

# Handbok för *therascreen*<sup>®</sup> GIST RapidScreen Pyro<sup>®</sup> Kit



Version 1

**IVD**

För in vitro-diagnostisk användning



**REF** 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

**R2** **MAT** 1075556SV



## **QIAGEN provtagnings- och analysmetoder**

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla typer av biologiska prover. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

### **QIAGEN sätter standarden för:**

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Innehåll

<b>Avsedd användning</b>	<b>5</b>
<b>Sammanfattning och förklaring</b>	<b>5</b>
<b>Användningsprinciper</b>	<b>7</b>
Kontroller	8
<b>Material som medföljer</b>	<b>9</b>
Kitets innehåll	9
<b>Material som behövs men inte medföljer</b>	<b>10</b>
<b>Varningar och säkerhetsåtgärder</b>	<b>13</b>
Säkerhetsinformation	13
Allmänna säkerhetsåtgärder	13
<b>Förvaring och hantering av reagenser</b>	<b>14</b>
<b>Förvaring och hantering av prover</b>	<b>14</b>
<b>Procedur</b>	<b>14</b>
DNA-isolering	14
Protokoll	
■ 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet	16
■ 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit	19
■ 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor	22
■ 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24	24
■ 5: Köra PyroMark Q24-systemet	28
■ 6: Analysera en PyroMark Q24-körning	30
<b>Tolkning av resultat</b>	<b>34</b>
Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivåmutationer	34
Felsökningsguide	38
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>41</b>
<b>Begränsningar</b>	<b>41</b>

<b>Testets egenskaper</b>	<b>41</b>
LOB och LOD	41
Linjäritet	43
Precision	44
Diagnostisk utvärdering	45
<b>Referenser</b>	<b>47</b>
<b>Symboler</b>	<b>48</b>
<b>Kontaktinformation</b>	<b>48</b>
<b>Bilaga A: Konfigurera <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro-analyser</b>	<b>50</b>
<b>Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trägen</b>	<b>53</b>
<b>Beställningsinformation</b>	<b>54</b>

## Avsedd användning

*therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit är ett in vitro-test med nukleinsyrasekvensering baserat på pyrosekvenseringsteknik (Pyrosequencing®) för kvantitativ detektion av mutationer i exon 9 i den mänskliga *KIT*-genen och i exon 18 i den mänskliga *PDGFRA*-genen i genomiskt DNA taget från mänsklig vävnad.

*therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit är avsett att ge läkare information som hjälper till att avgöra vilka patienter med diagnosen gastrointestinal stromacellstumör (GIST) som sannolikt är lämpade för behandling med läkemedel som hämmar signalvägar, t.ex. imatinib. För in vitro-diagnostisk användning.

Endast för användning med systemet PyroMark® Q24. I systemet PyroMark Q24 ingår:

- Instrumentet PyroMark Q24 och instrumentet PyroMark Q24 MDx.
- Vakuumstationen PyroMark Q24 och vakuumstationen PyroMark Q24 MDx.
- Programmet PyroMark Q24 (version 2.0) och programmet PyroMark Q24 MDx (version 2.0).

Produkten är endast avsedd att användas av professionella användare som tekniker och läkare som har utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer, molekylärbiologiteknik och systemet PyroMark Q24.

Den här produkten är inte avsedd att användas med vävnadsprover från lunga.

## Sammanfattning och förklaring

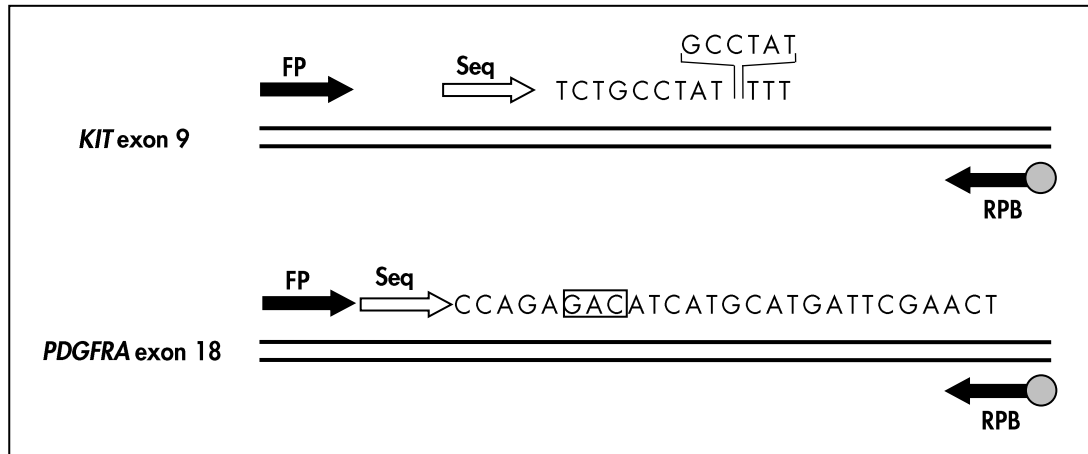
*therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit används för kvantitativ mätning av mutationer i *KIT* exon 9 och *PDGFRA* exon 18 (se bild 1). Detektion av mutationer i *KIT* exon 9 gör att det går att fastställa lämplig dos av imatinib, och detektion av mutationer i *PDGFRA* exon 18 hjälper till att utesluta mindre känsliga eller resistenta genotyper (1–3).

<i>KIT</i> exon 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
<i>PDGFRA</i> exon 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTGGAAGGCGT

**Bild 1. Genomisk kontext för de sekvenserade regionerna av de mänskliga *KIT*- och *PDGFRA*-generna (Ensembl-ID ENSG00000157404 och ENSG00000134853).** Kodon 503 i *KIT*-genen och kodon 842 i *PDGFRA*-genen indikeras med fyrkanter.

Kitet består av två analyser: en för detektion av mutationer i *KIT* exon 9 och en för detektion av mutationer i kodonerna *PDGFRA* exon 18 (se bild 2). De två regionerna amplifieras separat med PCR och sekvenseras genom den definierade regionen. Sekvenser som omger de definierade positionerna fungerar som normaliserings- och referenstoppar för kvantifiering och kvalitetsbedömning av analysen.

**Obs:** Båda analyserna sekvenseras framåt.



**Bild 2. Illustration av *KIT*/*PDGFRA*-analyserna.** Den indikerade sekvensen är den analyserade sekvensen för ett vildtypsprov. Positionen och sekvensen för 6 bp-dupliceringen i *KIT* exon 9 indikeras. Fyrkanten indikerar kodon 842 i *PDGFRA* exon 18. **FP:** Forward PCR-primrar; **RPB:** Reverse PCR-primrar (B indikerar biotinylering); **Seq:** Sekvenseringsprimrar.

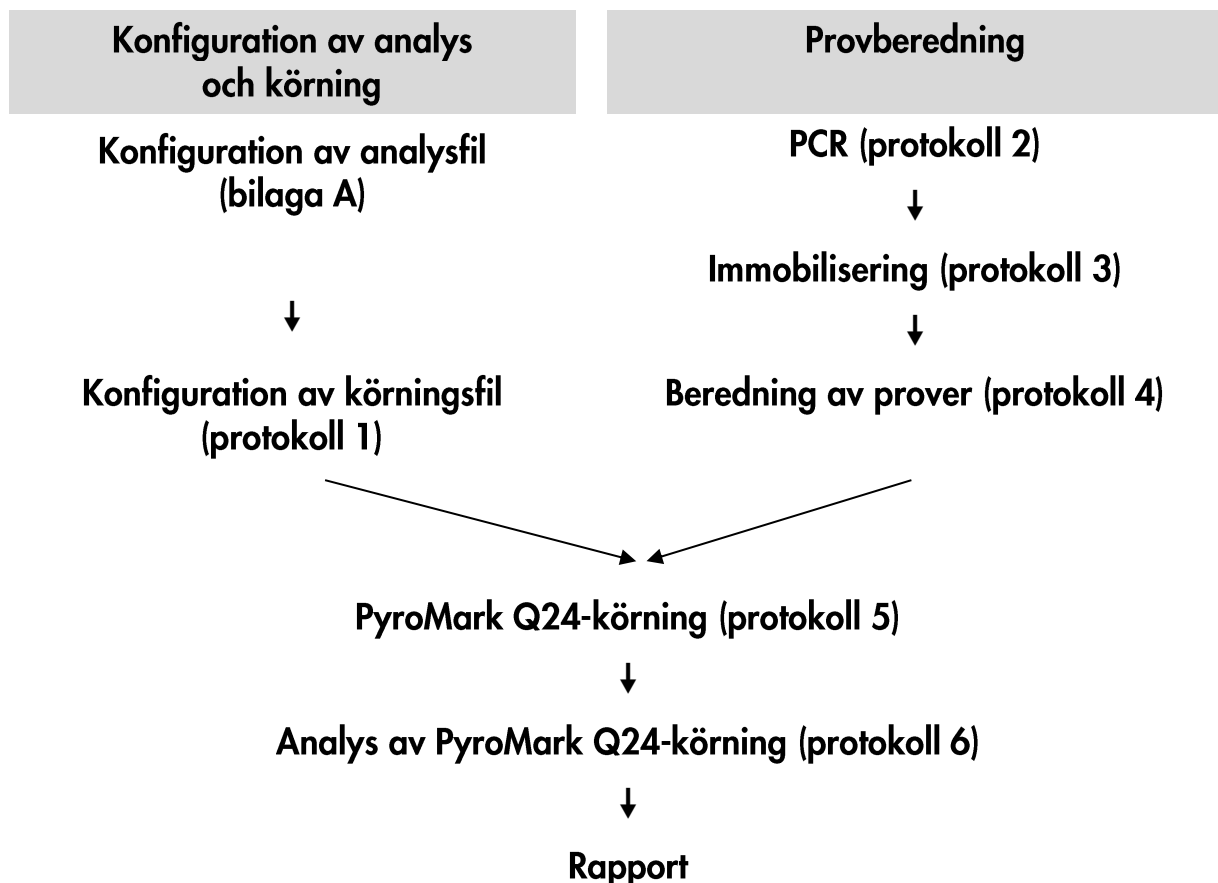
Produkten består av en PCR-primerblandning och en sekvenseringsprimer för varje analys. Primrarna levereras i lösningsform. Varje flaska innehåller 32 µl av varje primer eller primerblandning.

