotor (72-Kavitäten-Rotor) als Rotortyp aus. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring angebracht ist und aktivieren Sie das Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht). Klicken Sie auf „Next“ (Abbildung 1).**

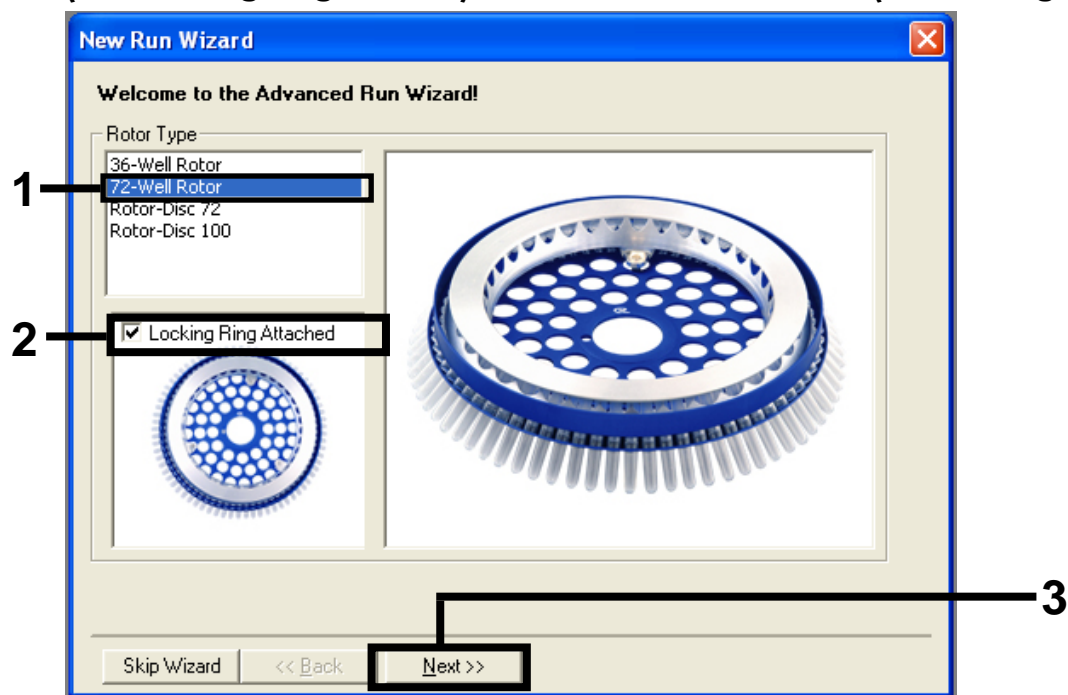


Abbildung 1. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe)

5. Geben Sie den Namen des Bedieners ein. Geben Sie unter „Notes“ Anmerkungen ein und wählen Sie für „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) den Wert 25 aus. Vergewissern Sie sich, dass unter „Sample Layout“ (Probenkonfiguration) „1, 2, 3...“ ausgewählt ist und klicken Sie auf „Next“ (Weiter, siehe Abbildung 2).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box with the following fields and annotations:

- 1** points to the 'Operator' text box containing 'QIAGEN'.
- 2** points to the 'Notes' text area, which is currently empty.
- 3** points to the 'Reaction Volume (µL)' spinner box, which is set to '25'.
- 4** points to the 'Next >>' button at the bottom right.

Additional UI elements include a 'Skip Wizard' button, a '<< Back' button, and a 'Sample Layout' dropdown menu showing '1, 2, 3...'. A help text box on the right states: 'This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.'

Abbildung 2. Einrichtung der allgemeinen Assay-Parameter

6. Klicken Sie im nächsten Fenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) auf die Schaltfläche „Edit Profile“ (Profil bearbeiten, siehe Abbildung 3) und programmieren Sie gemäß den Informationen in den folgenden Schritten das Temperaturprofil.

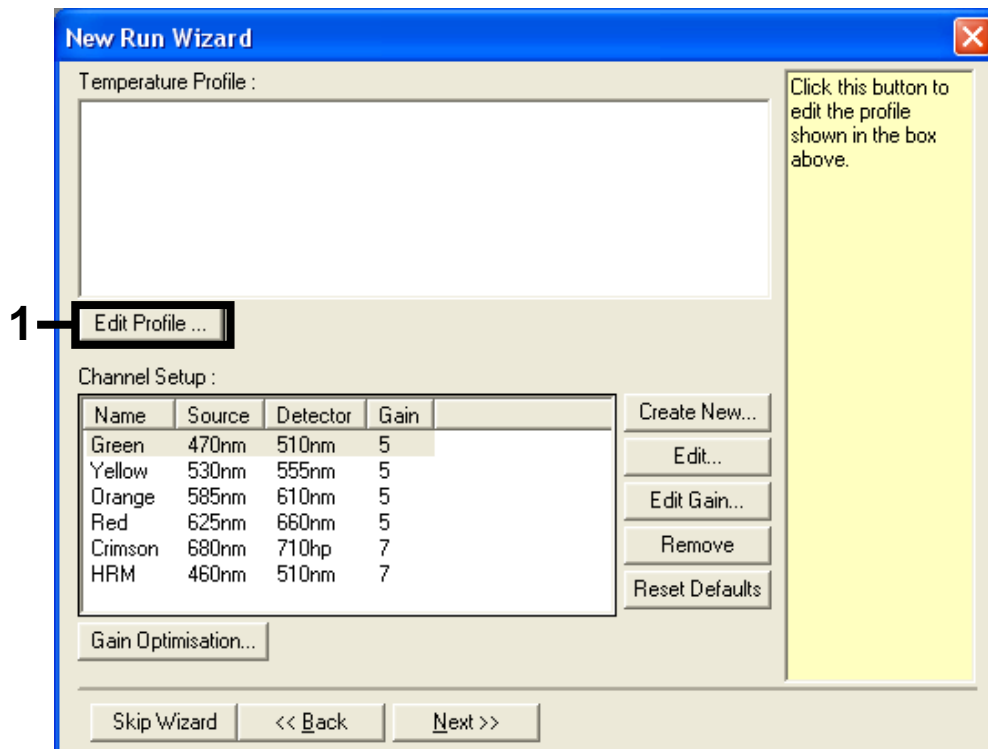


Abbildung 3. Bearbeiten des Profils

7. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Insert after“ (Einfügen nach) und wählen Sie die Option *New Hold at Temperature* (Neue Temperatur halten, siehe Abbildung 4).

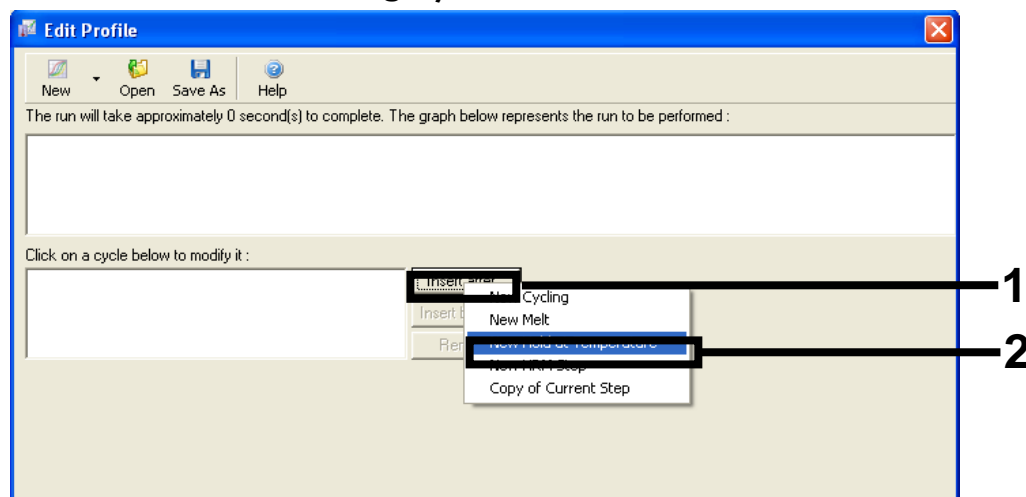


Abbildung 4. Erster Inkubationsschritt bei 95 °C

8. Ändern Sie den Wert für „Hold Temperature“ (Temperatur halten) auf 95 °C und den für „Hold Time“ (Zeit halten) auf 15 min. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Insert after“ (Einfügen nach) und wählen Sie „New Cycling“ (Neuer Zyklus, siehe Abbildung 5).

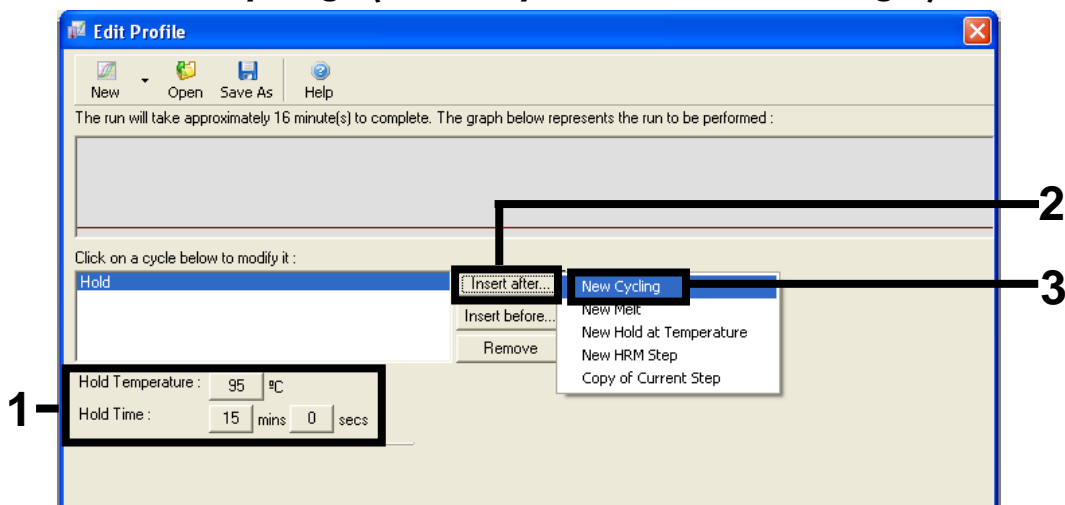


Abbildung 5. Erster Inkubationsschritt bei 95 °C

9. Ändern Sie die Anzahl der Zykluswiederholungen auf 40. Wählen Sie den ersten Schritt aus und stellen Sie diesen auf 95°C for 30 secs (95 °C für 30 Sek.) ein (siehe Abbildung 6).

