

therascreen[®] *MGMT Pyro*[®] Kit Håndbog



Version 1



Til in vitro-diagnostisk brug



REF 971061

HB 1061267DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R4 **MAT** 1061267DA



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyseteknologier, der muliggør isolation og påvisning af indholdet i enhver biologisk prøve. Vores avancerede høj kvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder inden for:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nucleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyseteknologier

Vor opgave er at bringe Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. Se www.qiagen.com for at få yderligere oplysninger.

Indhold

Tilsligtet anvendelse	5
Opsummering og forklaring	5
Procedureprincip	6
Kontroller	7
Medfølgende materialer	8
Kit-indhold	8
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	10
Anbefalede plademiksere	11
Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger	11
Sikkerhedsinformation	11
Generelle forholdsregler	11
Opbevaring og håndtering af reagenser	13
Håndtering og opbevaring af prøver	13
Procedure	14
DNA-isolation og bisulfitkonvertering	14
Protokoller	
■ 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR ved hjælp af de reagenser, der medfølger i <i>therascreen</i> MGMT Pyro-kittet	17
■ 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler	20
■ 4: Klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24	22
■ 5: Kørsel af PyroMark Q24	26
■ 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel	29
Fortolkning af resultater	30
Fejludbedringsvejledning	32
Kvalitetskontrol	35
Begrænsninger	35
Brugsegenskaber	35
Tomgrænse	35
Linearitet	36

Præcision	38
Diagnostisk evaluering	41
Referencer	43
Symboler	44
Kontaktoplysninger	44
Bilag A: Opsætning af MGMT-analysen	45
Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere	46
Bestillingsinformation	47

Tilsigtet anvendelse

therascreen MGMT Pyro Kit er en *in vitro* nucleinsyresekvensbaseret påvisningstest baseret på Pyrosequencing[®]-teknologi til kvantitative målinger af metyleringsstatus i exon 1 i det humane MGMT-gen i genomisk DNA udledt af humane vævsprøver.

therascreen MGMT Pyro-kittet er beregnet til at anvendes som et supplement til andre prognostiske faktorer og give klinikere oplysninger, der hjælper med at udvælge cancerpatienter, der med større sandsynlighed vil få fordel af kemoterapi. Til *in vitro*-diagnostisk brug.

Kun til brug på PyroMark[®] Q24-systemet. Der findes følgende PyroMark Q24-systemer:

- PyroMark Q24-instrumentet og PyroMark Q24 MDx-instrumentet.
- PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen og PyroMark Q24 MDx-vakuumarbejdsstationen.
- PyroMark Q24-softwaren (version 2.0) og PyroMark Q24 MDx-softwaren (version 2.0).

Produktet er beregnet til professionelle brugere, f.eks. teknikere og læger med kvalifikationer inden for *in vitro*-diagnostiske procedurer, molekylærbiologiske teknikker samt PyroMark Q24-systemet.

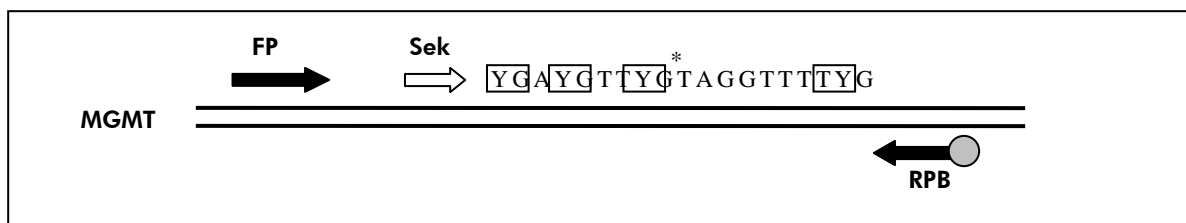
Opsummering og forklaring

therascreen MGMT Pyro-kittet er beregnet til kvantitative målinger af metylering af fire CpG-steder i exon 1 af det humane MGMT-gen (genomisk sekvens på kromosom 10 fra 131.265.519 til 131.265.537:

CGACGCCCGCAGGTCCTCG). Bisulfitkonverteret genomisk DNA forstærkes af PCR og sekvenseres fremad gennem det definerede område (Figur 1).