## Användningsprinciper

Arbetsflödet nedan illustrerar analysproceduren. Efter PCR med primrar med *KIT* exon 9 och *PDGFRA* exon 18 som mål immobiliseras amplikonerna på Strep-tavidin Sepharose® High Performance-kulor. Enkelsträngat DNA bereds och de motsvarande sekvenseringsprimrarna binds till DNA. Proverna analyseras sedan på PyroMark Q24 med hjälp av analyskonfigurationsfiler och en körningsfil.

Vi rekommenderar att GIST RapidScreen Plug-in Report används för att analysera körningen. GIST RapidScreen Plug-in Report kan fås via e-post från [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Körningen kan dock även analyseras med hjälp av analysverktyget som är integrerat i systemet PyroMark Q24. "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) kan justeras för detektion av sällsynta mutationer efter körningen (se "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 30 och "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser", sidan 50).

### Arbetsflöde för *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-proceduren



## Kontroller

Ometylerat kontroll-DNA ingår i kitet som en positiv kontroll för PCR och sekvenseringsreaktioner. Detta kontroll-DNA har en vildtyps-genotyp i de regioner som sekvenserats med detta kit, och det krävs för korrekt tolkning av resultat och identifiering av lågnivåmutationer (se "Tolkning av resultat", sidan 30). Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning.

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



## Material som medföljer

### Kitets innehåll

#### *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit (förpackning 1/2)

<b><i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalognr</b>	<b>971510</b>
<b>Antal reaktioner</b>	<b>24</b>
Seq Primer KIT exon 9	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18	32 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (PyroMark PCR-huvudmix, 2x)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (CoralLoad®-koncentrat, 10x)	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Ometylerat kontroll-DNA, 10 ng/µl)	100 µl

## **therascreen Pyro-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2)**

<b>therascreen Pyro-buffertar och -reagenser</b>	
PyroMark Binding Buffer (PyroMark bindningsbuffert)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark hybridiseringsbuffert)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark denatureringslösning)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (PyroMark tvättbuffert, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (Enzymlösning)	1 flaska
Substrate Mixture (Substratblandning)	1 flaska
dATP $\alpha$ S	1180 $\mu$ l
dCTP	1180 $\mu$ l
dGTP	1180 $\mu$ l
dTTP	1180 $\mu$ l
therascreen <i>GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (engelska)	1

\* Innehåller natriumhydroxid.

## **Material som behövs men inte medföljer**

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

### **Reagenser**

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", sidan 14)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))

- Höggradigt rent vatten (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller motsvarande)  
**Obs:** I kitet medföljer tillräckligt med vatten för PCR, DNA-immobilisering och för att lösa upp enzymblandningen och substratblandningen; det behövs ytterligare höggradigt rent vatten för att späda PyroMark tvättbuffert, 10x
- Etanol (70 %)\*

### Förbrukningsartiklar

- Sterila pipettspetsar (med filter för PCR-uppställning)
- PCR-plattor med 24 brunnar (se "Rekommenderade plattor med 24 brunnar", sidan 12)
- Självhäftande folie

### Utrustning

- Pipetter (justerbara)<sup>†</sup>
- Bänkstående mikrocentrifug<sup>†</sup>
- Termocykler<sup>†</sup> och passande PCR-rör
- PyroMark Q24 (kat.nr 9001513 eller 9001514)<sup>†‡</sup>
- PyroMark Q24 Software (kat.nr 9019063 eller 9019062)<sup>‡</sup>
- PyroMark Q24 Plate (kat.nr 979201)<sup>‡</sup>
- PyroMark Q24 Cartridge (kat.nr 979202)<sup>‡</sup>
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (kat.nr 9001515 eller 9001517)<sup>†‡</sup>
- Skakapparat<sup>†</sup> för immobilisering med kulor (se "Rekommenderade skakapparater", sidan 12)
- Värmeblock<sup>†</sup> med kapacitet för 80 °C

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

<sup>†</sup> Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

<sup>‡</sup> CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EC. Alla andra produkter som listas är inte CE-IVD-märkta baserat på EU-direktivet 98/79/EC.

## Rekommenderade plattor med 24 brunnar

Plattorna med 24 brunnar i tabell 1 rekommenderas för användning med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit.

**Tabell 1. Plattor med 24 brunnar rekommenderas för användning med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

Tillverkare	Produkt	Katalognummer
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

## Rekommenderade skakapparater

Skakapparaterna med orbital rörelse i tabell 2 rekommenderas för användning med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit.

**Tabell 2. Skakapparater som rekommenderas för användning med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

Tillverkare	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer confort (basenhet)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

# Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

## Säkerhetsinformation

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

Följande risk- och säkerhetsfraser gäller för komponenter i *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit:

### PyroMark Denaturation Solution



Varning! Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan vara korrosivt för metaller. Sug upp spill för att undvika materiella skador. Förvaras endast i originalbehållaren. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

## Allmänna säkerhetsåtgärder

Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- För optimalt resultat krävs att anvisningarna i användarmanualen följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrade prestanda.
- Komponenterna i den här produkten räcker för att utföra 24 reaktioner i upp till 5 oberoende körningar.
- Använd sterila pipettspetsar med filter (för PCR-konfiguration).
- Förvara och extrahera positivt material (prover, positiva kontroller och amplikon) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Tina alla komponenter omsorgsfullt i rumstemperatur (15–25 °C) innan analysen påbörjas.
- När komponenterna tinats ska de blandas (genom att pipettera upp och ned upprepade gånger eller genom att vortexa i pulser) och centrifugeras en kort stund.

- Misslyckade resultat får inte ligga till grund för bedömning av mutationsstatus.

## Förvaring och hantering av reagenser

*therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit levereras i två förpackningar.

*therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit (förpackning 1/2) levereras på torris. PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, ometylerat kontroll-DNA och alla primrar ska förvaras i  $-15$  till  $-30$  °C direkt vid ankomst.

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

Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning är stabilt i minst 10 dagar i  $2-8$  °C. Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning kan frysas och förvaras i flaska i  $-15$  till  $-30$  °C. Frusna reagenser ska inte genomgå mer än 6 frys-/upptiningscykler.

**Obs:** Nukleotider ska inte frysas.

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

## Förvaring och hantering av prover

Alla prover ska betraktas som potentiellt smittbärande material.

Provmaterialet är mänskligt DNA som extraherats från blod eller formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) prover.

Prover från människor som genomgår behandling med heparin får inte användas. Blodprover som tagits i rör med heparin som antikoagulant får inte användas. Heparin påverkar PCR.

## Procedur

### DNA-isolering

Systemegenskaperna har fastställts med EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit och QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit för extrahering av mänskligt DNA från formalinfixerade, paraffinbäddade tumörprover. För systemet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

har egenskaperna fastställts med blodprover från friska patienter som delvis spikats med tumörceller.

De kit från QIAGEN som visas i tabell 3 är validerade för DNA-rening från de angivna mänskliga provtyperna för användning med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit. Utför DNA-reningen enligt instruktionerna i kit-handböckerna.

