

Håndbok for *therascreen*[®] MGMT Pyro[®]-sett



Versjon 1

IVD

Til bruk i in vitro-diagnostikk

CE

REF 971061

HB 1061267NO

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R4 **MAT** 1061267NO



QIAGEN prøve- og analyseteknologier

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi og gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og tjenester sikrer suksessen fra prøve til resultat.

QIAGEN setter standardene innen:

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Målet er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Se www.qiagen.com for mer informasjon.

Innhold

Tiltenkt bruk	5
Sammendrag og forklaring	5
Prosedyreprinsipper	6
Kontroller	7
Materialer som medfølger	8
Settets innhold	8
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	10
Anbefalte platemiksere	11
Advarsler og forholdsregler	11
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	12
Oppbevaring og håndtering av reagenser	13
Oppbevaring og håndtering av prøver	13
Prosedyre	14
Isolering av DNA og hydrogensulfittkonvertering	14
Protokoller	
■ 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med <i>therascreen</i> MGMT Pyro-settet	17
■ 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler	20
■ 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24	22
■ 5: Kjøring av PyroMark Q24	26
■ 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie	28
Tolkning av resultater	29
Feilsøkingsveiledning	31
Kvalitetskontroll	33
Begrensninger	33
Ytelseskarakteristikker	34
Blank grense	34
Linearitet	34

Presisjon	36
Diagnostisk vurdering	39
Referanser	41
Symboler	42
Kontaktinformasjon	42
Vedlegg A: Oppsett av MGMT-analyse	43
Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar	44
Bestillingsinformasjon	45

Tiltenkt bruk

therascreen MGMT Pyro-settet er en nukleinsyretest til *in vitro*-diagnostisk bruk basert på sekvensdetektering og Pyrosequencing[®]-teknologi (pyrosekvenseringsteknologi), til kvantitative målinger av metyleringsstatus i ekson 1 i humant MGMT-gen i genomisk DNA som stammer fra human vevsprøve.

therascreen MGMT Pyro-settet skal brukes som et tillegg til andre prognostiske faktorer for å gi leger informasjon som skal hjelpe dem å velge hvilke kreftpasienter som har best utbytte av kjemoterapi. Til bruk i *in vitro*-diagnostikk.

Skal bare brukes sammen med PyroMark[®] Q24-systemet. PyroMark Q24-systemene omfatter:

- PyroMark Q24-instrumentet og PyroMark Q24 MDx-instrumentet.
- PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon og PyroMark Q24 MDx vakuumarbeidsstasjon.
- PyroMark Q24-programvare (versjon 2.0) og PyroMark Q24 MDx programvare (versjon 2.0).

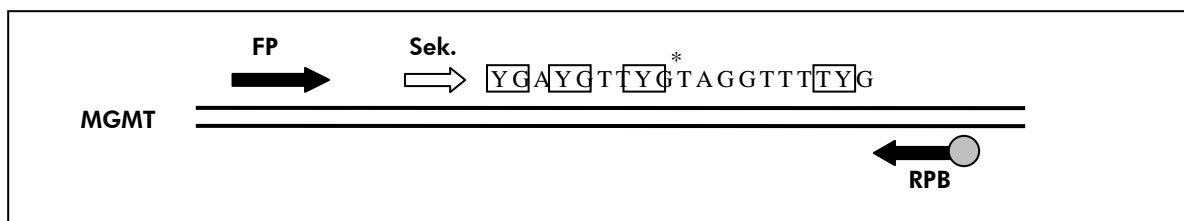
Dette produktet er beregnet til bruk av profesjonelle brukere, slik som teknikere og fysikere som har mottatt opplæring i *in vitro*-diagnostiske prosedyrer, molekylær-biologiske teknikker og PyroMark Q24-systemet.

Sammendrag og forklaring

therascreen MGMT Pyro-settet er tiltenkt kvantitative målinger av metylering i fire CpG-områder i ekson 1 i humant MGMT-gen (genomisk sekvens på kromosom 10 fra 131.265.519 til 131.265.537:

CGACGCCCGCAGGTCCTCG). Hydrogensulfittkonvertert genomisk DNA amplifiseres av PCR og sekvenseres oppstrøms gjennom angitt område (figur 1). Sekvenser som omgir de angitte posisjonene tjener som normaliserings- og referansetopper for kvantifisering og kvalitetsvurdering av analysen.

Produktet består av PCR-primerblanding og sekvenseringsprimer, to flasker av hver. Primerne leveres i en løsning. Hver flaske inneholder 24 µl primer eller primerblanding. Settet inneholder primere og reagenser til amplifikasjon av gener samt buffere, primere og reagenser til kvantitativ deteksjon av metylering i sanntid ved bruk av pyrosekvenseringsteknologi på PyroMark Q24-systemet.



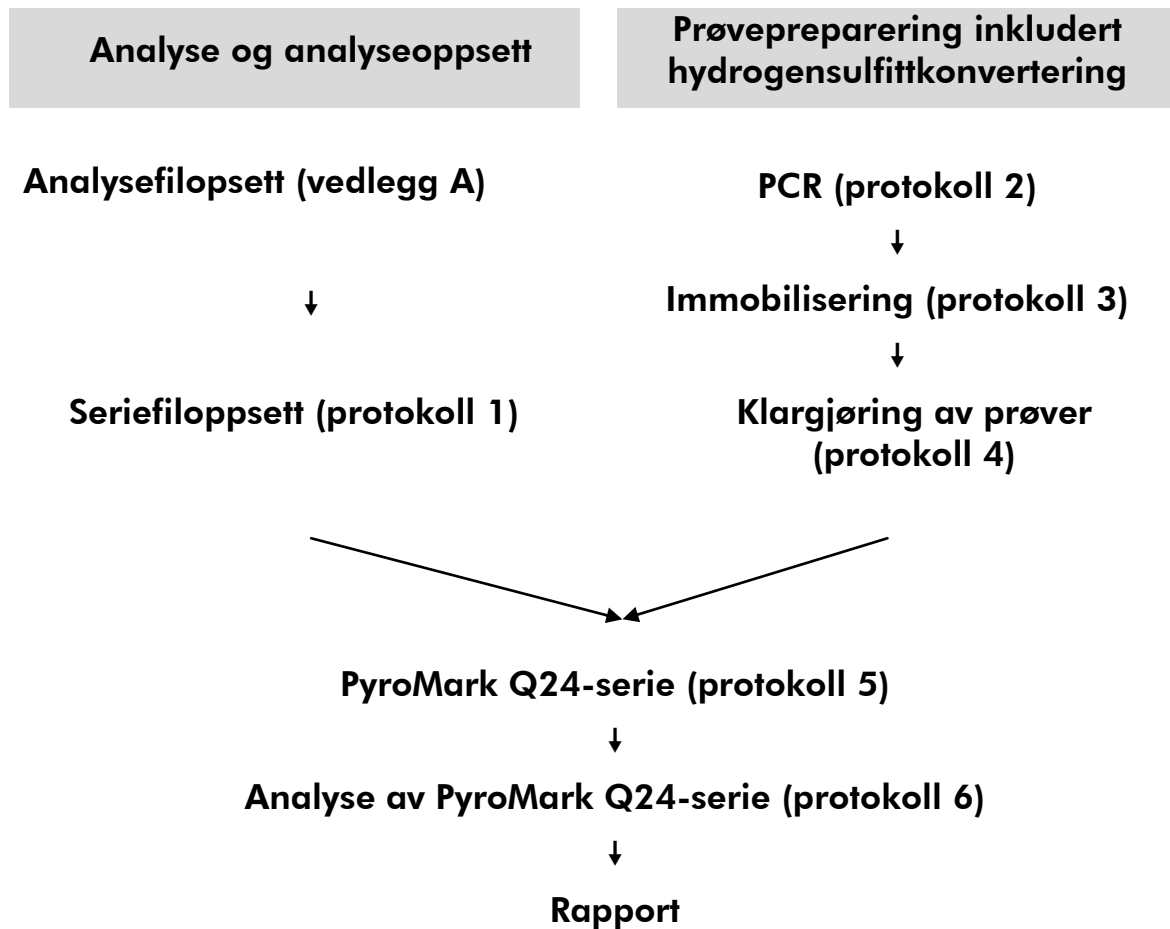
Figur 1. Illustrasjon av MGMT-analyse. Angitt sekvens er en analysert sekvens etter hydrogensulfittkonvertering. Y angir de potensielt metylerte områdene, og boksene angir de analyserte CpG-områdene. Stjernen angir området for kontroll med hydrogensulfittkonvertering. **FP:** Oppstrøms PCR-primere; **RPB:** Nedstrøms PCR-primere (**B** indikerer biotinylering); **Sek.:** Sekvenseringsprimere.

Prosedyreprinsipper

Arbeidsgangen illustrerer analyseprosedyren. Etter PCR med primere som har det angitte området på ekson 1 som mål, immobiliseres amplikonene på Streptavidin Sepharose® High Performance mikropartikler. Enkeltrådet DNA klargjøres, og sekvenseringsprimerne hybridiseres til DNA-et. Prøvene analyseres deretter i PyroMark Q24-systemet ved hjelp av en fil for å kjøre analyseoppsettet og en fil for å kjøre analyse.