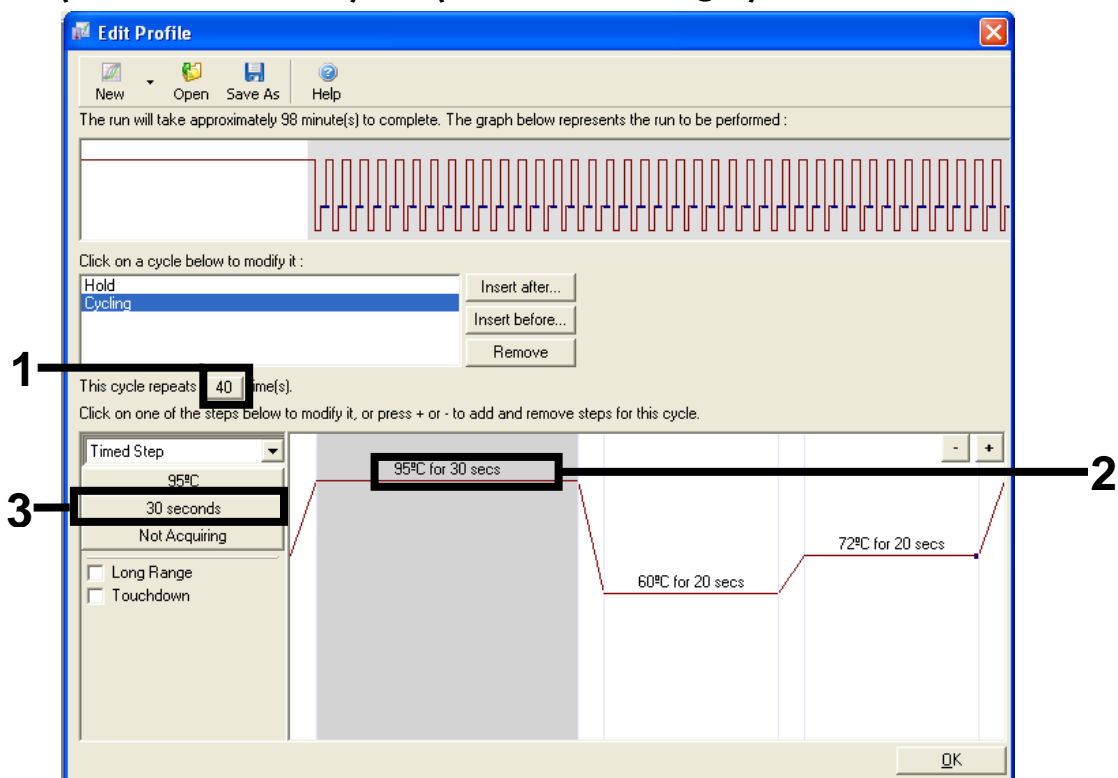


Abbildung 6. Zyklusschritt bei 95 °C

10. Markieren Sie den zweiten Schritt und stellen Sie diesen auf 60°C for 60 secs ein. Aktivieren Sie durch Klicken auf die Schaltfläche „Not

Acquiring“ (Keine Erfassung) die Datenerfassung für diesen Schritt (siehe Abbildung 7).

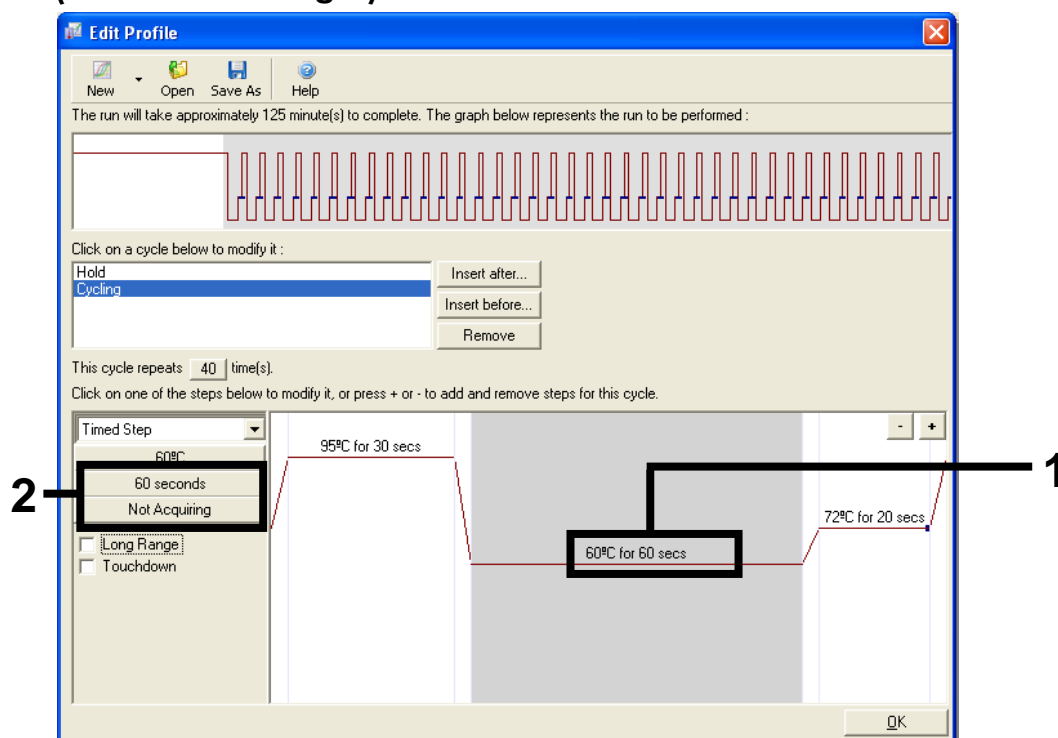


Abbildung 7. Zyklusschritt bei 60 °C

- 11. Wählen Sie Green (Grün) und Yellow (Gelb) als zu erfassende Kanäle aus, indem Sie auf die Schaltfläche „>“ klicken, um diese Kanäle in die Liste „Available Channels“ (Verfügbare Kanäle) zu verschieben. Klicken Sie auf „OK“ (Abbildung 8).**

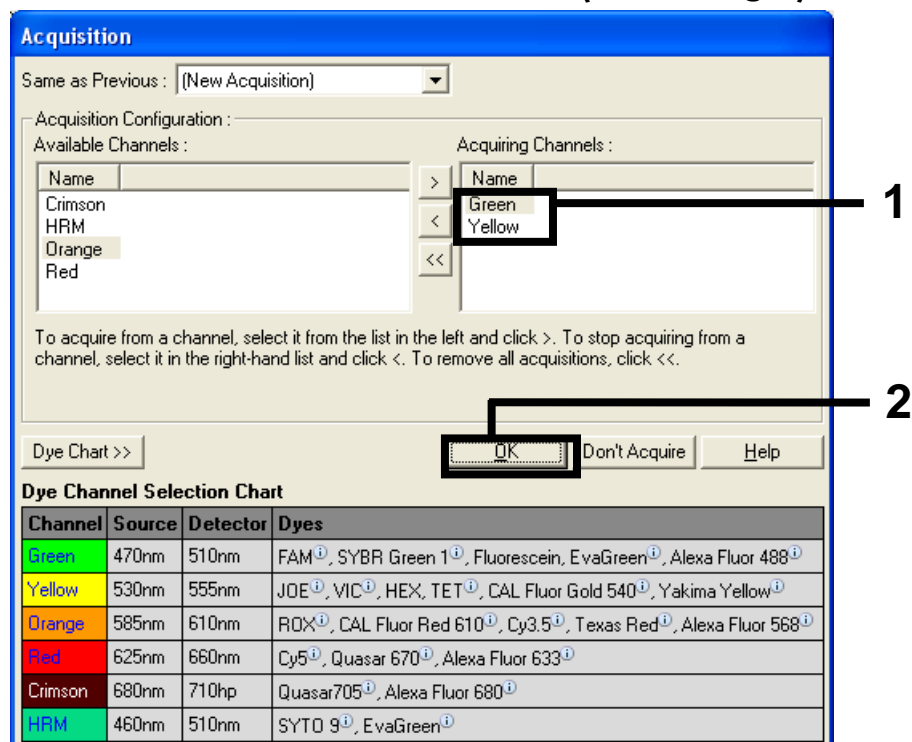


Abbildung 8. Erfassung im Zyklusschritt bei 60 °C

12. Markieren Sie den dritten Schritt und löschen Sie diesen, indem Sie auf die Schaltfläche „-“ klicken. Klicken Sie auf „OK“ (Abbildung 9).

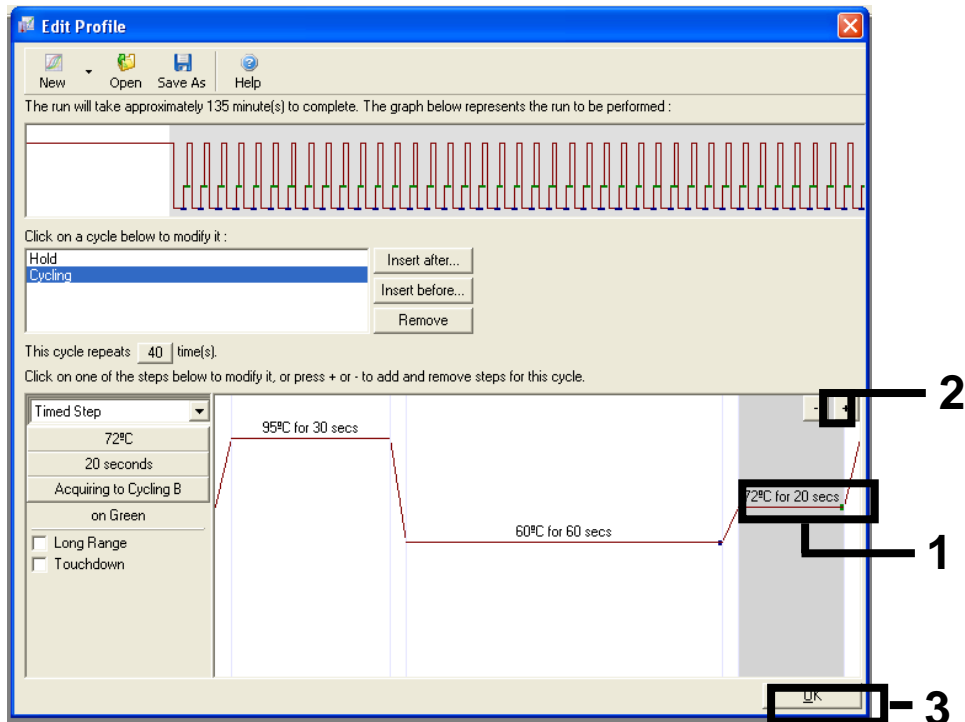


Abbildung 9. Entfernen des Erweiterungsschrittes

13. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld auf die Schaltfläche „Gain Optimisation“ (Verstärkungsoptimierung, siehe Abbildung 10).

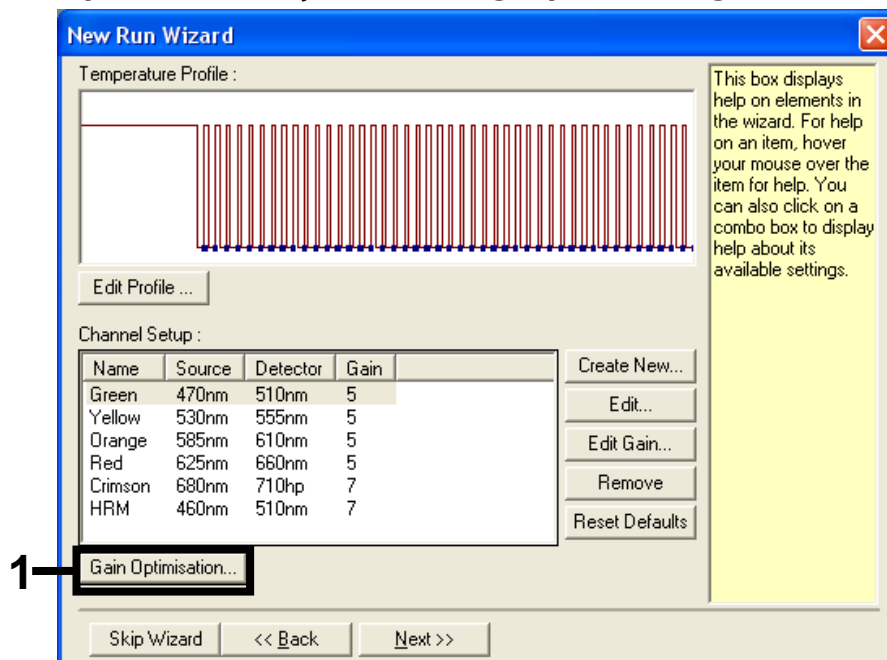


Abbildung 10. Verstärkungsoptimierung

14. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Optimise Acquiring“ (Erfassung optimieren). Es werden dann für jeden Kanal die Kanaleinstellungen angezeigt. Bestätigen Sie diese Standardwerte, indem Sie für beide Kanäle auf „OK“ klicken (siehe Abbildung 11).

