

Maj 2016

Handbok för *therascreen*[®] RAS Extension Pyro[®] Kit



Version 1

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

För detektion av mutationer i exonerna 3 och 4 i den mänskliga KRAS-onkogenen och exonerna 2, 3 och 4 i den mänskliga NRAS-onkogenen

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R2

MAT

1085873SE



Innehåll

Avsedd användning	5
Sammanfattning och förklaring	5
Användningsprinciper	7
Kontroller	8
Material som medföljer	9
Kitets innehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	12
Varningar och säkerhetsåtgärder	15
Allmänna säkerhetsåtgärder	15
Förvaring och hantering av reagenser	16
Provtagning, förberedelse för analys och förvaring	17
Procedur	19
DNA-isolering	19
Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet	19
Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	22
Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor	25
Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24	27
Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet	32
Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning	35
Tolkning av resultat	40

Karakteristiska resultat.....	45
Felsökningsguide	48
Kvalitetskontroll	50
Begränsningar.....	50
Testets egenskaper.....	51
Mutationerna GGT >TGT och GGT > GTT i NRAS-kodon 13.....	53
Linjäritet	54
Precision	55
Diagnostisk utvärdering.....	58
Referenser.....	61
Symboler	62
Kontaktinformation.....	63
Bilaga A: Konfigurera <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro-analyser	64
Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trägen.....	69
Beställningsinformation.....	71

Avsedd användning

therascreen RAS Extension Pyro Kit är ett in vitro-diagnostiskt test baserat på Pyrosequencing®-teknik för kvantitativ detektering av mutationer i kodonerna 59, 61, 117 och 146 i den mänskliga KRAS-onkogenen och kodonerna 12, 13, 59, 61, 117 och 146 i den mänskliga NRAS-onkogenen med hjälp av DNA som extraherats från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) mänsklig vävnad med metastatisk kolorektal cancer (mCRC).

therascreen RAS Extension Pyro Kit är avsett som hjälp för att identifiera vilka mCRC-patienter som sannolikt är lämpade för anti-EGFR-behandlingar som cetuximab och panitumumab (1).

- *therascreen* RAS Extension Pyro Kit är endast avsett för användning på systemet PyroMark® Q24. I systemet PyroMark Q24 ingår:
- Instrumentet PyroMark Q24 eller instrumentet PyroMark Q24 MDx.
- Vakuumstationen PyroMark Q24 eller vakuumstationen PyroMark Q24 MDx.
- Programmet PyroMark Q24 (version 2.0) eller programmet PyroMark Q24 MDx (version 2.0).

therascreen RAS Extension Pyro Kit är avsett att användas av professionella användare såsom tekniker och läkare som har utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer, molekylärbiologiteknik och systemet PyroMark Q24.

Sammanfattning och förklaring

therascreen RAS Extension Pyro Kit används för kvantitativa mätningar av mutationer i exonerna 3 och 4 i den mänskliga KRAS-genen och exonerna 2, 3 och 4 i den mänskliga NRAS-genen. Produkten består av 8 analyser (se Bild 1).

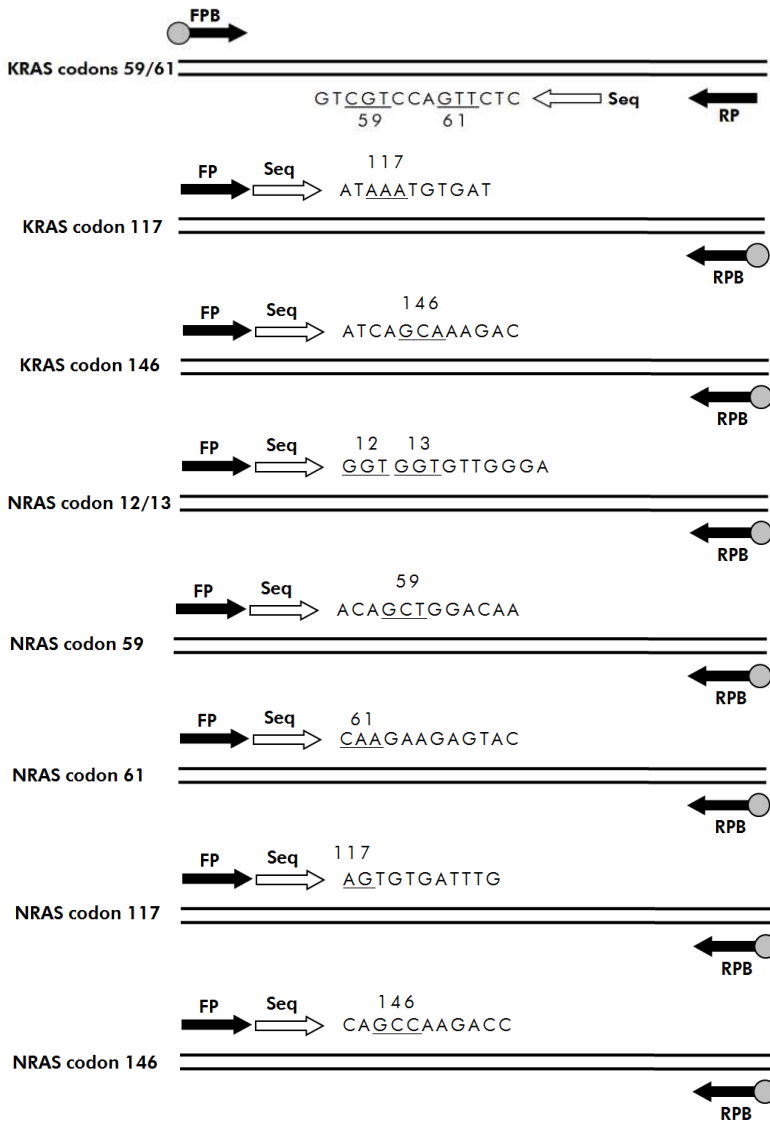


Bild 1. Analyser i *therascreen* RAS Extension Pyro Kit.

De 8 regionerna amplifieras separat med PCR och sekvenseras genom den definierade regionen. Mutationer i den täckta regionen leder till distinkta mönster i Pyrogram®-kurvan som kan urskiljas från kurvor som erhållits från vildtypsprov. Mutationer som kan analyseras med programmet PyroMark Q24 är listade i Tabell 15. Analyserna för KRAS-kodonerna 117 och 146 samt NRAS-kodonerna 12/13, 59, 61, 117 och 146 sekvenseras framåt medan analyserna för KRAS-kodon 59/61 sekvenseras bakåt. Produkten består av en PCR-primerblandning och en sekvenseringsprimer för varje analys. Primrarna levereras i lösningsform. Varje flaska innehåller 24 µl primer eller primerblandning.

Användningsprinciper

Bild 2 nedan illustrerar analysprocedurens arbetsflöde. När PCR är utfört används primrarna till att hitta det aktuella området och amplikonerna immobiliseras på Streptavidin Sepharose® High Performance-kulor. Enkelsträngat DNA bereds och de motsvarande sekvenseringsprimrarna binds till DNA. Proverna analyseras sedan på PyroMark Q24 med hjälp av analyskonfigurationsfiler och en körningsfil.

”Sequence to Analyze” (Sekvens att analysera) kan justeras för detektion av olika mutationer efter körningen (se ”Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning”, sidan 3533 och ”Bilaga A: Konfigurera *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser”, sidan 64).

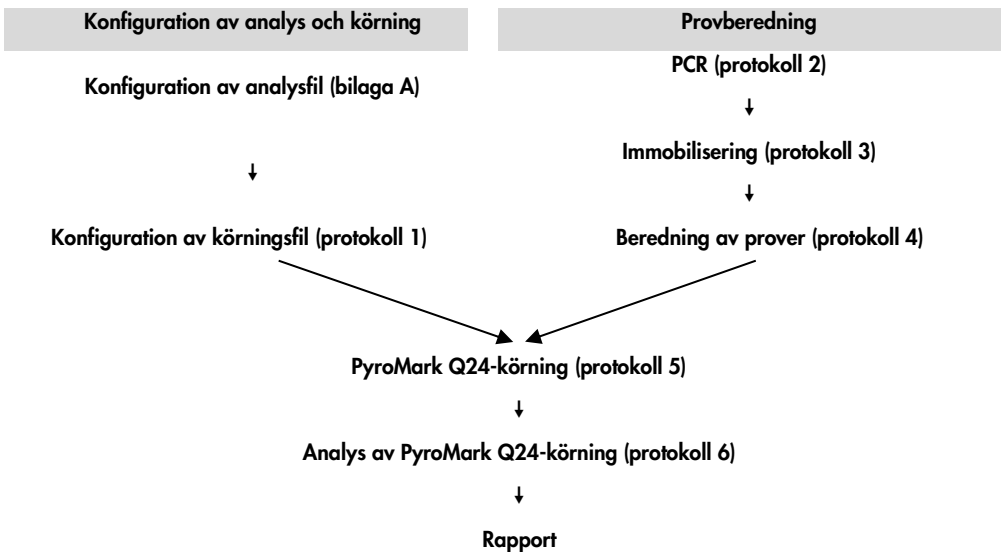


Bild 2. Arbetsflöde för *therascreen* RAS Extension Pyro Kit-proceduren.

Kontroller

Ometylerat kontroll-DNA ingår i kitet som en positiv kontroll för PCR och sekvenseringsreaktioner. Detta kontroll-DNA har en vildtyps-genotyp i de regioner som sekvenserats med detta kit. Inkludera ett prov med kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning. Detta krävs för korrekt tolkning av resultat och identifiering av lågnivåmutationer (se "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 35).

