

Mei 2016

Handleiding *therascreen*[®] RAS Extension Pyro[®]-kit



Versie 1

IVD

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor de detectie van mutaties in exons 3 en 4 van het menselijke KRAS-oncogen en exons 2, 3 en 4 van het menselijke NRAS-oncogen

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DUITSLAND

R2

MAT

1085873NL



Inhoud

Beoogd gebruik.....	5
Samenvatting en uitleg	5
Uitgangspunt van de procedure.....	7
Controles	8
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit	9
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	11
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	14
Algemene voorzorgsmaatregelen	14
Opslag en verwerking reagentia	15
Afname, preparatie voor analyse en bewaren van monsters	16
Procedure	18
DNA-isolatie	18
Protocol 1: Runopstelling voor het PyroMark Q24-systeem	18
Protocol 2: PCR met gebruik van de PCR-reagentia die zijn meegeleverd met de therascreen RAS Extension Pyro-kit	21
Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance parels	25
Protocol 4: Voorbereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse op de PyroMark Q24	27
Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken	32
Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run	35
Interpretatie van de resultaten	40

Interpretatie van analyseresultaten en detectie van low-level mutaties	40
Handleiding voor het oplossen van problemen	48
Kwaliteitscontrole.....	50
Beperkingen.....	50
Kwaliteitskenmerken.....	51
Blancolimiet en detectielimiet	51
Mutaties GGT > TGT en GGT > GTT in NRAS-codon 13.....	53
Lineariteit.....	54
Nauwkeurigheid	55
Diagnostisch onderzoek	57
Referenties	61
Symbolen	62
Contactgegevens.....	63
Appendix A: <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro-assays opstellen	64
Appendix B: De afvalcontainer en bakjes legen	70
Bestelgegevens.....	72

Beoogd gebruik

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit is een diagnostische in-vitrotest op basis van Pyrosequencing®-technologie voor de kwantitatieve detectie van mutaties in codons 59, 61, 117 en 146 van het menselijke KRAS-oncogen en codons 12, 13, 59, 61, 117 en 146 van het menselijke NRAS-oncogen, met behulp van DNA dat is geëxtraheerd uit in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (FFPE) menselijk weefsel van gemetastaseerde colorectale kanker (mCRC).

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit is bedoeld om te helpen bij de identificatie van mCRC-patiënten die waarschijnlijk meer baat hebben bij anti-EGFR-behandelingen, zoals cetuximab en panitumumab (1).

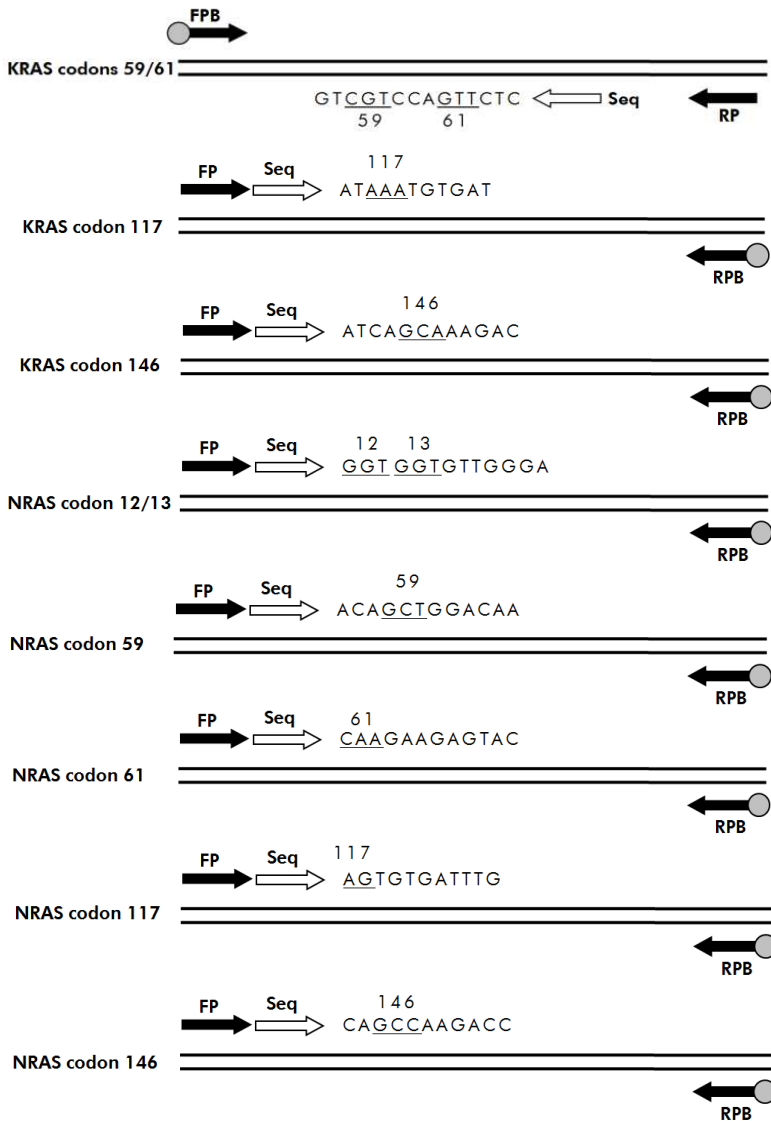
De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit is alleen voor gebruik op het PyroMark® Q24-systeem. PyroMark Q24-systemen omvatten het volgende:

- Het PyroMark Q24-instrument of het PyroMark Q24 MDx-instrument.
- Het PyroMark Q24-vacuümwerkstation of het PyroMark Q24 MDx-vacuümwerkstation.
- De PyroMark Q24-software (versie 2.0) of PyroMark Q24 MDx-software (versie 2.0).

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers, zoals technici en artsen die zijn opgeleid in in-vitrodiagnostiek, moleculaire biologische technieken en het PyroMark Q24-systeem.

Samenvatting en uitleg

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit wordt gebruikt voor kwantitatieve metingen van mutaties in exons 3 en 4 van het menselijke KRAS-gen en exons 2, 3 en 4 van het menselijke NRAS-gen. De kit bestaat uit 8 assays (zie Afbeelding 1).



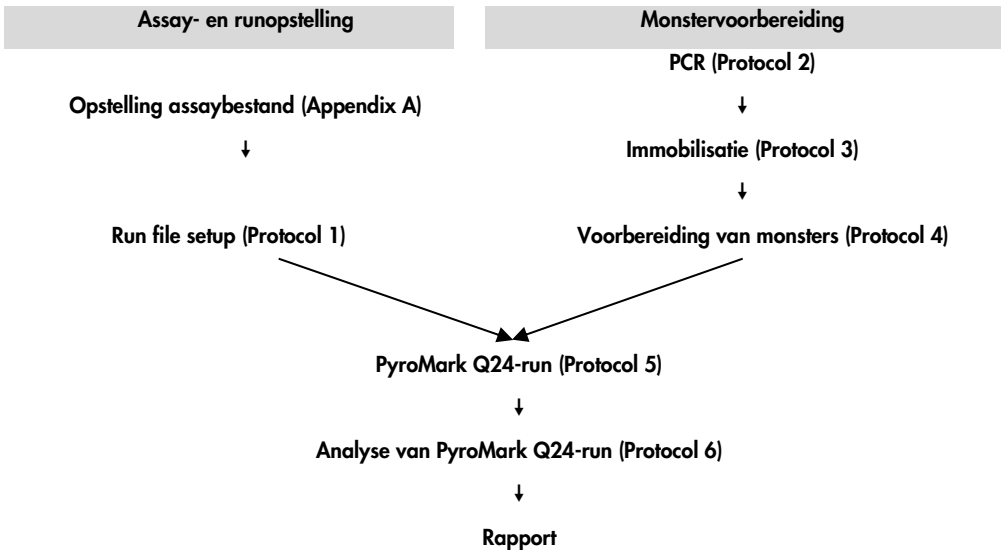
Afbeelding 1. Assays van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit.

De 8 regio's worden afzonderlijk door PCR geamplificeerd en door de gedefinieerde regio gesequenced. Mutaties in de gedekte regio leiden tot duidelijke patronen in de Pyrogram®-trace die kunnen worden onderscheiden van traces die zijn verkregen uit wildtype monsters. Mutaties die met de PyroMark Q24-software kunnen worden geanalyseerd, worden vermeld in Tabel 15 (Appendix A: *therascreen* RAS Extension Pyro-assays opstellen). De assays voor KRAS-codon 117 en 146 en NRAS-codon 12/13, 59, 61, 117 en 146, zijn gesequenced in voorwaartse richting terwijl de assay voor KRAS-codon 59/61 is gesequenced in achterwaartse richting. Het product bestaat uit een PCR-primermengsel en een sequencing-primer voor elke assay. De primers worden geleverd in oplossing, waarbij elke flacon 24 µl primer of primermengsel bevat.

Uitgangspunt van de procedure

Afbeelding 2 hieronder toont de workflow van de assayprocedure. Nadat PCR is uitgevoerd, worden primers specifiek gericht op het interessegebied en worden de amplicons geïmmobiliseerd op Streptavidin Sepharose® High Performance parels. Enkelstrengs DNA wordt voorbereid en de overeenkomende sequencing-primers hybridiseren aan het DNA. De monsters worden vervolgens op de PyroMark Q24 geanalyseerd met behulp van assayopstellingsbestanden en een runbestand.

De "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie) kan worden afgesteld voor het detecteren van verschillende mutaties na de run (zie "Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run", pagina 35 en "Appendix A: *therascreen* RAS Extension Pyro-assays opstellen", pagina 64).



Afbeelding 2. Workflow van procedure van *therascreen* RAS Extension Pyro-kit.

Controles

De kit bevat ongemethyleerd controle-DNA als een positieve controle voor PCR- en sequencing-reacties. Dit controle-DNA heeft een wildtype genotype in de gesequencede regio's met deze kit. Neem een monster van het controle-DNA op voor elke assay in elke Pyrosequencing-run. Dit is vereist voor adequate interpretatie van resultaten en identificatie van low-level mutaties (zie "Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run", pagina 35).

Ook dient er voor ten minste één assay een negatieve controle (zonder template-DNA) in elke PCR-opstelling te worden opgenomen.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

Doos 1/2

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
Catalogusnr.	971590
Aantal preparaten	24
Seq Primer KRAS 59/61	24 µl
Seq Primer KRAS 117	24 µl
Seq Primer KRAS 146	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13	24 µl
Seq Primer NRAS 59	24 µl
Seq Primer NRAS 61	24 µl
Seq Primer NRAS 117	24 µl
Seq Primer NRAS 146	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61	24 µl
PCR Primer KRAS 117	24 µl
PCR Primer KRAS 146	24 µl
PCR Primer NRAS 12/13	24 µl
PCR Primer NRAS 59	24 µl
PCR Primer NRAS 61	24 µl
PCR Primer NRAS 117	24 µl
PCR Primer NRAS 146	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1.2 ml
H ₂ O	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA (ongemethyleerd controle-DNA), 10 ng/µl	3 x 100 µl

Box 2/2

Buffers and reagents	Volume
PyroMark Binding Buffer (bindbuffer)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (hybridisatiebuffer)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (denaturatieoplossing)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (spoelbuffer), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (enzymmengsel)	2 flacons
Substrate Mixture (substraatmengsel)	2 flacons
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
Handleiding theascreen <i>RAS Extension Pyro Kit Handbook</i> (Engels)	1

* Bevat natriumhydroxide

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Voor meer informatie raadpleegt u de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's), verkrijgbaar bij de productleverancier.