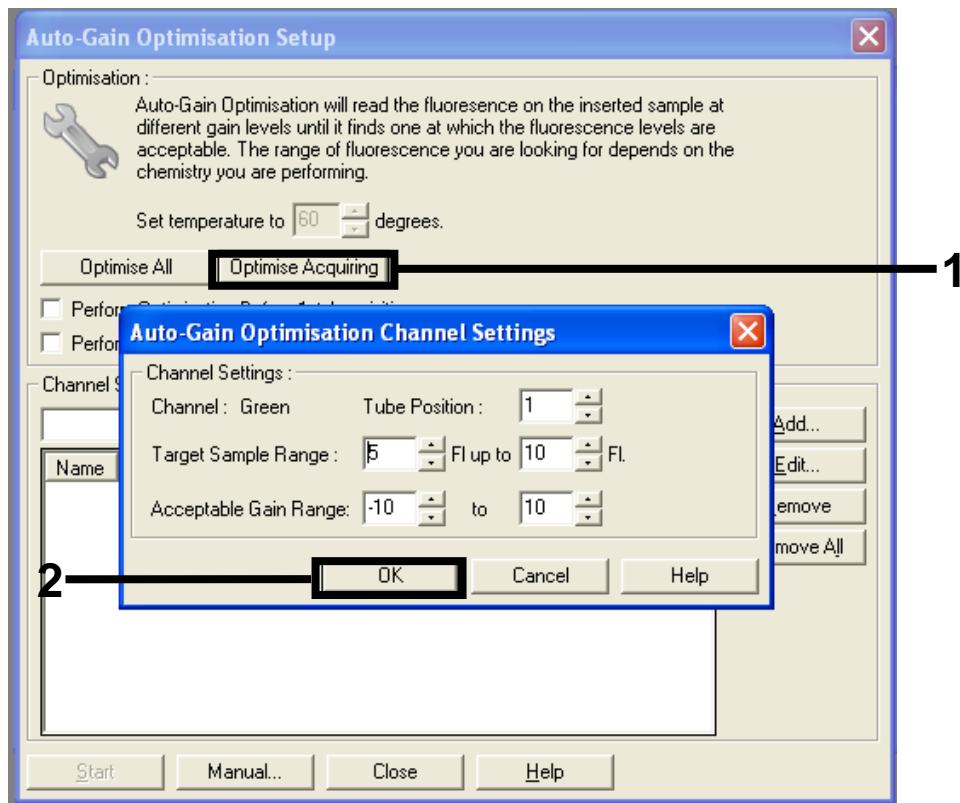


Abbildung 11. Automatische Verstärkungsoptimierung für den grünen Kanal

15. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen) und klicken Sie dann auf die Schaltfläche „Close“ (Schließen), um zum Assistenten zurückzukehren (siehe Abbildung 12).

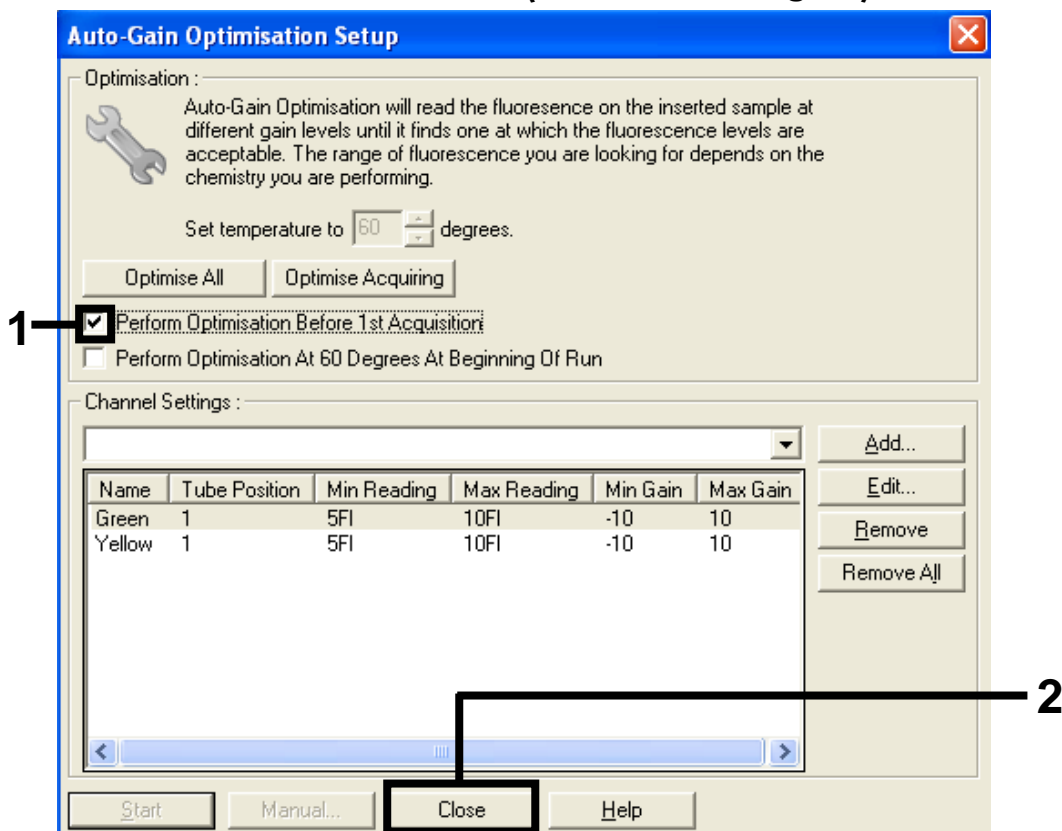


Abbildung 12. Auswahl des grünen und gelben Kanals

16. Klicken Sie auf „Next“ (Weiter), um die Vorlage am gewünschten Speicherort zu speichern. Klicken Sie dazu auf „Save Template“ (Vorlage speichern).

17. Überprüfen Sie den Bereich unter „Summary“ (Zusammenfassung) und klicken Sie auf „Start Run“ (Lauf starten), um die Laufdatei zu speichern und den Lauf zu starten (siehe Abbildung 13).

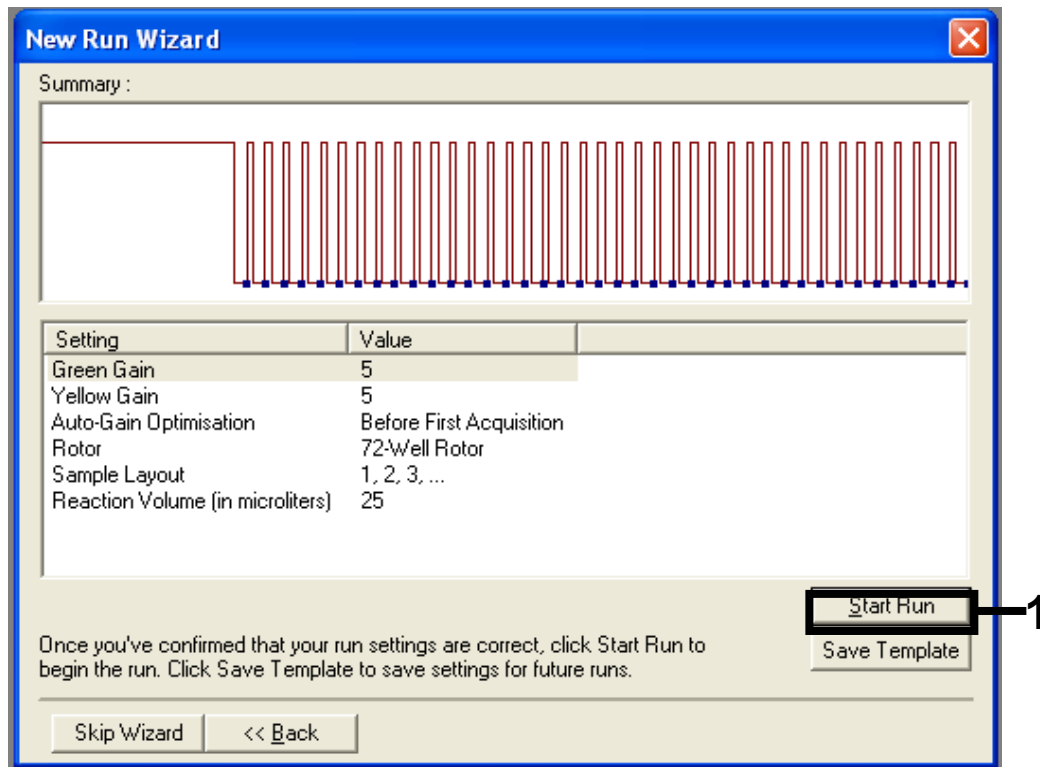


Abbildung 13. Starten des Laufs

18. Nach dem Start des Laufs wird ein neues Fenster aufgerufen. Hier können Sie entweder gleich die Probenamen eingeben oder auf „Finish“ (Fertig stellen) klicken und diese zu einem späteren Zeitpunkt eingeben, indem Sie während oder nach Abschluss des Laufs auf die Schaltfläche „Sample“ (Probe) klicken.
19. Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß dem entsprechenden Protokoll:
- Weitere Informationen zur Probenbestimmung finden Sie unter „Analyse der Daten aus der Probenbestimmung“ auf Seite 31.
 - Weitere Informationen zur Mutationsanalyse finden Sie unter „Analyse der EGFR-Mutationsdaten“ auf Seite 35.

Interpretation der Ergebnisse

ΔC_T -Analysemethode

Bei den Scorpions-Echtzeit-Assays werden die zu Reaktionsbeginn vorhandenen Zielmoleküle anhand der Anzahl von PCR-Zyklen gemessen, die zur Detektion eines fluoreszierenden Signals über einem Hintergrundsignal erforderlich sind. Der Punkt, an dem das Signal über der Hintergrundfluoreszenz erkannt wird, ist der so genannte Zyklusschwellenwert (Cycle Threshold, C_T).

Die ΔC_T -Werte der Probe werden als Differenz zwischen dem Mutations-Assay- C_T und dem Kontroll-Assay- C_T derselben Probe berechnet:

$$\Delta C_T = \text{Mutations-}C_T - \text{Kontroll-}C_T$$

Hinweis: Proben werden als positiv eingestuft, wenn das ΔC_T -Ergebnis unter dem ΔC_T -Cut-off-Wert des Assays liegt. Über diesem Wert enthält die Probe entweder weniger als den Prozentsatz an Mutation, der mit dem Kit nachgewiesen werden kann (außerhalb der Assay-Grenzwerte), oder die Probe ist mutationsnegativ.

Hinweis: Mutations- C_T -Werte von 40 oder höher werden als negativ oder außerhalb der Grenzwerte des Kits eingestuft.

Bei Verwendung von ARMS-Primern kann möglicherweise ineffizientes Priming erfolgen, das bei DNA, die keine Mutation enthält, einen sehr späten Hintergrund- C_T ergibt. Alle aus der Hintergrundamplifikation berechneten ΔC_T -Werte liegen über den ΔC_T -Cut-off-Werten; die Probe wird demnach als mutationsnegativ eingestuft.

Analyse der Daten aus der Probenbestimmung

Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß dem folgenden Verfahren.

Einstellungen für die Analyse in der Software

1. Öffnen Sie über die Rotor-Gene Q Software (Version 2.0.2 oder höher) die entsprechende Datei.
2. Stellen Sie sicher, dass die Proben etikettiert sind.
3. Klicken Sie auf der Seite mit den Rohfluoreszenzdaten für den jeweiligen Detektor/Kanal auf „Options“ (Optionen) und geben Sie einen Wert für *Crop start cycles* (Erste Zyklen löschen) ein. Geben Sie auf der Seite mit „Remove data before cycle“ (Daten vor Zyklus entfernen) den Wert 15 ein und klicken Sie auf „OK“.
4. Klicken Sie auf „Analysis“ (Analyse). Klicken Sie auf der Analysenseite auf „Cycling A (from 15), Yellow“ (Zyklus A [von 15], Gelb), um den HEX-Kanal zu aktivieren.