Dessutom ska en negativ kontroll (utan mall-DNA) ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Material som medföljer

Kitets innehåll

Förpackning 1/2

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Katalognr	971590
Antal beredningar	24
Seq Primer KRAS 59/61 (Sekvenseringsprimer KRAS 59/61)	24 µl
Seq Primer KRAS 117 (Sekvenseringsprimer KRAS 117)	24 µl
Seq Primer KRAS 146 (Sekvenseringsprimer KRAS 146)	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13 (Sekvenseringsprimer NRAS 12/13)	24 µl
Seq Primer NRAS 59 (Sekvenseringsprimer NRAS 59)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (Sekvenseringsprimer NRAS 61)	24 µl
Seq Primer NRAS 117 (Sekvenseringsprimer NRAS 117)	24 µl
Seq Primer NRAS 146 (Sekvenseringsprimer NRAS 146)	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61 (PCR-primer KRAS 59/61)	24 µl
PCR Primer KRAS 117 (PCR-primer KRAS 117)	24 µl
PCR Primer KRAS 146 (PCR-primer KRAS 146)	24 µl

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Katalognr	971590
Antal beredningar	24
PCR Primer NRAS 59 (PCR-primer NRAS 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (PCR-primer NRAS 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (PCR-primer NRAS 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (PCR-primer NRAS 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix (PyroMark PCR-huvudmix), 2x	24 µl
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad®-koncentrat), 10x	4 x 850 µl
H ₂ O	1.2 ml
Unmethylated Control DNA (Ometylerat kontroll-DNA), 10 ng/µl	6 x 1.9 ml
PCR Primer NRAS 59 (PCR-primer NRAS 59)	3 x 100 µl

Förpackning 2/2

Buffertar och reagenser	Volym
PyroMark Binding Buffer (PyroMark bindningsbuffert)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark hybridiseringsbuffert)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark denatureringslösning)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (PyroMark tvättbuffert), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Enzymblandning)	2 flaskor
Substrate Mixture (Substratblandning)	2 flaskor
dATP α S	2 x 1180 μ l
dCTP	2 x 1180 μ l
dGTP	2 x 1180 μ l
dTTP	2 x 1180 μ l
therascreen RAS Extension Pyro Kit Handbok (Engelska)	1 pc

* Innehåller natriumhydroxid

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Reagenser

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", sidan 19)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr 17-51113-01; www.gelifesciences.com)
- Höggradigt rent vatten (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller motsvarande)

Obs: I kitet medföljer tillräckligt med vatten för PCR, DNA-immobilisering och för att lösa upp enzymblandningen och substratblandningen; det behövs ytterligare höggradigt rent vatten för att späda PyroMark tvättbuffert, 10x.

- Etanol (70 %)*

Förbrukningsartiklar

- Sterila pipettspetsar (med filter för PCR-uppställning)
- PCR-plattor med 24 brunnar (se "Rekommenderade plattor med 24 brunnar", sidan 14)
- Självhäftande folie
- PyroMark Q24 Plate (kat.nr 979301)[†]
- PyroMark Q24 Cartridge (kat.nr 979302)[†]

* Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

[†] CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EG. Alla andra produkter som listas är inte CE-IVD-märkta baserat på EU-direktivet 98/79/EG.

Utrustning

- Pipetter (justerbara)*
- Bänkstående mikrocentrifug*
- Termocykler* och passande PCR-rör
- PyroMark Q24 MDx eller PyroMark Q24 (kat.nr 9001513 eller 9001514)*
- PyroMark Q24 MDx eller PyroMark Q24 Vacuum Workstation (kat.nr 9001515 eller 9001516 eller 9001518 eller 9001519)*
- Skakapparat* för immobilisering till kulor (se "Rekommenderade skakapparater" på sidan 14)
- Värmeblock* med kapacitet för 80 °C

* Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

Rekommenderade skakapparater

Skakapparaterna med orbital rörelse i Tabell 1 rekommenderas för användning med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit.

Tabell 1. Skakapparater som rekommenderas för användning med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Tillverkare	Produkt	Katalognr
Eppendorf	ThermoMixer® C	5382000031
Eppendorf	(basenhet)	5306000006
Thermo Fisher Scientific	SmartBlock™ PCR 96, termoblock för PCR-plattor med 96 brunnar	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10515882

Rekommenderade plattor med 24 brunnar

Plattorna med 24 brunnar i Tabell 2 rekommenderas för användning med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit.

Tabell 2. Plattor med 24 brunnar som rekommenderas för användning med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Tillverkare	Produkt	Katalognr
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24 brunnar	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, transparenta rör	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates utan ram	G030

Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning.

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Lägg alltid särskild vikt vid följande:

- Komponenterna i den här produkten räcker för att utföra 24 reaktioner i varje analys.
- Använd sterila pipettspetsar med filter (för PCR-konfiguration).
- Förvara och extrahera positivt material (prover, positiva kontroller och amplikon) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Tina alla komponenter omsorgsfullt i rumstemperatur (15–25 °C) innan analysen påbörjas.
- När komponenterna tinats ska de blandas (genom att pipettera upp och ned upprepade gånger eller genom att vortexa i pulser) och centrifugeras en kort stund.
- Misslyckade resultat får inte ligga till grund för bedömning av mutationsstatus.

Förvaring och hantering av reagenser

therascreen RAS Extension Pyro Kit levereras i 2 förpackningar. *therascreen* RAS Extension Pyro Kit (förpackning 1/2) levereras på torris. PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, ometylerat kontroll-DNA och alla primrar ska förvaras i -15 till -25 °C direkt vid ankomst.

Pyro-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2) som innehåller buffertar, enzymblandning, substratblandning, dATPaS, dCTP, dGTP och dTTP (reagenserna för analys med pyrosekvensering) levereras i kylförpackning. De här komponenterna ska förvaras i $2-8$ °C direkt vid ankomst. För att minimera försämring av aktiviteten rekommenderar vi att både enzymblandningen och substratblandningen förvaras i de medföljande flaskorna.

Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning är stabilt i minst 10 dagar i $2-8$ °C. Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning kan frysas och förvaras i flaskor i -15 till -25 °C. Frusna reagenser ska inte genomgå mer än 6 frys-/upptiningscykler.

Obs: Nukleotider ska inte frysas.

therascreen RAS Extension Pyro Kit är hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten om det förvaras under de här förhållandena.

Provtagning, förberedelse för analys och förvaring

Obs: Alla prover ska betraktas som potentiellt smittbärande material.

Provmaterialiet måste vara mänskligt, genomiskt DNA extraherat från FFPE-vävnad. Proverna måste transporteras enligt standardmässig patologisk metod för att garantera provets kvalitet.

Tumörprover är olikartade och data från ett tumörprov kanske inte stämmer överens med andra sektioner från samma tumör. Tumörprover kan även innehålla tumörfri vävnad. DNA från tumörfri vävnad förväntas inte innehålla mutationer som detekteras av *therascreen* RAS Extension Pyro-kitet.

Beredning av vävnadsprover

Obs: Använd torra skalpeller. Utför inte det här steget i en huv för laminärt flöde eller i ett dragskåp.

- Skrapa ned tumörvävnaden från snitten i märkta mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov.

Beredning av vävnadsprover för DNA-extraktion

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % neutralbuffrat formalin (NBF) och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- En utbildad person (t.ex. en patolog) ska bedöma tumörinnehåll och utbredning på ett H&E-färgat (Hematoxilin & Eosin) snitt. Markera det färgade objektglaset för att kunna skilja tumörvävnad från normal vävnad. Använd seriesnitt för DNA-extraktion.

-
- Använd snitt med > 20 % tumörinnehåll för bearbetning utan makrodissektion (se nästa punkt).
 - För snitt med < 20 % tumörinnehåll: Makrodissekera ett eller flera snitt. Kassera tumörfri vävnad.
 - För snitt med en yta < 4 mm²: Bearbeta två eller fler snitt för att öka den totala tumörytan till minst 4 mm² (gäller prover både med och utan makrodissektion). Kassera tumörfri vävnad.
 - Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnaden med en ny, steril skalpell.

Förvaring

Förvara FFPE-block och objektglas i rumstemperatur. Objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 4 veckor innan DNA-extraktion.

Genomiskt DNA kan förvaras i 2–8 °C i 1 vecka efter extraktion, och sedan i –15 till –25 °C i upp till 8 veckor innan användning.

Procedur

DNA-isolering

QIAGEN-kitet som visas nedan i Tabell 3 rekommenderas för DNA-rening för de angivna mänskliga provtyperna liksom för användning med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit. Om du ska använda detta kit följer du DNA-reningsinstruktionerna i handböckerna till respektive kit.

Tabell 3. DNA-reningskit som rekommenderas för användning med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit


Provmaterial	Kit för isolering av nukleinsyra	Katalognr
Paraffinbäddad vävnad	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404


Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet

Saker som ska göras före start

- Skapa en analyskonfiguration enligt beskrivningen i Bilaga A: Konfigurera *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser på sidan 64. Detta behöver endast göras en gång, innan du kör RAS Extension Pyro-analyserna för första gången.
- Undvik att placera prover med hög signalintensitet bredvid brunnar med "kontroll utan mall" och brunnar med förväntat låga signaler. Detta kan leda till överhörningssignaler mellan brunnarna när en signal från en brunn detekteras i en intilliggande brunn.

Procedur

1. Klicka på  i verktygsfältet.
En ny körningsfil skapas.
2. Skriv in körningsparametrarna (se "Körningsparametrar", sidan 20).