Sekvenserne omkring de definerede positioner fungerer som normaliserings- og referencespidser til kvantificering og kvalitetsvurdering af analysen.

Produktet består af PCR-primerblanding og sekvenseringsprimer, to hætteglas af hver. Primerne leveres i en opløsning. Hvert hætteglas indeholder 24 µl af primer eller primerblanding. Kittet indeholder primere og reagenser til forstærkning af generne, plus buffere, primere og reagenser til kvantitativ metyleringspåvisning i realtid ved hjælp af Pyrosequencing-teknologi på PyroMark Q24-systemet.



Figur 1. Illustration af MGMT-analysen. Den angivne sekvens er den analyserede sekvens efter bisulfitkonvertering. Y angiver de potentielt methylerede steder, og felterne angiver de analyserede CpG-steder. Stjernen angiver stedet for bisulfitkonverteringskontrol. **FP**: Forward-PCR-primere; **RPB**: Reverse-PCR-primere (**B** angiver biotinylering); **Sek**: Sekvenseringsprimere.

Procedureprincip

Rutediagrammet nedenfor illustrerer analyseproceduren. Efter PCR med primere rettet mod det definerede område af exon 1 immobiliseres amplikonerne på Streptavidin Sepharose[®] High Performance-kugler. Der forberedes enkeltstrenget DNA, og sekvenseringsprimerne afhærdes til DNA'et. Prøverne analyseres herefter på PyroMark Q24-systemet ved hjælp af en analyseopsætningsfil og en kørselsfil.

Bemærk: Rutediagrammet er blevet ændret en smule sammenlignet med *PyroMark Q24-brugervejledningen* (se "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24", side 22).

Rutediagram for *therascreen* MGMT Pyro-proceduren

Analyse- og kørselsopsætning

Prøveforberedelse herunder
bisulfitkonvertering

Analysefilopsætning (bilag A)

PCR (protokol 2)

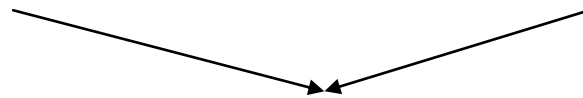


Immobilisering (protokol 3)



Kørselsfilopsætning (protokol 1)

Forberedelse af prøver
(protokol 4)



PyroMark Q24-kørsel (protokol 5)



Analyse af PyroMark Q24-kørsel (protokol 6)



Rapport

Kontroller

Kittet indeholder methyleret kontrol-DNA som positiv kontrol til PCR og sekvenseringsreaktioner. Dette kontrol-DNA er særdeles methyleret og bisulfitkonverteret. Det anbefales også, at en DNA-prøve udledt af en sund bloddonor inkluderes i hver pyrosekvenseringskørsel til sammenligning. Der bør desuden bruges en negativ kontrol (uden skabelon-DNA) i enhver PCR-opsætning.


Medfølgende materialer

Kit-indhold

therascreen MGMT Pyro Kit (æske 1/2)

<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit	(48)
Katalognr.	971061
Antal reaktioner	48
PCR Primer Mix MGMT (PCR-primerblanding MGMT)	2 x 24 µl
Seq Primer MGMT (Sekvenseringsprimer MGMT)	2 x 24 µl
PyroMark PCR Master Mix (PyroMark PCR-masterblanding), 2x	850 µl
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad®-koncentrat), 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Methylated Control DNA (Methyleret kontrol-DNA), 10 ng/µl	100 µl

therascreen Pyro buffers and reagents (æske 2/2)

Therascreen Pyro buffers and reagents		
PyroMark Binding Buffer (PyroMark-bindingsbuffer)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark-afhærdningsbuffer)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark-denatureringsopløsning)*		250 ml
PyroMark Wash Buffer (PyroMark-vaskebuffer), 10x		25 ml
Enzyme Mixture (Enzymblanding)		1 hætteglas
Substrate Mixture (Substratblanding)		1 hætteglas
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Handbook (Håndbog)		1

* Indeholder natriumhydroxid.