5. Stellen Sie sicher, dass „Dynamic tube“ (Dynamisches Röhrchen) aktiviert ist. Klicken Sie auf „Slope correct“ (Steigungskorrektur) und „Linear scale“ (Linearer Bereich).
6. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,02 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte für HEX.
7. Klicken Sie auf der Analysenseite auf „Cycling A (from 15), Green“ (Zyklus A [von 15], Grün), um den FAM-Kanal anzuzeigen.
8. Das dynamische Röhrchen sollte markiert sein. Klicken Sie auf „Slope correct“ (Steigungskorrektur) und „Linear scale“ (Linearer Bereich).
9. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,075 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte für FAM.

Wenn der Lauf abgeschlossen ist, analysieren Sie die Daten wie folgt.

- **Negativkontrolle:** Um eine Template-Kontamination auszuschließen, darf der C_T -Wert der Nicht-Template-Kontrolle im grünen Kanal (FAM) nicht unter 40 liegen. Wichtige Informationen zum Auswerten der Nicht-Template-Kontrollkurven finden Sie unter „Hinweise zur Dateninterpretation“ auf Seite 41. Um sicherzustellen, dass der Lauf korrekt eingerichtet wurde, muss die Nicht-Template-Kontrolle im gelben Kanal (HEX) eine Amplifikation von 31 bis 37 aufweisen.

Wenn eine positive Amplifikation im grünen Kanal vorliegt und/oder die Amplifikation im gelben Kanal außerhalb des Bereichs von 31 bis 37 liegt, müssen die Probenergebnisse verworfen werden.

- **Positivkontrolle:** Die EGFR-Positivkontrolle (PC) muss einen Kontroll-Assay- C_T -Wert (FAM-Kanal) zwischen 26,26 und 30,95 ergeben. Ein Lauf mit einem C_T -Wert außerhalb dieses Bereichs zeigt ein Problem mit der Assay-Konfiguration an und der Lauf sollte als fehlgeschlagen betrachtet werden. Wenn der C_T -Wert des Positivkontroll-Assays im Bereich von 26,26 bis 30,95 (Exon 2, FAM) liegt, aber der C_T -Wert (HEX) der internen Kontrolle außerhalb des Bereichs von 31 bis 37 liegt, fahren Sie mit der Analyse fort.

Hinweis: Die Probendaten dürfen nicht verwendet werden, wenn eine dieser beiden Laufkontrollen fehlgeschlagen ist.

Wenn beide Laufkontrollen gültig sind, muss der C_T -Wert jeder Probe im grünen Kanal (FAM) im Bereich von 23 bis 30,69 liegen. Wenn die Probe außerhalb dieses Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor:

- **C_T -Wert des Proben-Kontroll-Assays < 23:** Proben mit einem Kontroll- C_T von < 23 müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Damit die verschiedenen Mutationen schon in

geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können, müssen übermäßig hoch konzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie im oben angegebenen Bereich liegen. Als Faustregel hierbei gilt, dass eine Verdünnung um die Hälfte den C_T -Wert um 1 erhöht.

- **C_T -Wert des Proben-Kontroll-Assays zwischen 30,69 und 37:** Das Ergebnis sollte mit Vorsicht interpretiert werden, da besondere niedriggradige Mutationen möglicherweise nicht erkannt werden.
- **C_T -Wert des Proben-Kontroll-Assays zwischen 37 und 40:** Das Ergebnis sollte mit Vorsicht interpretiert werden, da nur sehr hochgradige Mutationen erkannt werden.
- **C_T -Wert des Proben-Kontroll-Assays > 40:** Die Probe enthält nicht ausreichend DNA für eine Analyse.

Hinweis: Wenn eine Probe keinen C_T ausreichender Größe (d. h. $C_T > 40$) ergibt, kann dies darauf zurückzuführen sein, dass ein Inhibitor vorhanden ist, bei der Assay-Konfiguration ein Fehler aufgetreten ist oder dass keine amplifizierbare EGFR-DNA vorhanden ist.

- **C_T -Wert der internen Kontrolle zwischen 31 und 37:** Es ist keine amplifizierbare EGFR-DNA vorhanden.
- **C_T -Wert der internen Kontrolle liegt nicht im Bereich von 31 bis 37:** Dies könnte einen Fehler bei der Assay-Konfiguration oder die Gegenwart eines Inhibitors anzeigen. Die Wirkung eines Inhibitors kann zwar durch Verdünnung der Probe verringert werden, allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die DNA verdünnt wird.

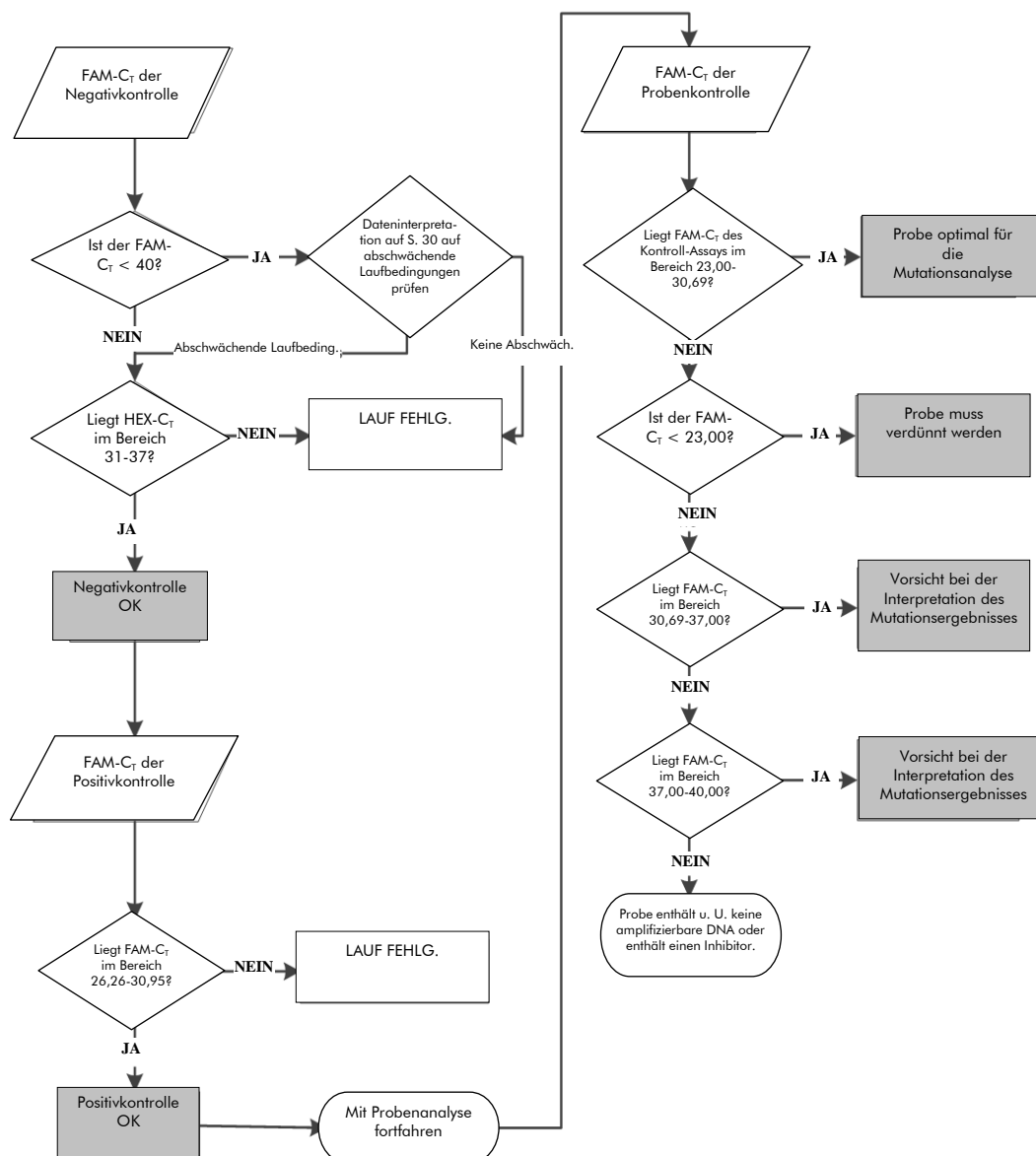


Abbildung 14. Arbeitsablauf zur Analyse der Daten aus der Probenbestimmung

Analyse der EGFR-Mutationsdaten

Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß dem folgenden Verfahren.

Einstellungen für die Analyse in der Software

1. Öffnen Sie über die Rotor-Gene Q Software (Version 2.0.2 oder höher) die entsprechende Datei.
2. Stellen Sie sicher, dass die Proben etikettiert sind.
3. Klicken Sie auf der Seite mit den Rohfluoreszenzdaten für den jeweiligen Detektor/Kanal auf „Options“ (Optionen) und geben Sie einen Wert für *Crop start cycles* (Erste Zyklen löschen) ein. Geben Sie auf der Seite mit „Remove data before cycle“ (Daten vor Zyklus entfernen) den Wert 15 ein und klicken Sie auf „OK“.
4. Klicken Sie auf „Analysis“ (Analyse). Klicken Sie auf der Analysenseite auf „Cycling A (from 15), Yellow“ (Zyklus A [von 15], Gelb), um den HEX-Kanal anzuzeigen.
5. Stellen Sie sicher, dass „Dynamic tube“ (Dynamisches Röhrchen) aktiviert ist. Klicken Sie auf „Slope correct“ (Steigungskorrektur) und „Linear scale“ (Linearer Bereich).
6. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,02 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte für HEX.
7. Klicken Sie auf der Analysenseite auf „Cycling A (from 15), Green“ (Zyklus A [von 15], Grün), um den FAM-Kanal anzuzeigen.
8. Stellen Sie sicher, dass „Dynamic tube“ (Dynamisches Röhrchen) aktiviert ist. Klicken Sie auf „Slope correct“ (Steigungskorrektur) und „Linear scale“ (Linearer Bereich).
9. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,075 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte für FAM.

Analyse der Laufkontrollen:

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm „Analyse der Laufkontrollen“ in Abbildung 15.

- **Negativkontrolle:** Um eine Template-Kontamination auszuschließen, darf der C_T -Wert der Nicht-Template-Kontrolle im grünen Kanal (FAM) nicht unter 40 liegen. Wichtige Informationen zum Auswerten der Nicht-Template-Kontrollkurven finden Sie unter „Hinweise zur Dateninterpretation“ auf Seite 41. Um sicherzustellen, dass der Lauf korrekt eingerichtet wurde, muss die Nicht-Template-Kontrolle im gelben Kanal (HEX) eine Amplifikation von C_T 31 bis 37 aufweisen.

Wenn eine positive Amplifikation im grünen Kanal vorliegt und/oder die Amplifikation im gelben Kanal außerhalb des Bereichs von 31 bis 37 liegt, müssen die Probenergebnisse verworfen werden.

- **Positivkontrolle:** Die EGFR-Positivkontrolle (PC) muss im grünen Kanal einen Kontroll-Assay- C_T -Wert zwischen 26,26 und 30,95 ergeben. Ein Lauf mit einem C_T -Wert außerhalb dieses Bereichs zeigt ein Problem mit der Assay-Konfiguration an und der Lauf sollte als fehlgeschlagen betrachtet werden. Wenn der C_T -Wert des Positivkontroll-Assays im Bereich von 26,26 bis 30,95 (Exon 2, FAM) liegt, aber der C_T -Wert (HEX) der internen Kontrolle außerhalb des Bereichs von 31 bis 37 liegt, fahren Sie mit der Analyse fort.