3. Förbered plattan genom att lägga till analyser för alla 8 analyser för therascreen RAS Extension Pyro Kit i brunnar som motsvarar de prover som ska analyseras.
Obs: En negativ kontroll (utan mall-DNA) måste ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.
Obs: Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA som vildtyp-kontroll för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning (se "Bild 2", sidan 8).
4. När körningen är i ordningställd och redo att köras på systemet PyroMark Q24 ska du skriva ut en lista med de volymer av enzymblandning, substratblandning och nukleotider som behövs, samt konfigurationen av plattan. Välj "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg). När rapporten visas klickar du på .
5. Stäng körningsfilen och kopiera den på ett USB-minne (medföljer systemet) via Utforskaren i Windows®.
Obs: Den utskrivna Pre Run Information-rapporten kan användas som mall för provkonfigurationen (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 25).
Obs: Information om körning av plattan på PyroMark Q24-systemet finns i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 32.

Körningsparametrar

- **"Run name" (Namn på körningen):** Namnet på körningen ges när filen sparas. Om du byter namn på filen ändras också namnet på körningen.
- **"Instrument method" (Instrumentmetod):** Välj instrumentmetod efter vilken kassett som ska användas för körningen; se instruktionerna som medföljer produkterna.
- **"Plate ID" (Platt-ID, valfritt):** Ange ID för PyroMark Q24 Plate.
- **"Bar code" (Streckkod, valfritt):** Ange ett streckodsnummer för plattan eller, om du har en streckodsläsare ansluten till din dator, placera muspekaren i textrutan "Barcode" (Streckkod) genom att klicka i rutan och läs in streckkoden.

- **“Kit and reagent ID” (Kit- och reagens-ID, valfritt):** Ange lotnumret för det thetascreen RAS Extension Pyro Kit som ska användas. Lotnumret finns på produktetiketten.
Obs: Vi rekommenderar att du anger båda lotnumren så att eventuella oväntade problem med thetascreen RAS Extension Pyro Kit kan spåras.
- **“Run note” (Anteckning om körningen, valfritt):** Gör en anteckning om innehållet i eller syftet med körningen.

Lägga till analysfiler

Om du vill lägga till en analysfil för en brunn gör du på ett av följande sätt:

- Högerklicka på brunnen och välj “Load Assay” (Ladda analys) på kontextmenyn.
- Markera analysen i snabbmenyn, klicka på den och dra den till brunnen.

En brunn färgkodas enligt den analys som laddas för brunnen.

Ange prov-ID och anteckningar

Om du ska ange ett prov-ID eller en anteckning markerar du cellen och skriver in texten.

Om du ska redigera ett prov-ID eller en anteckning markerar du antingen cellen (det aktuella innehållet markeras) eller dubbelklickar på cellen.

Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Det här protokollet är avsett för PCR-amplifiering av 8 separata regioner i exonerna 3 och 4 i den mänskliga KRAS-genen och exonerna 2, 3 och 4 i den mänskliga NRAS-genen med *therascreen* RAS Extension Pyro Kit.

Viktigt att tänka på före start

- HotStarTaq® DNA-polymeras i PyroMark PCR-huvudmix kräver aktivering i 15 minuter vid 95 °C.
- Förbered alla reaktionsblandningar i ett område avskilt från det område som används för DNA-rening, tillägg av mall till PCR, PCR-produktanalys eller beredning av prover före analys med pyrosekvensering.
- Använd engångspetsar med hydrofobiskt filter för att undvika korskontaminering.

Saker som ska göras före start

- Innan rören med PCR-primrar öppnas ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Justera koncentrationen av kontroll och prov-DNA till 0,4–2 ng/μl om det behövs.

Procedur

1. Tina alla komponenter som behövs (se Tabell 4).

Blanda väl före användning.

2. Bered en reaktionsmix för varje PCR-primer enligt Tabell 4.

Reaktionsmixen innehåller vanligtvis alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Bered en volym reaktionsmix som är större än vad som krävs för det totala antalet PCR-analyser som ska utföras.

Tabell 4. Beredning av reaktionsmix för varje PCR-primermix

Komponent	Volym/reaktion (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 eller	
PCR Primer KRAS 117 eller	
PCR Primer KRAS 146 eller	
PCR Primer NRAS 12/13 eller	
PCR Primer NRAS 59 eller	1
PCR Primer NRAS 61 eller	
PCR Primer NRAS 117 eller	
PCR Primer NRAS 146	
Vatten (H ₂ O, medföljer)	4
Total volym	20

3. Blanda reaktionsmixen väl och fördela 20 µl i varje PCR-rör.

Det är inte nödvändigt att ha PCR-rör på torris eftersom HotStarTaq DNA-polymeras är inaktivt i rumstemperatur.

4. Tillsätt 5 µl mall-DNA (2–10 ng genomiskt DNA) i varje PCR-rör (se Tabell 5) och blanda väl.

Obs: En negativ kontroll (utan mall-DNA) ska ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Obs: Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA som vildtyp-kontroll för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning (se "Kontroller", sidan 8).

Tabell 5. Beredning av PCR

Komponent	Volym/reaktion (µl)
Reaktionsmix	20
Prov-DNA	5
Total volym	25

5. Programmera termocyklern enligt tillverkarens anvisningar med hjälp av villkoren som anges i Tabell 6.

Tabell 6. Optimerat cyklingsprotokoll

	Tid	Temperatur	Kommentar
Initialt aktiveringssteg:	15 min	95°C	HotStarTaq DNA-polymeras aktiveras i det här värmesteget
3-stegscyklning:			
Denaturering	20 s	95°C	
Hybridisering	30 s	53°C	
Extension	20 s	72°C	
Antal cykler	42	–	
Slutlig extension:	5 min	72°C	

6. Placera PCR-rören i termocyklern och starta cyklingsprogrammet.
7. Fortsätt efter amplifieringen med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 25.
- PCR-proverna kan förvaras i 2–8 °C i upp till 3 dagar.

Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor

Sepharose High Performance före analys på systemet PyroMark Q24.

Saker som ska göras före start

- Låt alla reagenser och lösningar uppnå rumstemperatur (15–25 °C) innan du sätter igång.
- Slå på PyroMark Q24 minst 30 minuter innan du startar en körning. Strömbrytaren sitter på instrumentets baksida.
- Placera en PyroMark Q24-platthållare på ett föruppvärmt värmeblock med temperaturen 80 °C. Ha en andra PyroMark Q24-platthållare i rumstemperatur (15–25 °C).
- PyroMark tvättbuffert levereras som ett koncentrat, 10x. Innan det används första gången ska det spädas till en 1x-arbetslösning genom tillsats av 225 ml högggradigt rent vatten i 25 ml PyroMark tvättbuffert, 10x (slutlig volym 250 ml).

Obs: 1x PyroMark tvättbuffert-arbetslösning är stabil i 2–8 °C till angivet utgångsdatum.

- Förbered vakuumbstationen PyroMark Q24 för provberedning enligt anvisningarna i användarmanualen till *PyroMark Q24*.

Procedur

1. Skaka försiktigt flaskan som innehåller Streptavidin Sepharose High Performance tills lösningen är homogen.
2. Bered en huvudmix för DNA-immobilisering enligt Tabell 7.
Bered en volym som är större än den volym som krävs för det totala antalet reaktioner som ska utföras (antalet reaktioner + en extra).

Tabell 7. Huvudmix för DNA-immobilisering

Komponent	Volym/reaktion (µl)
PyroMark Binding Buffer	40
Vatten (H ₂ O, medföljer)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Total volym	70

3. Tillsätt 70 µl huvudmix i brunnarna i en PCR-platta med 24 brunnar enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 19).
Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Se till att huvudmixen är homogen genom att pipettera upp och ned upprepade gånger eller genom att vortexa i pulser. Centrifugera inte huvudmixen.
4. Tillsätt 10 µl biotinylerad PCR-produkt från protokoll 2 i varje brunn med huvudmix enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer theascreen RAS Extension Pyro Kit", sidan 22).
Den totala volymen per brunn ska vara 80 µl efter tillsats av huvudmix och PCR-produkt.
5. Förslut PCR-plattan med hjälp av självhäftande folie.
Se till att det inte kan förekomma läckage mellan brunnarna.
6. Skaka PCR-plattan i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter vid 1 400 rpm.
Fortsätt omedelbart med "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 27 under det här steget.

Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24

Det här protokollet är avsett för beredning av enkelsträngat DNA och bindning av sekvenseringsprimern till mallen före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24.

Viktigt att tänka på före start

- Innan rören med sekvenseringsprimrar öppnas ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Tillsätt de olika sekvenseringsprimrarna enligt den förinställning för plattan som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 19), beroende på analysregion.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i *användarmanualen till PyroMark Q24* och byt ut filterproberna när detta indikeras.

Procedur

1. Späd en tillräcklig mängd av varje sekvenseringsprimer i PyroMark-hybridiseringsbuffert enligt Tabell 8.

Bered en volym utspädd sekvenseringsprimer som är större än den volym som krävs för det totala antalet prover som ska sekvensbestämmas (antalet prover plus en extra).

Späd inte och förvara inte mer sekvenseringsprimer än vad som behövs.

Tabell 8. Exempel på spädning av sekvenseringsprimrarna

Komponent	Volym/prov (µl)	Volym för 9 + 1 reaktioner (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 eller Seq Primer KRAS 117 eller Seq Primer KRAS 146 eller Seq Primer NRAS 12/13 eller Seq Primer NRAS 59 eller Seq Primer NRAS 61 eller Seq Primer NRAS 117 eller Seq Primer NRAS 146	0.8	8
Total volym	25	250

2. Tillsätt 25 µl utspädd sekvenseringsprimer i varje brunn i PyroMark Q24-plattan enligt körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 19).

Behåll en av PyroMark Q24-platthållarna (medföljer vakuumbestationen PyroMark Q24) i rumstemperatur (15–25 °C), och använd den som hjälp när plattan bereds och flyttas.