Reagentia

- DNA-isolatiekit (zie "DNA-isolatie", pagina 18)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, cat.nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Water van hoge zuiverheid (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm of vergelijkbaar)
Opmerking: In de kit wordt voldoende water meegeleverd voor PCR, DNA-immobilisatie en voor het oplossen van het enzymmengsel en het substraatmengsel; er is aanvullend water van hoge zuiverheid vereist om PyroMark Wash Buffer (spoelbuffer), 10x te verdunnen.
- Ethanol (70%)*

Verbruiksartikelen

- Steriele pipettips (met filters voor PCR-opstelling)
- PCR-platen met 24 putjes (zie "Aanbevolen platen met 24 putjes", pagina 13)
- Plakfolie
- PyroMark Q24 Plate (PyroMark Q24-plaat) (cat.nr. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (PyroMark Q24-cartridge) (cat.nr. 979302)†

* Gebruik geen gedenatureerde alcohol, die andere substanties bevat, zoals methanol of methylethylketon.

† Met CE-IVD-markering volgens EU-richtlijn 98/79/EC. Alle overige vermelde producten hebben geen CE-IVD-markering op basis van EU-richtlijn 98/79/EC.

Apparatuur

- Pipetten (afstelbaar)*
- Benchtop-microcentrifuge*
- Thermische cycler* en geschikte PCR-buisjes
- PyroMark Q24 MDx of PyroMark Q24 (cat.nr. 9001513 of 9001514)*
- PyroMark Q24 MDx- of PyroMark Q24 Vacuum Workstation (vacuümwerkstation) (cat.nr. 9001515 of 9001516 of 9001518 of 9001519)*
- Plaatmixer* voor immobilisatie aan parels (zie "Aanbevolen plaatmixers", pagina 13)
- Verwarmingsblok* dat 80 °C kan bereiken

* Zorg ervoor dat instrumenten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Aanbevolen plaatmixers

De orbitale plaatmixers in Tabel 1 worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit.

Tabel 1. Plaatmixers die worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit

Fabrikant	Product	Catalogusnr.
Eppendorf	ThermoMixer® C (basisapparaat)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Aanbevolen platen met 24 putjes

De platen met 24 putjes in Tabel 2 worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit.

Tabel 2. Platen met 24 putjes die worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit

Fabrikant	Product	Catalogusnr.
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24-well	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostiek.

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) voor meer informatie. Deze zijn als handige en compacte PDF beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de VIB voor elke QIAGEN-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.

Algemene voorzorgsmaatregelen

Besteed altijd aandacht aan het volgende:

- Dit product bevat voldoende onderdelen om voor elke assay 24 reacties uit te voeren.
- Gebruik steriele pipettips (met filters voor PCR-opstelling).
- Positieve materialen (specimens, positieve controles en amplicons) dienen apart van alle andere reagentia te worden opgeslagen en te worden geëxtraheerd en in een ruimtelijk gescheiden instelling aan het reactiemengsel te worden toegevoegd.
- Ontdooi alle onderdelen volledig bij kamertemperatuur (15–25 °C) voordat u een assay start.
- Als de onderdelen zijn ontdooid, mengt u deze (door herhaaldelijk op en neer te pipetteren of te mengen met een pulse-vortexmixer) en centrifugeer kort.
- Mislukte resultaten zijn geen basis voor een oordeel over de mutatiestatus.

Opslag en verwerking reagentia

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit wordt in 2 dozen verzonden. De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit (doos 1/2) wordt verzonden op droogijs. PyroMark PCR-mastermengsel, CoralLoad-concentraat, ongemethyleerd controle-DNA en alle primers dienen bij aankomst te worden opgeslagen bij -15 tot -25 °C.

De Pyro-buffers en -reagentia (doos 2/2) met buffers, enzymmengsel, substraatmengsel, dATPaS, dCTP, dGTP en dTTP (de reagentia voor Pyrosequencing-analyse) worden verzonden met koelelementen. Deze onderdelen dienen bij aankomst te worden opgeslagen bij 2–8 °C. Om activiteitenverlies te beperken, wordt geadviseerd om zowel het enzymmengsel als het substraatmengsel in de meegeleverde flacons te bewaren.

Gereconstitueerde enzym- en substraatmengsels zijn minstens 10 dagen stabiel bij 2–8 °C. Gereconstitueerde enzym- en substraatmengsels kunnen worden ingevroren en in hun flacons worden opgeslagen bij -15 tot -25 °C. Bevroren reagentia dienen niet te worden blootgesteld aan meer dan 6 invries-ontdooicycli.

Opmerking: Nucleotiden mogen niet worden ingevroren.

Bij opslag onder deze omstandigheden is de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit stabiel tot de vervaldatum van de kit.

Afname, preparatie voor analyse en bewaren van monsters

Opmerking: Alle monsters dienen te worden behandeld als potentieel besmettelijk materiaal.

Monstermateriaal moet humaan genomisch DNA zijn dat is geëxtraheerd uit FFPE-weefsel. Monsters moeten volgens standaardpathologiemethodiek worden vervoerd om monsterkwaliteit te waarborgen.

Tumormonsters zijn heterogeen en gegevens afkomstig uit een bepaald tumormonster zijn mogelijk niet identiek aan die van andere coupes van dezelfde tumor. Tumormonsters kunnen ook niet-tumorweefsel bevatten. Van DNA van weefsel zonder tumor is niet te verwachten dat het de mutaties bevat die de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit detecteert.

Vorbereiding van weefselmonsters

Opmerking: Gebruik droge scalpels. Voer deze stap niet uit in een laminaire luchtstroomkast of zuurkast.

- Schraap het tumorweefsel van de coupes in gemerkte microcentrifugebuisjes. Gebruik voor elk monster een nieuw scalpel.

Preparatie van weefselmonsters voor DNA-extractie

- Gebruik standaardmaterialen en -methoden voor het fixeren van het weefselmonster in 10% neutraal gebufferde formaline (NBF, neutral buffered formalin) en het inbedden van het weefselmonster in paraffine. Snij met behulp van een microtoom seriecoupes van 5 µm van het paraffineblok en plaats deze op objectglasjes.
- Een getrainde medewerker (zoals een patholoog) moet een met hematoxilyne en eosine (H&E) gekleurde coupe beoordelen op tumorgehalte en contaminatie van het gebied.

Markeer de gekleurde objectglasjes om tumorweefsel te onderscheiden van normaal weefsel. Gebruik seriecoupes voor DNA-extractie.

- Gebruik coupes met > 20% tumorgehalte per gebied voor verwerking zonder macrodissectie (zie het volgende punt).
- Voor coupes met < 20% tumorgehalte per gebied, voert u macrodissectie uit op een of meerdere coupes. Werp het weefsel zonder tumor weg.
- Voor coupes die groter zijn dan < 4 mm², verwerkt u twee of meerdere coupes om het totale tumorgebied te vergroten tot minimaal 4 mm² (van toepassing op coupes met en zonder macrodissectie). Werp het weefsel zonder tumor weg.
- Schraap overtollige paraffine met behulp van een nieuw, steriel scalpel van het weefsel weg.

Bewaren

Bewaar FFPE-blokken en objectglasjes met FFPE op kamertemperatuur. Objectglasjes kunnen maximaal 4 weken bij omgevingstemperatuur worden bewaard voorafgaand aan DNA-extractie.

Genomisch DNA kan maximaal 1 week na extractie worden bewaard bij 2–8 °C, en vervolgens maximaal 8 weken voorafgaand aan gebruik bij -15 tot -25 °C.

Procedure

DNA-isolatie

De QIAGEN-kit die hieronder in Tabel 3 wordt weergegeven, wordt aanbevolen voor DNA-zuivering voor het geïndiceerde type menselijk monster en voor gebruik met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit. Voor gebruik van deze kit volgt u de instructies voor DNA-zuivering in de betreffende handleiding van de kit.

Tabel 3. DNA-zuiveringskits die worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit


Monstermateriaal	Kit isolatie nucleïnezuur	Catalogusnr.
In paraffine ingebed weefsel	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404


Protocol 1: Runopstelling voor het PyroMark Q24-systeem

Wat u moet doen voor u begint

- Maak een assayopstelling zoals wordt beschreven in Appendix A: *therascreen* RAS Extension Pyro-assays opstellen op pagina 64. Dit hoeft slechts eenmaal te worden gedaan, voordat de RAS Extension Pyro-assay voor de eerste keer wordt uitgevoerd.
- Voorkom dat monsters met hoge signaalintensiteiten naast putjes met templateloze controles en putjes met verwachte lage signalen worden geplaatst. Dit kan leiden tot kruiscommunicatiesignalen tussen putjes, waarbij een signaal van één putje in een aangrenzend putje wordt gedetecteerd.

Procedure

1. Klik op  op de werkbalk.
Er wordt een nieuw runbestand gemaakt.
2. Voer de runparameters in (zie "Runparameters", pagina 19).

3. Stel de plaat op door voor alle 8 assays van de therascreen RAS Extension Pyro-kit assays toe te voegen aan putjes die overeenkomen met de te analyseren monsters.
Opmerking: Er dient voor ten minste één assay een negatief controlemonster (zonder template-DNA) in elke PCR-opstelling te worden opgenomen.
Opmerking: Neem een monster met ongemethyleerd controle-DNA op als een wildtype controle voor elke assay in elke Pyrosequencing-run (zie "Afbeelding 2. Workflow van procedure van therascreen RAS Extension Pyro-kit.", pagina 8).
4. Als de run is opgesteld en klaar is om te worden uitgevoerd op het PyroMark Q24-systeem, drukt u een lijst af met vereiste volumes van enzymmengsel, substraatmengsel en nucleotiden en de opstelling van de plaat. Selecteer "Pre Run Information" (Pre-run-informatie) in het menu "Tools" (Hulpmiddelen). Als het rapport wordt weergegeven, klikt u op .
5. Sluit het runbestand en kopieer dit met behulp van Windows® Verkenner naar een USB-stick (meegeleverd met het systeem).
Opmerking: De afgedrukte pre-run-informatie kan worden gebruikt als sjabloon voor de monsteropstelling (zie "Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance parels", pagina 25).
Opmerking: Zie "Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken", pagina 32 om de plaat op het PyroMark Q24-systeem uit te voeren.