Berechnen Sie für jeden Mutationsassay den ΔC_T -Wert und vergewissern Sie sich, dass die Mutations- und Kontroll- C_T -Werte von der Positivkontrolle stammen.

$$\Delta C_T = \text{Mutations-}C_T - \text{Kontroll-}C_T$$

Die ΔC_T -Werte der EGFR-Positivkontrolle (PC) müssen in dem in Tabelle 7 angegebenen zulässigen Bereich liegen.

Tabelle 7. Erwartete ΔC_T -Werte der Positivkontrolle*

| Assay | ΔC_T -Wert der Positivkontrolle |
|-------------|---|
| T790M | –2,88 bis 3,01 |
| Deletionen | –6,71 bis 4,16 |
| L858R | –2,41 bis 0,90 |
| L861Q | –4,61 bis 1,48 |
| G719X | –2,89 bis 1,03 |
| S768I | –3,37 bis 2,31 |
| Insertionen | –2,93 bis 1,28 |

* Rotor-Gene Q Software (2.0.2)

Hinweis: Die Probendaten dürfen nicht verwendet werden, wenn die negative oder positive Laufkontrolle fehlgeschlagen ist.

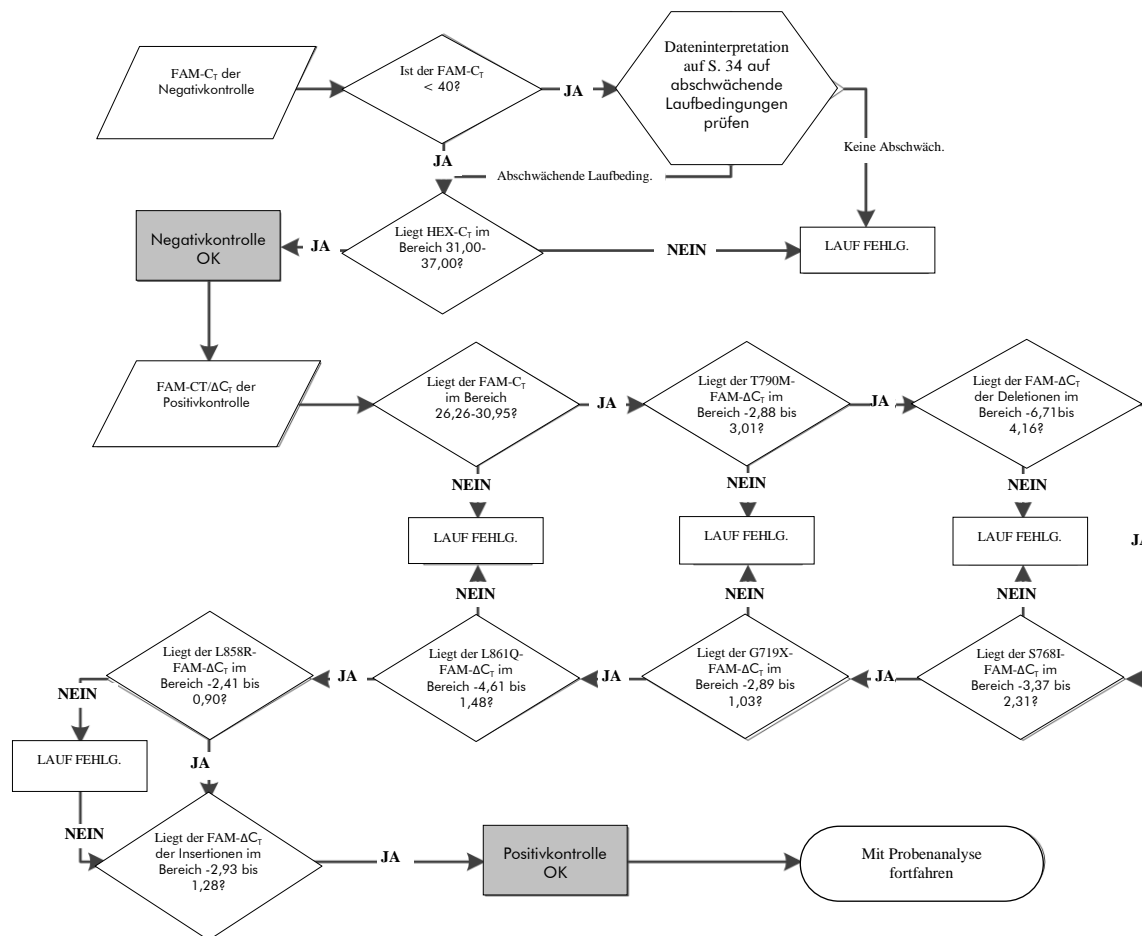


Abbildung 15. Arbeitsablauf zur Analyse der Laufkontrollen

Probenanalyse:

FAM-C_T der Probenkontrolle

Wenn beide Laufkontrollen gültig sind, muss der C_T-Wert jeder Probenkontrolle im grünen Kanal im Bereich von 23 bis 30,69 liegen. Weitere Informationen finden Sie im Flussdiagramm „Probenanalyse“ in Abbildung 16.

- **C_T-Wert des Proben-Kontroll-Assays < 23:** Proben mit einem Kontroll-C_T von < 23 müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Damit die verschiedenen Mutationen schon in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können, müssen übermäßig hoch konzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie im oben angegebenen Bereich liegen. Als Faustregel hierbei gilt, dass eine Verdünnung um die Hälfte den C_T-Wert um 1 erhöht.
- **C_T-Wert der Probenkontrolle zwischen 30,69 und 37:** Das Ergebnis sollte mit Vorsicht interpretiert werden, da besonders niedriggradige Mutationen möglicherweise nicht erkannt werden.

- **C_T-Wert der Probenkontrolle zwischen 37 und 40:** Das Ergebnis sollte mit Vorsicht interpretiert werden, da nur sehr hochgradige Mutationen erkannt werden.
- **C_T-Wert des Proben-Kontroll-Assays > 40:** Die Probe enthält nicht ausreichend DNA für eine Analyse.

Hinweis: Wenn der FAM-C_T-Wert der Probe zwischen 23 und < 37 liegt, braucht die interne Kontrolle nicht evaluiert zu werden.

Hinweis: Wenn eine Probe keinen C_T ausreichender Größe (d. h. C_T > 40) ergibt, kann dies darauf zurückzuführen sein, dass ein Inhibitor vorhanden ist, bei der Assay-Konfiguration ein Fehler aufgetreten ist oder dass keine amplifizierbare EGFR-DNA vorhanden ist.

- **C_T-Wert der internen Kontrolle zwischen 31 und 37:** Der Assay funktioniert einwandfrei, aber es ist keine amplifizierbare EGFR-DNA vorhanden.
- **C_T-Wert der internen Kontrolle liegt nicht im Bereich von 31 bis 37:** Dies könnte einen Fehler bei der Assay-Konfiguration oder die Gegenwart eines Inhibitors anzeigen. Die Wirkung eines Inhibitors kann zwar durch Verdünnung der Probe verringert werden, allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die DNA verdünnt wird.

Hinweis: Wenn die FAM-Reaktion des Mutationsassays keinen C_T-Wert hervorbringt und der C_T-Wert der internen Kontrollen außerhalb des Bereichs von 31 bis 37 liegt, müssen die Daten verworfen werden, da u. U. Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch-negativen Ergebnissen führen können. Durch Verdünnung der Probe kann die Wirkung der Inhibitoren verringert werden; allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die DNA verdünnt wird.

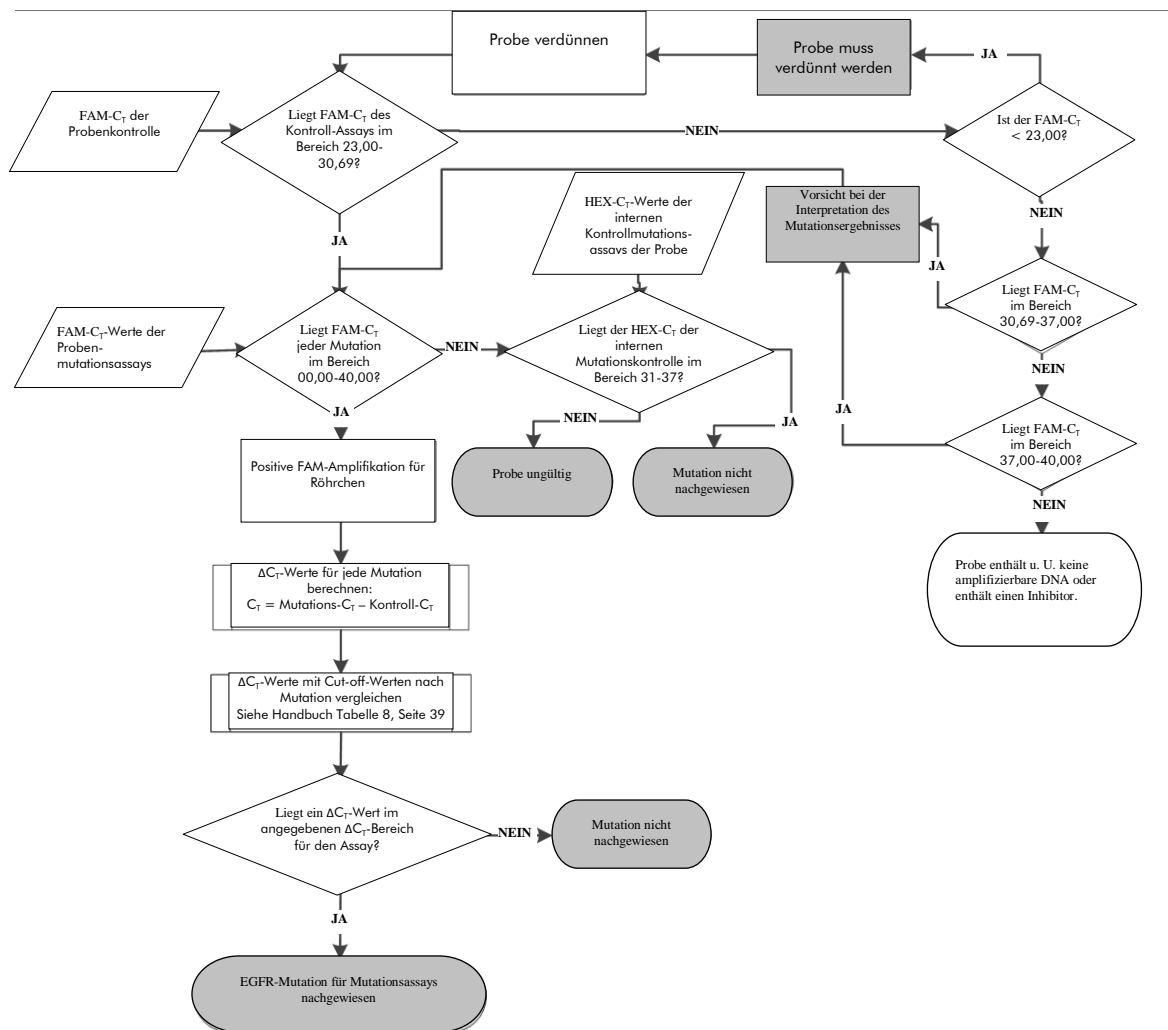


Abbildung 16. Flussdiagramm der Mutationsanalyse

FAM-C_T-Wert der Proben-Mutationsassays

Die FAM-Werte aller sieben Mutations-Reaktionsgemische sind mit den in Tabelle 8 aufgeführten Werten zu vergleichen.

Tabelle 8. Zulässige Werte für Probenmutationsreaktionen (FAM)*

| Assay | Zulässiger C _T -Bereich | ΔC _T -Cut-off-Wert |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------|
| T790M | 15,00–40,00 | 6,38 |
| Deletionen | 15,00–40,00 | 9,06 |
| L858R | 15,00–40,00 | 8,58 |
| L861Q | 15,00–40,00 | 9,26 |
| G719X | 15,00–40,00 | 9,31 |
| S768I | 15,00–40,00 | 9,26 |
| Insertionen | 15,00–40,00 | 7,91 |

* Die Grenzwerte der angegebenen Bereiche gehören noch zu den zulässigen Werten.