**Tabell 3. DNA-reningskit som rekommenderas för användning med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

Provmaterial	Kit för isolering av nukleinsyra	Katalognummer (QIAGEN)
Paraffinbäddad vävnad	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

\* Följ protokollet för användning med paraffinbäddad vävnad. EZ1 DNA Tissue Kit ska användas tillsammans med EZ1 Advanced (kat.nr 9001410 eller 9001411) och EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat.nr 9001492) och EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9018700) eller med BioRobot® EZ1 (kat.nr 9000705; har utgått ur sortimentet) och EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9015862).

† CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EC.

# Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet



## Viktigt att tänka på före start

- Om det behövs kan LOB bekräftas genom att ett vildtypsprov används för att ta fram en full platta med resultat. Mer information finns i riktlinjen CLSI EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".

## Saker som ska göras före start

- Om GIST RapidScreen Plug-in Report inte har installerats ska du skapa en analyskonfiguration (se "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser", sida 50). Detta behöver endast göras en gång innan du kör *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analysen för första gången. Om GIST RapidScreen Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24 under sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/GIST". GIST RapidScreen Plug-in Report kan fås via e-post från [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Procedur

1. **Klicka på  i verktygsfältet.**  
En ny körningsfil skapas.
2. **Skriv in körningsparametrarna (se "Körningsparametrar", sidan 17).**
3. **Förbered plattan genom att lägga till analyser för både KIT exon 9 och PDGFRA exon 18 i brunnar som motsvarar de prover som ska analyseras.**  
**Obs:** En negativ kontroll (utan mall-DNA) ska ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.  
**Obs:** Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning ("Kontroller", sidan 8).
4. **När körningen är iordningställd och redo att köras på systemet PyroMark Q24 ska du skriva ut en lista med de volymer av enzymblandning, substratblandning och nukleotider som behövs, samt iordningställandet av plattan. Välj "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) och när rapporten sedan visas klickar du på .**
5. **Stäng körningsfilen och kopiera den på ett USB-minne (medföljer systemet) via Utforskaren i Windows®.**



Den utskrivna Pre Run Information-rapporten kan användas som mall för provuppställningen (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 22).

Information om körning av plattan på PyroMark Q24 finns i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet" på sidan 28.

## Körningsparametrar

"Run name" (Namn på körningen):	Namnet på körningen ges när filen sparas. Om du byter namn på filen ändras också namnet på körningen.
"Instrument method" (Instrumentmetod):	Välj instrumentmetod efter vilken kassett som ska användas för körningen; se instruktionerna som medföljer produkterna.
"Plate ID" (Platt-ID):	<b>Valfritt:</b> Ange ID för PyroMark Q24 Plate.
"Bar code" (Strekkod):	<b>Valfritt:</b> Ange ett strekkodsnummer för plattan eller, om du har en strekkodsläsare ansluten till din dator, placera muspekaren i textrutan "Barcode" (Strekkod) genom att klicka i rutan och läs in strekkoden.
"Kit and Reagent ID" (Kit- och reagens-ID):	<b>Valfritt:</b> Ange lotnumret för den <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit-förpackning 1 och -förpackning 2 som ska användas. Lotnumret finns på produktetiketten. <b>Obs:</b> Vi rekommenderar att du anger båda lotnumren så att eventuella oväntade problem med <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit kan spåras.
Anteckning om körningen:	<b>Valfritt:</b> Gör en anteckning om innehållet i eller syftet med körningen.

## Lägga till analysfiler

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

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

En brunn färgkodas enligt den analys som laddas för brunnen.

## **Ange prov-ID och anteckningar**

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

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

## Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit

Det här protokollet är avsett för PCR-amplifieringar av en region som innehåller *KIT* exon 9, och en separat PCR-amplifiering av en region som innehåller *PDGFRA* exon 18 med hjälp av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit.

### Viktigt att tänka på före start

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

### Saker som ska göras före start

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

### Procedur

#### 1. Tina alla komponenter som behövs (se tabell 4).

Blanda väl före användning.

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

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

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

**Tabell 4. Beredning av reaktionsmix för varje PCR-primermix**

Komponent	Volym/reaktion
PyroMark PCR-huvudmix, 2x	12,5 µl
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5 µl
PCR-primer KIT exon 9 <b>eller</b> PCR-primer PDGFRA exon 18	1 µl
Vatten (H <sub>2</sub> O, medföljer)	4 µl
<b>Total volym</b>	<b>20 µl</b>

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

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

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

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

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

**Tabell 5. Beredning av PCR**

Komponent	Volym/reaktion
Reaktionsmix	20 µl
Prov-DNA	5 µl
<b>Total volym</b>	<b>25 µl</b>

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

Tabell 6. Optimerat cyklingsprotokoll

			Kommentar
<b>Initialt aktiveringssteg:</b>	15 minuter	95 °C	HotStarTaq DNA-polymeras aktiveras i det här värmesteget.
<b>3-stegscyklning:</b>			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Hybridisering	30 sekunder	53 °C	
Extension	20 sekunder	72 °C	
Antal cykler	42		
<b>Slutlig extension:</b>	5 minuter	72 °C	

6. Placera PCR-rören i termocyklern och starta cyklingsprogrammet.
7. Fortsätt efter amplifieringen med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 22. PCR-proverna kan förvaras i 2–8 °C i upp till 3 dagar.

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

Det här protokollet är avsett för immobilisering av mall-DNA på Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) före analys på systemet PyroMark Q24.

### Saker som ska göras före start

- Låt alla reagenser och lösningar uppnå rumstemperatur (15–25 °C) innan du sätter igång.
- Slå på PyroMark Q24 minst 30 minuter innan du startar en körning. Strömbrytaren sitter på instrumentets baksida.
- Placera en PyroMark Q24-platthållare på ett föruppvärmt värmeblock med temperaturen 80 °C. Ha en andra PyroMark Q24-platthållare i rumstemperatur (15–25 °C).
- PyroMark tvättbuffert levereras som ett koncentrat, 10x. Innan det används första gången ska det spädas till en 1x-arbetslösning genom tillsats av 225 ml höggradigt rent vatten i 25 ml PyroMark tvättbuffert, 10x (slutlig volym 250 ml).  
**Obs:** 1x PyroMark tvättbuffert-arbetslösning är stabil i 2–8 °C till angivet utgångsdatum.
- Förbered vakuumstationen PyroMark Q24 för provberedning enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24.

### Procedur

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

**Tabell 7. Huvudmix för DNA-immobilisering**

Komponent	Volym/prov
PyroMark bindningsbuffert	40 µl
Streptavidin Sepharose High Performance	1 µl
Vatten (H <sub>2</sub> O, medföljer)	29 µl
<b>Total volym</b>	<b>70 µl</b>

**Obs:** Det här protokollet gäller Streptavidin Sepharose High Performance med lotnummer 10057037 eller högre. Vid användning av Streptavidin Sepharose High Performance Beads med ett lotnummer som är lägre än 10057037 måste volymen kulor som används per prov ökas till 2 µl samtidigt som vattnet minskas med lämplig volym.

- 3. Tillsätt 70 µl huvudmix i brunnarna i en PCR-platta med 24 brunnar enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 16).**

Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Se till att huvudmixen är homogen genom att pipettera upp och ned upprepade gånger eller genom att vortexa i pulser. Centrifugera inte huvudmixen.

- 4. Tillsätt 10 µl biotinylerad PCR-produkt från protokoll 2 i varje brunn med huvudmix enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 2: PCR med de PCR-reagenser som medföljer *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit", sidan 19).**

Den totala volymen per brunn ska vara 80 µl efter tillsats av huvudmix och PCR-produkt.

- 5. Förslut PCR-plattan med hjälp av självhäftande folie.**

Se till att det inte kan förekomma läckage mellan brunnarna.

- 6. Skaka PCR-plattan i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter vid 1 400 rpm.**

Fortsätt omedelbart med "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 24 under det här steget.

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

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

### Viktigt att tänka på före start

- Innan rören med sekvenseringsprimrar öppnas ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Tillsätt de 2 olika sekvenseringsprimrarna enligt den förinställning för plattan som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 16), beroende på analysregion (*KIT* exon 9 eller *PDGFRA* exon 18).
- Förkorta inte tiden för nedkylning av proverna efter uppvärmning till 80 °C.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i *användarmanualen till PyroMark Q24* och byt ut filterproberna när detta indikeras.

### Procedur

- 1. Späd en tillräcklig mängd av varje sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer *KIT* exon 9 och sekvenseringsprimer *PDGFRA* exon 18, i PyroMark hybridiseringsbuffert enligt tabell 8.**

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

Späd inte ut och förvara någon mer sekvenseringsprimer.