3. Slå på vakuumpumpen till vakuumbestationen PyroMark Q24.
4. Placera PCR-plattan från protokoll 3 och PyroMark Q24-plattan på vakuumbestationen (Bild 3).

Inspektera PCR-plattan och säkerställ att Sepharose-kulorna ligger i lösning. Se till att PCR-plattan är i samma läge som när proverna laddades.



Bild 3. Placering av PCR-platta och PyroMark Q24-platta på vakuumstationen.

5. Applicera vakuum i verktyget genom att aktivera vakuumbrytaren.
6. Sänk långsamt ned vakuumverktygets filterprober i PCR-plattan för att fånga in kulorna som innehåller immobiliserad mall. Håll proberna på plats i 15 sekunder. Lyft försiktigt vakuumverktyget.

Obs: Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Infångning av kulorna måste ske omedelbart efter skakning. Om mer än 1 minut har gått sedan plattan skakades ska du skaka plattan på nytt i 1 minut innan kulorna fångas in.

Inspektera PCR-plattan för att se till att alla proverna tas upp fullständigt av vakuumverktyget.

7. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml 70-procentig etanol (**tråg 1, Bild 3**). Spola filterproberna i 5 sekunder.
8. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml denatureringslösning (**tråg 2, Bild 3**). Spola filterproberna i 5 sekunder.

9. Flytta vakuumverkytet till tråget som innehåller 50 ml tvättbuffert (**tråg 3, Bild 3**). Spola filterproberna i 10 sekunder.
10. Lyft upp vakuumverkytet och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (Bild 4).



Bild 4. Bilden visar vakuumverkytet i mer än 90° lodrät lutning.

11. Stäng av vakuumet medan vakuumverkytet hålls ovanför PyroMark Q24-plattan.
12. Frigör kulorna i PyroMark Q24-plattan genom att sänka ned filterproberna i den utspädda sekvenseringsprimern och flytta vakuumverkytet försiktigt fram och tillbaka.
Obs: Var försiktig så att du inte skadar ytan på PyroMark Q24-plattan genom att skrapa den med filterproberna.
13. Flytta vakuumverkytet till tråget med höggradigt rent vatten (**tråg 4, Bild 3**) och skaka vakuumverkytet i 10 sekunder.
14. Tvätta filterproberna genom att sänka ned proberna i höggradigt rent vatten (**tråg 5, Bild 3**) och applicera vakuum. Spola proberna med 70 ml höggradigt rent vatten.
15. Lyft upp vakuumverkytet och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (Bild 4).
16. Stäng vakuumverkytet och placera vakuumverkytet i parkeringspositionen (P).

17. Stäng vakuumpumpen.

Obs: I slutet av arbetsdagen ska vätskeavfall och återstående lösning kasseras och vakuumstationen PyroMark Q24 ska inspekteras avseende damm och spill. Se "Bilaga B: Tömning avfallsbehållaren och trågen", sidan 69.

18. Värm PyroMark Q24-plattan med prover i 80 °C i 2 minuter med hjälp av en föruppvärmd PyroMark Q24-platthållare.

19. Ta bort PyroMark Q24-plattan från platthållaren och placera den på en andra PyroMark Q24-platthållare som förvarats i rumstemperatur (15–25 °C) för att låta proverna svalna till rumstemperatur i 10–15 minuter.

Fortsätt direkt med "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 32.

Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet

Det här protokollet beskriver hur du bereder och laddar PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-kassetten samt hur du startar och slutför en körning på PyroMark Q24. Mer information om hur du utför en körning finns i *användarmanualen till PyroMark Q24*.

Viktigt att tänka på före start

- I rapporten "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 19) finns information om mängden nukleotider, enzym och substratbuffert som behövs för en specifik körning.
- Ladda kassetten med engångsspetsar (utan hydrofobiskt filter) för att säkerställa att kassetten fungerar korrekt.

Procedur

1. Lös upp frystorkat enzym och substratblandningar i vardera 620 µl vatten (H₂O, medföljer).
2. Blanda genom att skaka flaskan försiktigt.

Obs: Vortexa inte!

Låt blandningen stå i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter för att försäkra dig om att den är helt upplöst. Kontrollera att lösningen inte är grumlig innan du fyller PyroMark Q24-kassetten. Om reagenserna inte ska användas omedelbart ska reagensflaskorna placeras på is eller i ett kylskåp.

3. Låt reagenserna och PyroMark Q24-kassetten uppnå rumstemperatur (20–25 °C).
4. Placera PyroMark Q24-kassetten så att etiketten är vänd mot dig.
5. Ladda PyroMark Q24-kassetten med korrekta volymer av nukleotider, enzym och substratblandningar enligt Bild 5 på sidan 33.

Se till att inga luftbubblor överförs från pipetten till kassetten.

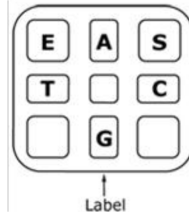


Bild 5. PyroMark Q24-kassetten sedd ovanifrån. Märkningarna motsvarar etiketterna på reagensflaskorna. Tillsätt enzymblandning (E), substratblandning (S) och nukleotider (A, T, C, G) enligt den mängd som anges i rapporten Pre Run (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) vid körningskonfigurationen.

- Öppna kassettdörren och sätt in den fyllda reagenskassetten med etiketten utåt. Tryck in kassetten helt och tryck den sedan nedåt.
- Kontrollera att randen är synlig framför kassetten och stäng dörren.
- Öppna ramen som håller plattan och placera plattan på värmeblocket.
- Stäng ramen och instrumentluckan.
- Sätt in USB-minnet (med körningsfilen) i USB-porten på instrumentets framsida. Ta inte bort USB-minnet förrän körningen är avslutad.
- Välj "Run" (Kör) i huvudmenyn (med skärmmknapparna ▲ och ▼) och tryck på "OK".
- Välj körningsfilen med skärmmknapparna ▲ och ▼.
 - Om du vill se innehållet i en mapp markerar du mappen och trycker på "Select" (Välj).
 - Om du vill gå tillbaka till föregående fönster trycker du på "Back" (Bakåt).
- När körningsfilen är vald trycker du på "Select" (Välj) för att starta körningen.
- När körningen är avslutad och instrumentet bekräftar att körningsfilen har sparats på USB-minnet trycker du på "Close" (Stäng).
- Ta ut USB-minnet.

-
16. Öppna instrumentluckan.
 17. Öppna kassettdörren och ta bort reagenskassetten genom att lyfta upp och dra ut den.
 18. Stäng kassettdörren.
 19. Öppna ramen som håller plattan och ta bort plattan från värmeblocket.
 20. Stäng ramen och instrumentluckan.
 21. Kassera plattan och rengör kassetten enligt instruktionerna i produktdatabladet som medföljde kassetten.
 22. Analysera körningen enligt "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 35.

Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning

Det här protokollet beskriver mutationsanalysen för en slutförd *therascreen* RAS Extension Pyro-körning med programmet PyroMark Q24.

Procedur

1. Sätt in USB-minnet (med den bearbetade körningsfilen) i datorns USB-port.
2. Flytta körningsfilen från USB-minnet till önskad plats på datorn med hjälp av Utforskaren i Windows.
3. Öppna körningsfilen i AQ-läget i programmet PyroMark Q24 genom att antingen välja "Open" (Öppna) i menyn "File" (Arkiv) eller genom att dubbelklicka på filen (✓) i snabbmenyn.
4. Om du vill använda RAS Extension Plug-In Report för att generera en plugin-rapport väljer du "AQ Add On Reports/RAS Extension" (AQ-tilläggsrapporter/RAS Extension) i menyn "Reports" (Rapporter) (se Bild 6).

Obs: Mutationer i KRAS-kodon 61 måste dessutom analyseras med den separata KRAS-plugin-rapporten genom att välja "AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61" (AQ-tilläggsrapporter/KRAS/kodon 61) i menyn "Reports" (Rapporter).

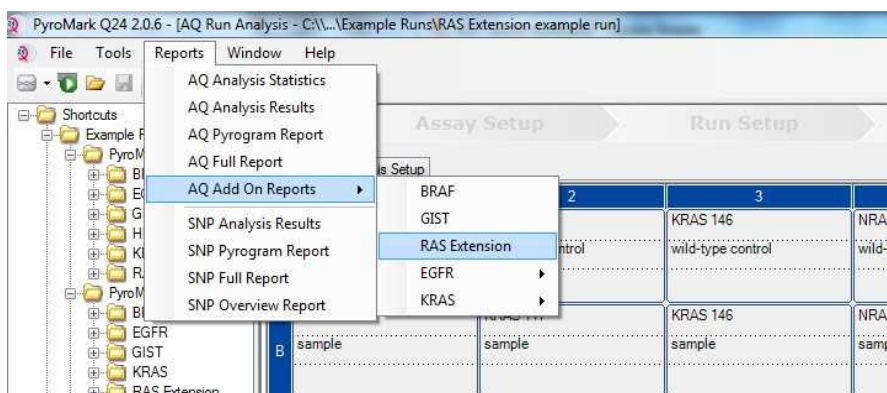


Bild 6. Menyn för plugin-rapporten RAS Extension.

Brunnarna analyseras automatiskt med avseende på alla mutationer för vilka LOD anges i Tabell 9, sidan 43. Resultaten visas i en översiktstabell (se Bild 7) som följs av detaljerad resultatinformation, t.ex. pyrogram och analyskvalitet.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Bild 7. RAS Extension Plug-In Report

5. Använda AQ-analys:

Klicka på en av analysknapparna för att analysera körningen och få en översikt av resultaten.



Analysera alla brunnar.

Analysera den markerade brunnen.