Runparameters

- **Run name (Runnaam):** De naam die de run krijgt als het bestand wordt opgeslagen. Als de naam van het bestand wordt gewijzigd, wordt de naam van de run ook gewijzigd.
- **Instrument method (Instrumentmethode):** Selecteer de instrumentmethode volgens de cartridge die voor de run wordt gebruikt. Raadpleeg hiervoor de instructies die met de producten zijn meegeleverd.
- **Plate ID (Plaat-ID, optioneel):** Voer een streepjescodenummer voor de plaat in of, als u een streepjescodelezer op uw computer hebt aangesloten, plaats de muiscursor in het tekstvak "Barcode" (Streepjescode) door op het vak te klikken en scan de streepjescode.

- **Bar code (Streepjescode, optioneel):** Enter a bar code number for the plate or, if you have a bar code reader connected to your computer, place the mouse cursor in the "Barcode" text box (by clicking the box) and scan the bar code.
- **Kit and reagent ID (Kit- en reagens-ID, optioneel):** Voer het partijnummer in van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit die wordt gebruikt. Dit partijnummer vindt u op het productetiket.
Opmerking: Wij raden aan om beide partijnummers in te voeren, zodat eventuele onverwachte problemen met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit kunnen worden getraceerd.
- **Run note (Runopmerking, optioneel):** Voer een opmerking in over de inhoud of doelstelling van de run.

Assaybestanden toevoegen

Om een assay aan een putje toe te voegen, kunt u het volgende doen:

- Klik met de rechtermuisknop op het putje en selecteer "Load Assay" (Assay laden) vanuit het contextmenu.
- Selecteer de assay in de snelkoppelingsbrowser en klik op de assay en sleep deze naar het putje.

Elk putje is voorzien van een kleurcodering volgens de assay die voor dat putje is geladen.

Monster-ID's en opmerkingen invoeren

Om een monster-ID of opmerking in te voeren, selecteert u de cel en voert u de tekst in.

Om een monster-ID of opmerking te bewerken, selecteert u de cel (de huidige inhoud wordt geselecteerd) of dubbelklikt u op de cel.

Protocol 2: PCR met gebruik van de PCR-reagentia die zijn meegeleverd met de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit

Dit protocol is voor PCR-amplificatie van 8 afzonderlijke gebieden in exons 3 en 4 van het menselijke KRAS-gen en exons 2, 3 en 4 van het menselijke NRAS-gen met gebruik van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit.

Wat u moet weten voor u begint

- De HotStarTaq® DNA-polymerase in het PyroMark PCR mastermengsel heeft een activatiestap nodig van 15 minuten bij 95 °C.
- Stel alle reactiemengsels op in een locatie die is afgezonderd van de locatie die voor DNA-zuivering wordt gebruikt. Voeg voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse template toe aan de PCR, PCR-productanalyse of voorbereiding van monsters.
- Gebruik wegwerptips met hydrofobe filters om kruisbesmetting te minimaliseren.

Wat u moet doen voor u begint

- Voordat u de buisjes met PCR-primers opent, centrifugeert u kort om de inhoud op de bodem van de buisjes te verzamelen.
- Pas de concentratie van het controle-DNA en monster-DNA zo nodig aan naar 0,4–2 ng/µl.

Procedure

1. Ontdooi alle noodzakelijk onderdelen (zie Tabel 4, pagina 22).

Goed mengen voor gebruik.

2. Bereid een reactiemengsel voor elke PCR-primerset voor volgens Tabel 4.

Het reactiemengsel bevat doorgaans alle onderdelen die voor PCR nodig zijn, behalve het monster.

Bereid een volume van reactiemengsel voor die groter is dan het vereiste volume voor het totale aantal PCR-assays dat wordt uitgevoerd.

Tabel 4. Voorbereiding van reactiemengsel voor elk PCR-primermengsel

Onderdeel	Volume/reactie (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 of PCR Primer KRAS 117 of PCR Primer KRAS 146 of	1
PCR Primer NRAS 12/13 of	
PCR Primer NRAS 59 of	
PCR Primer NRAS 61 of	
PCR Primer NRAS 117 of PCR Primer NRAS 146	4
Water (H ₂ O, meegeleverd)	
Totaal volume	20

3. Meng het reactiemengsel grondig en breng 20 µl in elk PCR-buisje in.

Het is niet nodig om PCR-buisjes op ijs te bewaren omdat HotStarTaq DNA-polymerase inactief is bij kamertemperatuur.

4. Voeg 5 µl template-DNA (2–10 ng genomisch DNA) toe aan de afzonderlijke PCR-buisjes (zie Tabel 5) en meng grondig.

Opmerking: Er dient voor ten minste één assay een negatief controlemonster (zonder template-DNA) in elke PCR-opstelling te worden opgenomen.

Opmerking: Neem een monster met ongemethyleerd controle-DNA op als een wildtype controle voor elke assay in elke Pyrosequencing-run (zie “Controles”, pagina 8).

Tabel 5. Voorbereiding van PCR

Onderdeel	Volume/reactie (µl)
Reactiemengsel	20
Monster-DNA	5
Totaal volume	25

5. Programmeer de thermische cyclier volgens de instructies van de fabrikant met gebruik van de omstandigheden die worden vermeld in Tabel 6.

Tabel 6. Geoptimaliseerd cyclusprotocol

	Tijd	Temperatuur	Opmerkingen
Eerste activatiestap:	15 min	95°C	Door deze verhittingsstap wordt HotStarTaq DNA-polymerase geactiveerd
3-stapscyclus:			
Denaturatie	20 s	95°C	
Hybridisatie	30 s	53°C	
Verlenging	20 s	72°C	
Aantal cycli	42	–	
Eindverlenging:	5 min	72°C	

6. Plaats de PCR-buisjes in de thermische cyclier en start het cyclusprogramma.

7. Ga na de amplificatie verder met "Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance parels", pagina 25.

De PCR-monsters kunnen maximaal 3 dagen worden opgeslagen bij 2–8 °C.

Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance parels

Dit protocol is voor de immobilisatie van template-DNA aan Streptavidin Sepharose High Performance voorafgaand aan analyse op het PyroMark Q24-systeem.

Wat u moet doen voor u begint

- Laat alle vereiste reagentia en oplossingen op kamertemperatuur (15–25 °C) komen voor u begint.
- Schakel de PyroMark Q24 ten minste 30 minuten voor u een run begint in. De aan/uit-schakelaar bevindt zich aan de achterzijde van het instrument.
- Plaats één PyroMark Q24-plaathouder op een voorverwarmd verwarmingsblok van 80 °C. Laat een tweede PyroMark Q24-plaathouder op kamertemperatuur (15–25 °C).
- PyroMark-spoelbuffer wordt geleverd als een concentraat 10x. Verdun voorafgaand aan het eerste gebruik tot een 1x werkoplossing door 225 ml water van hoge zuiverheid toe te voegen aan 25 ml 10x PyroMark-spoelbuffer (eindvolume van 250 ml).

Opmerking: De 1x werkoplossing van PyroMark-spoelbuffer is stabiel bij 2–8 °C tot de gemarkeerde vervaldatum.

- Bereid het PyroMark Q24-vacuümwerkstation voor monstervoorbereiding voor zoals wordt beschreven in de *PyroMark Q24 User Manual* (gebruikershandleiding van de PyroMark Q24).

Procedure

1. Schud de fles met Streptavidin Sepharose High Performance voorzichtig totdat de oplossing homogeen is.
2. Bereid een mastermengsel voor DNA-immobilisatie voor volgens Tabel 7.
Bereid een groter volume voor dan is vereist voor het totale aantal uit te voeren reacties (voor het aantal reacties plus één extra).

Tabel 7. Mastermengsel voor DNA-immobilisatie

Onderdeel	Volume/reactie (µl)
PyroMark Binding Buffer (bindbuffer)	40
Water (H ₂ O, meegeleverd)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Totaal volume	70

3. Voeg 70 µl van het mastermengsel toe aan putjes van een PCR-plaat met 24 putjes, zoals vooraf is gedefinieerd in de runopstelling (zie "Protocol 1: Runopstelling voor het PyroMark Q24-systeem", pagina 18).

Sepharose parels sedimenteren snel. Zorg ervoor dat het mastermengsel homogeen is door frequent te mengen met een pipet of een pulse-vortexmixer. Centrifugeer het mastermengsel niet.

4. Voeg 10 µl gebiotinyld PCR-product van protocol 2 toe aan elk putje met mastermengsel zoals vooraf is gedefinieerd in de runopstelling (zie "Protocol 2: PCR met gebruik van de PCR-reagentia die zijn meegeleverd met de theascreen RAS Extension Pyro-kit", pagina 21).

Het totale volume per putje dient 80 µl te zijn nadat het mastermengsel en PCR-product is toegevoegd.

5. Verzegel de PCR-plaat met plakfolie.

Zorg ervoor dat er geen lekkage mogelijk is tussen de putjes.

6. Schud de PCR-plaat bij kamertemperatuur (15–25 °C) gedurende 5–10 minuten bij 1400 rpm.

Ga tijdens deze stap direct verder met "Protocol 4: Voorbereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse op de PyroMark Q24", pagina 27.

Protocol 4: Voorbereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse op de PyroMark Q24

Dit protocol is voor het voorbereiden van enkelstrengs DNA en het hybridiseren van de sequencing-primer aan de template voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse op de PyroMark Q24.

Wat u moet weten voor u begint

- Voordat u de buisjes met sequencing-primers opent, centrifugeert u kort om de inhoud op de bodem van de buisjes te verzamelen.
- Voeg de verschillende sequencing-primers toe in hetzelfde patroon als vooraf voor de plaat is gedefinieerde in de runopstelling (zie "Protocol 1: Runopstelling voor het PyroMark Q24-systeem", pagina 18), afhankelijk van het analysegebied.
- Voer regelmatig de functietest voor de filterprobes uit zoals wordt beschreven in de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* en vervang filterprobes wanneer dit wordt aangegeven.

Procedure

1. Verdun voldoende van elke sequencing-primer in PyroMark-hybridisatiebuffer zoals wordt getoond in Tabel 8.

Bereid een groter volume van verdunde sequencing-primer voor dan is vereist voor het totale aantal te sequencen monsters (voor het aantal reacties plus één extra).

Er dient niet meer sequencing-primer te worden verdund en opgeslagen dan nodig is.

Tabel 8. Voorbeeld van verdunning van de sequencing-primers

Onderdeel	Volume/monster (µl)	Volume voor 9+1 reacties (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 of Seq Primer KRAS 117 of Seq Primer KRAS 146 of Seq Primer NRAS 12/13 of Seq Primer NRAS 59 of Seq Primer NRAS 61 of Seq Primer NRAS 117 of Seq Primer NRAS 146	0.8	8
Totaal volume	25	250

2. Voeg 25 µl verdunde sequencing-primer toe aan elk putje van de PyroMark Q24-plaat, volgens de runopstelling (zie "Protocol 1: Runopstelling voor het PyroMark Q24-systeem", pagina 18).
Houd één van de PyroMark Q24-plaathouders (meegeleverd met het PyroMark Q24-vacuümwerkstation) op kamertemperatuur (15–25 °C) en gebruik deze als ondersteuning bij het voorbereiden en verplaatsen van de plaat.
3. Schakel de vacuümpomp van het PyroMark Q24-vacuümwerkstation in.
4. Plaats de PCR-plaat van protocol 3 en de PyroMark Q24-plaat op het vacuümwerkstation (Afbeelding 3).
Inspecteer de PCR-plaat en zorg ervoor dat de Sepharose parels zich in oplossing bevinden. Zorg ervoor dat de PCR-plaat hetzelfde is georiënteerd als toen de monsters werden geladen.