- Wenn der FAM-C_T-Wert im angegebenen Bereich von 15,00 bis 40,00 liegt, ist die FAM-Amplifikation positiv.
- Wenn der FAM-C_T-Wert über dem angegebenen Bereich liegt oder keine Amplifikation stattfindet, ist die FAM-Amplifikation negativ.

Berechnen Sie für jede Mutationsprobe mit einer positiven Amplifikation wie folgt den ΔC_T-Wert und achten Sie darauf, dass die Mutations- und Kontroll-C_T-Werte von derselben Probe stammen.

$$\Delta C_T = \text{Mutations-C}_T - \text{Kontroll-C}_T$$

Vergleichen Sie den ΔC_T-Wert der Probe mit dem Cut-off-Wert des jeweiligen Assays (siehe Tabelle 8) und achten Sie darauf, dass für jeden Assay der korrekte Cut-off-Wert verwendet wird.

Ein positives Signal, das über dem Cut-off-Wert liegt, kann bei Wildtyp-DNA potenziell durch das Hintergrundsignal des ARMS-Primers verursacht werden. Liegt der ΔC_T-Wert der Probe über dem Cut-off-Wert, so wird sie als „Mutation nicht nachgewiesen“ oder außerhalb der Nachweisgrenze des Kits eingestuft. Liegt der Wert der Probe am oder unter dem Cut-off-Wert, so wird die Probe als positiv für die in diesem Assay getestete Mutation eingestuft.

Hinweis: Bei Proben, die keinen C_T-Wert für die FAM-Mutation zeigen, muss der C_T-Wert der internen Kontrolle (HEX) evaluiert werden, um zu bestimmen,

ob die Mutation nicht nachgewiesen wurde oder der Assay ungültig ist. Wenn der HEX- C_T -Wert zwischen 31 und 37 liegt, wurde die Mutation nicht nachgewiesen. Liegt der HEX- C_T -Wert jedoch außerhalb des Bereichs von 31–37, so ist die Probe ungültig.

Es werden also alle Mutationsreaktionen für jede Probe nach den folgenden Kriterien mit dem Status „Mutation nachgewiesen“, „Mutation nicht nachgewiesen“ oder „Ungültig“ bewertet.

- **Mutation nachgewiesen:** FAM-Amplifikation ist positiv und der ΔC_T -Wert ist kleiner oder gleich dem Cut-off-Wert. Wenn mehrere Mutationen nachgewiesen werden, können alle angegeben werden.
- **Mutation nicht nachgewiesen:**
FAM-Amplifikation ist positiv und der ΔC_T -Wert ist größer als der Cut-off-Wert.
Die FAM-Amplifikation ist negativ und die HEX-Amplifikation (interne Kontrolle) ist positiv.
- **Ungültig:**
Die FAM-Amplifikation ist negativ und die HEX-Amplifikation liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.

Hinweise zur Dateninterpretation

Lineare Amplifikation

Die Rotor-Gene Q Diagramme aller Reaktionen müssen überprüft werden. Gelegentlich tritt bei der Nicht-Template-Kontrolle und den negativen Proben ein Anstieg des Fluoreszenzsignals auf. Wenn dies der Fall ist und ein C_T -Wert ermittelt wird, müssen Sie zwischen einem tatsächlichen Amplifikationsereignis, das auf eine Kontamination der NTC hinweist, und einem linearen Anstieg der Fluoreszenz unterscheiden, der möglicherweise auf ein Fluoreszenz-Artefakt zurückzuführen ist.

Analyse der NTC

Zwei Beispiele für das Verhalten der Nicht-Template-Kontrollen sind in den Abbildungen 17 bis 18 veranschaulicht. In Abbildung 17 ist ein nicht-lineares Verhalten (tatsächliche Amplifikation) infolge einer Kontamination der Probe dargestellt. Dieser Lauf muss verworfen und die Proben müssen neu getestet werden. Abbildung 18 zeigt eine lineare Amplifikation einer Nicht-Template-Kontrolle. In diesem Fall muss die Rohfluoreszenz untersucht werden. Das zugehörige Rohfluoreszenzdiagramm ist in Abbildung 19 dargestellt; es zeigt kein tatsächliches Amplifikationsereignis, sondern einen linearen Anstieg der Fluoreszenz. Die Daten dieses Laufs können verwendet werden, sofern die Positivkontrolle und die internen Kontrollen nicht fehlgeschlagen sind. Im

Gegensatz zu Abbildung 19 enthält Abbildung 20 Rohfluoreszenzdaten, die eine tatsächliche Amplifikation anzeigen. Da dies auf eine Kontamination hinweist, müssen die Daten in diesem Fall verworfen und die Proben neu getestet werden.

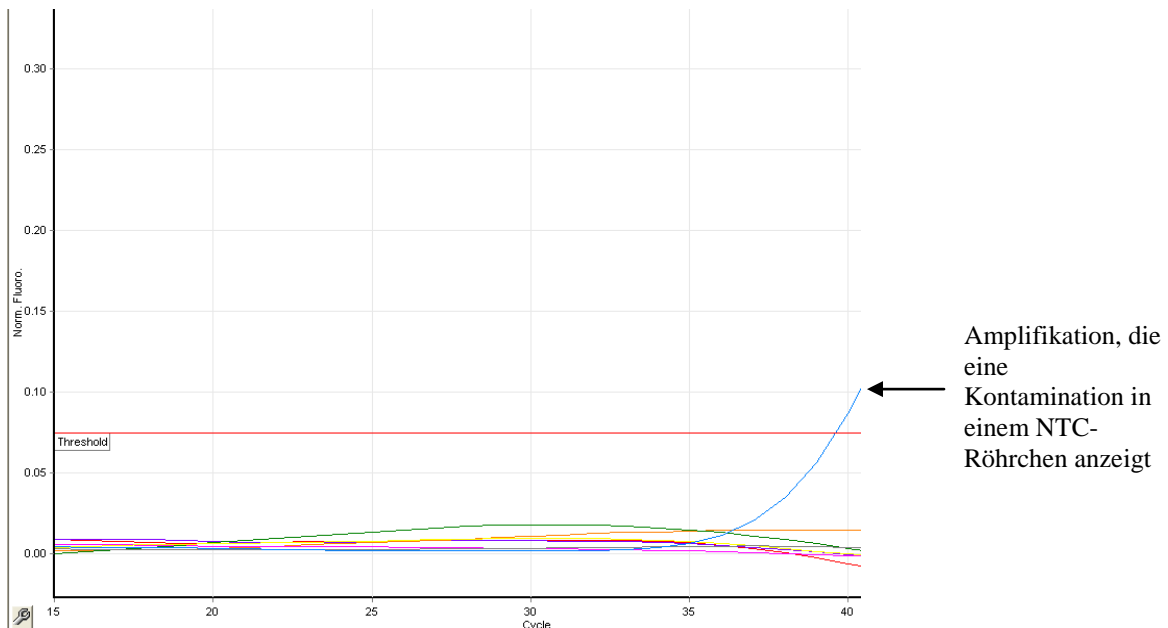


Abbildung 17. Kontamination einer NTC eines Assays in einem analysierten Lauf

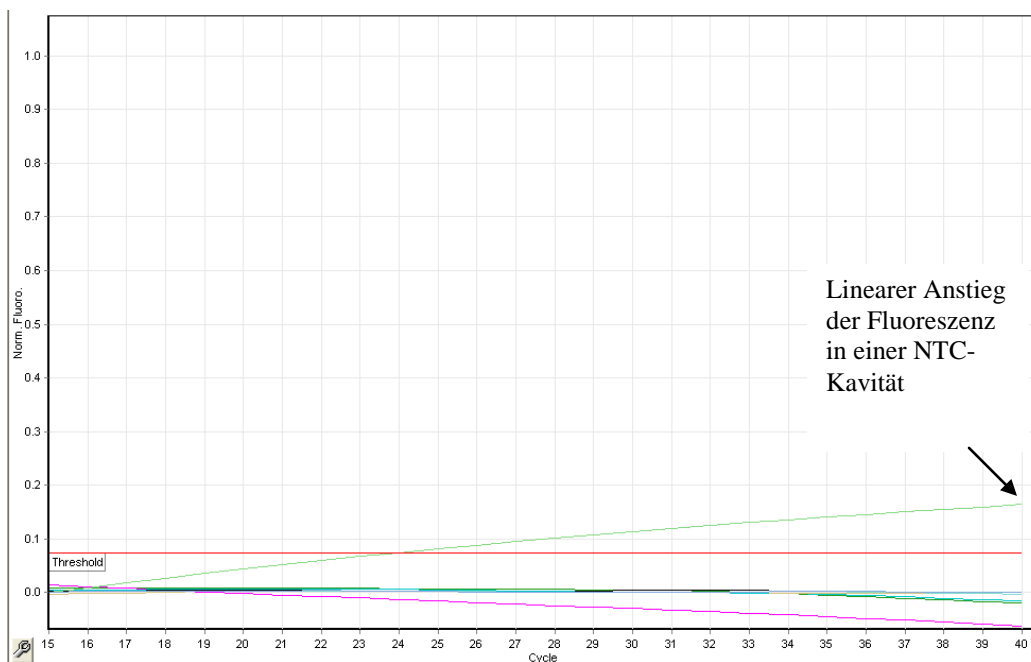


Abbildung 18. Beispiel eines linearen Anstiegs der Fluoreszenz in einer NTC-Kavität