**Tabell 8. Exempel på spädning av sekvenseringsprimrarna**

Komponent	Volym/prov	Volym för 9 + 1 reaktioner
PyroMark hybridiseringsbuffert	24,2 µl	242 µl
sekvenseringsprimer KIT exon 9 <b>eller</b> sekvenseringsprimer PDGFRA exon 18	0,8 µl	8 µl
<b>Total volym</b>	<b>25 µl</b>	<b>250 µl</b>

2. Tillsätt 25 µl utspädd sekvenseringsprimer i varje brunn i PyroMark Q24-plattan enligt körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 16).

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

3. Slå på vakuumpumpen till vakuumbastationen PyroMark Q24.
4. Placera PCR-plattan från protokoll 3 och PyroMark Q24-plattan på vakuumbastationen (se bild 3).

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



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

5. Applicera vakuum i verktyget genom att öppna vakuumbrytaren.
6. Sänk långsamt ned vakuumverktygets filterprober i PCR-plattan för att fånga in kulorna som innehåller immobiliserad mall. Håll proberna på plats i 15 sekunder. Var försiktig när du tar upp vakuumverktyget.

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

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

7. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml 70-procentig etanol (tråg 1, bild 3). Spola filterproberna i 5 sekunder.
8. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml denatureringslösning (tråg 2, bild 3). Spola filterproberna i 5 sekunder.
9. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 50 ml tvättbuffert (tråg 3, bild 3). Spola filterproberna i 10 sekunder.
10. Lyft upp vakuumverktyget och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (bild 4).



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

11. Stäng verktygets vakuumbrytare (Off) medan vakuumverktyget hålls ovanför PyroMark Q24 Plate.
12. Frigör kulorna i PyroMark Q24-plattan genom att sänka ned filterproberna i den utspädda sekvenseringsprimern och flytta vakuumverktyget försiktigt fram och tillbaka.  
Var försiktig så att du inte skadar ytan på PyroMark Q24-plattan genom att skrapa den med filterproberna.
13. Flytta vakuumverktyget till tråget med höggradigt rent vatten (tråg 4, bild 3) och skaka det i 10 sekunder.
14. Tvätta filterproberna genom att sänka ned proberna i höggradigt rent vatten (tråg 5, bild 3) och applicera vakuum. Spola proberna med 70 ml höggradigt rent vatten.

- 15. Lyft upp vakuumverktyget och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (bild 4).**
- 16. Stäng verktygets vakuumbrytare (Off) och placera vakuumverktyget i parkeringsposition (P).**
- 17. Stäng av vakuumpumpen.**

I slutet av arbetsdagen ska vätskeavfall och återstående lösning kasseras och vakuumstationen PyroMark Q24 ska kontrolleras avseende damm och spill. Se "Bilaga B: Tömning avfallsbehållaren och trägen", sidan 53.
- 18. Värm PyroMark Q24-plattan med prover i 80 °C i 2 minuter med hjälp av en föruppvärmd PyroMark Q24-platthållare.**
- 19. Ta bort PyroMark Q24-plattan från platthållaren och placera den på en andra PyroMark Q24-platthållare som förvarats i rumstemperatur (15–25 °C) för att låta proverna svalna till rumstemperatur i 10–15 minuter.**
- 20. Fortsätt med "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 28.**

## Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet

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

### Viktigt att tänka på före start

- I rapporten "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 16) finns information om mängden nukleotider, enzym och substratbuffert som behövs för en specifik körning.
- Använd engångsspetsar utan hydrofobiskt filter vid laddning av kassetten för att kassetten ska fungera korrekt.

### Procedur

**1. Lös upp frystorkat enzym och substratblandningar i vardera 620 µl vatten (H<sub>2</sub>O, medföljer).**

**2. Blanda genom att skaka flaskan försiktigt.**

Vortexa inte!

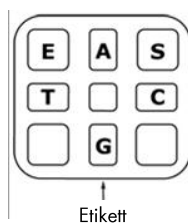
Låt blandningen stå i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter för att försäkra dig om att den är helt upplöst. Kontrollera att lösningen inte är grumlig innan du fyller PyroMark Q24-kassetten. Om reagenserna inte ska användas omedelbart ska reagensflaskorna placeras på is eller i ett kylskåp.

**3. Låt reagenserna och PyroMark Q24-kassetten uppnå rumstemperatur (20–25 °C).**

**4. Placera PyroMark Q24-kassetten så att etiketten är vänd mot dig.**

**5. Ladda PyroMark Q24-kassetten med korrekta volymer av nukleotider, enzym och substratblandningar enligt bild 5.**

Se till att inga luftbubblor överförs från pipetten till kassetten.



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

6. **Öppna kassettdörren och sätt in den fyllda reagenskassetten med etiketten utåt. Tryck in kassetten helt och tryck den sedan nedåt.**
7. **Kontrollera att randen är synlig framför kassetten och stäng dörren.**
8. **Öppna ramen som håller plattan och placera plattan på värmeblocket.**
9. **Stäng ramen och instrumentluckan.**
10. **Sätt in USB-minnet (med körningsfilen) i USB-porten på instrumentets framsida.**  
Ta inte bort USB-minnet förrän körningen är avslutad.
11. **Välj "Run" (Kör) i huvudmenyn (med skärmknapparna ▲ och ▼) och tryck på "OK".**
12. **Välj körningsfilen med skärmknapparna ▲ och ▼.**  
Om du vill se innehållet i en mapp markerar du mappen och trycker på "Select" (Välj). Om du vill gå tillbaka till föregående fönster trycker du på "Back" (Bakåt).
13. **När körningsfilen är vald trycker du på "Select" (Välj) för att starta körningen.**
14. **När körningen är avslutad och instrumentet bekräftar att körningsfilen har sparats på USB-minnet trycker du på "Close" (Stäng).**
15. **Ta ut USB-minnet.**
16. **Öppna instrumentluckan.**
17. **Öppna kassettdörren och ta bort reagenskassetten genom att lyfta upp och dra ut den.**
18. **Stäng kassettdörren.**
19. **Öppna ramen som håller plattan och ta bort plattan från värmeblocket.**
20. **Stäng ramen och instrumentluckan.**
21. **Kassera plattan och rengör kassetten enligt instruktionerna i produkt-databladet som medföljde kassetten.**
22. **Analysera körningen enligt "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 30.**

## Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning

Det här protokollet beskriver mutationsanalysen av en slutförd GIST RapidScreen-körning med programmet PyroMark Q24.

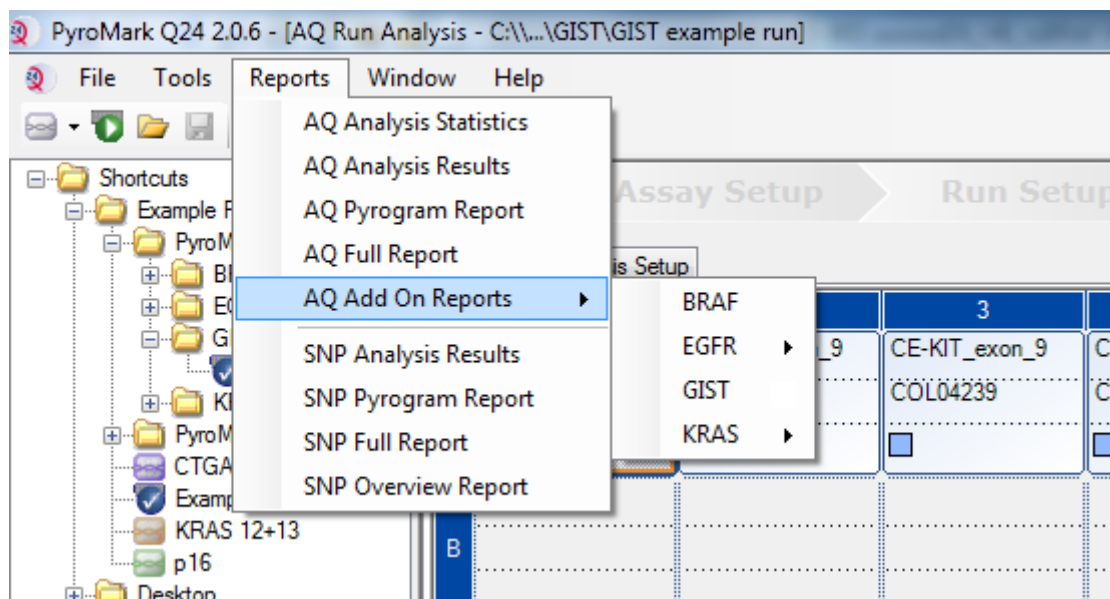
### Procedur

1. Sätt in USB-minnet (med den bearbetade körningsfilen) i datorns USB-port.
2. Flytta körningsfilen från USB-minnet till önskad plats på datorn med hjälp av Utforskaren i Windows.
3. Öppna körningsfilen i AQ-läget i programmet PyroMark Q24 genom att antingen välja "Open" (Öppna) i menyn "File" (Arkiv) eller genom att dubbelklicka på filen (✓) i snabbmenyn.
4. Körningen kan analyseras på 2 sätt. Gå till steg 5 om du använder GIST RapidScreen Plug-in Report. Gå till steg 6 om du använder den AQ-analys som är integrerad i programmet PyroMark Q24.