Afbeelding 3. Plaatsing van de PCR-plaat en PyroMark Q24-plaat op het vacuümwerkstation.

5. Activeer het vacuüm op het hulpmiddel door het vacuüm in te schakelen.
6. Breng de filterprobes van het vacuümhulpmiddel langzaam in de PCR-plaat omlaag om de parels met geïmmobiliseerde template vast te leggen. Houd de probes 15 seconden op hun plaats. Wees voorzichtig bij het optillen van het vacuümhulpmiddel.

Opmerking: Sepharose parels sedimenteren snel. Het vastleggen van de parels moet direct na het schudden plaatsvinden. Als er meer dan 1 minuut is verstreken sinds het schudden van de plaat, dient u de plaat opnieuw 1 minuut te schudden voordat u de parels vastlegt.

Inspecteer de PCR-plaat om te controleren of alle monsters door het vacuümhulpmiddel zijn opgenomen.

7. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met 40 ml 70% ethanol (**bakje 1; Afbeelding 3**). Spoel de filterprobes gedurende 5 seconden.
8. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met 40 ml denaturatieoplossing (**bakje 2; Afbeelding 3**). Spoel de filterprobes gedurende 5 seconden.

9. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met 50 ml spoelbuffer (**bakje 3; Afbeelding 3**). Spoel de filterprobes gedurende 10 seconden.
10. Breng het vacuümhulpmiddel gedurende 5 seconden omhoog en naar achteren, onder een hoek van 90°, om vloeistof uit de filterprobes te laten lopen (Afbeelding 4).



Afbeelding 4. Afbeelding van het vacuümhulpmiddel dat omhoog is gebracht voorbij een verticale hoek van 90°.

11. Terwijl het vacuümhulpmiddel over de PyroMark Q24-plaat wordt gehouden, schakelt u het vacuüm uit.
12. Geef de parels in de PyroMark Q24-plaat vrij door de filterprobes in de verdunde sequencing-primer neer te laten en het vacuümhulpmiddel voorzichtig heen en weer te bewegen.
Opmerking: Zorg ervoor dat u het oppervlak van de PyroMark Q24-plaat niet bekrast met de filterprobes.
13. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met water van hoge zuiverheid (**bakje 4; Afbeelding 3**) en schud het vacuümhulpmiddel gedurende 10 seconden.
14. Was de filterprobes door de probes in het bakje met water van hoge zuiverheid (**bakje 5; Afbeelding 3**) omlaag te brengen en activeer het vacuüm. Spoel de probes met 70 ml water van hoge zuiverheid.

15. Breng het vacuümhulpmiddel gedurende 5 seconden omhoog en naar achteren, onder een hoek van 90°, om vloeistof uit de filterprobes te laten lopen (Afbeelding 4).

16. Schakel het vacuümhulpmiddel uit en plaats het vacuümhulpmiddel in de parkeerpositie (P).

17. Schakel de vacuümpomp uit.

Opmerking: Na afloop van een werkdag dienen vloeibaar afval en resterende oplossing te worden afgevoerd en dient het PyroMark Q24-vacuümwerkstation te worden geïnspecteerd op stof en gemorste vloeistoffen. Zie "Appendix B: De afvalcontainer en bakjes legen", pagina 70.

18. Verwarm de PyroMark Q24-plaat met de monsters gedurende 2 minuten op 80 °C met de voorverwarmde PyroMark Q24-plaathouder.

19. Verwijder de PyroMark Q24-plaat van de hete plaathouder en plaats deze op een tweede PyroMark Q24-plaathouder die op kamertemperatuur (15–25 °C) is gehouden zodat de monsters gedurende 10–15 minuten bij kamertemperatuur kunnen afkoelen. Ga direct verder met "Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken", pagina 32.

Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken

In dit protocol worden het voorbereiden en laden van PyroMark Gold Q24-reagentia in de PyroMark Q24-cartridge beschreven, alsmede het starten en eindigen van een run op de PyroMark Q24. Voor een gedetailleerde beschrijving van het opstellen van een run raadpleegt u de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24*.

Wat u moet weten voor u begint

- Het pre-run-informatierapport dat u kunt vinden in het menu “Tools” (Hulpmiddelen) bij de runopstelling (zie “Protocol 1: Runopstelling voor het PyroMark Q24-systeem”, pagina 18), geeft informatie over het volume van nucleotiden, enzym en substraatbuffer dat voor een specifieke run nodig is.
- Laad de cartridge met wegwerptips (zonder hydrofobe filters) om een juiste werking van de cartridge te garanderen.

Procedure

1. Los de gevriesdroogde enzym- en substraatmengsels op in 620 µl water (H₂O, meegeleverd).
2. Meng door de flacon voorzichtig rond te draaien.

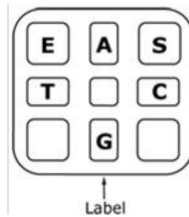
Opmerking: Niet schudden!

Laat het mengsel gedurende 5–10 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C) staan om te garanderen dat het mengsel volledig is opgelost. Zorg ervoor dat de oplossing niet troebel is voordat u de PyroMark Q24-cartridge vult. Als de reagentia niet direct moeten worden gebruikt, plaats u de flacons met reagentia op ijs of in een koelkast.

3. Laat de reagentia en de PyroMark Q24-cartridge op omgevingstemperatuur (20–25 °C) komen.
4. Plaats de PyroMark Q24-cartridge met het etiket naar u toe gericht.

5. Laad de PyroMark Q24-cartridge met het juiste volume nucleotiden, enzymmengsel en substraatmengsel volgens Afbeelding 5.

Zorg ervoor dat er geen luchtballen worden overgedragen van de pipet naar de cartridge.



Afbeelding 5. Afbeelding van de PyroMark Q24-cartridge, gezien van bovenaf. De aantekeningen komen overeen met het etiket op de flacons met reagentia. Voeg enzymmengsel (E), substraatmengsel (S) en nucleotiden (A, T, C, G) toe volgens de volume-informatie die wordt gegeven in het pre-run-informatierapport dat u kunt vinden in het menu "Tools" (Hulpmiddelen) bij de runopstelling.

6. Open de klep van de cartridge en plaats het gevulde reagenscartridge met het etiket naar voren. Duw de cartridge volledig naar binnen en vervolgens omlaag.
7. Zorg ervoor dat de lijn aan de voorzijde van de cartridge zichtbaar is en sluit de klep.
8. Open het plaathoudende frame en plaats de plaat op het verwarmingsblok.
9. Sluit het plaathoudende frame en het instrumentdeksel.
10. Plaats de USB-stick (met het runbestand) in de USB-poort aan de voorzijde van het instrument.
Verwijder de USB-stick pas als de run is voltooid.
11. Selecteer "Run" in het hoofdmenu (met de schermtoetsen ▲ en ▼) en druk op "OK".
12. Selecteer het runbestand met de schermtoetsen ▲ en ▼.
Selecteer een map om de inhoud van die map te bekijken en druk op "Select" (Selecteren). Druk op "Back" (Terug) om naar de vorige weergave terug te keren.

-
13. Als het runbestand is geselecteerd, drukt u op "Select" (Selecteren) om de run te starten.
 14. Als de run is voltooid en het instrument bevestigt dat het runbestand op de USB-stick is opgeslagen, drukt u op "Close" (Sluiten).
 15. Verwijder de USB-stick.
 16. Open het instrumentdeksel.
 17. Open de klep van de cartridge en verwijder de reagenscartridge door deze omhoog te tillen en naar buiten te trekken.
 18. Sluit de klep.
 19. Open het plaathoudende frame en verwijder de plaat van het verwarmingsblok.
 20. Sluit het plaathoudende frame en het instrumentdeksel.
 21. Werp de plaat weg en reinig de cartridge volgens de instructies in het productblad dat met de cartridge is meegeleverd.
Analyseer de run volgens "Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run pagina 35.

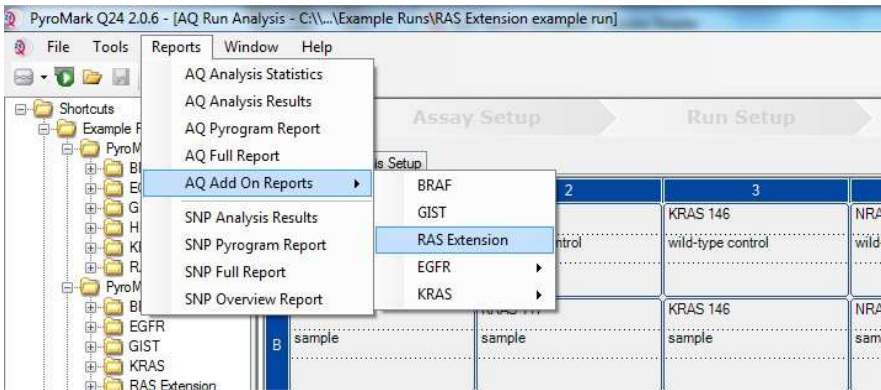
Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run

In dit protocol wordt de mutatieanalyse van een voltooide therascreen RAS Extension Pyro-run met de PyroMark Q24-software beschreven.

Procedure

1. Plaats de USB-stick met het verwerkte runbestand in de USB-poort van de computer.
2. Verplaats het runbestand met behulp van Windows Verkenner van de USB-stick naar de gewenste locatie op de computer.
3. Open het runbestand in de AQ-modus van de PyroMark Q24-software door "Open" (Openen) te selecteren in het menu "File" (Bestand) of door dubbel te klikken op het bestand (👉) in de snelkoppelingsbrowser.
4. Gebruik het RAS Extension-invoegrapport om een invoegrapport te genereren en selecteer "AQ Add On Reports/RAS Extension" (AQ aanvullende rapporten/RAS Extension) onder "Reports" (Rapporten) in het menu (zie Afbeelding 6).

Opmerking: Mutaties in KRAS-codon 61 moeten hiernaast ook worden geanalyseerd met de afzonderlijke KRAS-invoegtoepassing door "AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61" (AQ aanvullende rapporten/KRAS/ Codon 61) onder "Reports" (Rapporten) in het menu te selecteren (zie Afbeelding 6).



Afbeelding 6. Menu RAS Extension-invoegrapport.

De putjes worden automatisch geanalyseerd op alle mutaties waarvoor LOD (limit of detection, detectielimiet) in Tabel 9, pagina 43 wordt gegeven. De resultaten worden weergegeven in een overzichtstabel (zie

), gevolgd door de gedetailleerde resultaten, waaronder Pyrogrammen en analysekwaliteit.

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.

Afbeelding 7. RAS Extension-invoegrapport

5. AQ-analyse gebruiken:

Klik op een van de analysetoetsen om de run te analyseren en een overzicht te krijgen van de resultaten.