Analysresultaten (allelfrekvenser) och kvalitetsbedömning visas ovanför variabelns position i pyrogramkurvan. Mer information om hur en körning analyseras finns i *användarmanualen till PyroMark Q24*.

Generera en rapport genom att välja "AQ Full Report" (AQ fullständig rapport) eller "AQ Analysis Results" (AQ-analysresultat) på menyn "Reports" (Rapporter).

Obs: För så pålitliga resultat som möjligt rekommenderar vi enskilda höjdtoppar på över 30 RLU. Ange 30 RLU som "required peak height for passed quality" (tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet) i analyskonfigurationen och säkerställ att "A-peak reduction factor" (reduktionsfaktor för A-topp) är inställt på 0,86 för analys av NRAS-kodon 61 (se "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* RAS Extension Pyro-analys", sidan 64 och *användarmanualen till PyroMark Q24*).

Rapporten "AQ Analysis Results" (AQ-analysresultat) bör användas för dokumentation och tolkning av allelkvantifiering. De siffror som visas i pyrogrammet är avrundade och anger inte den exakta kvantifieringen.

Obs: Pyrogrammet ska alltid jämföras med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. De uppmätta topparna ska matcha höjden på histogramstaplarna. Se även sidan 40 "Tolkning av resultat".

Omanalys av prover där ingen mutation har detekterats med standarden "Sequence to analyze" (Sekvens att analysera) eller med kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad).

Standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) är inriktad på den mest frekventa punktmutationen i analyserna *therascreen* RAS Extension Pyro.

Vi rekommenderar manuell omanalys av alla prover där ingen mutation har detekterats med standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) samt av prover som kvalitetsbedömts som "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad). Kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) och "Failed" (Misslyckad) kan indikera en mutation som inte hittas av standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) vilket resulterar i oväntade referenstoppar.

Om du vill omanalysera och fokusera på andra mutationer går du till "Analysis Setup" (Analyskonfiguration) och ändrar "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) till varianter som beskrivs i Tabell 16 och Tabell 17 i bilaga A eller varianter för andra sällsynta eller oväntade mutationer. Klicka på "Apply" (Tillämpa) och "To All" (För alla) när fönstret "Apply Analysis Setup" (Tillämpa analyskonfiguration) visas.

Uppdaterade frekvenser av mutationer i de mänskliga KRAS- och NRAS-generna finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Obs: När du har ändrat "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ska du se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU och säkerställa att "A-peak reduction factor" (reduktionsfaktor för A-topp) är inställt på 0,86 för analys av NRAS-kodon 61 (se " Bilaga A: Konfigurera *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser", sidan 64).

Obs: Ytterligare sällsynta eller oväntade mutationer kan finnas i den region som sekvenserats och kan analyseras med alternativet "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) där hänsyn ska tas till oväntade mutationer.

Obs: Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta eller oväntade mutationer är inte resultatet en grund för bedömning av mutationsstatus. Vi rekommenderar att provet körs på nytt.

Tolkning av resultat

Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivåmutationer

Inkludera ett prov med kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning. Detta krävs för korrekt tolkning av resultat och identifiering av lågnivåmutationer och som kontroll för bakgrunds nivåer. Den uppmätta frekvensen för kontrollprovet ska vara mindre än eller lika stor som LOB (limit of blank). Värdena för LOB (limit of blank) och LOD (limit of detection) som presenteras i handboken kan användas vid bestämning av förekomst av en mutation. De här värdena erhöles med hjälp av plasmidblandningar som bar på vildtypssekvensen eller den relevanta muterade sekvensen.

Efter analys med programmet PyroMark Q24 eller plugin-rapporterna kan 3 resultat erhållas. För LOD-data, se Tabell 9.

- Mutationsfrekvens < LOD: Mutation inte detekterad
- Mutationsfrekvens > LOD + 3 procentenheter: Mutation
- Mutationsfrekvens \geq LOD och \leq LOD + 3 procentenheter: Potentiell lågnivåmutation

Obs: Om RAS Extension Plug-In Report används (se steg 5 i "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 35) och detta inträffar genereras ett varningsmeddelande.

Intervall från LOD till LOD + 3 % enheter möjliggör känslig detektion av lågnivåmutationer vid optimala förhållanden. En uppmätt frekvens som ligger över LOB i det ometylerade kontrollprovet indikerar en högre bakgrunds nivå än vanligt i respektive körning, vilket kan påverka allelkvantifiering, särskilt för låga mutationsnivåer. Därför måste resultat med varningen "Potential low level mutation" (Potentiell lågnivåmutation) utvärderas noggrant. Prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation ska endast anses vara positiva för mutationen om det bekräftas genom att de körs om i duplikat tillsammans med ometylerat

kontroll-DNA. Resultatet av båda duplikaten ska rapportera samma mutation med värden \geq LOD, och kontrollprovet ska rapporteras som "No mutation detected" (Ingen mutation detekterad). Annars ska provet bedömas som "No mutation detected" (Ingen mutation detekterad).

Ökad bakgrunds nivå för en mutation kan detekteras genom att jämföra de LOB-värden som listas i handboken med de mätningar som erhöles med ometylerat kontroll-DNA. Prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation kan bedömas som "Mutation not detected" (Mutation inte detekterad) utan repetition om den uppmätta frekvensen för ometylerat kontroll-DNA är högre än det LOB-värde som listas i handboken för den relevanta mutationen. Därför är 3 olika scenarier möjliga med rapporterade potentiella lågnivåmutationer.

1. Mätfrekvens med ometylerat kontroll-DNA $>$ LOB för den här mutationen: Provet kan bedömas som "Mutation not detected" (Mutation inte detekterad) utan repetition.
2. Resultatet reproduceras inte i duplikat med samma resultat: Bedöm provet som "Mutation not detected" (Mutation inte detekterad).
3. Reproducerat i duplikat med samma resultat och vildtypsprov $<$ LOB för den relevanta mutationen: Mutation detekterad.

Obs: Pyrogrammet ska alltid jämföras med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. De uppmätta topparna ska matcha höjden på histogramstaplarna. Pyrogrammen ska granskas för att se om de innehåller oväntade toppar. Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta eller oväntade mutationer rekommenderar vi att provet körs på nytt. Ett misslyckat resultat får inte ligga till grund för bedömning av mutationsstatus. För en giltig mutation är en ändring av topphöjden alltid relaterad till en motsvarande ändring av höjden på en annan topp. En ändring av höjden på en enskild topp ska inte bedömas som en indikering på en mutation.

Obs: Vi rekommenderar att RAS Extension Plug-in Report används för tolkning av resultat. För en närmare undersökning av prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation rekommenderar vi att även analysera provet manuellt i tillämpningsprogrammet (t.ex. för jämförelse med mutationsfrekvensen i kontrollprovet).

Obs: Ett beslut om behandling för cancerpatienter får inte enbart baseras på KRAS- och NRAS-mutationsstatus.

Tabell 9. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procent- enheter)	LOD (procentenheter)	COSMIC ID* (V70)
KRAS-kodon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS-kodon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS-kodon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS-kodon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS-kodon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS-kodon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procent- enheter)	LOD (procentenheter)	COSMIC ID* (V70)
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS-kodon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS-kodon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS-kodon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS-kodon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Den lägsta mutationsnivån i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \geq LOD.

Karakteristiska resultat

Karakteristiska pyrogramresultat visas i Bild 8–Bild 15.

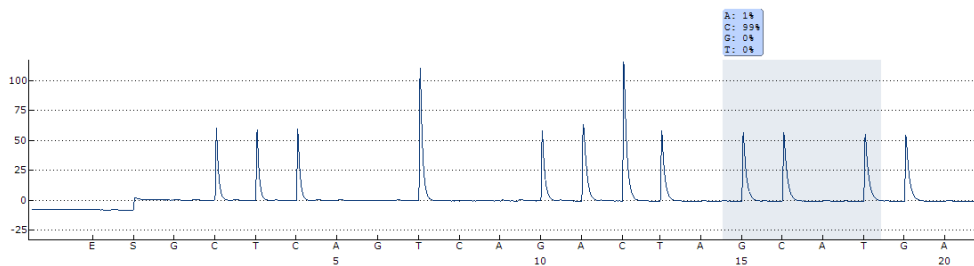


Bild 8. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen KRAS 59/61.

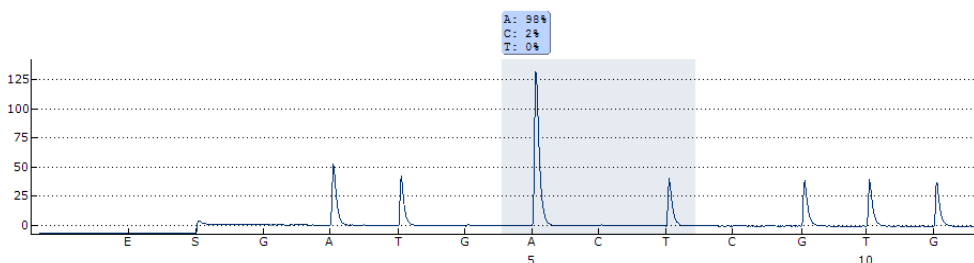


Bild 9. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen KRAS 117.

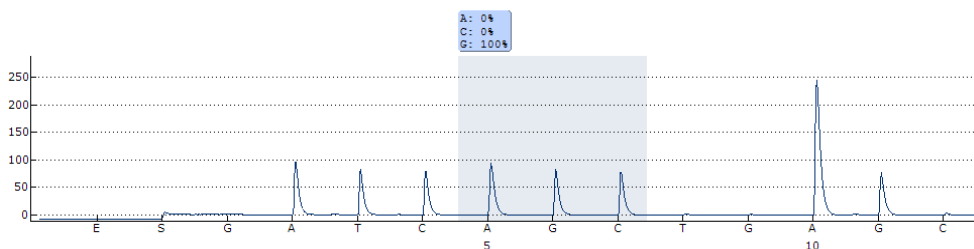


Bild 10. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen KRAS 146.