Merk: Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med *håndboken for PyroMark Q24* (se "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24", på side 22).

Arbeidsgang for *therascreen* MGMT Pyro-prosedyren



Kontroller

Metylert kontroll-DNA er inkludert i settet som en positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner. Dette kontroll-DNAet er sterkt metylert og hydrogensulfittkonvertert. Det er også anbefalt å inkludere en DNA-prøve fra en frisk blodgiver i hver pyrosekvenseringsserie til sammenligning. I tillegg bør man ta med en negativ kontroll (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett.


Materialer som medfølger

Settets innhold

therascreen MGMT Pyro-sett (eske 1/2)

<i>therascreen</i> MGMT Pyro-sett	(48)
Katalognr.	971061
Antall reaksjoner	48
PCR Primer Mix MGMT (PCR-primerblanding MGMT)	2 x 24 μ l
Seq Primer MGMT (Sekvenseringsprimer)	2 x 24 μ l
PyroMark PCR Master Mix (PyroMark PCR Master Mix), 2 x	850 μ l
CoralLoad [®] Concentrate (CoralLoad [®] -konsentrat), 10 x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Methylated Control DNA (Metylert kontroll-DNA), 10 ng/ μ l	100 μ l

therascreen Pyro buffers and reagents (eske 2/2)

therascreen Pyro buffers and reagents		
PyroMark Binding Buffer (PyroMark bindingsbuffer)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark hybridiseringsbuffer)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark denatureringsløsning)*		250 ml
PyroMark Wash Buffer (PyroMark vaskebuffer), 10 x		25 ml
Enzyme Mixture (Enzymblanding)		1 flaske
Substrate Mixture (Substratblanding)		1 flaske
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Handbook (Håndbok)		1

* Inneholder natriumhydroksid.

Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene), som fås fra leverandøren av produktet.

- DNA-isoleringssett (se "Isolering av DNA og hydrogensulfittkonvertering" på side 14)
- Reagenser for hydrogensulfittkonvertering av DNA (se "Isolering av DNA og hydrogensulfittkonvertering" på side 14)
- Pipetter (justerbare)*
- Sterile pipettespisser (med filter for PCR-oppsett)
- Bordsentrifuge*
- Termosykler og egnede PCR-rør
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (kat.nr. 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24-programvare (kat.nr. 9019062 eller 9019063)†
- PyroMark Q24-plate (kat.nr. 979201)†
- PyroMark Q24-kassett (kat.nr. 979202)†
- PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon (kat.nr. 9001515 eller 9001517)*†
- Platemikser* for immobilisering til mikropartikler (se "Anbefalte platemiksere" på side 11)
- Varmeblokk* som kan oppnå 80 °C
- 24-brønners PCR-plate eller remser
- Korker
- Vann med høy renhetsgrad (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende)

Merk: Produktet inneholder tilstrekkelig vann for PCR, DNA-immobilisering og til å løse opp enzymblandingen og substratblandingen. Det er nødvendig med ekstra vann med høy renhetsgrad for å fortynne PyroMark vaskebuffer, 10 x

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

† CE-IVD-merket i samsvar med EU-direktiv 98/79/EF. Alle andre angitte produkter er ikke CE-IVD-merket basert på EU-direktiv 98/79/EF.

■ Etanol (70 %)*

Anbefalte platemiksere

Platemikserne som er vist i tabell 1 anbefales for bruk med *therascreen* MGMT Pyro-sett.

Tabell 1. Platemiksere som anbefales for bruk med *therascreen* MGMT Pyro-sett

Produsent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Termomikser komfort (grunnleggende utstyr)	5355 000.011
	Varmebløkk for mikrotiterplater	5363 000.012
	Adapterplate for 96 x 0,2 ml PCR-rør til å settes inn i blokker for mikrotiterplater	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene). Disse er tilgjengelige elektronisk i et praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety der du kan finne, vise og skrive ut datablad for hvert QIAGEN[®]-sett og hver settkomponent.

* Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i *therascreen* MGMT Pyro-settet.

PyroMark Denaturation Solution



Advarsel! Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Kan være etsende for metaller. Absorber spill for å hindre materiell skade. Oppbevares bare i originalbeholder. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

PyroMark Enzyme Mixture



Inneholder: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Fare! Irriterer huden. Gir alvorlig øyeskade. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. VED eksponering eller bekymring: Ring et GIFTKONTROLLSENTER eller lege. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

PyroMark Substrate Mixture



Inneholder: acetic acid. Advarsel! Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

Generelle forholdsregler

Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Håndboken må følges nøyaktig for å få mest mulig optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.
- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med *håndboken for PyroMark Q24* (se "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 22).
- Komponentene i dette produktet er tilstrekkelige til å utføre de 48 reaksjonene i opptil fem uavhengige serier.
- Bruk sterile pipettespisser med filter (for PCR-oppsett).
- Positivt materiell (prøver, positive kontroller og amplikoner) skal oppbevares og ekstraheres separat i forhold til alle andre reagenser, og tilsettes reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.

- Alle komponenter tines grundig opp ved romtemperatur (15–25 °C) før analysering.
- Når komponentene er tint, kan de blandes (pipetteres gjentatte ganger opp og ned, eller vortekses i pulser) og sentrifugeres en kort stund.
- Ikke godkjente resultater danner ikke grunnlag for å bedømme metyleringsstatus.

Oppbevaring og håndtering av reagenser

therascreen MGMT Pyro-settet leveres i to esker. *therascreen* MGMT Pyro-sett (eske 1/2) sendes på tørris. PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-konsentrat, metylert kontroll-DNA og alle primere bør oppbevares ved –30 til –15 °C etter levering.

therascreen-bufferne og reagensene (eske 2/2) som inneholder buffere, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP og dTTP (reagenser for pyrosekvenseringsanalyse), transporteres og leveres på kuldepakninger. Disse komponentene bør oppbevares ved 2–8 °C ved levering. Det kan være lurt å beholde enzymblandingen og substratblandingen i flaskene som følger med, for å redusere tap av aktivitet.

Rekonstituerte enzym- og substratblandinger er stabile i minst 10 dager ved 2–8 °C. Rekonstituert enzym- og substratblandinger kan fryses og oppbevares i flaskene ved –30 til –15 °C. Frosne reagenser bør ikke utsettes for mer enn 6 fryse/tine-sykluser.

Merk: Nukleotider må ikke fryses.

therascreen MGMT Pyro-settet er stabilt frem til settets utløpsdato dersom det oppbevares under disse betingelsene.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet er hydrogensulfittkonvertert DNA ekstrahert fra blod eller formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) prøver.

Prøver fra personer som mottar heparinbehandling, skal ikke brukes.

Blodprøver som er tatt i rør som inneholder heparin som antikoagulant, skal ikke brukes. Heparin påvirker PCR.

Prosedyre

Isolering av DNA og hydrogensulfittkonvertering

Systemets ytelse er etablert ved hjelp av EZ1[®] DNA-vevssett og QIAamp[®] DNA FFPE-vevssett for ekstrahering av humant DNA fra formalinfikserte, parafinlagrede tumorprøver. Ytelsen for QIAamp DSP DNA Blood Mini-sett-systemet er etablert ved hjelp av friske donorblodprøver delvis tilsatt med tumorceller.

QIAGEN-settene som er vist i tabell 2 anbefales for DNA-rensing fra de angitte humane prøvetypene som skal brukes sammen med *therascreen* MGMT Pyro-sett. Utfør DNA-rensing i henhold til instruksjonene angitt i settets håndbøker.

For hydrogensulfittkonvertering anbefales EpiTect[®] Bisulfite-sett (kat.nr. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite-sett (kat.nr. 59144) eller EpiTect Plus DNA Bisulfite-sett (kat.nr. 59124) fra QIAGEN.

Tabell 2. Sett for DNA-rensing som anbefales for bruk med *therascreen* MGMT Pyro-sett

Prøvemateriale	Nukleinsyreisoleringssett	Katalognummer (QIAGEN)
Parafinlagret vev	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* Følg protokollen for bruk sammen med parafinlagret vev. EZ1 DNA vevssett bør brukes i kombinasjon med EZ1 Advanced (kat.nr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat.nr. 9001492) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9018700) eller med BioRobot[®] EZ1 (kat.nr. 9000705; ikke lenger tilgjengelig) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr. 9015862).

[†] CE-IVD-merket i samsvar med EU-direktiv 98/79/EF.

Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet

Viktige poeng før du starter

- LOB kan om nødvendig bekreftes ved hjelp av en prøve fra en frisk blodgiver for å generere en full plate med resultater. Du finner mer informasjon ved å se i CLSI Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protokoller for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer).

Dette må du gjøre før du starter:

- Lag et analyseoppsett slik det er beskrevet i vedlegg A på side 43. Dette trenger kun å gjøres én gang, før du kjører *therascreen* MGMT Pyro-analysen første gang.

Prosedyre

1. **Klikk på  på verktøylinjen.**


En ny seriefil opprettes.

2. **Skriv inn analyseparameterne (se "Serieparametere" på side 16).**

3. **Sett opp platen ved å legge til analysen i brønner som samsvarer med prøvene som skal analyseres.**

Merk: Man bør ta med en negativ kontrollprøve (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett.