Analyze all wells.



Analyze the selected well.

De analyseresultaten (allelfrequenties) en kwaliteitsbeoordeling worden weergegeven boven de variabele positie in de Pyrogram-trace. Voor meer details over het analyseren van een run raadpleegt u de *PyroMark Q24 User Manual* (gebruikershandleiding van de PyroMark Q24).

Selecteer “AQ Full Report” (AQ volledig rapport) of “AQ Analysis Results” (AQ-analyseresultaten) in het menu “Reports” (Rapporten).

Opmerking: Voor betrouwbare resultaten worden enkele piekhoogten boven 30 RLU aanbevolen. Stel 30 RLU in als de “required peak height for passed quality” (vereiste piekhoogte voor geslaagde kwaliteit) in de assayopstelling en controleer of de A-piekverminderingfactor is ingesteld op 0,86 voor analyse van NRAS-codon 61 (zie “Appendix A: *therascreen* RAS Extension Pyro-assays opstellen”, pagina 64 en de gebruikershandleiding van de PyroMark Q24).

Het rapport “AQ Analysis Results” (AQ-analyseresultaten) dient te worden gebruikt voor de documentatie en interpretatie van allelkwantificering. De getallen die in het Pyrogram worden weergegeven, zijn afgerond en geven niet de exacte kwantificering weer.

Opmerking: Het Pyrogram dient altijd te worden vergeleken met het histogram, dat kan worden weergegeven door rechts te klikken in het venster Pyrogram. De gemeten pieken dienen overeen te komen met de hoogte van de balken in het histogram. Raadpleeg ook “Interpretatie van de resultaten”, pagina 40.

Opnieuw analyseren van monsters waarin met de standaard “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) geen mutatie is gedetecteerd of monsters met de kwaliteitsbeoordeling “Check” (Controle) of “Failed” (Mislukt)

De standaard “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) zoals wordt gedefinieerd in de analyseopstelling, gaat in op de meest frequente puntmutaties in de *therascreen* RAS Extension Pyro-assays.

Wij raden ten eerste aan om alle monsters waarbij met de standaard “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) geen mutatie wordt gedetecteerd en monsters met de kwaliteitsbeoordeling “Check” (Controle) of “Failed” (Mislukt) opnieuw te analyseren. Kwaliteitsbeoordelingen “Check” (Controle) of “Failed” (Mislukt) kunnen duiden op een mutatie die niet onder de standaard “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) valt, wat leidt tot onverwachte referentiepieken.

Om opnieuw te analyseren en andere mutaties te onderzoeken, gaat u naar “Analysis Setup” (Analyseopstelling) en wijzigt u de “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) in varianten die worden beschreven in Tabel 16 en Tabel 17 in Appendix A

of varianten voor andere zeldzame of onverwachte mutaties. Klik op “Apply” (Toepassen) en klik vervolgens op “To All” (Op alle) als het venster “Apply Analysis Setup” (Opstelling analyse toepassen) wordt weergegeven.

Bijgewerkte frequenties van mutaties in de menselijke KRAS- en NRAS-genen worden online verstrekt door het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Opmerking: Nadat u de “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) hebt gewijzigd, controleert u of de drempel voor de enkele piekhoogte is ingesteld op 30 RLU en of de A-piek-verminderingfactor is ingesteld op 0,86 voor analyse van NRAS-codon 61 (zie “Appendix A: *therascreen* RAS Extension Pyro-assays opstellen”).

Opmerking: Er kunnen aanvullende zeldzame of onverwachte mutaties in de gesequencede regio aanwezig zijn en deze kunnen worden geanalyseerd met een alternatieve “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) waarbij rekening wordt gehouden met onverwachte mutaties.

Opmerking: Als de gemeten pieken niet overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram en niet kunnen worden verklaard door zeldzame of onverwachte mutaties, is het resultaat geen basis voor een oordeel over de mutatiestatus. Het wordt aanbevolen om de run voor het monster opnieuw uit te voeren.

Interpretatie van de resultaten

Interpretatie van analyseresultaten en detectie van low-level mutaties

Neem een monster van het controle-DNA op voor elke assay in elke Pyrosequencing-run. Dit is vereiste voor de juiste interpretatie van resultaten en de identificatie van low-level mutaties en als een controle voor achtergrondkleuringsniveaus. De gemeten frequentie van het controlemonster dient kleiner te zijn dan of gelijk te zijn aan de blankolimiet (LOB, limit of blank). De LOB-waarden (limit of blank, blankolimiet) en LOD-waarden (limit of detection, detectielimiet) die in de handleidingen worden gegeven, kunnen worden gebruikt bij het bepalen van de aanwezigheid van een mutatie. Deze waarden zijn verkregen met gebruik van plasmidemengsels die het wildtype of de relevante gemuteerde sequentie dragen.

Na analyse met de PyroMark Q24-software of de invoegrapporten zijn er 3 resultaten mogelijk. Zie Tabel 9 voor LOD-gegevens.

- Mutatiefrequentie < LOD: Mutatie niet gedetecteerd
- Mutatiefrequentie > LOD + 3% eenheden: Mutatie
- Mutatiefrequentie \geq LOD en \leq LOD + 3% eenheden: Potentiële low-level mutatie

Opmerking: Als u het RAS Extension-invoegrapport gebruikt (zie stap 5 van "Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run", pagina 35) en dit gebeurt, wordt er een waarschuwing gegeven.

Het bereik van LOD tot LOD + 3% eenheden maakt gevoelige detectie van low-level mutaties onder optimale omstandigheden mogelijk. Een gemeten frequentie boven LOB in het ongemethyleerd controlemonster duidt op een hoger niveau achtergrondkleuring dan gebruikelijk is in de betreffende run, wat van invloed kan zijn op allelkwantificering, vooral

voor lage mutatieniveaus. Daarom moeten resultaten met de waarschuwing “Potential low level mutation” (Potentiële low-level mutatie) zorgvuldig worden geëvalueerd.

Monsters met een gerapporteerde potentiële low-level mutatie dienen alleen positief voor de mutatie te worden beschouwd als dit wordt bevestigd door de run opnieuw dubbel uit te voeren samen met het ongemethyleerde controle-DNA. De resultaten van beide duplicaten dienen dezelfde mutatie te rapporteren met waarden \geq LOD en het controlemonster dient “No mutation detected” (Geen mutatie gedetecteerd) te rapporteren. Anders dient het monster te worden beoordeeld als “No mutation detected” (Geen mutatie gedetecteerd).

Verhoogde achtergrondkleuring voor een mutatie kan worden gedetecteerd door de in de handleiding vermelde LOB-waarden te vergelijken met de metingen die zijn verkregen met het ongemethyleerde controle-DNA. Monsters met een gerapporteerde potentiële low-level mutatie kunnen zonder herhaling worden beoordeeld als “Mutation not detected” (Mutatie niet gedetecteerd) als de gemeten frequentie voor ongemethyleerd controle-DNA groter is dan de LOB-waarde die in de handleiding staat vermeld voor de relevante mutatie. Daarom zijn er 3 verschillende scenario's mogelijk met gerapporteerde potentiële low-level mutaties.

1. Metingsfrequentie met ongemethyleerd controle-DNA $>$ LOB voor deze mutatie: Monster kan zonder herhaling worden beoordeeld als “Mutation not detected” (Mutatie niet gedetecteerd).
2. Resultaat niet met hetzelfde resultaat gereproduceerd in duplicaat: Beoordeel het monster als “Mutation not detected” (Mutatie niet gedetecteerd).
3. Dezelfde resultaten gereproduceerd in duplicaat en ongemethyleerd controle-DNA $<$ LOB voor relevante mutatie: Mutatie gedetecteerd.

Opmerking: Het Pyrogram dient altijd te worden vergeleken met het histogram, dat kan worden weergegeven door rechts te klikken in het venster Pyrogram. De gemeten pieken dienen overeen te komen met de hoogte van de balken in het histogram. De Pyrogrammen dienen te worden onderzocht op de verschijning van onverwachte pieken. Als de gemeten pieken niet overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram en niet kunnen

worden verklaard door zeldzame of onverwachte mutaties, wordt aanbevolen om de run voor het monster opnieuw uit te voeren. Het mislukte resultaat is geen basis voor een oordeel over de mutatiestatus. Voor een geldige mutatie is een wijziging in de piekhoogte altijd gerelateerd aan een overeenkomstige wijziging in de hoogte van een andere piek. Een wijziging in de hoogte van een enkele piek dient niet te worden beoordeeld als een indicatie van een mutatie.

Opmerking: Het wordt aanbevolen om het RAS Extension-invoegrapport te gebruiken voor de interpretatie van resultaten. Voor nader onderzoek van monsters met een gerapporteerde potentiële low-level mutatie, raden wij aan om het monster aanvullend handmatig te analyseren in de toepassingssoftware (bijvoorbeeld voor een vergelijking met de mutatiefrequentie van het controlemonster).

Opmerking: Een behandelbeslissing voor kankerpatiënten mag niet uitsluitend worden gebaseerd op de KRAS-en NRAS-mutatiestatus.

Tabel 9. LOB en LOD bepaald voor specifieke mutaties

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	LOB (% eenheden)	LOD (% eenheden)	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 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 codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 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 codon 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 codon 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
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

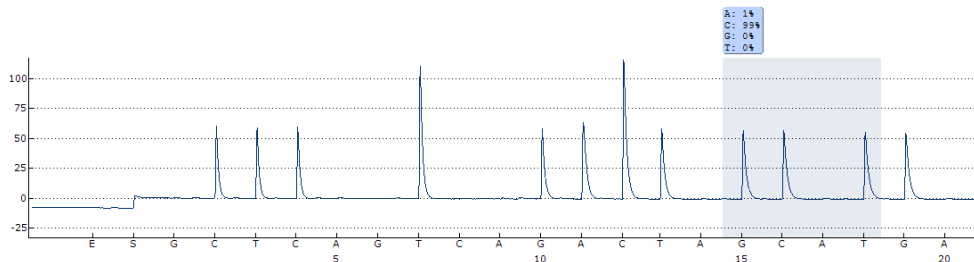
Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	LOB (% eenheden)	LOD (% eenheden)	COSMIC ID* (V70)
NRAS codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4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

* Uit de Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, online beschikbaar bij het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

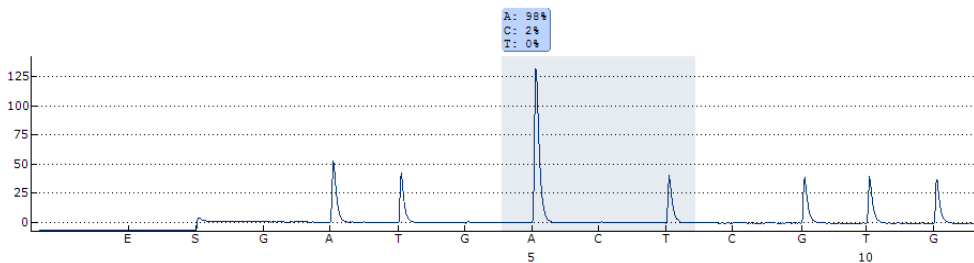
† Laagste mutatie-niveau in een monster dat leidt tot een gemeten frequentie \geq LOD.