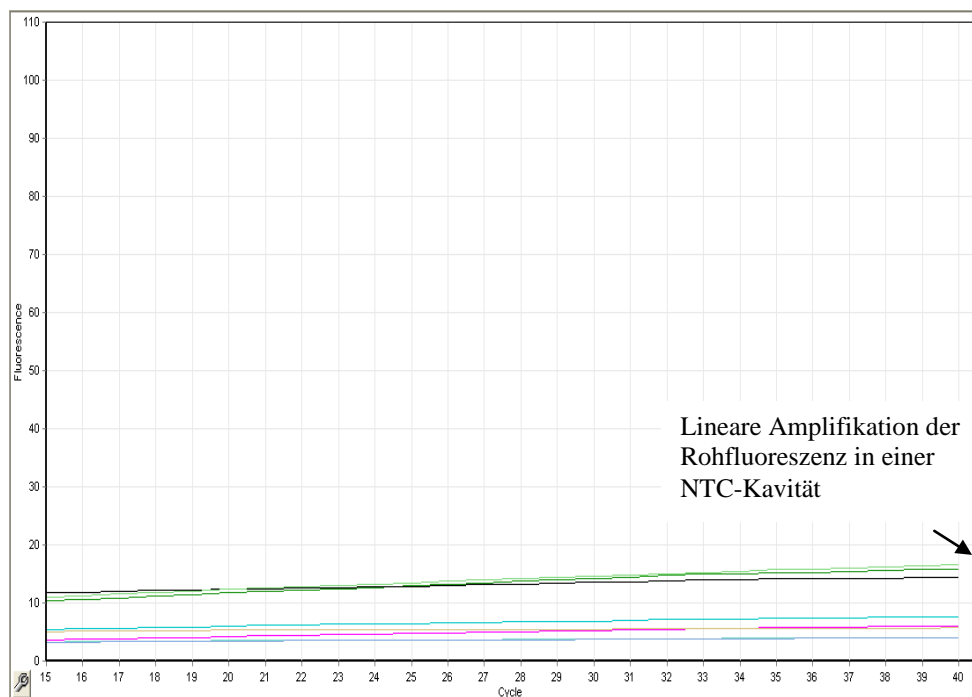


Abbildung 19. Rohfluoreszenz aus Abbildung 18

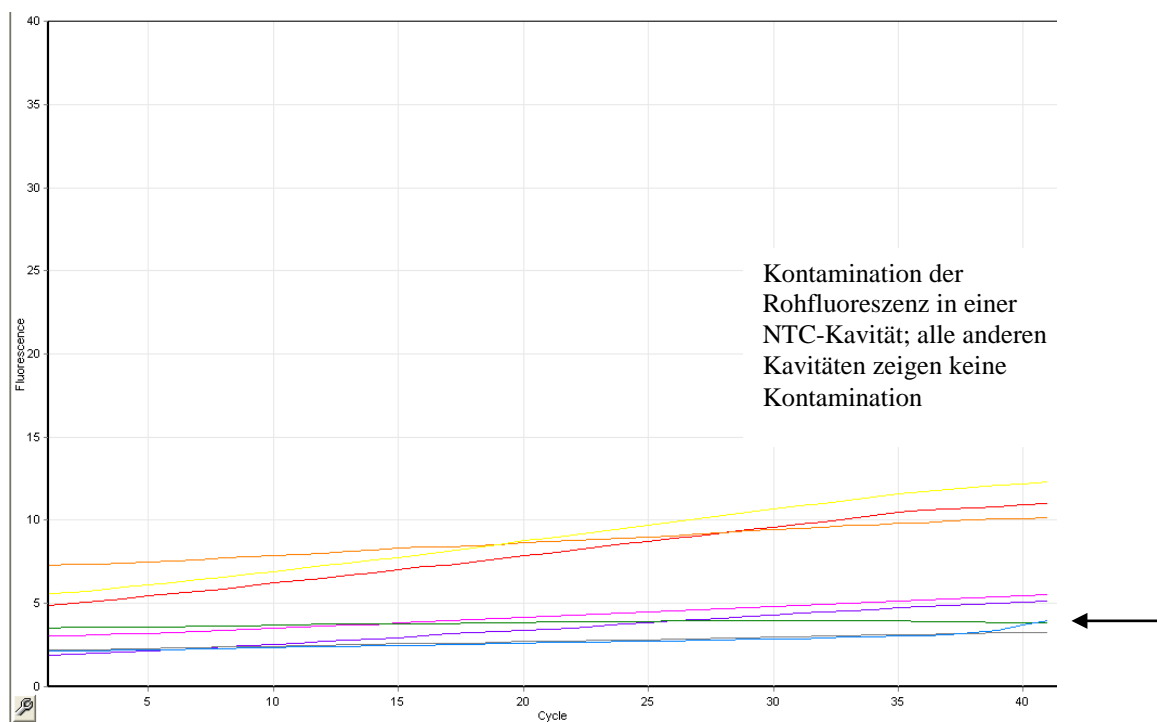


Abbildung 20. Rohfluoreszenzdaten einer NTC-Kavität mit einem tatsächlichen Amplifikationsereignis

Analyse der Proben

Die Abbildungen 21 bis 22 zeigen zwei Beispiele für die Amplifikation von Probenreaktionen. Abbildung 21 zeigt eine tatsächliche Amplifikation in einer Probenkavität in einem analysierten Lauf. Wenn ein Lauf diese Art sigmoider Amplifikationskurve aufweist, liegt tatsächliche Amplifikation vor und die Daten dieses Laufs können verwendet werden, sofern die Positivkontrolle und die internen Kontrollen nicht fehlgeschlagen sind.

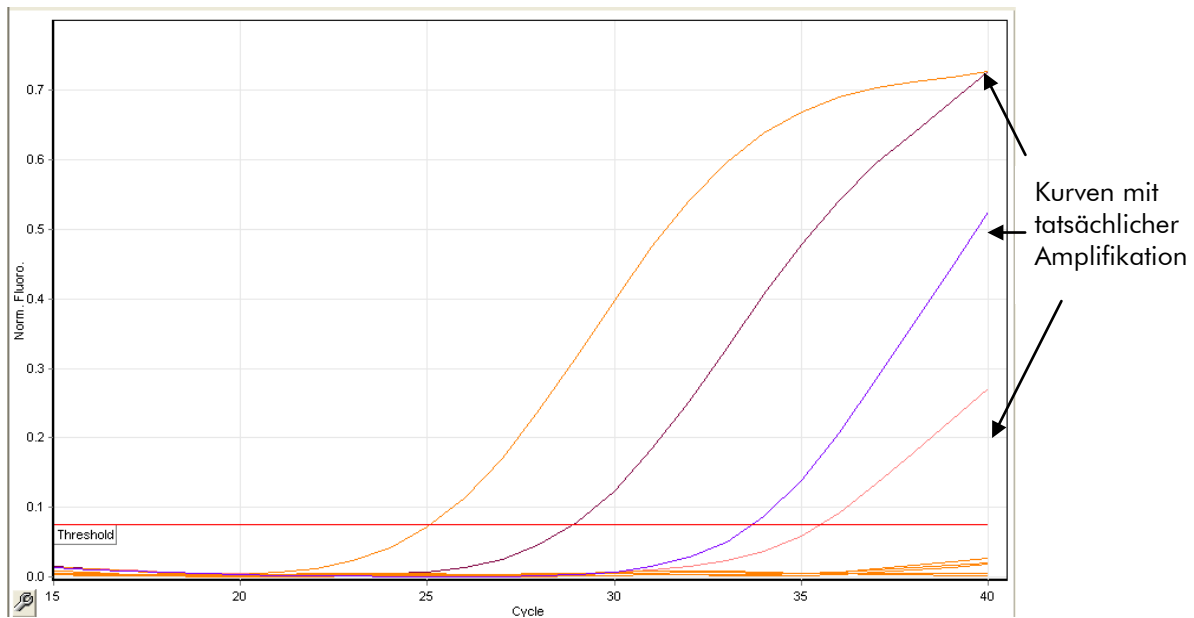


Abbildung 21. Tatsächliche Amplifikation in einer Probenkavität in einem analysierten Lauf

Abbildung 22 zeigt ein Beispiel für eine lineare Amplifikation in einer Probenreaktion. In diesem Fall müssen die Rohfluoreszenzdaten untersucht werden. Das zugehörige Rohfluoreszenzdiagramm (Abbildung 23) macht deutlich, dass der in Abbildung 22 beobachtete lineare Anstieg einem linearen Anstieg der Rohfluoreszenz entspricht und keiner tatsächlichen Amplifikation zugerechnet werden kann. Sofern die Positivkontrolle und die interne Kontrolle nicht fehlgeschlagen sind, können die Probenergebnisse dieser Läufe unter dem Vorbehalt verwendet werden, dass die lineare Amplifikation als „kein C_T “ bezeichnet wird.

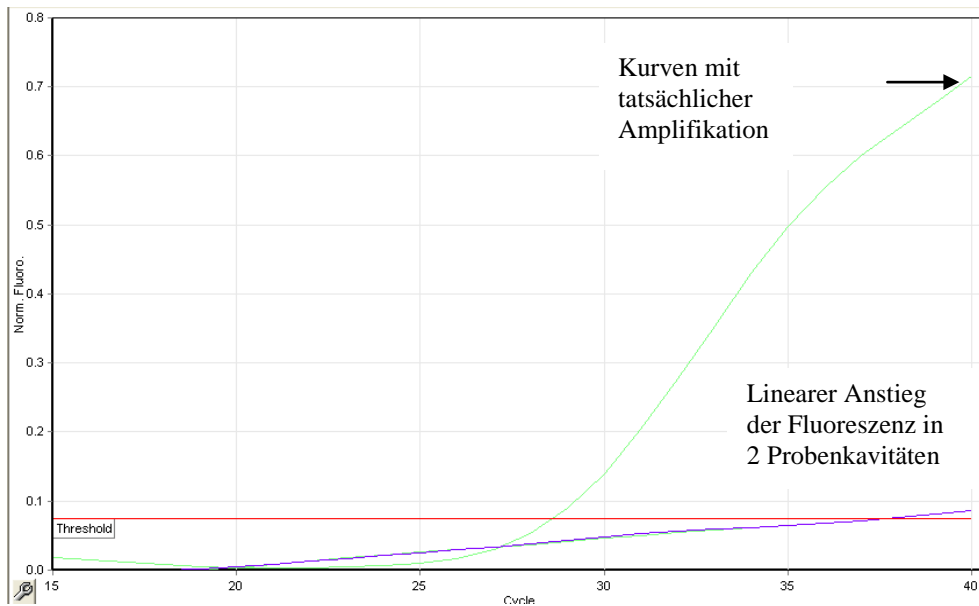


Abbildung 22. Beispiel eines linearen Anstiegs der Fluoreszenz in zwei Probenkavitäten

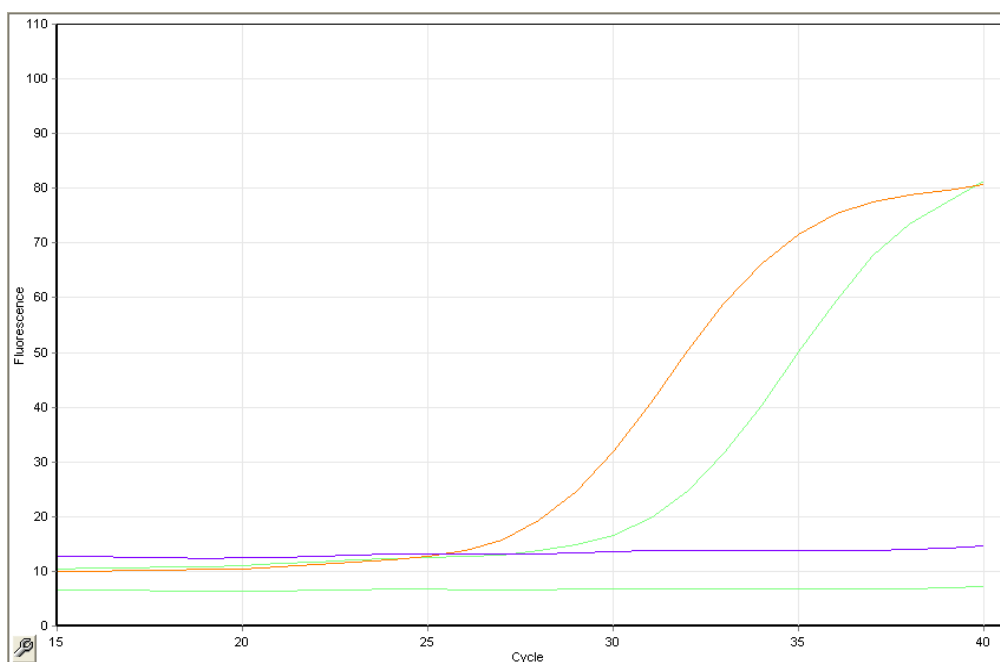


Abbildung 23. Rohfluoreszenz aus Abbildung 22

Fehlerbehebung

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

www.qiagen.com). Das Team besteht aus erfahrenen Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Kommentare und Vorschläge

Kein Signal mit der EGFR-Positivkontrolle (PC) im Fluoreszenzkanal „Cycling Green“

- | | |
|--|---|
| a) Der für die PCR-Datenanalyse ausgewählte Fluoreszenzkanal erfüllt nicht die Anforderungen des Protokolls. | Wählen Sie bei der Datenanalyse für die analytische EGFR-PCR-Reaktion den Fluoreszenzkanal „Cycling Green“ und für die PCR-Reaktion der internen Kontrolle den Fluoreszenzkanal „Cycling Yellow“. |
| b) Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils für das Rotor-Gene System | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll und wiederholen Sie den Lauf, wenn das Profil nicht korrekt ist. |
| c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie bei Bedarf die PCR. |
| d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Komponenten des Kits stimmen nicht mit den Anweisungen im Abschnitt „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 12 überein. | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf einen neuen Kit. |
| e) Das <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit ist abgelaufen. | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf einen neuen Kit. |

Signale mit den Negativkontrollen im Fluoreszenzkanal „Cycling Green“ der analytischen PCR

- | | |
|---|--|
| a) Während der Vorbereitung der PCR ist eine Kontamination aufgetreten. | Wiederholen Sie die PCR mit neuen Reagenzien in Replikaten. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen möglichst sofort nach der Zugabe der zu testenden Probe. Stellen Sie sicher, dass der Arbeitsbereich und die Geräte in regelmäßigen Abständen dekontaminiert werden. |
| b) Während der Extraktion ist eine Kontamination aufgetreten. | Wiederholen Sie die Extraktion und PCR der zu testenden Probe mit neuen Reagenzien. Stellen Sie sicher, dass der Arbeitsbereich und die Geräte in regelmäßigen Abständen dekontaminiert werden. |

Qualitätskontrolle

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

Einschränkungen

Zur Auswertung der mit dem Produkt erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen und labortechnischen Daten berücksichtigt werden. Es dürfen nicht nur die Ergebnisse allein für die Diagnose verwendet werden.

Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die für die Anwendung in-vitro-diagnostischer Verfahren und des Rotor-Gene Q Systems speziell eingewiesen und geschult wurden.

Es wurden analytische Validierungsstudien unter Verwendung humaner DNA durchgeführt, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben extrahiert wurde.

Das Produkt ist ausschließlich für die Verwendung mit dem Rotor-Gene Q Echtzeit-PCR-Cycler der 5plex HRM-Serie vorgesehen.

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Handbuch genau befolgt werden. Eine Verdünnung der Reagenzien, die von den in diesem Handbuch beschriebenen

Anweisungen abweicht, ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt.

Vor der Analyse der Proben mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit müssen Menge und Qualität der DNA in der Probe bestimmt werden. Im Lieferumfang ist ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch (Ctrl) enthalten, mit dem bestimmt werden kann, ob der C_T -Wert im zulässigen Bereich für diesen Assay liegt. Extinktions-Messwerte dürfen nicht verwendet werden, da sie mit den C_T -Werten in fragmentierten DNA-Proben nicht korrelieren.

Die Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, müssen unbedingt beachtet werden. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Leistungsmerkmale

Cut-off-Werte

Unter Verwendung einer Methode, die an NCCLS EP17-A (2004) angelehnt ist, wurden 171 FFPE-Proben getestet. Zur Festlegung der Cut-off-Werte für das Kit wurden Daten von 159 Proben verwendet. Der C_T -Bereich der Kontrollreaktion wurde auf 23,00 bis 30,69 festgesetzt. Es wurden die Cut-off-Werte bestimmt (siehe Tabelle 8).

Nachweisgrenze (LOD: Limit of Detection)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurde durch das Vermischen von synthetischer mutierter DNA mit genomischer Wildtyp-DNA eine Probenreihe hergestellt, um für jede der 29 Mutationen eine Reihe von Mutationsprozensätzen zu simulieren. Die Nachweisgrenze jedes Assays ist als der Mutationsprozensatz festgelegt, bei dem 95 % der Replikate mit dem *therascreen* EGFR PCR RGQ Kit positiv getestet werden. Die Nachweisgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Bei den Multiplex-Assays, mit denen mehrere Mutationen nachgewiesen werden (G719X, Deletionen und Insertionen), wird der Wert für die Reaktion verwendet, die die höchste Nachweisgrenze liefert.

Tabelle 9. Nachweisgrenzen für die sieben EGFR-Mutationsassays

| Mutation | Prozentsatz der nachweisbaren Mutationen (%) |
|-----------------|---|
| T790M | 7,02 |
| Deletionen | 1,64 |
| L858R | 1,26 |
| L861Q | 0,50 |
| G719X | 5,43 |
| S768I | 1,37 |
| Insertionen | 2,03 |

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurde durch das Vermischen von synthetischer mutierter DNA mit genomischer Wildtyp-DNA eine Probenreihe hergestellt, um für jeden der sieben Mutationsassays einen niedrigen Mutationsprozentsatz zu simulieren. Die Präzision wurde bestimmt, indem Proben mit zwei Replikaten pro Probe unter Verwendung mehrerer Kitchargen, Bediener und Läufe an verschiedenen Tagen und an einem Standort getestet wurden. Die beobachtete Variation bezüglich der anhand der Varianzkomponentenanalyse bestimmten Standardabweichung betrug weniger als 1 ΔC_T und kann als Schätzwert der Präzision verwendet werden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10. Testergebnisse innerhalb eines Labors*

| Assay | Mutationspositive Tests (%) | Schätzwert der Standardabweichung (ΔC_T) |
|--------------|------------------------------------|--|
| T790M | 100% | 0,33 |
| Deletionen | 100% | 0,40 |
| L858R | 100% | 0,45 |
| L861Q | 100% | 0,49 |
| G719X | 97,9% | 0,59 |
| S768I | 97,9% | 0,31 |
| Insertionen | 97,9% | 0,38 |

* Es wurden für jede Mutation 93 Replikate getestet.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde bestimmt, indem Proben mit hochgradigen Mutationen vor einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA an drei verschiedenen Standorten unter Verwendung mehrerer Kitchargen, Bediener und Läufe an verschiedenen Tagen mit zwei Replikaten pro Probe getestet wurden. Es wurden für alle sieben Mutationsassays 96,1 bis 100 % der Proben mit mutierter DNA positiv auf Mutationen getestet. Die Wildtyp-Proben waren in allen Assays und an allen Standorten mutationsnegativ.

Effekt der DNA-Aufgabekonzentration

Um den Effekt sich ändernder DNA-Aufgabekonzentrationen auf die Ergebnisse zu bestimmen, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nahe an der Nachweisgrenze erhalten werden, wurde durch das Vermischen von synthetischer mutierter DNA mit genomischer Wildtyp-DNA für alle 29 Mutationen eine Probenreihe mit Proben niedriger, mittlerer und hoher DNA-Aufgabekonzentration hergestellt.

Die hohen und niedrigen DNA-Aufgabekonzentrationen wurden als Unter- und Obergrenze für den C_T -Bereich des Kontroll-Assays (23,50 bis 29,50) verwendet.

Eine Untersuchung der DNA-Aufgabekonzentrationsdaten (29 Mutationen bei Konzentrationen nahe an der Nachweisgrenze und für drei verschiedene DNA-Aufgabekonzentrationen) ergab eine mutationspositive Rate von 95,44 %.

Diese Daten machen deutlich, dass sich ändernde DNA-Aufgabekonzentrationen über den Arbeitsbereich des Assays keinen Effekt auf den ΔC_T -Wert oder das Mutationsergebnis einer Probe haben.

Störsubstanzen

Es wurde der Effekt von Komponenten, die bei der Verarbeitung von FFPE-Proben vom QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit potenziell verschleppt werden können, auf die Leistung des Kits bestimmt.

Formalin, Paraffin, Xylen, Ethanol, ATL-Puffer, Proteinase K, AL-Puffer, AW1-Waschpuffer und AW2-Waschpuffer wurden in den höchsten zu erwartenden Konzentrationen (schlimmster anzunehmender Fall) verwendet. Dabei wurde angenommen, dass jeder Wasch- oder Aufreinigungsschritt im Protokoll des Extraktionskits zu einer Konzentrationsabnahme der Komponente um 1 logarithmische Größenordnung führt.

Bei der Studie wurden anstelle deutlich höherer Mutationsgrade Proben mit der dreifachen Nachweisgrenze verwendet, um sicherzustellen, dass mögliche Interferenzen auch nachweisbar sind.

Ein Unterschied im ΔC_T -Wert von ≥ 3 Standardabweichungen (aus der Präzisionsuntersuchung) zwischen dem „Test“ und der „Kontrolle“ (d. h. ohne Störsubstanz) wurde als Grenzwert betrachtet, der eine potenzielle Störung anzeigt.

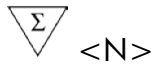
Bei keiner der potenziellen Störsubstanzen, die untersucht wurden, wurde beim Vergleich mit den Kontrollen ein ΔC_T -Unterschied ≥ 1 Standardabweichung gefunden.

Literatur

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

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

Symbole



Kit enthält Reagenzien für <N> Tests



Verwendbar bis



In-vitro-Diagnostikum



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



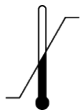
Komponenten



Enthält



Anzahl



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Gebrauchsanleitung beachten

Kontakt

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Anhang: Weitere Informationen zu Mutationen

Die COSMIC-IDs wurden dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) entnommen.

Tabelle 11. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs.

| Mutation | Exon | Basenveränderung | COSMIC-ID |
|--------------------|-------------|-------------------------|------------------|
| T790M | 20 | 2369C>T | 6240 |
| L858R | 21 | 2573T>G | 6224 |
| L861Q | 21 | 2582T>A | 6213 |
| S768I | 20 | 2303G>T | 6241 |
| G719A | 18 | 2156G>C | 6239 |
| G719S | 18 | 2155G>A | 6252 |
| G719C | 18 | 2155G>T | 6253 |
| Insertionen | 20 | 2307_2308ins9 | 12376 |
| | | 2319_2320insCAC | 12377 |
| | | 2310_2311insGGT | 12378 |
| Deletionen | 19 | 2235_2249del15 | 6223 |
| | | 2235_2252>AAT (Komplex) | 13551 |
| | | 2236_2253del18 | 12728 |
| | | 2237_2251del15 | 12678 |
| | | 2237_2254del18 | 12367 |
| | | 2237_2255>T (Komplex) | 12384 |
| | | 2236_2250del15 | 6225 |
| | | 2238_2255del18 | 6220 |
| | | 2238_2248>GC (Komplex) | 12422 |
| | | 2238_2252>GCA (Komplex) | 12419 |
| | | 2239_2247del9 | 6218 |
| | | 2239_2253del15 | 6254 |

Tabelle 11. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs (Fortsetzung)

| Mutation | Exon | Basenveränderung | COSMIC-ID |
|-------------------|-------------|------------------------------------|------------------|
| Deletionen | 19 | 2239_2256del18 | 6255 |
| | | 2239_2248TTAAGAGAAG>C (Komplex) | 12382 |
| | | 2239_2258>CA (Komplex) | 12387 |
| | | 2240_2251del12 | 6210 |
| | | 2240_2257del18 | 12370 |
| | | 2240_2254del15 | 12369 |
| | | 2239_2251>C (Komplex) | 12383 |

Bestellinformationen

| Produkt | Inhalt | Katalog-Nr. |
|--|--|-------------|
| <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24) | Für 24 Reaktionen: 1 Kontroll-Assay, 7 Mutations-Assays, Positivkontrolle, Taq-DNA-Polymerase | 870111 |
| Rotor-Gene Q und Zubehör | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung; Installation und Schulung nicht eingeschlossen | 9002033 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung, Installation und Schulung | 9002032 |
| Rotor-Gene Q 5plex HRM System | Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung; Installation und Schulung nicht eingeschlossen | 9001650 |
| Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform | Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung, Installation und Schulung | 9001580 |

| Produkt | Inhalt | Katalog-Nr. |
|--|---|-------------|
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionseinrichtung mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1 ml-Röhrchen | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 Streifen mit jeweils 4 Röhrchen und Deckeln für 1000 Reaktionen | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 Streifen mit jeweils 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen | 981106 |

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

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Mit dem Kauf dieses Produkts erwirbt der Käufer die Berechtigung zur Bereitstellung diagnostischer Dienstleistungen im Rahmen in-vitro-diagnostischer Anwendungen. Außer dieser speziellen Berechtigung wird durch den Kauf kein allgemeines Patent und keine Lizenz jeglicher Art erworben.

Marken: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Limited); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist ein CE-gekennzeichneter Diagnose-Kit gemäß der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wieder verwendet, wieder aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und fordert sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurück, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

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

© 2012–2013 QIAGEN. Alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