Merk: Det er også anbefalt å inkludere en DNA-kontrollprøve fra en frisk blodgiver i hver pyrosekvenseringsserie til sammenligning. En prøve med metylert kontroll-DNA kan tas med som positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner (se "Kontroller" på side 7).

4. **Når serien er satt opp og klar til å kjøre på PyroMark Q24-systemet, skal du skrive ut en liste over nødvendig mengde enzymblanding, substratblanding og nukleotider, samt plateoppsettet. Velg "Pre Run Information" (Informasjon før analyse) fra menyen "Tools" (Verktøy), og klikk på  når rapporten vises.**

5. **Velg analysefil og kopier den til en USB-enhet (leveres med systemet) ved hjelp av Windows® Utforsker.**

Informasjon før analyse som er skrevet ut, kan brukes som en mal for prøveoppsettet (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler" på side 20).

Slik kjører du platen på PyroMark Q24, se "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24" på side 26.

Serieparametere

Run name (Serienavn):	Navnet på serien gis når filen er lagret. Hvis man gir filen et nytt navn, vil dette også endre navnet på serien.
Instrument method (Instrumentmetode):	Velg instrumentmetode i henhold til kassetten som vil bli brukt til serien. Se instruksjonene som følger med produktene.
Plate ID (Plate-ID):	Valgfritt: Skriv inn ID for PyroMark Q24-plate.
Bar code (Strekkode):	Valgfritt: Skriv inn en strekkode for platen. Hvis du har en skanner tilkoblet datamaskinen, kan du også sette musemarkøren i tekstboksen "Barcode" (Strekkode) (ved å klikke på boksen) og skanne strekkoden.
Reagent ID (Reagens-ID):	Valgfritt: Skriv inn partinumrene for eske 1 og eske 2 i <i>therascreen</i> MGMT Pyro-settene som skal brukes. Partinummeret er angitt på produktemballasjen. Merk: Vi anbefaler at du skriver inn lotnummeret, slik at eventuelle uventede problemer med <i>therascreen</i> MGMT Pyro-settet kan spores.
Run note (Merknad til serie):	Valgfritt: Skriv inn en merknad om innholdet eller målet med serien.

Legge til analysefiler

Du kan legge til en analyse til en brønn ved enten å:

- høyreklikke på brønnen og velge "Load Assay" (Sett inn analyse) fra menyen
- velge analysen i snarveifunksjonen og klikke på og dra analysen inn i brønnen

En brønn er fargekodet i forhold til analysen som er satt inn i brønnen.

Legg inn prøve-ID-er og merknader

Velg celle og skriv inn tekst for å legge inn en prøve-ID eller merknad.

Du kan redigere en prøve-ID eller merknad ved enten å velge cellen (gjeldende innhold vil bli valgt) eller dobbeltklikke på cellen.

Protokoll 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med *therascreen* MGMT Pyro-settet

Denne protokollen er for PCR-amplifikasjoner av et område som inneholder DNA konvertert med hydrogensulfitt ved hjelp av *therascreen* MGMT Pyro-sett.

Viktige poeng før du starter

- HotStarTaq[®] DNA-polymerase i PyroMark PCR Master Mix krever et aktiveringstrinn på **15 minutter ved 95 °C**.
- Sett opp alle reaksjonsblandinger i et område som er skilt av fra det som brukes til DNA-rensing, tilsetning av DNA-templat til PCR, PCR-produktanalyse eller klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse.
- Bruk engangsspisser som inneholder vannavstøtende filter for å minimere faren for krysskontaminering.
- DNA konvertert med hydrogensulfitt skal brukes som DNA-templat. EpiTect Bisulfite-sett (kat.nr. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite-sett (kat.nr. 59144) eller EpiTect Plus DNA Bisulfite-sett (kat.nr. 59124) fra QIAGEN anbefales.

Dette må du gjøre før du starter:

- Før du åpner røret med PCR-primer, må rørene sentrifugeres en kort stund for at innholdet skal samles i bunnen av rørene.
- Juster konsentrasjonen av prøve-DNA til 2–10 ng/μl ved behov.

Prosedyre

1. Tin alle nødvendige komponenter.

Bland godt før bruk.

2. Klargjør en reaksjonsblanding i henhold til tabell 3.

Reaksjonsblandingen inneholder normalt alle komponentene som er nødvendige PCR, unntatt prøven.

Klargjør en mengde reaksjonsblanding som er større enn den som kreves for det totale antallet PCR-analyser som skal utføres.

Tabell 3. Klargjøring av reaksjonsblanding

Komponent	Volum/reaksjon (μ l)
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	12,5
CoralLoad-konsentrat, 10 x	2,5
PCR-primerblanding MGMT	1,0
Vann (H ₂ O, følger med)	4,0
Totalt volum	20,0

3. Bland reaksjonsblandingen grundig, og pipetter 20 μ l i hvert PCR-rør.

Det er ikke nødvendig å ha PCR-rørene på is, fordi HotStarTaq DNA-polymerase er inaktiv ved romtemperatur.

4. Tilsett 5 μ l DNA-templat (10–50 ng av genomisk DNA målt før hydrogensulfittkonvertering) til hvert PCR-rør (tabell 4), og bland grundig.

Merk: Man bør ta med en negativ kontrollprøve (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett.

Merk: Det er også anbefalt å inkludere en DNA-kontrollprøve fra en frisk blodgiver i hver pyrosekvenseringsserie til sammenligning. En prøve med metylert kontroll-DNA kan tas med som positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner (se "Kontroller" på side 7).

Tabell 4. Klargjøring av PCR

Komponent	Volum/reaksjon (μ l)
Reaksjonsblanding	20
Prøve-DNA	5
Totalt volum	25

5. Programmer termosykleren i henhold til produsentens anvisninger med betingelsene angitt i tabell 5.

Tabell 5. Optimalisert syklusprotokoll

			Kommentarer
Innledende aktiveringstrinn:	15 minutter	95°C	HotStarTaq DNA-polymerase aktiveres av dette varmetrinnet.
3-trinns syklus:			
Denaturering	20 sekunder	95°C	
Hybridisering	30 sekunder	53°C	
Forlengelse	20 sekunder	72°C	
Antall sykluser	42		
Endelig forlengelse:	5 minutter	72°C	

6. Sett inn PCR-rørene i den termiske sentrifugen og start syklusprogrammet.
7. Fortsett med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler" på side 20 etter amplifikasjonen.

Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler

Denne protokollen gjelder for immobilisering av DNA-templat til Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) før analyse på PyroMark Q24-systemet.

Viktige poeng før du starter

- Alle nødvendige reagenser og løsninger må oppnå romtemperatur (15-25 °C) før start.

Prosedyre

1. Rist flasken som inneholder Streptavidin Sepharose High Performance forsiktig, til det er blitt en jevn løsning.
2. Klargjør Master Mix for DNA-immobilisering i henhold til tabell 6. Klargjør et volum som er 10 % større enn det som kreves for det totale antallet reaksjoner som skal utføres.

Tabell 6. Master Mix for DNA-immobilisering

Komponent	Volum/prøve (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark bindingsbuffer	40
Vann (H ₂ O, følger med)	28
Totalt volum	70

3. Tilsett 70 µl Master Mix til brønnene i en PCR-plate med 24 brønner (eller remser), slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).
4. Tilsett 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokoll 2 til hver brønn som inneholder Master Mix, slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 2: PCR ved bruk av reagensene som leveres sammen med *therascreen* MGMT Pyro-settet" på side 17).
Det totale volumet per brønn skal være 80 µl etter at Master Mix og PCR-produktet er tilsatt.
5. Forsegl PCR-platen (eller remsene) ved hjelp av korker.
Se til at det ikke kan lekke mellom brønnene.

6. Beveg PCR-platen frem og tilbake i romtemperatur (15–25 °C) i 5-10 minutter ved 1400 opm.

I løpet av dette trinnet kan du klargjøre PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon for prøveklargjøring, slik det er beskrevet i *håndboken for PyroMark Q24*.

7. Fortsett umiddelbart med “Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24” på side 22.

Merk: Sepharose mikropartikler lager fort bunnfall. Henting av mikropartikler må skje umiddelbart etter bevegelse av platen.

Hvis det er gått mer enn ett minutt siden platen (eller remsene) ble beveget opp og ned, bør dette gjøres på nytt i ett minutt før mikropartiklene hentes.

Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24

Denne protokollen er til klargjøring av enkelttrådet DNA og hybridisering av sekvenseringsprimer til templatet før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24.

Viktige poeng før du starter

- Tilsett sekvenseringsprimer i det samme mønsteret som er angitt for platen i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).
- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med *håndboken for PyroMark Q24* (trinn 18). Ikke kort ned tiden for nedkjøling av prøvene etter oppvarming til 80 °C.
- Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i *håndboken for PyroMark Q24* regelmessig, og bytt filterprober når dette angis.