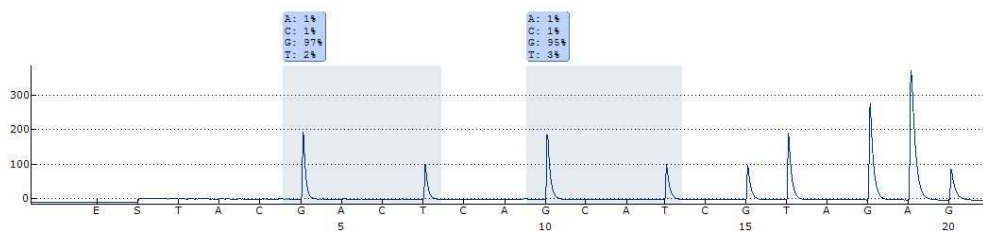


Bild 11. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen NRAS 12/13.

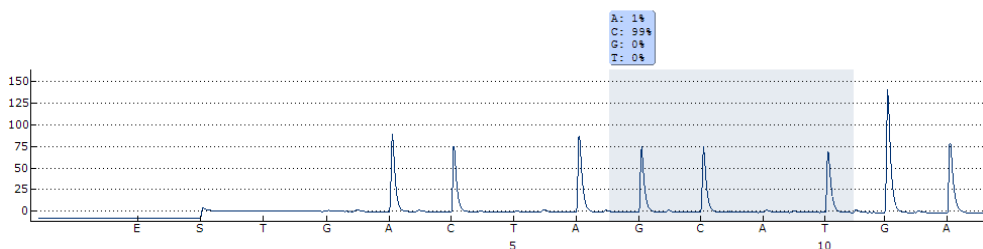


Bild 12. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen NRAS 59.

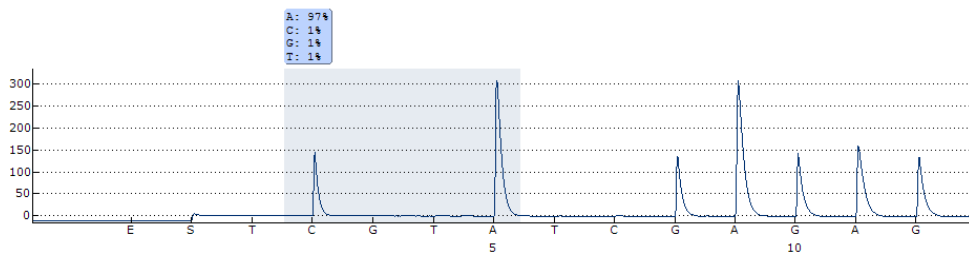


Bild 13. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen NRAS 61.

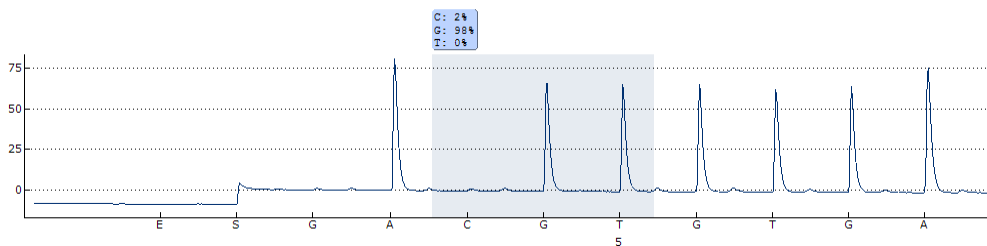


Bild 14. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen NRAS 117.

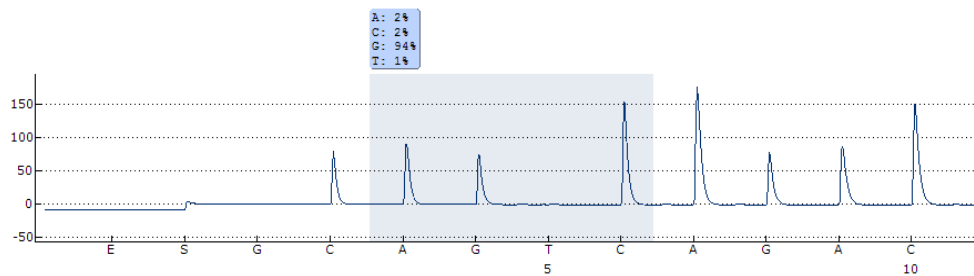


Bild 15. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp med analysen NRAS 146.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vetenskapsmännen på QIAGENS tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag på åtgärd

Resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad)

- a) Låg topphöjd
- Hanteringsfel vid PCR-konfigurationen eller provberedningen innan pyrosekvensering kan resultera i låga toppar.
- Det är viktigt att proverna tas upp helt av vakuümverkytet. Se till att vakuümverkytet sänks ned långsamt i proverna och att konfigurationen av den PCR-platta eller de remsor som används för immobilisering tillåter fullständig upptagning av proverna.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till *PyroMark Q24* och byt ut filterproberna när detta indikeras.
- Om varningsmeddelandet "Check" (Kontrollera) visas ska du jämföra pyrogrammet noggrant med histogrammet, vilket visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna är resultatet giltigt. Annars rekommenderar vi att provet körs på nytt.
- b) Mutationen är inte definierad i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
- Justera sekvensen som ska analyseras i analyskonfigurationen (se "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser", sidan 64) och analysera körningen på nytt. Mutationer som inte täcks med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) kan identifieras med mönstersimuleringsverkytet.
- c) Övåntad och sällsynt mutation
- En kvalitetsbedömning med resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad) kan orsakas av ett övåntat mönster av toppar. Detta kan indikera en övåntad mutation som inte analyseras av "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera). Dessa prover ska analyseras med alternativet "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) där hänsyn ska tas till övåntade mutationer. Mutationer som inte täcks med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) kan identifieras med mönstersimuleringsverkytet.

Kommentarer och förslag på åtgärd

- | | |
|--|--|
| d) Varning om topphöjdsavvikelse för en dispensering | Pyrogrammet ska alltid jämföras med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta mutationer, rekommenderar vi att provet körs på nytt. |
|--|--|

Högt bakgrundsvärde

- | | |
|--|--|
| a) Felaktig förvaring av nukleotider | Förvara nukleotider i 2–8 °C. Förvaring i –15 till –25 °C kan orsaka en ökning i bakgrunden. |
| b) Kort tid för nedkylning av prover innan analys med pyrosekvensering | Förvara proverna på en PyroMark Q24-platthållare i rumstemperatur i 10–15 minuter. Förkorta inte tiden för nedkylning. |
| c) Kontaminering av kassetten | Rengör kassetten noggrant enligt instruktionerna i produktdatabladet. Förvara kassetten skyddad mot ljus och damm. |

Inga signaler i positiv kontroll (ometylerat kontroll-DNA)

- | | |
|--|--|
| a) Otillräcklig mängd enzym eller substratblandning för alla brunnar | Se till att fylla PyroMark Q24-kassetten enligt "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg). |
| b) Reagenser felaktigt förvarade eller spädda | Bered reagenserna enligt instruktionerna i "Förvaring och hantering av reagenser" på sidan 16 och "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet" på sidan 32. |
| c) PCR- eller provberedningsfel | Rengör kassetten noggrant enligt instruktionerna i produktdatabladet. Förvara kassetten skyddad mot ljus och damm. |

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringsystem.

Begränsningar

Testet är utformat för att detektera 37 mutationer i KRAS- eller NRAS-generna. Prover med resultat som rapporteras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad] kan innehålla KRAS- eller NRAS-mutationer som inte detekteras av analysen.

Detektion av mutationer beror på provets integritet och på mängden amplifierbart DNA som finns i provet.

therascreen RAS Extension Pyro Kit används med en procedur där en polymeraskedjereaktion (PCR) ingår. Precis som vid alla PCR-procedurer kan prover kontamineras av externa DNA-källor i testmiljön och av DNA i den positiva kontrollen. Iaktta försiktighet för att förhindra att prover och reaktionsmixreagenser kontamineras.

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med resultat från andra kliniska studier och laboratoriestudier.

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENs egenskapsstudier.

Testets egenskaper

LOB och LOD

LOB (limit of blank) och LOD (limit of detection) har fastställts för ett antal mutationer med hjälp av blandningar av plasmider (Tabell 10). LOB och LOD fastställdes enligt rekommendationerna i *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline"* (NRAS-kodonerna 12, 13, 61 och KRAS-kodon 61) och *EP17-A2 "Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition"* (alla övriga kodoner). α - och β -fel (falskt positiva respektive falskt negativa resultat) ställdes in på 5%. LOB-värden representerar den frekvens som mätts upp med ett vildtypsprov. LOD-värden representerar den lägsta signal (uppmätt frekvens) som kan ses som positiv för den respektive mutationen.

Tabell 10. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procent- enheter)	LOD (procentenheter)	COSMIC ID* (V70)
KRAS-kodon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS-kodon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS-kodon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS-kodon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS-kodon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS-kodon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procentenheter)	LOD (procentenheter)	COSMIC ID* (V70)
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS-kodon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS-kodon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS-kodon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS-kodon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Den lägsta mutationsnivån i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \geq LOD.