**Obs:** Vi rekommenderar starkt att GIST RapidScreen Plug-in Report används för dokumentation och tolkning av resultat. GIST RapidScreen Plug-in Report kan fås via e-post från [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Rapporten garanterar att de respektive LOD-värdena (tabell 9) och de olika "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) används för att detektera alla mutationer automatiskt.

**Obs:** Två komplexa mutationer i *PDGFRA* exon 18 (2526\_2538>G och 2524\_2526 GAC>TAT) kan inte analyseras med AQ-analysen i programmet PyroMark Q24. Vi rekommenderar att GIST RapidScreen Plug-in Report används för analys av komplexa mutationer i *PDGFRA* exon 18.

5. **Använda GIST RapidScreen Plug-in Report:**  
Generera en rapport genom att välja "AQ Add On Reports/GIST" (AQ-tilläggsrapporter/GIST) i menyn "Reports" (Rapporter) (se bild 6).



**Bild 6. Menyn GIST RapidScreen Plug-in Report (GIST RapidScreen plugin-rapport).**

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

### Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

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

**Bild 7. GIST RapidScreen Plug-in Report.**

- Använda AQ-analys:**  
Klicka på en av analysknapparna för att analysera körningen och få en översikt av resultaten.



Analysera alla brunnar.



Analysera den markerade brunnen.

Analysresultaten (allelfrekvenser) och kvalitetsbedömning visas ovanför variabelns position i Pyrogram<sup>®</sup>-kurvan. Mer information om hur en körning analyseras finns i *användarmanualen till PyroMark Q24*.

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

**Obs:** För så pålitliga resultat som möjligt rekommenderar vi enskilda höjdtoppar på över 30 RLU. Ange 30 RLU som "required peak height for passed quality" (tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet) i analyskonfigurationen (se "Bilaga A: Konfigurera theascreen GIST RapidScreen Pyro-analyser" och *användarmanualen till PyroMark Q24*).

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

**Obs:** Pyrogrammet ska alltid jämföras med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. De uppmätta topparna ska matcha höjden på histogramstaplarna.

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

Standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) är inriktad på 6 bp-dupliceringen i *KIT* exon 9 och den mest frekventa punktmutationen i kodon 842 (GAC>GTC) i *PDGFRA* exon 18 enligt definitionen i analyskonfigurationen (se bilaga A, sidan 50). Om ett prov innehåller en mindre vanlig mutation i *PDGFRA* exon 18 kan "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ändras så att mutationsstatusen för den aktuella mutationen analyseras enligt beskrivningen i bilaga A.

Två komplexa mutationer i *PDGFRA* exon 18 (2526\_2538>G och 2524\_2526GAC>TAT) kan inte analyseras med AQ-analysen i programmet PyroMark Q24. Vi rekommenderar att GIST RapidScreen Plug-in Report används för analys av komplexa mutationer i *PDGFRA* exon 18.

Vi rekommenderar omanalys av alla prover där ingen mutation har detekterats med standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) samt av prover som kvalitetsbedömts som "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad). Kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) och "Failed" (Misslyckad) kan



indikera en sällsynt mutation som inte hittas av standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) vilket resulterar i oväntade referenstoppar.

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

Uppdaterade frekvenser av mutationer i mänskliga *KIT/PDGFR*A finns på Sanger Institutes hemsida på adressen [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Obs:** När du har ändrat "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ska du se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

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

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

## Tolkning av resultat

### Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivåmutationer

Vi rekommenderar starkt att ometylerat kontroll-DNA ingår i varje körning för jämförelse och som kontroll för bakgrunds nivåer. Den uppmätta frekvensen för kontrollprovet ska vara mindre än eller lika stor som LOB (limit of blank).

Värdena för LOB (limit of blank) och LOD (limit of detection) som presenteras i handboken kan användas vid bestämning av förekomst av en mutation. De här värdena erhöles med hjälp av plasmidblandningar som bar på vildtypssekvensen eller den relevanta muterade sekvensen.

Efter analys med programmet PyroMark Q24 eller plugin-rapporterna kan 3 resultat erhållas.

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

**Obs:** Om GIST RapidScreen Plug-in Report används (se steg 5 av "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 30) och detta inträffar genereras ett varningsmeddelande.

Intervall från LOD till LOD + 3 % enheter möjliggör känslig detektion av lågnivåmutationer vid optimala förhållanden. En uppmätt frekvens som ligger över LOB i det ometylerade kontrollprovet indikerar en högre bakgrunds nivå än vanligt i respektive körning, vilket kan påverka allelkvantifiering, särskilt för låga mutationsnivåer. Därför måste resultat med varningen "Potential low level mutation" (Potentiell lågnivåmutation) utvärderas noggrant.

Prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation ska endast anses vara positiva för mutationen om det bekräftas genom att de körs om i duplikat tillsammans med ometylerat kontroll-DNA. Resultatet av båda duplikaten ska rapportera samma mutation med värden  $\geq$  LOD, och kontrollprovet ska rapporteras som "No mutation detected" (Ingen mutation detekterad). Annars ska provet bedömas som "No mutation detected" (Ingen mutation detekterad).

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

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

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

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

**Obs:** Ett beslut om behandling för cancerpatienter får inte enbart baseras på mutationsstatusen i *KIT* exon 9 och *PDGFRA* exon 18.

**Tabell 9. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer**

Nukleinsyrasubstitution	Aminosyra-substitution	LoB (procent-enheter)	LoD (procent-enheter)	COSMIC ID* (v58)
<b>KIT exon 9</b>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<b>PDGFRA exon 18</b>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y <sup>†</sup>	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 eller <sup>‡</sup>	D842_H845del eller <sup>‡</sup>	2,2	5,2	737 eller <sup>‡</sup>
2526_2537del12	I843_D846del <sup>‡</sup>			96892
2527_2538del12	I843_D846del <sup>†</sup>	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G <sup>§</sup>	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y <sup>†</sup>	0,9	3,9	12397

\* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

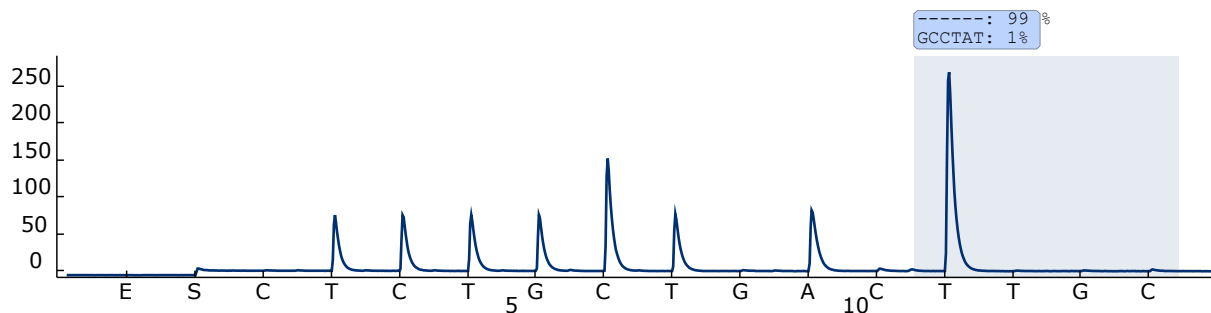
<sup>†</sup> Mutationerna 2524G>T och 2524\_2526GAC>TAT, och 2526\_2537del12 och 2527\_2538del12 resulterar i samma utbyte av aminosyra.

<sup>‡</sup> Mutationerna 2524\_2535del12 och 2526\_2537del12 resulterar i samma utbyte av nukleinsyra.

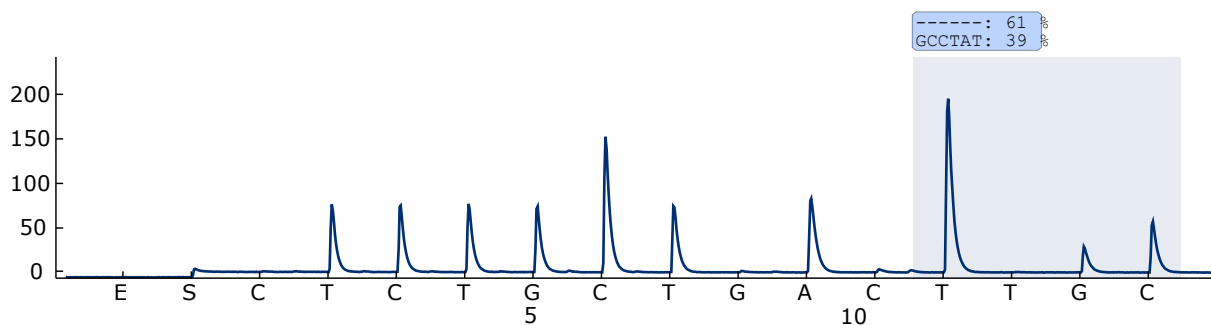
<sup>§</sup> Mutationen 2526\_2538>G och 2524\_2526GAC>TAT kan inte analyseras med AQLäget i programmet PyroMark Q24.