Dette må du gjøre før du starter:

- Før du åpner røret med sekvenseringsprimer, må disse sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet i bunnen av rørene.
- Sett én PyroMark Q24-plateholder på en forvarmet varmeblokk som holder 80 °C til bruk i trinn 17. Hold en andre PyroMark Q24-plateholder ved romtemperatur (15–25 °C) for bruk i trinn 18.
- PyroMark vaskebuffer tilsettes som et 10 x-konsentrat. Før den brukes første gang, må det tilsettes vann med høy renhetsgrad til 25 ml 10 x PyroMark vaskebuffer for å oppnå et endelig volum på 250 ml og oppnå en 1 x aktiv løsning.
1 x PyroMark vaskebuffer aktiv løsning er stabil ved 2–8 °C til den angitte utløpsdatoen.

Prosedyre

1. Fortynn en tilstrekkelig stor mengde av sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer MGMT, i PyroMark hybridiseringsbuffer som vist i tabell 7.

Klargjør et volum med fortynnet sekvenseringsprimer som er større enn det som kreves for det totale antallet prøver som skal sekvenseres (for antall prøver + en ekstra).

Tabell 7. Eksempel på fortynning av sekvenseringsprimerne

Komponent	Volum/prøve (μl)	Volum til 9 + 1 reaksjoner (μl)
Sekvenseringsprimer	0,8	8,0
PyroMark hybridiseringsbuffer	24,2	242,0
Totalt volum	25,0	250,0

- 2. Tilsett 25 μl fortynnet sekvenseringsprimer til hver brønn i PyroMark Q24-platen i henhold til analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).**

En av PyroMark Q24-plateholderne (leveres med PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon) må holde romtemperatur (15–25 °C) og brukes som støtte ved klargjøring og flytting av platen.

- 3. Sett PCR-platen (eller remsene) fra protokoll 3 og PyroMark Q24-platen på arbeidsbenken (figur 2).**

Se til at platen står i samme retning som når prøvene ble satt inn.



Figur 2. Plassering av PCR-plate (eller remser) og PyroMark Q24-plate på vakuumarbeidsstasjonen.

- 4. Sett vakuum på vakuumverktøyet ved å åpne vakuumbryteren.**
- 5. Senk filterprobene til vakuumverktøyet forsiktig ned i PCR-platen (eller remsene) for å fange opp mikropartiklene som inneholder immobilisert templat. Hold probene på plass i 15 sekunder. Vær forsiktig når du henter opp vakuumverktøyet.**

Merk: Sepharose mikropartikler lager fort bunnfall. Henting av mikropartikler må skje umiddelbart etter bevegelse av platen.

Hvis det er gått mer enn ett minutt siden platen (eller remsene) ble beveget opp og ned, bør dette gjøres på nytt i ett minutt før mikropartiklene hentes.

6. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml med 70 % etanol (figur 2). Skyll filterprobene i 5 sekunder.**
7. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder 40 ml med denatureringsløsning (figur 2). Skyll filterprobene i 5 sekunder.**
8. **Overfør verktøyet til karet som inneholder 50 ml med vaskebuffer (figur 2). Skyll filterprobene i 10 sekunder.**
9. **Løft vakuumverktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 3).**



Figur 3. Illustrasjon av vakuumverktøyet som er løftet mer enn 90° vertikalt.

10. **Mens vakuumverktøyet holdes over PyroMark Q24-platen, skal vakuumbryteren på verktøyet slås av (Off).**
11. **Frigjør mikropartiklene i PyroMark Q24-platen ved å senke filterprobene i den fortynnede sekvenseringsprimeren og bevege verktøyet forsiktig frem og tilbake.**

Vær forsiktig så du ikke skader overflaten på PyroMark Q24-platen ved å ripe den med filterprobene.
12. **Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder vann med høy renhetsgrad (figur 2), og beveg verktøyet frem og tilbake i 10 sekunder.**
13. **Vask filterprobene ved å senke probene ned i vann med høy renhetsgrad (figur 2) og ved å tilføye vakuum. Skyll probene med 70 ml vann med høy renhetsgrad.**
14. **Løft verktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 3).**
15. **Slå av verktøyets vakuumbrytere (Off) og sett verktøyet i posisjon P (Parking).**

16. Slå av vakuumpumpen.

Merk: Mot slutten av en arbeidsdag må væskeavfall og resterende løsninger kastes, og PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon skal kontrolleres for støv og søl (se vedlegg B på side 44).

17. Varm opp PyroMark Q24-platen med prøvene ved 80 °C i 2 minutter med forhåndsoppvarmet PyroMark Q24-plateholder.

18. Fjern PyroMark Q24-platen fra den varme plateholderen og sett den på en andre PyroMark Q24-plateholder, som ble holdt ved romtemperatur (15–25 °C), for å la prøvene avkjøles til romtemperatur i 10–15 minutter.

19. Fortsett med "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24" på side 26.

Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24

Denne protokollen beskriver prepareringen og innlastingen av PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-kassetten, og starting og ferdigstilling av en analyseserie på PyroMark Q24. En utførlig beskrivelse om analyseoppsett finner du i *håndboken for PyroMark Q24*.

Viktige poeng før du starter

- Rapporten som inneholder informasjon før analyse, i menyen "Tools" (Verktøy) i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15), gir informasjon om hvor mye nukleotider, enzym og substratbuffer som er nødvendig for en bestemt analyseserie.

Dette må du gjøre før du starter:

- Slå på PyroMark Q24. Strømbryteren er plassert bak på instrumentet.

Prosedyre

- 1. Hver frysetørret enzym- og substratblanding skal oppløses i 620 µl vann hver (H₂O, følger med).**
- 2. Bland ved å bevege flasken forsiktig rundt.**

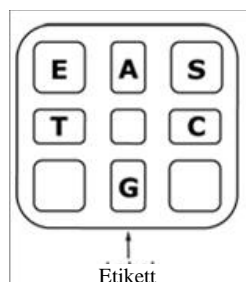
Ikke vorteks!

For å være sikker på at blandingen er helt løst opp, kan du la den ligge i romtemperatur (15–25 °C) i 5–10 minutter. Pass på at løsningen ikke er grumset før du fyller PyroMark Q24-kassetten. Hvis reagensene ikke skal brukes med det samme, skal reagensflaskene settes på is* eller i et kjøleskap.

- 3. La reagensene og PyroMark Q24-kassetten oppnå romtemperatur (20–25 °C).**
- 4. Plasser PyroMark Q24-kassetten med etiketten vendt mot deg.**
- 5. Fyll PyroMark Q24-kassetten med korrekt mengde nukleotider, enzym og substratblandinger i samsvar med figur 4.**

Kontroller at det ikke kommer luftbobler fra pipetten og over i kassetten.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene), som fås fra leverandøren av produktet.



Figur 4. Illustrasjon av PyroMark Q24-kassetten sett ovenfra. Kommentarene svarer til etiketten på reagensflaskene. Tilsett enzymblending (**E**), substratblending (**S**) og nukleotider (**A**, **T**, **C**, **G**) i samsvar med det volumet som er angitt i rapporten som inneholder informasjon før analyse i menyen "Tools" (Verktøy) i analyseoppsettet.

6. **Åpne kassettopningen og sett inn den fylte reagenskassetten med etiketten vendt utover. Skyv kassetten helt inn og trykk den ned.**
7. **Pass på at linjen er synlig foran på kassetten, og lukk åpningen.**
8. **Åpne rammen som holder platen på plass, og plasser platen på varmeblokken.**
9. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
10. **Sett inn USB-enheten (som inneholder analysefilen) i USB-porten foran på instrumentet.**
USB-enheten må ikke fjernes før serien er fullført.
11. **Velg "Run" (Serie) i hovedmenyen (ved hjelp av skjermknappene ▲ og ▼) og trykk på "OK".**
12. **Velg seriefil ved hjelp av skjermknappene ▲ og ▼.**
Du kan se innholdet i en mappe ved å velge mappe og trykke på "Select" (Velg). Trykk på "Back" (Tilbake) for å gå tilbake til forrige visning.
13. **Når analysefilen er valgt, trykker du på "Select" (Velg) for å starte serien.**
14. **Når serien er fullført og instrumentet bekrefter at analysefilen er lagret på USB-enheten, trykker du på "Close" (Lukk).**
15. **Ta ut USB-enheten.**
16. **Åpne instrumentlokket.**
17. **Åpne kassettopningen og ta ut reagenskassetten ved å løfte den opp og dra den ut.**
18. **Lukk åpningen.**
19. **Åpne rammen som holder platen på plass, og ta ut platen fra varmeblokken.**
20. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
21. **Kast platen og rengjør kassetten i henhold til instruksjonene i produktarket som leveres med kassetten.**
22. **Analyser serien i henhold til "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 28.**

Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie

Denne protokollen beskriver metyleringsanalysen til en fullført *therascreen* MGMT-serie ved bruk av Q24-programvare.

Prosedyre

1. Sett USB-enheten, som inneholder den behandlede seriefilen, inn i PC-ens USB-port.
2. Overfør seriefilen fra USB-enheten til ønsket plassering på datamaskinen ved hjelp av Windows Utforsker.
3. Åpne seriefilen i CpG-modus i PyroMark Q24-programvaren ved å velge "Open" (Åpne) i menyen "File" (Fil) eller ved å dobbeltklikke på filen (📁) i snarveifunksjonen.
4. Klikk på en av analyseringsknappene for å analysere en serie og for å få en oversikt over resultatene.