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

- DNA-isolationskit (se "DNA-isolation og bisulfitkonvertering", side 14)
- Reagenser til bisulfitkonvertering af DNA (se "DNA-isolation og bisulfitkonvertering", side 14)
- Pipetter (justerbare)*
- Sterile pipettespidser (med filtre til PCR-opsætning)
- Bordmikrocentrifuge*
- Termocykler og egnede PCR-rør
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, katalognr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (katalognr. 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24-software (katalognr. 9019062 eller 9019063)†
- PyroMark Q24-plade (katalognr. 979201)†
- PyroMark Q24-beholder (katalognr. 979202)†
- PyroMark Q24-vakuumarbejdsstation (katalognr. 9001515 eller 9001517)*†
- Plademikser* til immobilisering på kugler (se "Anbefalede plademiksere", side 11)
- Varmebløkk*, som kan nå op på 80° C
- 24-brønds PCR-plade eller strips
- Strip-hætter
- Rektificeret vand (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende)

Bemærk: Der medfølger tilstrækkeligt vand i produktet til PCR, DNA-immobilisering og til at opløse enzymblandingen og substratblandingen. Der skal bruges yderligere rektificeret vand til fortynding af PyroMark-vaskebufferen, 10x.

- Ethanol (70 %)‡

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

† CE-IVD-mærket i henhold til EU-direktiv 98/79/EF. De øvrige produkter på listen er ikke CE-IVD-mærkede i henhold til EU-direktiv 98/79/EF.

‡ Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer som f.eks. metanol eller methylethylketon.

Anbefalede plademiksere

De i tabel 1 viste plademiksere anbefales til brug sammen med *therascreen* MGMT Pyro-kittet.

Tabel 1. Plademiksere anbefalet til brug med *therascreen* MGMT Pyro-kittet

Producent	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer komfort (grundenhed)	5355 000.011
	Thermoblock til mikrotiterplader	5363 000.012
	Adapterplade til 96 x 0,2 ml PCR-rør til isætning i blokke til mikrotiterplader	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

Advarsler og sikkerhedsforanstaltninger

Til in vitro-diagnostisk brug

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (SDS) for yderligere information. Disse er tilgængelige online i det praktiske og kompakte PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive et SDS til hvert enkelt QIAGEN®-kit og samtlige kitkomponenter.

Følgende farer og forholdsregler gælder for komponenterne i *therascreen* MGMT Pyro-kittet.

PyroMark Denaturation Solution



Advarsel! Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Kan ætse metaller. Absorber udslip for at undgå materielskade. Opbevares kun i den originale beholder. Bær beskytteshandsker/ beskyttelsestøj/ øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.

PyroMark Enzyme Mixture



Indeholder: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Fare! Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenskade. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. VED eksponering eller mistanke om eksponering: Ring til GIFTINFORMATION eller en læge. Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Bær beskyttelsehandsker/ beskyttelsestøj/ øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.

PyroMark Substrate Mixture



Indeholder: acetic acid. Advarsel! Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp. Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Bær beskyttelsehandsker/ beskyttelsestøj/ øjenbeskyttelse/ ansigtsbeskyttelse.

Generelle forholdsregler

Brugeren skal altid være opmærksom på følgende.

- Brugervejledningen skal følges fuldstændigt for at opnå optimale resultater. Det anbefales ikke at fortynde reagenserne, undtagen som det er beskrevet i denne håndbog, da det vil medføre tab af ydelse.
- Bemærk, at rutediagrammet er blevet ændret en smule sammenlignet med *PyroMark Q24-brugervejledningen* (se "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24", side 22).
- Komponenterne i dette produkt er tilstrækkelige til at udføre 48 reaktioner i op til 5 uafhængige kørsler.
- Brug sterile pipettespidser med filtre (til PCR-opsætning).
- Positive materialer (prøver, positive kontroller og amplikoner) skal opbevares og ekstraheres separat fra alle andre reagenser og tilsættes reaktionsblandingen på et separat sted.
- Alle komponenter skal omhyggeligt optøs til stuetemperatur (15-25 °C), inden analysen startes.
- Efter optøning skal komponenterne blandes (ved gentagen pipettering op og ned eller ved pulsvortexing) og centrifugeres kortvarigt.
- Mislykkede resultater kan ikke bruges som udgangspunkt for vurdering af metyleringsstatus.