## Karakteristiska resultat

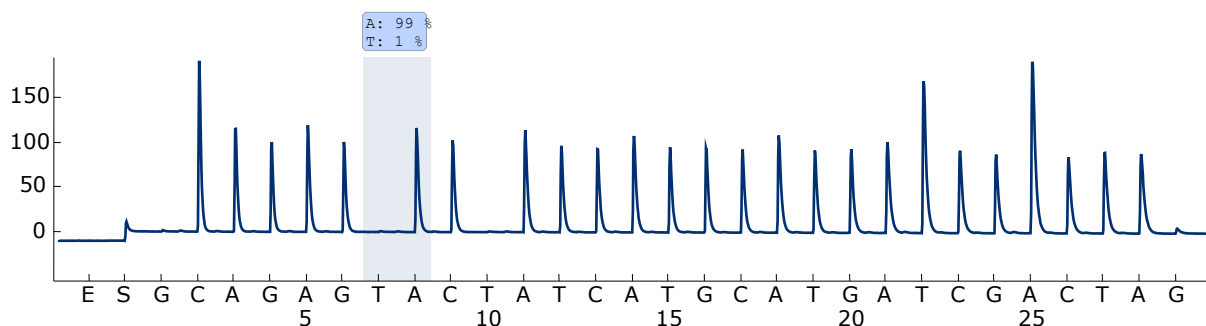
Karakteristiska pyrogramresultat visas i bild 8–11.



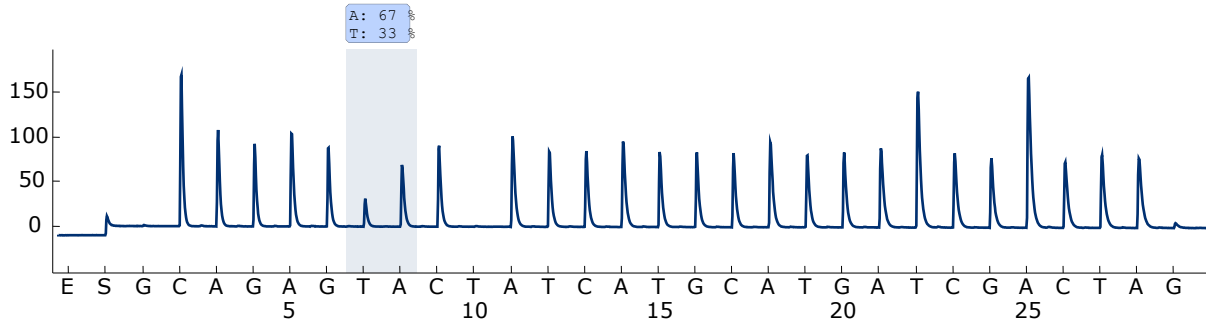
**Bild 8.** Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp i *KIT* exon 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* inriktad på 6 bp-dupliceringen efter kodon 503.



**Bild 9.** Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en GCCTAT-duplicering efter kodon 503 i *KIT* exon 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.



**Bild 10.** Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp i *PDGFRA* exon 18 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* inriktad på mutationen GAC>GTC i kodon 842 (nukleotid 2525).



**Bild 11. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en GAC>GTC-mutation i kodon 842 (nukleotid 2525) i PDGFRA exon 18 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.**

## Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vetenskapsmännen på QIAGENs tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Se *användarmanualen till PyroMark Q24* för allmän felsökning av instrumentet.

### Kommentarer och förslag

#### Signaler i kontrollen utan mall (negativ kontroll)

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| a) Överhörning mellan brunnar | Signalen från en brunn har detekterats i en intilliggande brunn. Undvik att placera prover med hög signalintensitet bredvid brunnar med "kontroll utan mall". |
| b) PCR-kontaminering          | Använd sterila pipettspetsar med filter. Förvara och extrahera material såsom prover, kontroller och amplikon separerat från PCR-reagenser.                   |

#### Dålig eller oväntad sekvens

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Genomiskt DNA av dålig kvalitet | Genomiskt DNA av dålig kvalitet kan göra att PCR misslyckas. Analysera PCR-prover med hjälp av elektroforetisk teknik (t.ex. systemet QIAxcel® eller agarosgelelektrofores). |
|---------------------------------|--|

## Kommentarer och förslag

---

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

- a) Låg topphöjd
- Hanteringsfel vid PCR-konfigurationen eller provberedningen innan pyrosekvensering kan resultera i låga toppar.
- Det är viktigt att proverna tas upp helt av vakuumentytan. Se till att vakuumentytan sänks ned långsamt i proverna och att geometrin för den PCR-platta eller de remsor som används för immobilisering tillåter fullständig upptagning av proverna.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i *användarmanualen till PyroMark Q24* och byt ut filterproberna när detta indikeras.
- Om varningsmeddelandet "Check" (Kontrollera) visas ska du jämföra pyrogrammet noggrant med histogrammet, vilket visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna är resultatet giltigt. Annars rekommenderar vi att provet körs på nytt.
- b) Mutationen är inte definerad i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
- Justera sekvensen som ska analyseras i analyskonfigurationen (se "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser", sidan 50) och analysera körningen på nytt.
- c) Oväntad och sällsynt mutation
- En kvalitetsbedömning med resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad) kan orsakas av ett oväntat mönster av toppar. Detta kan indikera en oväntad mutation som inte analyseras av "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera). Dessa prover ska analyseras med alternativet "Sequences to Analyze" (Sekvens att analysera) där hänsyn ska tas till oväntade mutationer.

## Kommentarer och förslag

---

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

### Högt bakgrundsvärde

- a) Felaktig förvaring av nukleotider
- Förvara nukleotider i 2–8 °C. Förvaring i –15 till –30 °C kan orsaka en ökning i bakgrunden.
- b) Kort tid för nedkylning av prover innan analys med pyrosekvensering
- Förvara proverna på en PyroMark Q24-platt-hållare i rumstemperatur i 10–15 minuter. Förkorta inte tiden för nedkylning.
- c) Kontaminering av kassetten
- Rengör kassetten noggrant enligt instruktionerna i produktdatabladet. Förvara kassetten skyddad mot ljus och damm.

### Inga signaler i positiv kontroll (ometylerat kontroll-DNA)

- a) Otillräcklig mängd enzym eller substratblandning för alla brunnar
- Se till att fylla PyroMark Q24-kassetten enligt "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg).
- b) Reagenser felaktigt förvarade eller spädda
- Bered reagenserna enligt instruktionerna i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 28.
- c) PCR- eller provberedningsfel
- Hanteringsfel vid PCR-konfiguration, programmering av PCR-cyklern eller provberedning innan pyrosekvensering kan resultera i uteblivna signaler. Utför funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i *användarmanualen till PyroMark Q24* och byt ut filterproberna när detta indikeras. Upprepa PCR och analys med pyrosekvensering.



## Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

## Begränsningar

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

För optimalt PCR-resultat krävs att anvisningarna i användarmanualen följs strikt. Var uppmärksam på de utgångsdatum som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

## Testets egenskaper

### LOB och LOD

LOB (limit of blank) och LOD (limit of detection) har fastställts för ett antal mutationer med hjälp av blandningar av plasmider (tabell 10). LOB och LOD fastställdes enligt rekommendationerna i Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".  $\alpha$ - och  $\beta$ -fel (falskt positiva respektive falskt negativa resultat) ställdes in på 5 %. LOD för vissa sällsynta borttagningar i *PDGFRA* exon 18 bestämdes genom att lägga till 3 standardavvikelser för blankmätningar till LOB-värdet. LOD-värdena ställdes in på minst 3 procentenheter över LOB-värdet.

LOB-värden representerar den frekvens som mätts upp med ett vildtypsprov. LOD-värden representerar den lägsta signal (uppmätt frekvens) som kan ses som positiv för den respektive mutationen.