Analyser alle brønner.



Analyser den valgte brønnen.

Analyseresultatene (metyleringsfrekvenser) og kvalitetsvurderingen vises over den variable posisjonen i Pyrogram[®]-sporet. Du finner mer informasjon om hvordan du analyserer en serie i *håndboken for PyroMark Q24*.

5. Du kan opprette en rapport ved å velge "CpG Full Report" (CpG fullstendig rapport) eller "CpG Analysis Results" (CpG analyseresultater) i menyen "Reports" (Rapporter).

Merk: For å få pålitelige resultater anbefaler vi enkelttopphøyder over 30 RLU. Angi 30 RLU som "required peak height for passed quality" (nødvendig topp for godkjent kvalitet) i analyseoppsettet (se vedlegg A på side 43 og *håndboken for PyroMark Q24*).

Merk: CpG-analyseresultatrapporten bør brukes som dokumentasjon på og tolkning av metyleringskvantifisering. Tallene som vises i pyrogrammet er avrundet og viser ikke nøyaktig kvantifisering.

Merk: Pyrogrammet må alltid sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. De målte toppene skal stemme overens med høydene på histogramsøylene.

Tolkning av resultater

Det er anbefalt å inkludere en DNA-prøve fra en frisk blodgiver i hver serie til sammenligning.

Kontrollprøven for hydrogensulfittkonvertering (markert med en gul stripe i vinduet Pyrogram) indikerer hvor langt hydrogensulfittkonverteringen har kommet. En påvisning i kontrollprøven for hydrogensulfittkonvertering kan indikere en ufullstendig hydrogensulfittkonvertering, som kan resultere i en avvikende metyleringskvantifisering, og vil generere en advarsel.

Verdiene for blank grense (LOB) angir metyleringsfrekvensene oppnådd fra prøver fra friske blodgivere med en sannsynlighet på 95 % (se tabell 8 og "Ytelseskarakteristikker" på side 34).

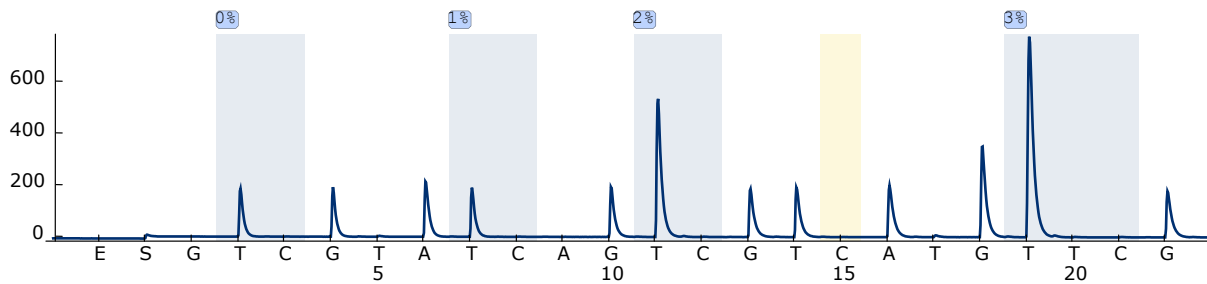
Tabell 8. LOB bestemt for spesifikke metyleringsområder ved bruk av prøver fra friske blodgivere

Posisjon	LOB (% enheter)
CpG-område 1	1,5
CpG-område 2	1,8
CpG-område 3	3,2
CpG-område 4	3,4
Gjennomsnittet for CpG-område 1 til 4	2,1

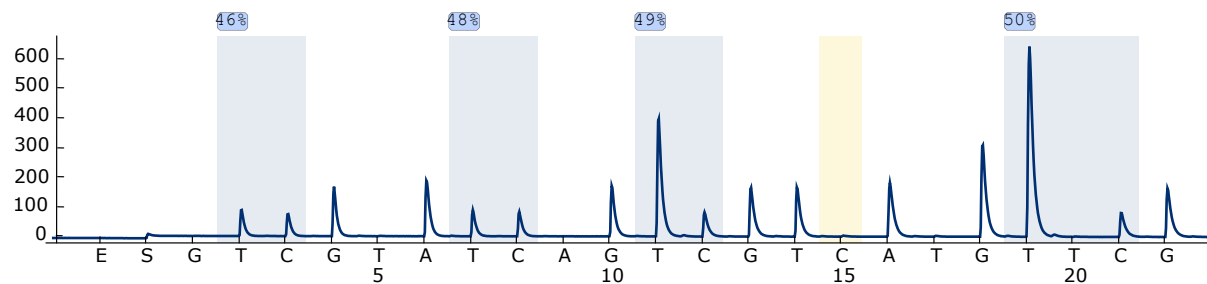
Merk: Disse verdiene var basert på serier der signalet var over 30 relative lysenheter (RLU), rutinemessig oppnådd fra 10 ng av DNA isolert fra blod (målt før hydrogensulfittkonvertering). Det er anbefalt at metodeytelsen bekreftes i laboratoriet.

Representative resultater

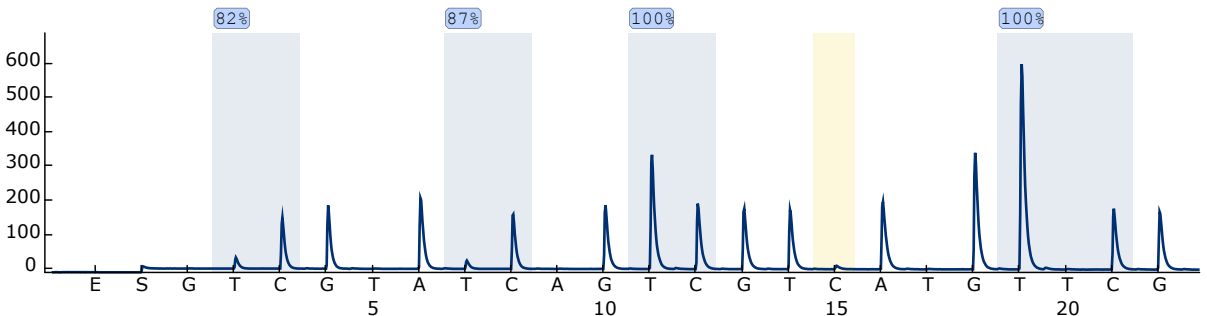
Representative Pyrogram-resultater er vist i figur 5–7.



Figur 5. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av umetylert hydrogensulfittkonvertert DNA fra en frisk donorblodprøve. Søylene ved inndeling 15 indikerer kontroll av fremgang i hydrogensulfittkonverteringen.



Figur 6. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av metylert hydrogensulfittkonvertert DNA. Søylene ved inndeling 15 indikerer kontroll av fremgang i hydrogensulfittkonverteringen.



Figur 7. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av høyt metylert hydrogensulfittkonvertert DNA (metylert kontroll-DNA, medfølger). Søylene ved inndeling 15 indikerer kontroll av fremgang i hydrogensulfittkonverteringen.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENS tekniske tjenester er alltid klare til å besvare alle spørsmål du måtte ha, enten om informasjon og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Merk: Se i håndboken til PyroMark Q24 for generell feilsøking i instrumentet.

Kommentarer og forslag

Signaler i ikke-templat-kontrollen (negativ kontroll)

- | | |
|-----------------------------|---|
| a) Krysstale mellom brønner | Signal fra én brønn er påvist i en brønn ved siden av. Unngå å plassere prøver med høy signalintensitet ved siden av brønner med "ikke-templat-kontroll". |
| b) PCR-kontaminering | Bruk sterile pipettespisser med filter. Oppbevar og ekstraher materialer som prøver, kontroller og amplikoner separat fra PCR-reagenser. |

Dårlig eller uventet sekvens

- | | |
|------------------------------------|---|
| a) Dårlig kvalitet på genomisk DNA | Genomisk DNA med dårlig kvalitet kan føre til at PCR mislykkes. Analyser PCR-prøver ved å bruke en elektroforetisk teknikk (for eksempel QIAxcel [®] -system eller agarosegelelektroforese). |
|------------------------------------|---|

Kommentarer og forslag

Resultatet "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes)

a) Lav topphøyde

Håndteringsfeil i PCR-oppsettet eller prøveklargjøring før pyrosekvensering kan føre til lave topper.

Det er viktig at prøvene blir fullstendig tatt opp av vakuumverktøyet. Sørg for at vakuumverktøyet senkes sakte ned til prøvene og at geometrien til PCR-platen eller remsene brukt til immobilisering tillater fullstendig optak av prøvene.

Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i *håndboken for PyroMark Q24* regelmessig og bytt filterprober når dette angis.

Hvis advarselen "Check" (Kontroller) kommer opp, må du sammenligne pyrogrammet nøye med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. Hvis de målte toppene stemmer overens med høydene på histogramsøyene, er resultatet gyldig. Hvis ikke, anbefales det å kjøre prøven på nytt.

b) Advarselen
"Uncertain/Failed
bisulfite conversion at
dispensation: 15"
(Usikker / ikke godkjent
hydrogensulfittkonvertering
ved fordeling: 15)
vises

Sørg for at verdiene for "Allowed percentage for passed quality" (Tillatt prosentantall for godkjent kvalitet) og "Allowed percentage for check quality" (Tillatt prosentantall for kontrollkvalitet) er satt til henholdsvis 7,0 og 10,0.