Mutationerna GGT >TGT och GGT > GTT i NRAS-kodon 13

För de här mutationerna var blankmätningarna till största delen 0 procentenheter, vilket resulterade i en icke-gaussisk fördelning. LOD fastställdes därför med en annan metod, enligt rekommendationerna i CLSI Guideline EP17-A. Den lägsta signalen som indikerar närvaro av en mutation (LOD) i de här positionerna ställdes in på 2 procentenheter över respektive baslinjenivå enligt 95:e percentilen i blankmätningar. Vid analys av ett prov med

mutationsnivån som visas inom parentes i tabell 9 gav 95 % av resultaten (n = 72) en signal som kan anses vara positiv (\geq LOD). För LOB/LOD, se Tabell 10.

Obs: PCR- och pyrosekvenseringsprimers för NRAS-kodonerna 12, 13 och 61 tas utan ändringar från *therascreen* NRAS Pyro Kit (kat.nr 971530). Effektdata för dessa NRAS-kodoner förblir oförändrade.

Linjäritet

Linjäritet fastställdes med hjälp av blandningar av plasmider som bar på vildtyps- eller mutantsekvensen för mutationerna 176C>G i KRAS-kodon 59, 351A>T i KRAS-kodon 117, 436G>C i KRAS-kodon 146, 34G>A i NRAS-kodon 12, 37G>A i NRAS-kodon 13, 175G>A i NRAS-kodon 59, 182A>G i NRAS-kodon 61, 351G>C i NRAS-kodon 117 och 437C>T i NRAS-kodon 146. Plasmiderna blandades i proportioner som gav 4 mutationsnivåer (5, 10, 30 och 50 %). Varje blandning analyserades med 3 olika loter av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit i 3 pyrosekvenseringskörningar med vardera 3 replikat.

Resultaten (n = 9 för varje mutationsnivå) analyserades enligt riktlinjen CLSI EP6A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" med programmet Analyse-it® v 2.21. Resultaten visas i Bild 16.

Resultaten var linjära inom en tillåten icke-linjäritet på 5 procentenheter i det testade intervallet från 5 till 50 % mutationsnivå. Liknande resultat erhöles för alla täckta mutationer i KRAS-kodonerna 59, 117, 146 och NRAS-kodonerna 12, 13, 59, 61, 117 och 146.

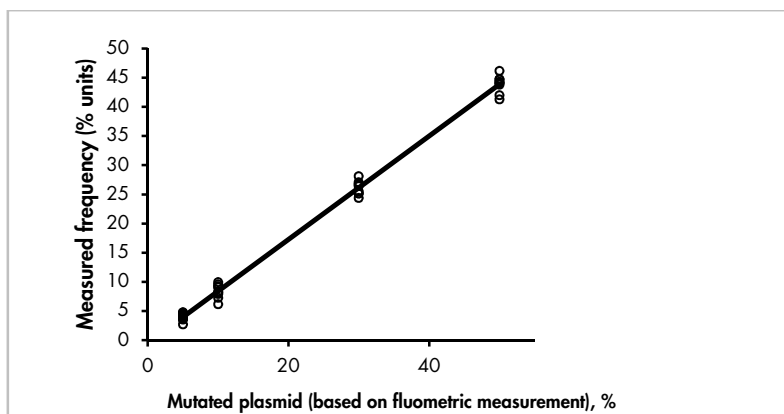


Bild 16. Linjäritet för mutationen 176C>G i KRAS-kodon 59.

Liknande resultat erhöles för alla täckta mutationer i KRAS-kodonerna 59, 117, 146 och NRAS-kodonerna 12, 13, 59, 61, 117 och 146.

Precision

Precisionsdata möjliggör bestämning av den totala variabiliteten för analyserna och erhöles på 3 olika nivåer genom analys av de ovan nämnda plasmidblandningarna med vardera 3 replikat.

Reperterbarhet (variationer inom analyser och mellan batchar) beräknades baserat på data för bestämning av linjäritet (3 körningar på samma dag med olika loter av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit). Variationer inom laboratoriet bestämdes i 3 körningar i ett laboratorium på 3 olika dagar. Körningarna utfördes av olika operatörer med PyroMark Q24-instrument liksom med flera *therascreen* RAS Extension Pyro Kit. Reproducerbarhet (variationer mellan laboratorier) beräknades av 2 körningar vardera i två oberoende laboratorier med hjälp av olika loter av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit.

Uppskattningar av precision uttrycks som standardavvikelse av de uppmätta mutationsfrekvenserna i procentenheter (Tabell 11).

Tabell 11. Precision för mutationer*

% muterad plasmid†	Repeterbarhet		Variationer inom laboratoriet		Reproducerbarhet	
	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD
176C>G i KRAS-kodon 59						
5	4.0	0.7	3.8	0.6	4.2	1.1
10	8.4	1.2	8.5	1.0	8.4	1.4
30	26.1	1.2	26.3	1.1	26.8	1.2
50	43.9	1.5	44.0	0.7	43.7	1.3
351A>T i KRAS-kodon 117						
5	5.5	1.6	5.5	2.2	7.1	2.0
10	11.0	1.7	10.8	1.4	12.5	2.9
30	30.6	1.7	30.6	2.0	31.9	2.7
50	52.8	2.0	53.5	1.3	54.5	1.6
436G>C i KRAS-kodon 146						
5	4.2	0.6	4.1	0.5	3.7	1.2
10	9.6	0.9	9.1	0.9	8.6	1.3
30	29.0	0.9	28.8	1.0	28.1	1.1
50	47.5	1.5	46.8	0.7	45.6	1.9
34G>A i NRAS-kodon 12†						
5	7.5	1.2	7.3	1.0	6.7	1.3
10	14.6	1.3	13.5	1.1	13.7	1.3
30	37.8	1.9	37.9	1.5	36.1	2.9
50	59.8	1.7	60.4	2.0	57.5	3.1
175G>A i NRAS-kodon 59						
5	7.8	0.9	7.3	0.5	7.1	1.3
10	11.9	1.0	11.6	2.0	12.5	1.7
30	29.5	1.1	29.6	1.2	29.9	1.9
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4
182A>G i NRAS-kodon 61						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0

% muterad plasmid [†]	Repeterbarhet		Variationer inom laboratoriet		Reproducerbarhet	
	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
351G>C i NRAS-kodon 117						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
437C>T i NRAS-kodon 146						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

* Alla värden ges som procentenheter. SD: standardavvikelse (n = 9 för repeterbarhet och variationer inom laboratoriet, n = 12 för reproducerbarhet).

† Baserat på fluorometrisk mätning, för 34G>A i NRAS-kodon 12 baserat på OD₂₆₀.

Diagnostisk utvärdering

therascreen RAS Extension Pyro Kit utvärderades i jämförelse med Sanger-sekvensering i 2 olika studier.

En första studie hade tidigare utförts för att utvärdera *therascreen* NRAS Pyro Kit i jämförelse med Sanger-sekvensering. DNA extraherades från 100 formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) tumörprover från benmärg och analyserades med avseende på mutationer i kodonerna 12/13 och kodon 61.

Eftersom analyser som täcker NRAS-kodonerna 12/13 och 61 i *therascreen* NRAS Pyro Kit ingår i *therascreen* RAS Extension Pyro Kit utan ändringar, visas resultat från utvärderingen av *therascreen* NRAS Pyro Kit.

I den andra studien extraherades DNA från 110 formalinfixerade paraffinbäddade (FFPE) mCRC-tumörprover och analyserades med avseende på mutationer i kodonerna 59, 61, 117 och 146 i den mänskliga KRAS-genen och kodonerna 59, 117 och 146 i den mänskliga NRAS-genen. Lågfrekvensmutationer analyserades med plasmid-DNA spikat med vildtyp-FFPE-DNA.

I båda studierna isolerades DNA med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit och analyserades därefter med analyser som ingick i *therascreen* RAS Extension Pyro Kit på PyroMark Q24. Sanger-sekvensering utfördes med Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer.

Utvärdering av NRAS-kodon 12, 13 och 61

Av 100 prover som analyserades med Sanger-sekvensering bestämdes mutationsstatus i 97 prover för både kodon 12/13 och kodon 61. I 4 av de 100 proverna detekterades en mutation i kodon 12 eller kodon 13 med Sanger-sekvensering.

12 av de 100 proverna reproducerades mutationsstatusen med *therascreen* NRAS Pyro Kit och ingen mutation rapporterades. Resultaten visas i Tabell 12. Inga mutationer detekterades i kodon 61.

Om de prover som misslyckades med en av eller båda metoderna räknades bort visade *therascreen* NRAS Pyro Kit och Sanger-sekvensering 98 % och 100 % överensstämmande resultat för kodonerna 12/13 respektive kodon 61. Se Tabell 12.

Tabell 12. Resultat för de analyserade proverna för NRAS 12, 13 och 61

		Sanger-sekvensering				Totalt
		Mutant i kodon 12/13	Mutant i kodon 61	Vildtyp	Okänd	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutant i kodon 12/13	2	–	–	–	2
	Mutant i kodon 61	–	–	–	–	–
	Vildtyp	2	–	90	3	95
	Okänd	–	–	3	–	3
	Totalt	4	–	93	3	100

Utvärdering av KRAS-kodonerna 59, 61, 117, 146 och NRAS-kodonerna 59, 117, 146

DNA extraherades från 110 formalinfixerade paraffinbäddade (FFPE) mCRC-tumörprover och analyserades med avseende på mutationer i kodonerna 59, 61, 117 och 146 i den mänskliga KRAS-genen och 59, 117 och 146 i den mänskliga NRAS-genen. På grund av den förväntat låga mängden i kliniska prover analyserades alla mutationer som täcktes av *therascreen* RAS Extension Kit i 56 ytterligare prover med plasmid-DNA spikat med vildtyp-FFPE-DNA. Alla mutationer hittades både med pyrosekvensering och Sanger-sekvensering.