**Tabell 10. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer**

Nukleinsyrasubstitution	Aminosyra-substitution	LOB (procent-enheter)	LOD (procent-enheter)	COSMIC ID* (v58)
<b>KIT exon 9</b>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<b>PDGFRA exon 18</b>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y <sup>†</sup>	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 eller <sup>‡</sup>	D842_H845del eller <sup>‡</sup>	2,2	5,2	737 eller <sup>‡</sup>
2526_2537del12	I843_D846del <sup>†</sup>			96892
2527_2538del12	I843_D846del <sup>†</sup>	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 <sup>§</sup>	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 <sup>§</sup>	12406
2526_2538>G <sup>¶</sup>	D842_D846>E	0,3	3,3 <sup>§</sup>	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y <sup>†</sup>	0,9	3,9 <sup>§</sup>	12397

\* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

<sup>†</sup> Mutationerna 2524G>T och 2524\_2526GAC>TAT, och 2526\_2537del12 och 2527\_2538del12 resulterar i samma utbyte av aminosyra.

<sup>‡</sup> Mutationerna 2524\_2535del12 och 2526\_2537del12 resulterar i samma utbyte av nukleinsyra.

<sup>§</sup> LOD för de här borttagningarna i *PDGFRA* exon 18 bestämdes genom att lägga till 3 standardavvikelser för blankmätningar till LOB-värdet.

<sup>¶</sup> Mutationen 2526\_2538>G kan inte analyseras med AQ-läget i programmet PyroMark Q24.

## Linjäritet

Linjäritet fastställdes med hjälp av blandningar av plasmider som bar på vildtyps- eller mutantsekvensen för dupliceringen 1509\_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9 och mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18. Plasmiderna blandades i proportioner som gav 4 mutationsnivåer (5, 10, 30 och 50 %). Varje blandning analyserades med 3 olika loter av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit i 3 pyrosekvenseringskörningar med vardera 3 replikat.

Resultaten (n = 9 för varje mutationsnivå) analyserades enligt riktlinjen CLSI EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" med programmet Analyse-it® v2.21 och visas i bilderna 12 och 13.

Resultaten var linjära inom en tillåten icke-linjäritet på 5 procentenheter i det testade intervallet från 5 till 50 % mutationsnivå.

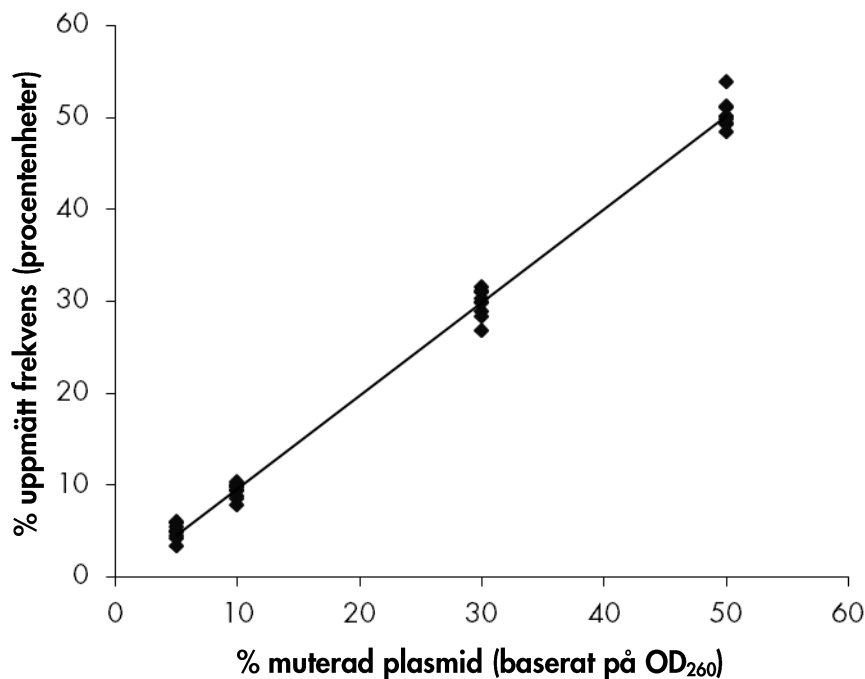


Bild 12. Linjäritet för dupliceringen 1509\_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9.

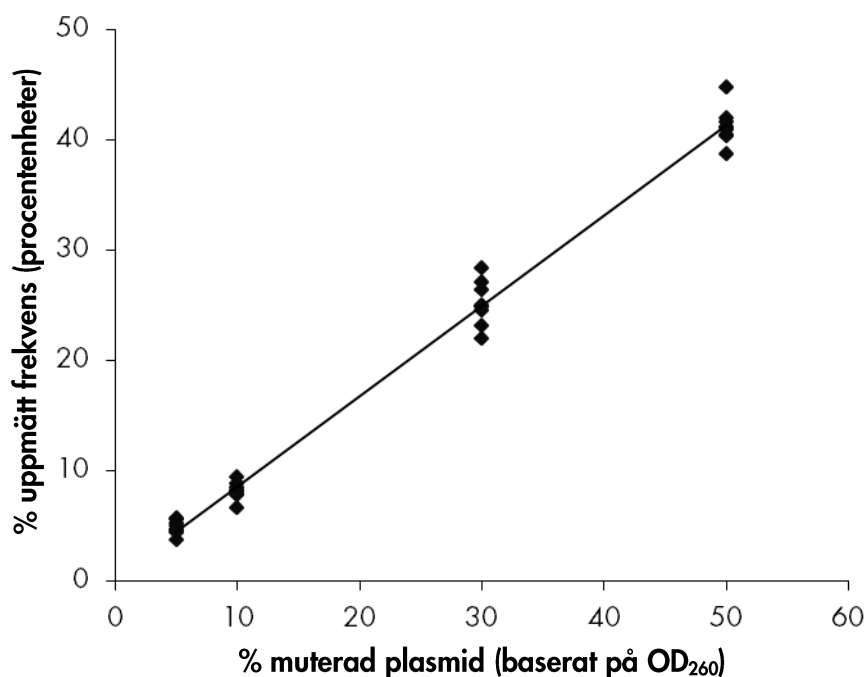


Bild 13. Linjäritet för mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18.

## Precision

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

Repeterbarhet (variationer inom analyser och mellan batchar) beräknades baserat på data för bestämning av linjäritet (3 körningar på samma dag med olika loter av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit). Variationer inom laboratoriet bestämdes i 3 körningar i ett laboratorium på 3 olika sätt med olika operatörer, PyroMark Q24-instrument och loter för *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit. Reproducerbarhet (variationer mellan laboratorier) beräknades av 2 körningar vardera i ett internt och externt laboratorium med hjälp av olika loter av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit.

Uppskattningar av precision uttrycks som standardavvikelse av de uppmätta mutationsfrekvenserna i procentenheter (tabell 11). Repeterbarhet, variationer inom laboratoriet och reproducerbarhet för dupliceringen 1509\_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9 var 0,8–1,6, 0,5–1,5 respektive 0,7–1,9 procentenheter i det uppmätta intervallet på 5–50 % mutationsnivå. Repeterbarhet, variationer inom laboratoriet och reproducerbarhet för mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18 var 0,6–1,9, 0,6–3,7 respektive 0,5–2,4 procentenheter i det uppmätta intervallet på 5–50 % mutationsnivå.

**Tabell 11. Precision för dupliceringen 1509\_1510insGCCTAT i *KIT* exon 9\***

% muterad plasmid <sup>†</sup>	Repetierbarhet		Variationer inom laboratoriet		Reproducerbarhet	
	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

\* Alla värden ges som procentenheter. SD: standardavvikelse (n=9).

<sup>†</sup> Baserat på OD<sub>260</sub>-mätning.

**Tabell 12. Precision för mutationen 2525A>T i *PDGFRA* exon 18<sup>‡</sup>**

% muterad plasmid <sup>§</sup>	Repetierbarhet		Variationer inom laboratoriet		Reproducerbarhet	
	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

<sup>‡</sup> Alla värden ges som procentenheter. SD: standardavvikelse (n=9).

<sup>§</sup> Baserat på OD<sub>260</sub>-mätning.

## Diagnostisk utvärdering

*therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit utvärderades i jämförelse med Sanger-sekvensering. DNA extraherades från 100 formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) GIST-tumörprover och analyserades med avseende på mutationer i *KIT* exon 9 och *PDGFRA* exon 18.

DNA isolerades med hjälp av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Analyserna utfördes med *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit på PyroMark Q24. Sanger-sekvensering utfördes på Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Av 100 prover som analyserades kunde mutationsstatus bestämmas för alla *KIT* exon 9 (bild 13) och *PDGFRA* exon 18 (bild 14) med båda metoderna.

Tabell 13. Resultat för de analyserade GIST-tumörproverna för *KIT* exon 9

<i>KIT</i> exon 9		Sanger-sekvensering		
		Ingen mutation detekterad	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Totalt
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit	Ingen mutation detekterad	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Totalt	92	8	100

Tabell 14. Resultat för de analyserade GIST-tumörproverna för *PDGFRA* exon 18

<i>PDGFRA</i> exon 18		Sanger-sekvensering				Totalt
		WT	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit	Ingen mutation detekterad	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Totalt	93	2	3	2	100

**Obs:** I alla körningar för bestämning av testegenskaper låg signalen på över 30 RLU, rutinmässigt erhållet från 10 ng DNA isolerat från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) vävnad. Data för pyrosekvensering analyserades med GIST RapidScreen Plug-in Report.