Merk: Ved kvalitetsvurderinger som "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) var hydrogensulfittkonverteringen ufullstendig, noe som kan påvirke metyleringskvantifiseringen.

For hydrogensulfittkonvertering anbefales EpiTect Bisulfite-sett (kat.nr. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite-sett (kat.nr. 59144) eller EpiTect Plus DNA Bisulfite-sett (kat.nr. 59124) fra QIAGEN. Følg protokollen for konvertering nøye.

Kommentarer og forslag

Høy bakgrunn

- | | |
|---|---|
| a) Feil oppbevaring av nukleotider | Nukleotider skal oppbevares ved 2–8 °C. Oppbevaring ved –10 til –25 °C kan forårsake en økning i bakgrunnen. |
| b) Kort tid for nedkjøling av prøver før pyrosekvenseringsanalyse | Prøvene på en PyroMark Q24-plateholder må holde romtemperatur i 10–15 minutter. Ikke kort ned tiden for nedkjøling. |
| c) Kontaminering av kasset | Rengjør kassetten grundig som beskrevet i produktarket. Beskytt kassetten mot lys og støv under oppbevaring. |

Ingen signaler i positive kontroller

- | | |
|---|---|
| a) Utilstrekkelig enzym eller substratblanding for alle brønner | Pass på å fylle PyroMark Q24-kassetten i henhold til "Pre Run Information" (Informasjon før analyse) i menyen "Tools" (Verktøy). |
| b) Feil oppbevaring eller fortynning av reagenser | Klargjør <i>therascreen</i> -reagenser i henhold til instruksjonene under "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24" på side 26. |
| c) Feil i PCR eller prøveklargjøring | Håndteringsfeil i PCR-oppsettet, programmering av PCR-syklere eller prøveklargjøring før pyrosekvenseringsanalyse kan føre til manglende signal. Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i <i>håndboken for PyroMark Q24</i> og bytt filterprober ved behov. Gjenta PCR-en og pyrosekvenseringsanalysen. |

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hvert parti med *therascreen* MGMT Pyro-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske eller laboratoriske funn.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse til andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGEN ytelsesevalueringstudier.

Ytelseskaraktistikker

Blank grense

Blank grense (LOB, tabell 9) er bestemt for de fire CpG-områdene analysert ved hjelp av *therascreen* MGMT Pyro-sett ved bruk av DNA-prøver fra friske blodgivere i henhold til anbefalinger fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protokoller for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer). α - og β -feil (henholdsvis falske positive og falske negative) ble satt til 5 %.

Verdiene for blank grense (LOB) angir metyleringsfrekvensene oppnådd fra prøver fra friske blodgivere med en sannsynlighet på 95 %.

Tabell 9. LOB bestemt for spesifikke metyleringsområder ved bruk av av prøver fra friske blodgivere

Posisjon	LOB (% enheter)
CpG-område 1	1,5
CpG-område 2	1,8
CpG-område 3	3,2
CpG-område 4	3,4
Gjennomsnittet for CpG-område 1 til 4	2,1

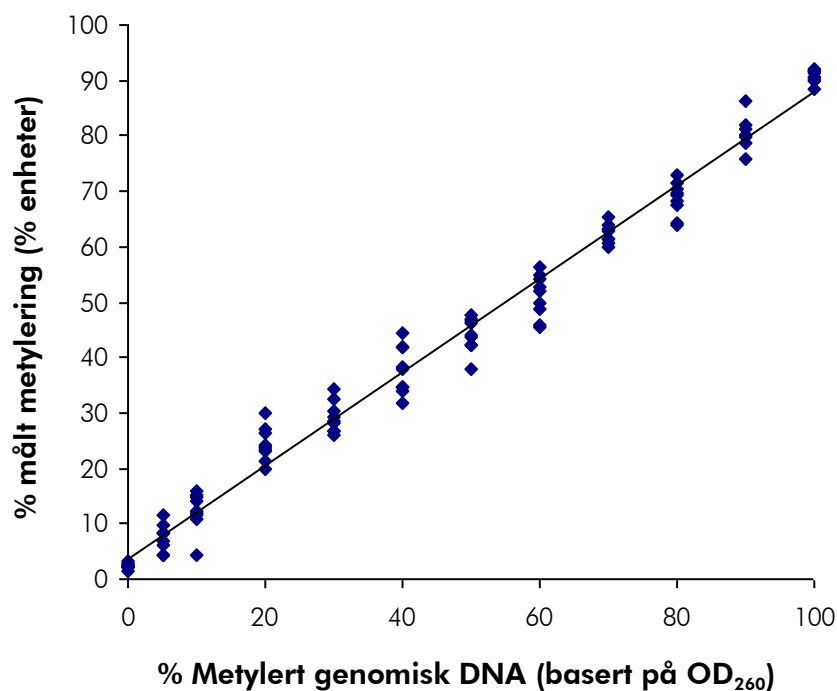
Merk: Det er anbefalt at metodeytelsen bekreftes i laboratoriet.

Linearitet

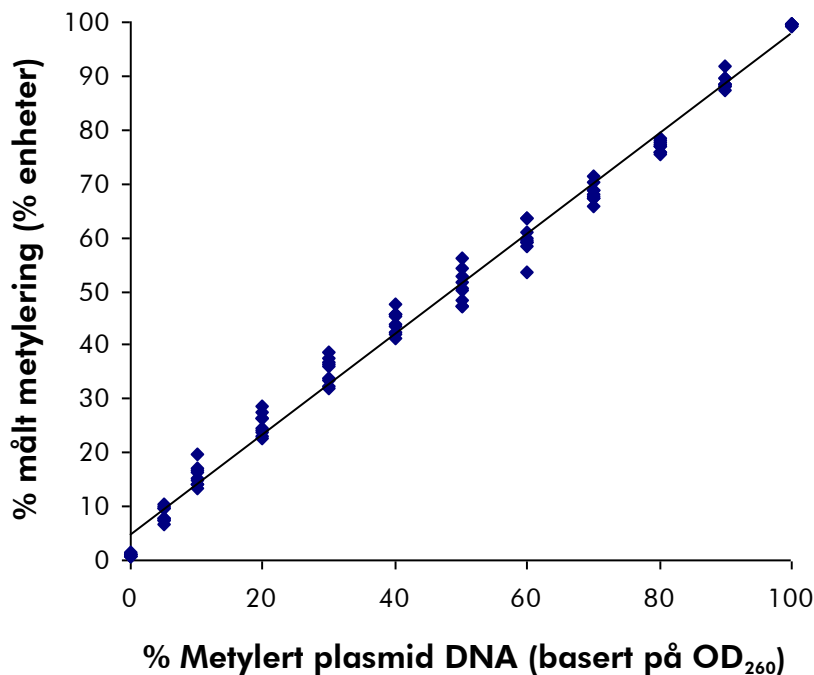
Linearitet ble bestemt ved å bruke metylert og umetylert hydrogensulfittkonvertert genomisk DNA fra EpiTect PCR Control DNA-settet (kat.nr. 59104) og ved parallell bruk av plasmidblandinger med den respektive hydrogensulfittkonverterte sekvensen fra en umetylert eller metylert prøve (f.eks. blandinger med henholdsvis C- og T-nukleotider i CpG-områder). Genomiske DNA og plasmider ble henholdsvis blandet i riktig forhold for å gi tolv nivåer av metylering (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, og 100 %). Hver blanding ble analysert med tre forskjellige partier av *therascreen* MGMT Pyro-settet i tre pyrosekvenseringsserier med tre replikater hver.

Resultatene (n = 9 for hvert mutasjonsnivå) ble analysert i henhold til CLSI Guideline EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Evaluering av linearitet til kvantitative måleprosedyrer: En statistisk fremgangsmåte. Godkjente retningslinjer) ved å bruke Analyse-it[®]-programvaren v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) og vises i figur 8 og 9 for gjennomsnittlig metylering av CpG-område 1 til 4 ved bruk av henholdsvis genomisk eller plasmid DNA som templat.

Resultatene var lineære med en tillatt ikke-linearitet på 5 % enheter i det testede området på 0 til 100 % metyleringsnivå for hvert individuelle metyleringsområde og for gjennomsnittet for de fire metyleringsområdene.



Figur 8. Linearitet for gjennomsnittlig metylering av CpG-område 1 til 4 ved bruk av blandinger med Epiect kontroll-DNA.



Figur 9. Linearitet for gjennomsnittlig metylering av CpG-område 1 til 4 ved bruk av blandinger med plasmid DNA.

Presisjon

Presisjonsdataene gjør det mulig å bestemme analysens totale variasjon og ble oppnådd på tre forskjellige nivåer ved å analysere de ovennevnte blandinger med genomisk og plasmid DNA med tre replikater hver.