Representatieve resultaten

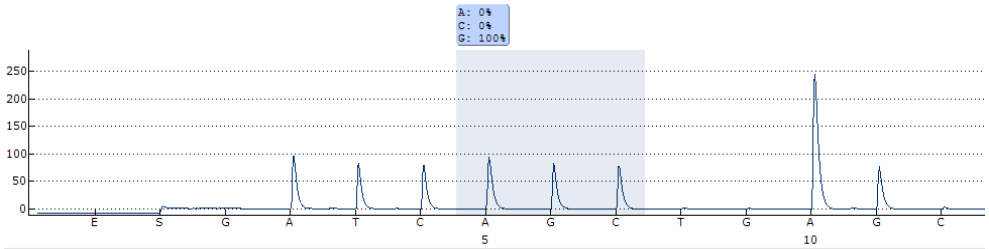
Representatieve resultaten worden weergegeven in Afbeelding 8–Afbeelding 15.



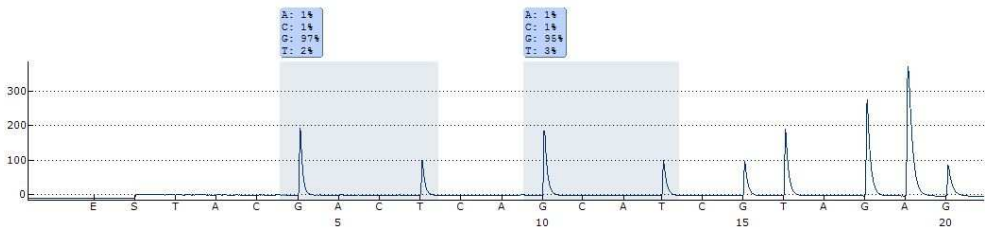
Afbeelding 8. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay KRAS 59/61.



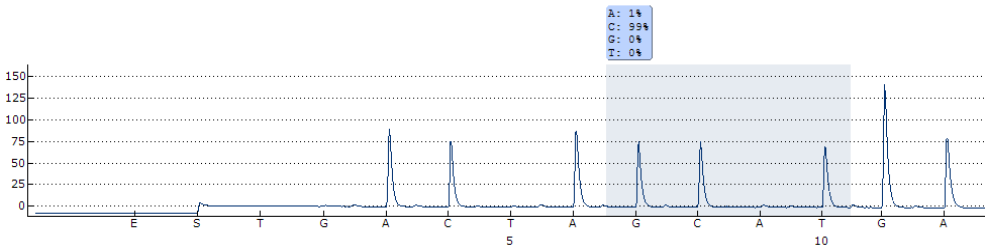
Afbeelding 9. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay KRAS 117.



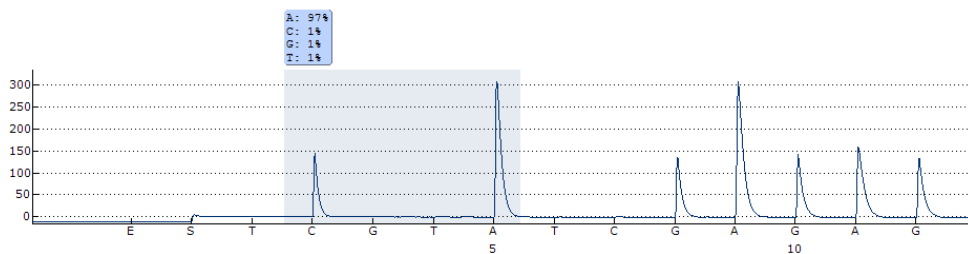
Afbeelding 10. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay KRAS 146.



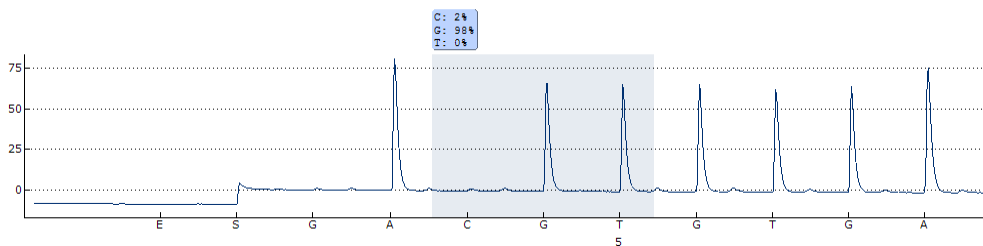
Afbeelding 11. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay NRAS 12/13.



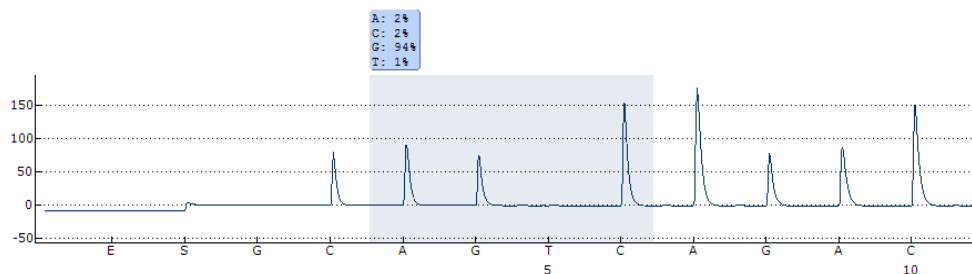
Afbeelding 12. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay NRAS 59.



Afbeelding 13. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay NRAS 61.



Afbeelding 14. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay NRAS 117.



Afbeelding 15. Pyrogram-trace verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype met de assay NRAS 146.

Handleiding voor het oplossen van problemen

Deze handleiding kan nuttig zijn bij het oplossen van problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de lijst met veelgestelde vragen op ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers van de afdeling technische services van QIAGEN beantwoorden graag uw vragen over de informatie en protocollen in deze handleiding of over de monster- en assaytechnologieën (zie de achterzijde voor contactgegevens of ga naar www.qiagen.com). Raadpleeg de gebruikershandleiding van de PyroMark Q24 voor het oplossen van problemen met het instrument.

Opmerkingen en suggesties

Resultaat "Check" (Controle) of "Failed" (Mislukt)

- | | |
|--|--|
| a) Lage piekhoogte | <p>Verwerkingsfouten bij de PCR-opstelling of monstervoorbereiding voorafgaand aan Pyrosequencing kunnen leiden tot lage pieken.</p> <p>Het is belangrijk dat de monsters volledig worden opgenomen door het vacuümhulpmiddel. Zorg ervoor dat het vacuümhulpmiddel langzaam omlaag wordt gebracht in de monsters en dat de geometrie van de PCR-plaat of strips voor immobilisatie het mogelijk maken dat de monsters volledig worden opgenomen.</p> <p>Voer regelmatig de functietest voor de filterprobes uit zoals wordt beschreven in de gebruikershandleiding van de PyroMark Q24 en vervang filterprobes wanneer dit wordt aangegeven.</p> <p>Bij een waarschuwing "Check" (Controle) vergelijkt u het Pyrogram zorgvuldig met het histogram, dat kan worden weergegeven door rechts te klikken in het venster Pyrogram. Als de gemeten pieken overeenkomen met de balken van het histogram, is het resultaat geldig. Anders wordt aanbevolen om de run voor het monster opnieuw uit te voeren.</p> |
| b) Mutatie die niet is gedefinieerd in "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie) | <p>Pas de "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie) in de assayopstelling aan (zie "Appendix A: <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro-assays opstellen", pagina 64) en analyseer de run opnieuw. Mutaties die niet worden gedekt onder "Sequences to Analyze" (Te analyseren sequenties) kunnen met het patroonsimulatiehulpmiddel worden geïdentificeerd.</p> |

Opmerkingen en suggesties

- c) Onverwachte, zeldzame mutatie
Een kwaliteitsbeoordeling "Check" (Controle) of "Failed" (Mislukt) kan worden veroorzaakt door een onverwacht patroon van pieken. Dit kan duiden op een onverwachte mutatie, die niet wordt geanalyseerd door de geleverde "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie). Deze monsters dienen te worden geanalyseerd met de alternatieve "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie) waarbij rekening wordt gehouden met onverwachte mutaties. Mutaties die niet worden gedekt onder "Sequences to Analyze" (Te analyseren sequenties) kunnen met het patroonsimulatiehulpmiddel worden geïdentificeerd.
- d) Waarschuwing afwijking hoge piekhoogte voor een distributie
Het Pyrogram dient nauwkeurig te worden vergeleken met het histogram, dat kan worden weergegeven door rechts te klikken in het venster Pyrogram. Als de gemeten pieken niet overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram en niet kunnen worden verklaard door zeldzame mutaties, wordt aanbevolen om de run voor het monster opnieuw uit te voeren.

Sterke achtergrondkleuring

- a) Onjuiste opslag van nucleotiden
Bewaar nucleotiden bij 2–8 °C. Opslag bij -15 tot -25 °C kan leiden tot een toename van achtergrondkleuring.
- b) Korte afkoeltijd van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse
Bewaar de monsters gedurende 10–15 minuten bij kamertemperatuur op een PyroMark Q24-plaathouder. Verkort de afkoeltijd niet.
- c) Contaminatie van cartridge
Reinig de cartridge zorgvuldig zoals in het productblad wordt beschreven. Bewaar de cartridge beschermd tegen licht en stof.

Geen signalen in positieve controle (ongemethyleerd controle-DNA)

- a) Onvoldoende enzym- of substraatmengsel voor alle putjes
Zorg ervoor dat u de PyroMark Q24-cartridge vult volgens de "Pre Run Information" (Pre-run-informatie) in het menu "Tools" (Hulpmiddelen).
- b) Reagentia onjuist opgeslagen of verdund
Bereid de reagentia voor volgens de instructies in "Opslag en verwerking reagentia" op pagina 15 en "Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken" op pagina 32.
- c) Fouten bij PCR- of monstervoorbereiding
Reinig de cartridge zorgvuldig zoals in het productblad wordt beschreven. Bewaar de cartridge beschermd tegen licht en stof.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit getest ten opzichte van vooraf vastgelegde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen.

Beperkingen

De test is ontworpen om 37 mutaties in de KRAS- of NRAS-genen te detecteren. Monsters waarbij resultaten worden gerapporteerd als “No Mutation Detected” (Geen mutatie gedetecteerd), kunnen KRAS- of NRAS-mutaties bevatten die niet door de assay zijn gedetecteerd.

De detectie van mutaties is afhankelijk van de integriteit van het monster en de hoeveelheid amplificeerbaar DNA dat in het monster aanwezig is.

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit wordt gebruikt in een procedure waarbij een polymerasekettingreactie (PCR) wordt gebruikt. Zoals bij alle PCR-procedures, kunnen monsters worden gecontamineerd door externe DNA-bronnen in de testomgeving en het DNA bij de positieve controle. Wees voorzichtig om contaminatie van monsters en reactiemengsel van reagens te voorkomen.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden gedekt door de prestatieonderzoeken van QIAGEN.