Opbevaring og håndtering af reagenser

therascreen MGMT Pyro-kittet forsendes i to æsker. *therascreen* MGMT Pyro-kittet (æske 1/2) forsendes på tøris. PyroMark PCR-masterblandingen, CoralLoad-koncentratet, det methylerede kontrol-DNA og samtlige primere skal opbevares ved -30 til -15 °C efter modtagelsen.

therascreen buffere og reagenser (æske 2/2), der indeholder buffere, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP og dTTP (reagenserne til pyrosekvenseringsanalyse) forsendes på køleelementer. Disse komponenter skal opbevares ved 2-8 °C efter modtagelse. For at minimere aktivitetstab anbefales det at opbevare både enzymblandingen og substratblandingen i de leverede hætteglas.

Rekonstituerede enzym- og substratblandinger er stabile i mindst 10 dage ved 2-8 °C. Rekonstituerede enzym- og substratblandinger kan nedfryses og opbevares i hætteglassene ved -30 til -15 °C. Frosne reagenser bør ikke udsættes for mere end seks optønings- og indfrysningscykluser.

Bemærk: Nucleotider må ikke fryses.

therascreen MGMT Pyro-kittet er stabilt indtil udløbsdatoen ved opbevaring under disse betingelser.

Håndtering og opbevaring af prøver

Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Prøvematerialet er bisulfitkonverteret humant DNA ekstraheret fra blod eller fra formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) prøver.

Prøver fra personer i heparinbehandling må ikke bruges. Blodprøver, der er opsamlet i rør tilsat heparin som antikoagulationsmiddel, må ikke bruges. Heparin påvirker PCR.

Procedure

DNA-isolation og bisulfitkonvertering

Systemets ydeevne er fastlagt ved hjælp af EZ1[®] DNA Tissue-kit og QIAamp[®] DNA FFPE Tissue-kittet til ekstrahering af humant DNA fra formalinfikserede, paraffinindstøbte tumorprøver. Ydeevnen for QIAamp DSP DNA Blood Mini-kitsystemet er fastlagt ved hjælp af blodprøver fra raske donorer tilsat tumorceller.

De QIAGEN-kit, der er vist i tabel 2 anbefales til oprensning af DNA fra de angivne humane prøvetyper til brug med *therascreen* MGMT Pyro-kittet. DNA-oprensningen skal udføres i henhold til instruktionerne i kit-håndbøgerne.

Til bisulfitkonvertering anbefales EpiTect[®] Bisulfite Kit (katalognr. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (katalognr. 59144) eller EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (katalognr. 59124) fra QIAGEN.

Tabel 2. DNA-oprensningskit anbefalet til brug med *therascreen* MGMT Pyro-kittet

Prøvemateriale	Isolationskit til nucleinsyre	Katalognummer (QIAGEN)
Paraffinindstøbt væv	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Blod	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Følg protokollen for brug med paraffinindstøbt væv. EZ1 DNA Tissue-kittet skal bruges sammen med EZ1 Advanced (katalognr. 9001410 eller 9001411) og EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9018298), med EZ1 Advanced XL (katalognr. 9001492) og EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9018700) eller med BioRobot[®] EZ1 (katalognr. 9000705 – fås ikke længere) og EZ1 DNA Paraffin Section Card (katalognr. 9015862).

† CE-IVD-mærket i henhold til EU-direktiv 98/79/EF.

Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet


Vigtig anvisning før start

- Hvis det er nødvendigt, kan LOB bekræftes ved hjælp af en prøve fra en sund bloddonor, så der opnås en hel plade resultater. Yderligere oplysninger fås i CLSI's retningslinje EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".

Ting, der skal gøres før start


- Opret en analyseopsætning som beskrevet i bilag A, side 45. Dette skal kun gøres én gang før kørsel af *therascreen* MGMT-analysen første gang.

Procedure

1. **Klik på  på værktøjslinjen.**
Der oprettes en ny kørselsfil.
2. **Angiv kørselsparametrene (se "Kørselsparametre", side 16).**
3. **Sæt pladen op ved at føje analysen til brønde, der svarer til de prøver, der skal analyseres.**

Bemærk: Der bør bruges en negativ kontrol (uden skabelon-DNA) i enhver PCR-opsætning.