Repeterbarhet (variasjon for intra-analyse og mellom-batch) ble beregnet basert på dataene for bestemmelse av linearitet (tre serier på samme dag ved å bruk vekslende partier av *therascreen* MGMT Pyro-settet). Intermediær presisjon (variasjon for intra-laboratorium) ble bestemt i tre serier i ett laboratorium på tre forskjellige dager med vekslende brukere, PyroMark Q24-instrumenter og partier av *therascreen* MGMT Pyro-settet. Reproduserbarhet (variasjoner mellom laboratorier) ble beregnet fra to serier hver i et internt og eksternt laboratorium og ved å bruke vekslende partier av *therascreen* MGMT Pyro-settet.

Presisjonsestimater uttrykkes som standardavvik for de målte gjennomsnittlige metyleringsfrekvensene for CpG-område 1 til 4 (tabell 10 og 11).

Repeterbarheten, den intermediære presisjonen og reproduserbarheten ved bruk av blandinger med genomisk DNA var innenfor henholdsvis 0,5–4,3, 0,4–4,0 og 0,4–4,4 % enheter i det målte området på 0 til 100 % metyleringsnivå. Lignende resultater ble oppnådd ved bruk av blandinger med plasmid DNA (se tabell 11).

Figur 10. Presisjon for gjennomsnittlig metylering av CpG-område 1 til 4 ved bruk av EpiTect kontroll-DNA*

% metylert EpiTect kontroll-DNA [†]	Repeterbarhet		Intermediær presisjon		Reproduserbarhet	
	Gjennomsnitt	SA [‡]	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

* Alle verdier er angitt som % enheter.

[†] Basert på OD₂₆₀-måling.

[‡] SA: standardavvik (n = 9 for repeterbarhet og intermediær presisjon, n = 12 for reproduserbarhet).

Tabell 11. Presisjon for gjennomsnittlig metylering av CpG-område 1 til 4 ved bruk av blandinger med plasmid DNA*

Blanding med plasmid DNA (%) [†]	Repeterbarhet		Intermediær presisjon		Reproduserbarhet	
	Gjennomsnitt	SA [‡]	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

* Alle verdier er angitt som % enheter.

[†] Basert på OD₂₆₀-måling. Verdiene 0–100 % indikerer prosentandelen av plasmid som bærer C-nukleotider i CpG-områder (representerer metylerte C-nukleotider) i en blanding med plasmid som bærer T-nukleotider i CpG-områder (representerer umetylerte C-nukleotider).

[‡] SA: standardavvik (n = 9 for repeterbarhet og intermediær presisjon, n = 12 for reproduserbarhet).

Diagnostisk vurdering

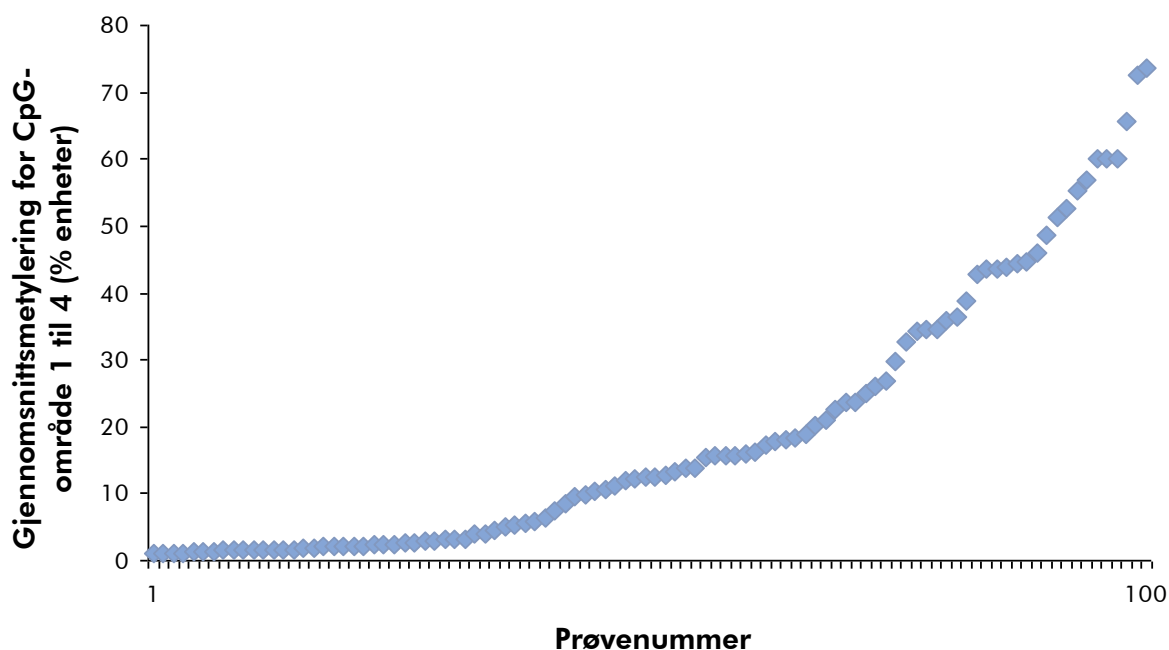
therascreen MGMT Pyro-settet ble vurdert i sammenligning med Sanger-sekvensering. DNA ble ekstrahert fra 100 formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) tumorprøver fra glioblastom og analysert for metylering i de fire CpG-områdene analysert med *therascreen* MGMT Pyro-sett.

DNA ble isolert ved å bruke QIAamp DNA FFPE Tissue-settet og hydrogensulfittkonvertert ved bruk av Epiect Bisulfite-settet.

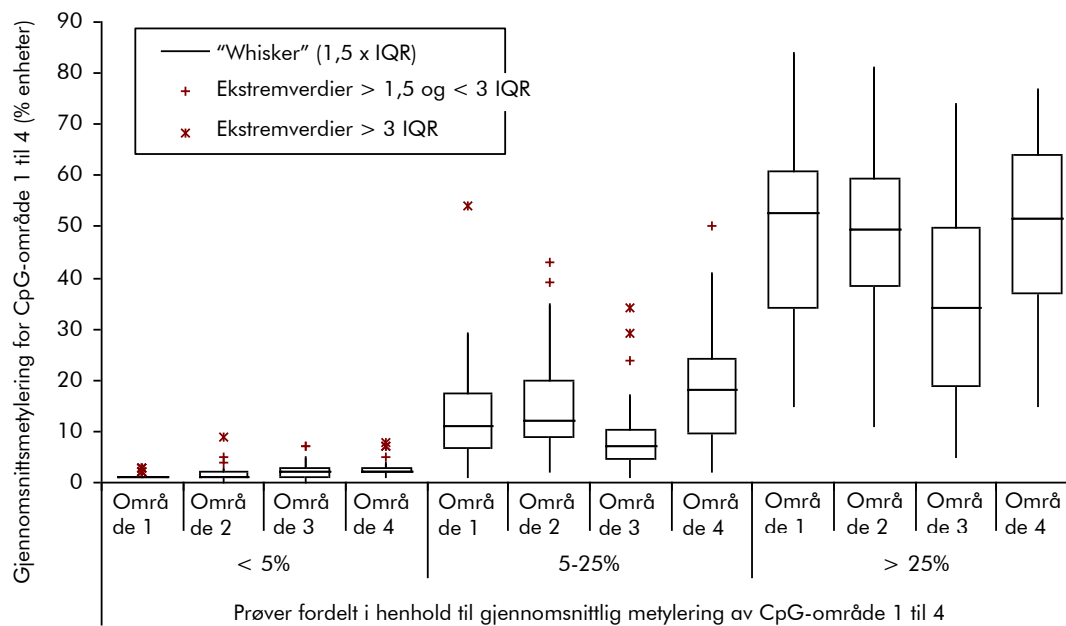
Pyrosekvenseringsanalyse ble utført med *therascreen* MGMT Pyro-settet på PyroMark Q24 og Sanger-sekvensering på ABI™ 3130 genanalyseapparat.

Blant 100 prøver som ble analysert med Sanger-sekvensering, kunne metyleringsstatus bestemmes i 49 prøver, mens det med *therascreen* MGMT Pyro-settet var mulig å bestemme metyleringsnivået i alle prøvene.

Gjennomsnittlige metyleringsnivåer mellom 1 og 74 % enheter ble bestemt i de 100 prøvene ved pyrosekvenseringsanalyse (figur 10). Fordelingen av metyleringsnivåer for de enkelte områdene er vist i figur 11.



Figur 10. Gjennomsnittlig metylering av CpG-område 1 til 4 oppnådd for 100 glioblastomprøver ved bruk av *therascreen* MGMT Pyro-sett. Prøvene er sortert etter stigende metyleringsnivå.



Figur 11. Fordeling av metylering i CpG-enkeltområder i 100 glioblastoprøver ved bruk av *therascreen* MGMT Pyro-sett. Prøvene er sortert etter gjennomsnittlig metylering i CpG-områdene 1 til 4. Boksene representerer øvre og nedre kuartil (25. og 75. percentil) delt opp etter medianen (50. persentil, vist som en horisontal linje). Verdier som ligger utenfor dette området vises som "whiskers" og ekstremverdier, som indikert i boksplott-oversikten. IQR: Interkvartil område.