Kwaliteitskenmerken

Blancolimiet en detectielimiet

De blancolimiet (LOB, limiet of blank) en detectielimiet (LOD, limit of detection) zijn bepaald voor een aantal mutaties met behulp van plasmidemengsels (Tabel 10). LOB en LOD zijn bepaald volgens de aanbevelingen in de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline"* (NRAS-codons 12, 13 en 61 en KRAS-codon 61) en *EP17-A2 "Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition"* (alle overige codons). α - en β -fouten (fout-positieven en fout-negatieven, respectievelijk) waren op 5% ingesteld. LOB-waarden vertegenwoordigen de gemeten frequentie die is verkregen met een wildtype monster. LOD-waarden vertegenwoordigen het laagste signaal (gemeten frequentie) dat als positief kan worden beschouwd voor de respectievelijke mutatie.

Tabel 10. LOB en LOD bepaald voor specifieke mutaties

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	LOB (% eenheden)	LOD (% eenheden)	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 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 codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 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 codon 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 codon 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
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	LOB (% eenheden)	LOD (% eenheden)	COSMIC ID* (V70)
NRAS codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codon 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 codon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Uit de Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, online beschikbaar bij het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Laagste mutatiëniveau in een monster dat leidt tot een gemeten frequentie \geq LOD

Mutaties GGT > TGT en GGT > GTT in NRAS-codon 13

Voor deze mutaties waren blanco metingen vooral 0% eenheden die resulteren in een niet-Gaussiaanse verdeling. LOD is daarom met een andere methode vastgesteld, volgens de aanbevelingen in de CLSI-richtlijn EP17-A. Het laagste signaal dat de aanwezigheid van een mutatie (LOD) in deze posities aangeeft, was ingesteld op 2% eenheden boven het respectievelijke basisniveau zoals is gedefinieerd door het 95e percentiel van blanco metingen. Bij het analyseren van een monster met het mutatiëniveau dat tussen haakjes wordt vermeld in Tabel 9, gaf 95% van de resultaten (n=72) een signaal dat als positief kan worden beschouwd (\geq LOD). Zie Tabel 10 voor LOB/LOD.

Opmerking: PCR- en Pyrosequencing-primers voor NRAS-codons 12, 13 en 61 zijn zonder wijzigingen overgenomen uit de *therascreen* NRAS Pyro-kit (cat.nr. 971530). Presentatiegegevens voor deze NRAS-codon blijven ongewijzigd.

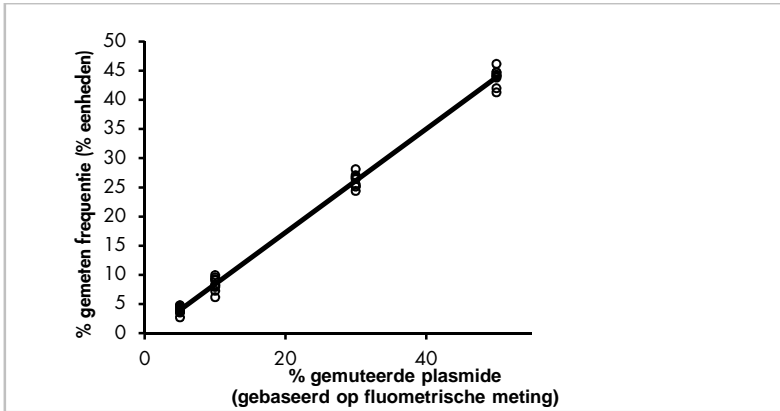
Lineariteit

Lineariteit werd bepaald met gebruik van plasmidemengsels die het wildtype of de gemuteerde sequentie van de mutaties 176C>G in KRAS-codon 59, 351A>T in KRAS-codon 117, 436G>C in KRAS-codon 146, 34G>A in NRAS-codon 12, 37G>A in NRAS-codon 13, 175G>A in NRAS-codon 59, 182A>G in NRAS-codon 61, 351G>C in NRAS-codon 117 en 437C>T in NRAS-codon 146 dragen. De plasmiden waren in verhouding gemengd zodat ze 4 niveaus van mutaties opleverden (5, 10, 30 en 50%). Elk niveau werd geanalyseerd met 3 verschillende partijen van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit in 3 Pyrosequencing-runs met elk 3 replicaten.

De resultaten (n=9 voor elk mutatieniveau) werden geanalyseerd volgens de CLSI-richtlijn EP6-A2 "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" met de software Analyse-it® v2.21. Deze resultaten worden weergegeven in

Afbeelding 16.

De resultaten waren lineair binnen een toegestane niet-lineariteit van 5% eenheden in het geteste bereik van mutatieniveaus van 5 tot 50%. Er zijn vergelijkbare resultaten verkregen voor alle gedekte mutaties in KRAS-codons 59, 117, 146 en NRAS-codons 12, 13, 59, 61, 117 en 146.



Afbeelding 16. Lineariteit van de mutatie 176C>G in KRAS-codon 59.

Er zijn vergelijkbare resultaten verkregen voor alle gedekte mutaties in KRAS-codons 59, 117, 146 en NRAS-codons 12, 13, 59, 61, 117 en 146.

Nauwkeurigheid

De nauwkeurigheidsgegevens maken de bepaling van de totale variabiliteit van de assays mogelijk en zijn verkregen op 3 verschillende niveaus door de analyse van de hierboven genoemde plasmidmengsels met elk 3 replicaten.

Herhaalbaarheid (intra-assay- en inter-batch-variatie) werd berekend op basis van de gegevens voor de bepaling van lineariteit (3 runs op dezelfde dag met verschillende partijen van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit). Intermediaire nauwkeurigheid (intra-laboratorium-variatie) werd bepaald over 3 runs binnen één laboratorium op 3 verschillende dagen. De runs zijn door verschillende operators uitgevoerd met PyroMark Q24-instrumenten en veel *therascreen* RAS Extension Pyro-kits. Reproduceerbaarheid (inter-laboratorium-variatie) is berekend uit 2 runs die elk in twee onafhankelijke laboratoria zijn uitgevoerd met verschillende partijen *therascreen*RAS Extension Pyro-kit.

Nauwkeurigheidsschattingen worden uitgedrukt als een standaardafwijking van de gemeten mutatiefrequenties in % eenheden (Tabel 11).

Tabel 11. Nauwkeurigheid van mutaties*

% gemuteerde plasmide†	Herhaalbaarheid		Intermediaire nauwkeurigheid		Reproduceerbaarheid	
	Gemiddelde	SA	Gemiddelde	SA	Gemiddelde	SA
176C>G in KRAS codon 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 in KRAS codon 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 in KRAS codon 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 in NRAS codon 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 in NRAS codon 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

% gemuteerde plasmide†	Herhaalbaarheid		Intermediaire nauwkeurigheid		Reproduceerbaarheid	
	Gemiddelde	SA	Gemiddelde	SA	Gemiddelde	SA
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4
182A>G in NRAS codon 61						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0
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 in NRAS codon 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 in NRAS codon 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

* Alle waarden worden gegevens als % eenheden. SA: standaardafwijking (n=9 voor herhaalbaarheid en intermediaire nauwkeurigheid, n=12 voor reproduceerbaarheid).

† Gebaseerd op fluometrische meting, voor 34G>A in NRAS-codon 12 gebaseerd op OD₂₆₀.

Diagnostisch onderzoek

De *therascreen* RAS Extension Pyro-kit is in 2 verschillende onderzoeken geëvalueerd in vergelijking met Sanger-sequencing.

Er is eerder een eerste onderzoek uitgevoerd om de *therascreen* NRAS Pyro-kit te evalueren in vergelijking met Sanger-sequencing. DNA werd geëxtraheerd uit 100 in formaline

gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) tumorweefsels uit beenmerg en geanalyseerd op mutaties in codons 12/13 en codon 61.

Omdat assays die NRAS-codon 12/13 en 61 dekken in de *therascreen* NRAS Pyro-kit zonder wijzigingen zijn opgenomen in de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit, worden resultaten getoond van de evaluatie van de *therascreen* NRAS Pyro-kit.

In het tweede onderzoek werd DNA geëxtraheerd uit 110 in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) mCRC-tumorweefsels en geanalyseerd op mutaties in codons 59, 61, 117 en 146 van het menselijke KRAS-gen en codons 59, 117 en 146 van het menselijke NRAS-gen. Mutaties met lage frequentie werden geanalyseerd met plasmide-DNA dat in wildtype FFBE DNA was gespiked.

In beide onderzoeken werd DNA geïsoleerd met de QIAamp DNA FFPE-weefselkit en vervolgens geanalyseerd met assays uit de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit op de PyroMark Q24. Sanger-sequencing werd uitgevoerd met de 3730xl Genetic Analyzer van Applied Biosystems®.

Evaluatie van NRAS-codons 12, 13 en 61

Van de 100 monsters die met Sanger-sequencing werden geanalyseerd, werd de mutatiestatus in 97 monsters bepaald voor zowel codon 12/13 als codon 61. In 4 van de 100 monsters werd door Sanger-sequencing een mutatie gedetecteerd in codon 12 of codon 13.

In 2 van de 100 monsters werd de mutatiestatus gereproduceerd met de *therascreen* NRAS Pyro-kit en werd er geen mutatie gerapporteerd. De resultaten worden weergegeven in Tabel 12. Er werden geen mutaties gedetecteerd in codon 61.

Met uitzondering van monsters die zijn mislukt met een of beide methoden, vertoonden de *therascreen* NRAS Pyro-kit en Sanger-sequencing 98% en 100% concordantie in de resultaten voor respectievelijk codons 12/13 en codon 61. Zie Tabel 12

Tabel 12. Resultaten van de geanalyseerde monsters voor NRAS-codons 12, 13 en 61

		Sanger-sequencing				Totaal
		Mutant in codon 12/13	Mutant in codon 61	Wild-type	On-bekend	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutant in codon 12/13	2	–	–	–	2
	Mutant in codon 61	–	–	–	–	–
	Wild-type	2	–	90	3	95
	Onbekend	–	–	3	–	3
	Totaal	4	–	93	3	100

Evaluatie van KRAS-codons 59, 61, 117 en 146 en NRAS-codons 59, 117 en 146

DNA werd geëxtraheerd uit 110 in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) mCRC-tumorweefsels en geanalyseerd op mutaties in codons 59, 61, 117 en 146 van het menselijke KRAS-gen en codons 59, 117 en 146 van het menselijke NRAS-gen. Vanwege de verwachte lage hoeveelheid in klinische monsters zijn alle mutaties die zijn gedekt door de *therascreen* RAS Extension-kit geanalyseerd in 56 aanvullende monsters met plasmide-DNA dat in wildtype FFBE DNA was gespiked. Alle mutaties zijn gevonden door zowel Pyro- als Sanger-sequencing.

Van de 166 geanalyseerde monsters zijn voor 137 monsters (83%) algehele concordante resultaten gevonden tussen de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit en Sanger-sequencing.