Av de 166 proverna som analyserades överensstämde resultaten generellt mellan *therascreen* RAS Extension Pyro Kit och Sanger-sekvensering för 137 prov (83 %).

Ej överensstämmande resultat kunde förklaras med flera olika faktorer.

På grund av högt bakgrundsvärde misslyckades 20 prover i NRAS 59 Sanger-sekvenseringsanalysen.

Sanger-sekvensering kunde inte detektera mutationer i KRAS 59 och KRAS 61 för 1 respektive 3 prover. Alla 4 mutationer hade lågfrekvensresultat från pyrosekvensering (7,5–13,1 %). Detta kan förklaras med den lägre sensitiviteten hos Sanger-sekvensering (15–20 %) jämfört med pyrosekvensering (5 %) (2). Alla andra giltiga prover var av vildtyp för båda teknikerna.

Ett prov bedömdes som okänt för pyrosekvensering eftersom en dubbel mutation detekterades (KRAS 59–61).

Fyra prover som innehöll spikat plasmid-DNA visade en extra A>G-mutation vid KRAS-kodningssekvensposition 350, vilken inte täcks av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit. Mutationer detekterades genom manuell analys.

Tabell 13. Resultat för de analyserade proverna för KRAS-kodonerna 59, 61, 117, 146 och NRAS-kodonerna 59, 117, 146

	KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	wt	UK	Totalt	
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	KRAS 59	8	–	–	–	–	–	1	9	
	KRAS 61	–	6	–	–	–	2	1	9	
	KRAS 117	–	–	4	–	–	–	–	4	
	KRAS 146	–	–	–	3	4	–	–	7	
	KRAS ^a	–	–	–	–	16	–	–	16	
	NRAS ^b	–	–	–	–	–	28	–	28	
	wt	–	–	–	–	–	–	71	16	87
	UK	1	–	–	–	–	–	3	2	6
	Totalt	9	6	4	3	20	28	76	20	166

WT: vildtyp

^a KRAS-spikade prov som bar på både KRAS 117- och 146-mutationerna.

^b NRAS-spikade prov som bar på mutationer för NRAS 59, 117 och 146.

* Ett prov detekterades mutant för KRAS 146 men uppvisade ett ogiltigt resultat för NRAS 117.

Analysernas sensitivitet och specificitet per kodon rapporteras i Tabell 14.

Tabell 14. Analysernas sensitivitet och specificitet för KRAS-kodon 59, 61, 117, 146 och NRAS-kodon 59, 117, 146

	Sensitivitet	Specificitet	Täckt mutation
Mutation KRAS 59	100%	99%	175G>A / 176C>G
Mutation KRAS 61	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Mutation KRAS 117	100%	100%	351A>C / 351A>T
Mutation KRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Mutation NRAS 59	100%	100%	175G>A / 176C>G
Mutation NRAS 117	100%	100%	351G>C / 351G>T
Mutation NRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T











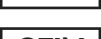




Obs: I alla körningar för bestämning av testegenskaper låg signalen på över 30 RLU, rutinmässigt erhållen från 10 ng DNA isolerat från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) vävnad. Pyrosekvenseringsdata analyserades med RAS Extension Plug-In Report för KRAS-kodonerna 59, 117 146 och NRAS-kodonerna 59, 117 och 146.

Referenser

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023.
2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> reaktioner
	Används senast
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Se bruksanvisningen
	Varning

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Bilaga A: Konfigurera *therascreen* RAS Extension Pyro-analyser

Om RAS Extension Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna för KRAS-kodonerna 59/61, 117 och 146 samt NRAS-kodonerna 12/13, 59, 61, 117 och 146 tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24. Använd sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension". I det här fallet behöver inte följande steg utföras.


RAS Extension Plug-in Report kan laddas ned från den aktuella katalogsidan på **www.qiagen.com** på fliken "Product Resources" [Produktresurser] i sektionen "Protocol Files" [Protokollfiler].


Vi rekommenderar starkt att du använder RAS Extension Plug-in Report framför manuell analys.

Efter installation av plugin-rapporten eller varje gång ett nytt program har installerats eller upgraderats på datorn ska du verifiera att plugin-rapporten fungerar korrekt enligt anvisningarna i RAS Extension Plug-In Quick Guide.

Om RAS Extension Plug-in Report inte har installerats måste analysfilerna konfigureras manuellt innan *therascreen* RAS Extension Pyro-analysen körs första gången. Konfigurera analysen för KRAS-kodonerna 59/61, 117 och 146 samt NRAS-kodonerna 12, 13, 59, 61, 117 och 146 med hjälp av programmet PyroMark Q24, enligt beskrivningen nedan.

Procedur

1. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).
2. I Tabell 15 visas "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) för alla åtta RAS Extension Pyro-analyserna. Ange den analys-specifika sekvensen i fältet "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).

3. "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) kan också ändras efter körningen för att analysera mutationer på andra positioner (se "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 35).
4. Om du vill kontrollera ifall det finns mutationer i andra nukleotider ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) enligt tabell 15. Det går att ändra "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) efter körningen (om den inte är låst).
Obs: Se till att tröskelvärde för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU. Se också till att reduktionsfaktorn för A-topp är inställd på 0,86 för analys av NRAS-kodon 61.
5. Ange aktuell analys-specifik "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) från tabell 15 manuellt.
Obs: Använd inte knappen "Generate Dispensation Order" (Generera dispenseringsordning). Både "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) och "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) måste skrivas in manuellt.
6. Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.
7. Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "KRAS 59/61" eller "KRAS 117" eller "KRAS 146" eller "NRAS 12/13" eller "NRAS 59" eller "NRAS 61" eller "NRAS 117" eller "NRAS 146".

Tabell 15. Analyskonfiguration: "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) och "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) för de åtta analyserna i *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

<i>therascreen</i> RAS Extension-analys	Sekvens att analysera	Dispenseringsordning
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Tabell 16. Vanliga mutationer i den mänskliga KRAS-genen detekterade av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit med respektive "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	Sekvens att analysera	COSMIC ID* (V70)
KRAS-kodon 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS-kodon 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTC D TGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTC H GACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTC H GACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTC D TGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTT S ACCTGCTGT	550
KRAS-kodon 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAA H TGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAA H TGTGA	28519
KRAS-kodon 146 (GCA)			
436G>A	A146T	ATCA V CAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCA V CAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAG B AAAGA	19900

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/


Tabell 17. Vanliga mutationer i den mänskliga NRAS-genen detekterade av *therascreen* RAS Extension Pyro Kit med respektive "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	Sekvens att analysera	COSMIC ID* (V70)
NRAS-kodon 12 (GGT)			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	565
NRAS-kodon 13 (GGT)			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	575
NRAS-kodon 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACA VCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	-
NRAS-kodon 117 (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATT	-
351G>T	K117N	ABTGTGATT	-
NRAS codon 61 (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	Sekvens att analysera	COSMIC ID* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS-kodon 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trågen

 <p>VARNING</p>	<p>Farliga kemikalier</p> <p>Denatureringslösningen som används tillsammans med vakuumbekantstationen innehåller natriumhydroxid som irriterar ögonen och huden.</p> <p>Använd alltid säkerhetsglasögon, handskar och en labbrock.</p> <p>Ansvarig person (t.ex. laboratoriechef) måste vidta nödvändiga åtgärder för att se till att den omgivande arbetsplatsen är säker och att användarna av instrumentet inte utsätts för farliga nivåer av giftiga ämnen (kemiska eller biologiska) enligt definitionen i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) eller dokumenten OSHA,* ACGIH,† eller COSHH‡.</p> <p>Ventilation för ångor och kassering av avfall måste ske i enlighet med alla nationella och lokala hälso- och säkerhetsföreskrifter och lagar.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA).

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

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (UK).

Följ gällande nationella och regionala föreskrifter för miljövänlig hantering av laboratorieavfall.

Viktigt att tänka på före start

- För det här protokollet krävs höggradigt rent vatten.

Procedur

1. Se till att det inte finns något vakuum i vakuumverkyget. Kontrollera att vakuumet är stängt (Off) och att vakuumpumpen är avstängd.
2. Kassera eventuell kvarvarande lösning i trågen.
3. Skölj trågen med höggradigt rent vatten eller byt ut dem vid behov.
4. Töm avfallsbehållaren.
5. Locket kan tas bort utan att koppla loss slangarna.

Om vakuumstationen måste rengöras (t.ex. från damm eller spill) följer du instruktionerna i *användarmanualen till PyroMark Q24*.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	För 24 reaktioner: Sekvenserings-primrar, PCR-primrar, ometylerat kontroll-DNA, PyroMark PCR-huvudmix, Coralload-koncentrat, buffertar och reagenser	971590
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumbesättning för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Analysprogram	9019063
Tillbehör		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatta för sekvensering med 24 brunnar	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter för dosering av nukleotider och reagenser	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Återanvändbara filterprober för vakuumbesättning PyroMark Q96 och Q24	979010
PyroMark Control Oligo	För installationskontroll av system	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	För bekräftelse av systemegenskaper	979304

Product	Contents	Cat. no.
Relaterade produkter		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: 50 QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar, uppsamlingsrör (2 ml)	56404

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN-gruppen); Analyse-it® (Analyse-it Software Ltd); Applied Biosystems®, Variomag® (Thermo Fisher Scientific); Axygen® (Corning Inc.); FrameStar® (4itude Ltd); Milli-Q® (Merck Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); SmartBlock™, ThermoMixer® (Eppendorf AG); Windows® (Microsoft Corporation).

Avtal om begränsad licens för *therascreen* RAS Extension Pyro Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser panelen och/eller någon av dess komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

Maj-16 HB-1882-002 © 2016 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/contact | Teknisk Support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com