For å sammenligne metoder ble umetylert eller metylert status angitt for resultater av pyrosekvenseringsanalyse ved bruk av 5 % enheter gjennomsnittsmetylering av CpG-områdene 1 til 4, mens resultater av Sanger-sekvensering ble fordelt manuelt til umetylert eller metylert status.

Trettito prøver ble detektert som metylerte med Sanger-sekvensering. I alle tilfeller kunne metyleringsstatusen gjenskapes med *therascreen* MGMT Pyro-sett. To ytterligere prøver ble rapportert som metylerte ved pyrosekvensering, mens metylering ikke ble oppdaget for prøver med Sanger-sekvensering. Av 19 umetylerte prøver detektert ved Sanger-sekvensering, ble det samme resultatet rapportert for 17 prøver ved bruk av *therascreen* MGMT Pyro-sett. Resultatene er illustrert i tabell 12.

Med unntak av prøver som ikke ble godkjent ved Sanger-sekvenseringsanalyse, viste *therascreen* MGMT Pyro-settet og Sanger-sekvensering 96 % overensstemmelse i resultater (tabell 12).

Tabell 12. Resultater for metyleringsanalyse i CpG-område 1 til 4 for analyserte glioblastoprøver

		Sanger-sekvensering			
		Umetylert	Metylert	Ukjent	Totalt
therascreen MGMT Pyro-sett	Umetylert	17	0	18	35
	Metylert	2	32	31	65
	Ukjent	0	0	0	0
	Totalt	19	32	49	100










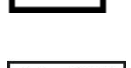
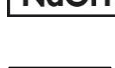
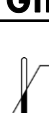


Merk: I alle serier brukt til å bestemme ytelseskaraktistikker, ble signalet på over 30 RLU rutinemessig oppnådd fra 10 ng av DNA isolert fra blod (målt før hydrogensulfittkonvertering).

Referanser

QIAGEN opprettholder en stor, oppdatert elektronisk database med vitenskapelige publikasjoner ved bruk av QIAGEN-produkter. Omfattende søkealternativer gjør at du kan finne de artiklene du har behov for, enten med et enkelt nøkkelordsøk eller ved å spesifisere applikasjonen, forskningsområdet, tittelen, osv.

Du finner en fullstendig liste over referanser i QIAGENS referansedatabase på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller ved å ta kontakt med QIAGENS tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Symboler

	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester
	Skal brukes innen
	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Partinummer (lot)
	Materialnummer
	Komponenter
	Innhold
	Nummer
	Natriumhydroksyd
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent
	Se informasjonen som gis i håndboken



Kontaktinformasjon

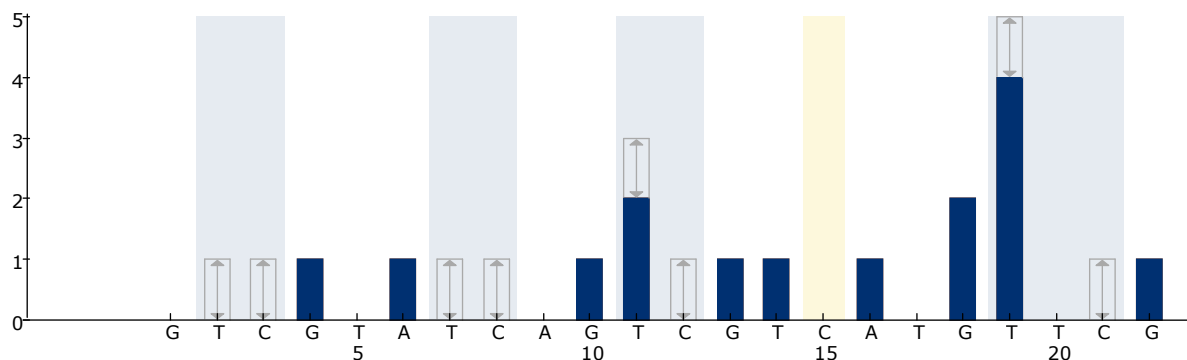
Hvis du ønsker teknisk assistanse eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenters på www.qiagen.com/Support eller ringe en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller www.qiagen.com).

Vedlegg A: Oppsett av MGMT-analyse

Før du kjører MGMT-analysen for første gang, må analysefilen angis. Angi MGMT-analysen med PyroMark Q24-programvaren som beskrevet nedenfor.


Prosedyre

1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New CpG Assay" (Ny CpG-analyse).
2. Skriv inn sekvensen i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens):
YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT
3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):
GTCGTATCAGTCGTCATGTTCCG
4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Topp høydeterskel – Nødvendig topp for godkjent kvalitet) til 30.
5. Angi "Allowed percentage for passed quality" (Tillatt prosentantall for godkjent kvalitet) og "Allowed percentage for check quality" (Tillatt prosentantall for kontrollkvalitet) i fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) til henholdsvis 7,0 og 10,0.
6. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "MGMT".



Figur 12. Histogram for MGMT-analysen. Søylen ved inndeling 15 indikerer kontrollen av fremgang i hydrogensulfittkonverteringen.

Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar

ADVARSEL 	Farlige kjemikalier Denatureringsløsningen som brukes med vakuumarbeidsstasjonen inneholder natriumhydroksid som kan irritere øyne og hud. Vernebriller, beskytteshansker og laboratoriefrakk må alltid benyttes. Ansvarshavende (f.eks. laboratoriesjef) må ta nødvendige forholdsregler for å sikre at arbeidsområdet er trygt og at brukerne av instrumentene ikke utsettes for farlige nivåer av giftige substanser (kjemiske eller biologiske) slik det er angitt i de aktuelle HMS-databladene (SDS) eller OSHA*-, ACGIH [†] - eller COSHH [‡] -dokumentene. Luftesystemer for avgasser og avfallssystemer må være i samsvar med alle nasjonale, regionale og lokale lover og helse- og sikkerhetsregler.
--	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

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

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Storbritannia)

Statlige og lokale miljøkrav til håndtering av laboratorieavfall må overholdes.

Viktige poeng før du starter

- Denne protokollen krever vann med høy renhetsgrad.

Prosedyre

- B1. Se til at vakuumverktøyet ikke mottar noe vakuum. Pass på at vakuomet er stengt av (Off) og at vakuumpumpen er slått av.**
- B2. Resterende løsninger som er igjen i karene skal kastes.**
- B3. Skyll karene med vann med høy renhetsgrad, eller bytt dem ut om nødvendig.**
- B4. Tøm avfallsbeholderen.**
- B5. Korke kan fjernes uten at slangene må kobles fra.**
- B6. Hvis vakuumarbeidsstasjonen må rengjøres (for eksempel pga. støv eller søl), må du følge instruksjonene angitt i *håndboken for PyroMark Q24*.**

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	For 48 reaksjoner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenseringsprimer, PCR-primere, metylert kontroll-DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-konsentrat, PyroMark bindingsbuffer, PyroMark hybridiseringsbuffer, PyroMark denatureringsløsning, PyroMark vaskebuffer, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP og H ₂ O	971061
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-brønners reaksjonsplate til sekvensering	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter til pipettering av nukleotider og reagenser	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Filterprober til flergangsbruk for PyroMark vakuumarbeidsstasjon Q96 og Q24	979010
PyroMark Control Oligo	For installasjonskontroll av systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	For bekreftelse av systemytelse	979304
Tilknyttede produkter		
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001514

Produkt	Innhold	Katalognr.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Brukerorientert programvare	9019063
PyroMark Q24 Software	Analyseprogramvare	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute [®] -kolonner, Proteinase K, buffere, prøverør (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Til 48 klargjøringer: Reagenskassetter (vev), filterspisser til engangsbruk, spissholdere til engangsbruk, prøverør (2 ml), elusjonsrør (1,5 ml), buffer G2, proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini Spin-kolonner, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104
EpiTect Bisulfite Kit	Til 48 klargjøringer: EpiTect Bisulfite Spin-kolonner, reaksjonsblanding, DNA Protect-buffer, bærer-RNA, buffere	59104
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Til 48 klargjøringer: MinElute DNA Spin-kolonner, hydrogensulfittblanding, beskyttelsesbuffer for DNA, bærer-RNA, buffere, Deparaffinization-løsning, Lysis FTB-buffer	59144

* Kun Storbritannia.

† Alle andre land.

Produkt	Innhold	Katalognr.
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Til 48 klargjøringer: MinElute DNA Spin-kolonner, hydrogensulfittblanding, beskyttelsesbuffer for DNA, bærer-RNA, buffere	59124
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Kontrollsett for menneskelig DNA (inneholder både hydrogensulfittkonvertert metylert og umetylert DNA og ikke-konvertert umetylert DNA) for 100 kontroll-PCR-er	59695

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasingelser, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-settet er tilgjengelig på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENS tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

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

Begrenset lisensavtale

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av *therascreen* MGMT Pyro-settet samtykker i følgende vilkår:

1. *therascreen* MGMT Pyro-settet kan bare brukes i samsvar med *håndboken for theascreen MGMT Pyro-sett* og bare til bruk med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkluderte i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i *håndboken for theascreen MGMT Pyro-sett* og flere protokoller som nå finnes på www.qiagen.com.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

© 2015 QIAGEN. Med enerett.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