## Referenser

QIAGEN upprätthåller en stor, uppdaterad databas online med vetenskapliga publikationer där QIAGEN-produkter avhandlas. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelords-sökning eller genom att specificera applikation, forskningsområde, titel, etc.










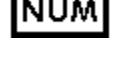




En fullständig lista med referenser finns i QIAGENS referensdatabas online på [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) eller hos QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

### Citerade referenser

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

## Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

 $\Sigma$	Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test
 <N>	Används senast
 IVD	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
 REF	Katalognummer
 LOT	Lotnummer
 MAT	Materialnummer
 COMP	Komponenter
 CONT	Innehåller
 GTIN	GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)
 NUM	Antal
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Se bruksanvisningen
	Varning

## Kontaktinformation

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





## Bilaga A: Konfigurera *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analyser

Om GIST RapidScreen Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna för *KIT* exon 9 och *PDGFRA* exon 18 tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24 under sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/GIST". Följande steg behöver inte utföras. GIST RapidScreen Plug-in Report kan fås från [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Vi rekommenderar starkt att du använder GIST RapidScreen Plug-in Report framför manuell analys. Komplexa mutationer i *PDGFRA* exon 18 kan inte läggas till manuellt i en "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) och måste analyseras med hjälp av GIST RapidScreen Plug-in Report. Efter installation av plugin-rapporten eller varje gång ett nytt program har installerats eller uppgraderats på kontorsdatorn ska du verifiera att plugin-rapporten fungerar korrekt enligt anvisningarna i GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide.

Om GIST RapidScreen Plug-in Report inte har installerats måste analysfilerna konfigureras manuellt innan *therascreen* GIST RapidScreen Pyro-analysen körs första gången. Konfigurera analysen för *KIT* exon 9 och *PDGFRA* exon 18 med hjälp av programmet PyroMark Q24 enligt beskrivningen nedan.

### Procedur

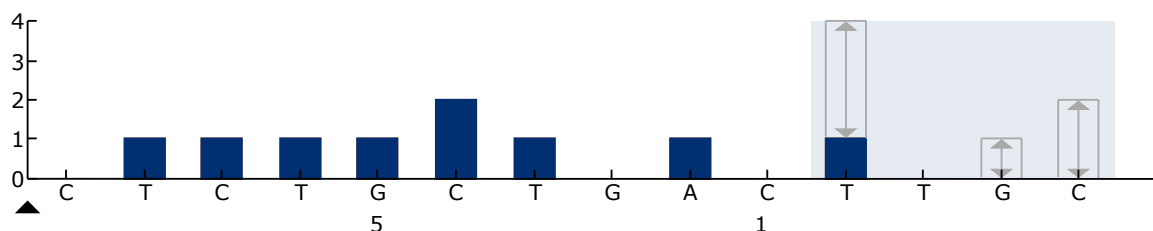
#### *KIT* exon 9

**A1.** Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).

**A2.** Ange följande "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) manuellt:  
**CTCTGCTGACTTGC**

**A3.** Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera):  
**TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA**

6 bp-dupliceringen GCCTAT efter kodon 503 i *KIT* exon 9 kommer att detekteras med hjälp av denna "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).



**Bild 14.** Histogram för *KIT* exon 9 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) **TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA** inriktad på 6 bp-dupliceringen efter kodon 503.

**A4.** Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.

**A5.** Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "KIT exon 9".

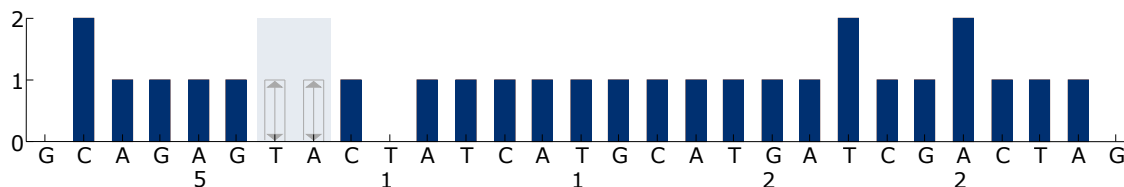
### PDGFRA exon 18

**A1.** Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).

**A2.** Ange följande "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) manuellt:  
**GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG**

**A3.** Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera):  
**CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGA**

Den mest frekventa mutationen GAC>GTC i kodon 842 (nukleotid 2525) i PDGFRA exon 18 kommer att detekteras med hjälp av denna "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).



**Bild 15.** Histogram för PDGFRA exon 18 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGA inriktad på mutationen GAC>GTC i kodon 842 (nukleotid 2525).

"Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) kan ändras efter körningen för att analysera mutationer i nukleotid 2524 (codon 842) samt 9 borttagningar och komplexa mutationer inom regionen för kodon 842 till 847.

Om du vill kontrollera om följande mutationer finns närvarande ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) enligt tabell 15.

**Obs:** Varningen "Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations" (Kvantifieringen kan vara osäker: den variabla positionen kräver mer än 5 dispenseringsringar) under analyskonfigurationen kan ignoreras.

**Obs:** Se till att tröskelvärde för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

**A4.** Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.

**A5.** Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "PDGFRA exon 18".

**Tabell 15. Vanliga mutationer som detekterats av *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit med en annan "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)**

Utbyte av nukleinsyra	Utbyte av aminosyra	"Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
<b>KIT exon 9</b>		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTAA*
<b>PDGFRA exon 18</b>		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y <sup>†</sup>	CCAGAKACATCATGCAT GATTCGAACTAT
2524_2535del12 eller <sup>‡</sup> 2526_2537del12	D842_H845del eller <sup>‡</sup> I843_D846del <sup>†</sup>	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del <sup>†</sup>	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	– <sup>§</sup>
2524_2526GAC>TAT	D842Y <sup>†</sup>	– <sup>§</sup>


\* Standard-"Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).

<sup>†</sup> Mutationerna 2524G>T och 2524\_2526GAC>TAT, och 2526\_2537del12 och 2527\_2538del12 resulterar i samma substitution av aminosyra.

<sup>‡</sup> Mutationerna 2524\_2535del12 och 2526\_2537del12 resulterar i samma substitution av aminosyra och analyseras med samma "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera).

<sup>§</sup> Mutationen 2526\_2538>G och 2524\_2526GAC>TAT kan inte analyseras med AQLäget i programmet PyroMark Q24.

## Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trägen

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

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

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

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

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

### Viktigt att tänka på före start

- För det här protokollet krävs höggradigt rent vatten (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com) eller motsvarande).

### Procedur

- B1. Se till att det inte finns något vakuum i vakuumentytet. Kontrollera att vakuomet är stängt (Off) och att vakuumpumpen är avstängd.**
- B2. Kassera eventuell kvarvarande lösning i trägen.**
- B3. Skölj trägen med höggradigt rent vatten eller byt ut dem vid behov.**
- B4. Töm avfallsbehållaren.**  
Locket kan tas bort utan att koppla loss slangarna.
- B5. Om vakuumbekämpningen måste rengöras (t.ex. från damm eller spill) följer du instruktionerna i *användarmanualen till PyroMark Q24*.**

## Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	För 24 reaktioner på PyroMark Q24-system: Seq-primrar, PCR-primrar, ometylerat kontroll-DNA, PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, PyroMark bindningsbuffert, PyroMark hybridiseringsbuffert, PyroMark denatureringslösning, PyroMark tvättbuffert, enzymblandning, substratblandning, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP och H <sub>2</sub> O	971510
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumstation (220 V) för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumstation för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Tillämpningsprogram	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysprogram	9019062

\* Endast UK.

† Övriga världen.

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<b>Tillbehör</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatta för sekvensering med 24 brunnar	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter för dosering av nukleotider och reagenser	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Återanvändbara filterprober för vakuumstation PyroMark Q96 och Q24	979010
PyroMark Control Oligo	För installationskontroll av system	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	För bekräftelse av systemegenskaper	979304
<b>Relaterade produkter</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: 50 QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar, uppsamlingsrör (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	För 48 beredningar: reagenskassetter (Tissue), engångspipettspetsar med filter, engångspetshållare, provrör (2 ml), elueringsrör (1,5 ml), buffert G2, proteinas K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	För 50 beredningar: QIAamp Mini Spin-kolumner, buffertar, reagenser, rör, vakuumanslutningar	61104

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





Varumärken: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies); FrameStar® (4titude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

#### **Avtal om begränsad licens för *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit**

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

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

Uppdaterade licensvillkor finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1547-002 © 2013–2015 QIAGEN, med ensamrätt.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