Gevallen met discrepanties kunnen door verschillende factoren worden verklaard.

Wegens sterke achtergrondkleuring zijn 20 monsters niet geslaagd voor de analyse Sanger-sequencing NRAS 59.

Sanger-sequencing heeft geen mutaties gedetecteerd in KRAS 59 en KRAS 61 in 1 en 3 monsters, respectievelijk. Alle 4 de mutaties hadden lage frequentieresultaten bij Pyrosequencing (7,5–13,1%). Dit kan worden verklaard door de lagere gevoeligheid van Sanger-sequencing (15–20%) vergeleken met Pyrosequencing (5%) (2). Alle overige geldige monsters waren wildtype voor beide technieken.

Er werd één monster beoordeeld als onbekend voor Pyrosequencing wegens een gedetecteerde dubbele mutatie (KRAS 59–61).

Vier monsters met gespiked plasmide-DNA vertoonden een aanvullende A>G-mutatie bij positie 350 van de KRAS-coderingssequentie, wat niet wordt gedekt door de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit. Mutaties zijn gedetecteerd door handmatige analyse.

Tabel 13. Resultaten van de geanalyseerde monsters voor KRAS-codons 59, 61, 117 en 146 en NRAS-codons 59, 117 en 146

		KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	wt	UK	Totaal
<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
	On-bekend	1	–	–	–	–	–	3	2	6
	Totaal	9	6	4	3	20	28	76	20	166

WT: Wildtype

^a Gespikede KRAS-monsters met mutaties van zowel KRAS 117 als 146.

^b Gespikede NRAS-monsters met mutaties voor NRAS 59, 117 en 146.

* Eén monster werd als mutant gedetecteerd voor KRAS 146, maar vertoonde een ongeldig resultaat voor NRAS 117.

Gevoeligheid en specificiteit van de assays per codon worden vermeld in Tabel 14.

Tabel 14. Gevoeligheid en specificiteit van assays KRAS-codons 59, 61, 117 en 146 en NRAS-codons 59, 117 en 146

	Gevoeligheid	Specificiteit	Gedekte mutatie
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
















Opmerking: In alle runs die zijn gebruikt voor het bepalen van kwaliteitskenmerken was het signaal meer dan 30 RLU, zoals normaal wordt verkregen uit 10 ng DNA dat is geïsoleerd uit in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (FFPE) weefsel. De Pyrosequencing-gegevens zijn geanalyseerd met het RAS Extension-invoegrapport voor KRAS-codons 59, 117 en 146 en NRAS-codons 59, 117 en 146.

Referenties

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.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen worden weergegeven op de verpakking en etiketten:

Symbol	Definitie van symbolen
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Onderdelen
	Bevat
	Nummer
	Global trade item number
	Temperatuurbepering
	Fabrikant
	Raadpleeg Instructies voor gebruik
	Voorzichtig

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via **www.qiagen.com/Support**. Ook kunt u bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar **www.qiagen.com**).

Appendix A: *therascreen* RAS Extension Pyro-assays opstellen

Als het RAS Extension-invoegrapport is geïnstalleerd, zijn vooraf gedefinieerde opstellingen voor KRAS-codons 59/61, 117 en 146 en NRAS-codons 12/13, 59, 61, 117 en 146 beschikbaar in de snelkoppelingsbrowser van de PyroMark Q24-software. Volg het pad "Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension" (Voorbeeldbestanden/PyroMark-opstellingen/RAS Extension). In dit geval, hoeven de volgende stappen niet te worden uitgevoerd.

Het RAS Extension-invoegrapport kunt u downloaden via de relevante pagina in de catalogus op **www.qiagen.com** onder het tabblad "Product Resources" (Hulpbronnen product) in het gedeelte "Protocol Files" (Protocolbestanden).

Het wordt sterk aanbevolen om het RAS Extension-invoegrapport te gebruiken in plaats van handmatige analyse.

Na installatie van de invoegtoepassing of elke keer dat er nieuwe software op de computer wordt geïnstalleerd of bijgewerkt, dient te worden gecontroleerd of de invoegtoepassing juist werkt zoals wordt beschreven in de beknopte handleiding van de RAS Extension-invoegtoepassing.

Als het RAS Extension-invoegrapport niet is geïnstalleerd, moet het assaybestand handmatig worden opgesteld voordat de *therascreen* RAS Extension Pyro-assay voor de eerste keer wordt uitgevoerd. Stel de assays op voor KRAS-codons 59/61, 117 en 146 en NRAS-codons 12, 13, 59, 61, 117 en 146 door de PyroMark Q24-software te gebruiken, zoals hieronder wordt beschreven.

Procedure


1. Klik op  op de werkbalk en selecteer "New AQ Assay" (Nieuwe AQ-assay).

2. In Tabel 15 worden de “Sequences to Analyze” (Te analyseren sequenties) getoond die voor alle acht RAS Extension Pyro-assays worden geanalyseerd. Voer de assayspecifieke sequentie in het veld “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) in.
3. De “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) kan ook na de run worden gewijzigd zodat mutaties op verschillende posities kunnen worden geanalyseerd (zie “Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run Om te controleren of mutaties in andere nucleotiden aanwezig zijn, wijzigt u de “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) volgens Tabel 10. Na de run is het mogelijk om de “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) te wijzigen (indien deze niet is vergrendeld).

Opmerking: Controleer of de drempel voor enkele piekhoogte is ingesteld op 30 RLU. Controleer ook of de A-piek-verminderingfactor is ingesteld op 0,86 voor analyse van NRAS-codon 61.

4. Voer handmatig de assayspecifieke “Dispensation Order” (Distributievolverde) uit Tabel 15 in.

Opmerking: Gebruik de toets “Generate Dispensation Order” (Distributievolverde genereren) niet. Zowel de “Sequence to Analyze” (Te analyseren sequentie) als de “Dispensation Order” (Distributievolverde) moeten handmatig worden ingevoerd.

5. Klik op het tabblad “Analysis Parameters” (Analyseparameters) en verhoog de “Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:” (Drempel piekhoogte – Vereiste piekhoogte voor geslaagde kwaliteit:) naar 30.
6. Klik op  op de werkbalk en sla de assay op als “KRAS 59/61” of “KRAS 117” of “KRAS 146” of “NRAS 12/13” of “NRAS 59” of “NRAS 61” of “NRAS 117” of “NRAS 146”.

Tabel 15. Assayopstelling: "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie) en "Dispensation Order" (Distributievolgorde) voor de acht assays van de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit

<i>therascreen</i> RAS Extension-assay	Te analyseren sequentie	Distributievolgorde
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

Tabel 16. Veel voorkomende mutaties in het menselijke KRAS-gen die worden gedetecteerd door de *therascreen* RAS Extension Pyro-kit met de betreffende "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie)

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	Te analyseren sequentie	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS codon 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
KRAS codon 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS codon 146 (GCA)			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	Te analyseren sequentie	COSMIC ID* (V70)
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

* Uit de Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, online beschikbaar bij het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Tabel 17. Veel voorkomende mutaties in het menselijke NRAS-gen die worden gedetecteerd door de therascreen RAS Extension Pyro-kit met de betreffende "Sequence to Analyze" (Te analyseren sequentie)

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	Te analyseren sequentie	COSMIC ID* (V70)
NRAS codon 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 codon 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 codon 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACAVCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	-
NRAS codon 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

Substitutie nucleïnezuur	Substitutie aminozuur	Te analyseren sequentie	COSMIC ID* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS codon 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	–
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	–

* Uit de Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, online beschikbaar bij het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Appendix B: De afvalcontainer en bakjes legen



WAARSCHUWING

Gevaarlijke chemicaliën

De denaturatieoplossing die bij het vacuümwerkstation wordt gebruikt, bevat natriumhydroxide, dat irriterend is voor de ogen en de huid.

Draag altijd een veiligheidsbril, handschoenen en een laboratoriumjas.

De verantwoordelijke partij (zoals de laboratoriummanager) moet de noodzakelijke voorzorgsmaatregelen treffen om te garanderen dat de omliggende werkplek veilig is en dat de instrumentoperators niet worden blootgesteld aan gevaarlijke niveaus van giftige substanties (chemisch of biologisch) zoals wordt gedefinieerd in de toepasselijke veiligheidsinformatiebladen (VIB's) of documenten van OSHA,* ACGIH,[†] of COSHH[‡].

De ventilatie voor dampen en de afvoer van afval moet worden uitgevoerd volgens alle nationale, provinciale en plaatselijke voorschriften en wetten voor gezondheid en veiligheid.

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Verenigde Staten van Amerika).

[†] ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Verenigde Staten van Amerika).

[‡] COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Verenigd Koninkrijk).

Leef alle nationale, provinciale en plaatselijke milieuvoorschriften na voor de afvoer van laboratoriumafval.

Wat u moet weten voor u begint

- Voor dit protocol is water van hoge zuiverheid vereist.

Procedure

1. Zorg dat er geen vacuüm wordt toegepast op het vacuümhulpmiddel. Zorg dat het vacuüm is gesloten (uitgeschakeld) en dat de vacuümpomp is uitgeschakeld.
2. Voer alle oplossingen die in de bakjes zijn overgebleven af.
3. Spoel de bakjes met water van hoge zuiverheid of vervang indien nodig de bakjes.
4. Leeg de afvalcontainer.
5. De dop kan worden verwijderd zonder de slang los te koppelen.

Als het vacuümwerkstation moet worden gereinigd (bijvoorbeeld wegens stof of gemorste vloeistoffen), volgt u de instructies in de gebruikershandleiding van de PyroMark Q24.

Bestelgegevens

Product	Contents	Cat. no.
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	Voor 24 reacties: Sequencing-primers, PCR-primers, ongemethyleerd controle-DNA, PyroMark PCR-mastermengsel, Coralload-concentraat, buffers en reagentia	971590
PyroMark Q24 MDx	Sequentiegebaseerd detectieplatform voor Pyrosequencing van 24 monsters tegelijkertijd	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vacuümwerkstation voor het voorbereiden van 24 monsters tegelijkertijd, van PCR-product tot enkelstrengs template	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Analysesoftware	9019063
Accessoires		
PyroMark Q24 Plate (100)	Sequencing-reactieplaat met 24 putjes	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartridges voor het distribueren van nucleotiden en reagentia	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Herbruikbare filterprobes voor PyroMark-vacuümwerkstation Q96 en Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Voor installatiecontrole van systeem	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Voor prestatiebevestiging van systeem	979304

Product	Contents	Cat. no.
Verwante producten		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Voor 50 DNA-voorbereidingen: 50 QIAamp MinElute®-kolommen, proteïnase K, buffers, afnamebuisjes (2 ml)	56404

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke leverancier.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Groep); 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).

Beperkte licentieovereenkomst voor *therascreen* RAS Extension Pyro-kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in het paneel bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van dit paneel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij het paneel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die verkrijgbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met het paneel en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie www.qiagen.com voor bijgewerkte licentievoorwaarden.

Mei-16 HB-1882-002 © 2016 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com