Bemærk: Det anbefales også at inkludere en kontrolprøve med DNA fra en sund bloddonor i hver pyrosekvenseringskørsel til sammenligning. En prøve med methyleret kontrol-DNA kan inkluderes som en positiv kontrol for PCR- og sekvenseringsreaktionerne (se "Kontroller", side 7).

4. **Når kørslen er konfigureret og klar til at køre på PyroMark Q24-systemet, skal der udskrives en liste over de påkrævede volumener enzymblanding, substratblanding og nucleotider samt pladeopsætningen. Vælg "Pre Run Information" (Information før kørsel) i menuen "Tools" (Funktioner), og klik på , når rapporten vises.**
5. **Luk kørselsfilen, og kopiér den til en USB-nøgle (leveres med systemet) ved hjælp af Windows® Stifinder.**

Den udskrevne information før kørsel kan bruges som skabelon for prøveopsætningen (se "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 20).

Se "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24", side 26 for at køre pladen på PyroMark Q24.

Kørselsparametre

Run name (Kørselsnavn):	Navnet på kørslen angives, når filen gemmes. Hvis filen omdøbes, ændres navnet på kørslen også.
Instrument method (Instrumentmetode):	Vælg instrumentmetode ud fra den beholder, der skal bruges til kørslen. Se instruktionerne til produkterne.
Plate ID (Plade-id):	Valgfrit: Angiv id'et for PyroMark Q24-pladen.
Bar code (Stregkode):	Valgfrit: Angiv et stregkodennummer for pladen. Hvis der er en stregkodelæser tilsluttet computeren, kan du også placere markøren i feltet "Barcode" (Stregkode) ved at klikke i feltet og herefter scanne stregkoden.
Reagent ID (Reagens-id):	Valgfrit: Angiv lotnumrene for det <i>therascreen</i> MGMT Pyro-kit, æske 1 og æske 2, der skal bruges. Lotnummeret fremgår af etiketten på produktet. Bemærk: Det anbefales at angive lotnummeret, så eventuelle uventede problemer med <i>therascreen</i> MGMT Pyro-kittet kan spores.
Run note (Kørselsbemærkning):	Valgfrit: Angiv en bemærkning om indholdet af eller formålet med kørslen.

Tilføj analysefiler

En analyse kan føjes til en brønd på en af følgende måder:

- Højreklik på brønden, og vælg "Load Assay" (Indlæs analyse) i genvejsmenuen.
- Marker analysen i genvejsbrowseren, klik på den, og træk den til brønden.

En brønd har farve efter den analyse, der er anbragt i brønden.

Angiv prøve-id'er og bemærkninger

Der kan angives prøve-id'er eller bemærkninger ved at vælge den pågældende celle og indtaste teksten.

Eksisterende prøve-id'er eller bemærkninger kan redigeres ved at markere cellen (det aktuelle indhold markeres) eller dobbeltklikke på cellen.

Protokol 2: PCR ved hjælp af de reagenser, der medfølger i *therascreen* MGMT Pyro-kittet

Denne protokol er til PCR-forstærkning af et område af bisulfitkonverteret DNA ved hjælp af *therascreen* MGMT Pyro-kittet.

Vigtige anvisninger før start

- HotStarTaq[®] DNA-polymerasen i PyroMark PCR-masterblandingen kræver et aktiveringstrin på **15 minutter ved 95 °C**.
- Alle reaktionsblandinger skal klargøres i et område, som er adskilt fra det område, der bruges til DNA-oprensning, tilføjelse af skabelon-DNA i PCR, PCR-produktanalyse eller klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse.
- Brug engangsspidser med hydrofobiske filtre for at minimere krydskontaminering.
- Bisulfitkonverteret DNA skal anvendes som skabelon-DNA. EpiTect Bisulfite Kit (katalognr. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (katalognr. 59144) eller EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (katalognr. 59124) fra QIAGEN anbefales.

Ting, der skal gøres før start

- Inden røret med PCR-primer åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- Juster evt. koncentrationen af prøve-DNA'et til 2-10 ng/ μ l.

Procedure

1. Optø alle nødvendige komponenter.

Bland dem godt inden brug.

2. Forbered en reaktionsblanding i overensstemmelse med tabel 3.

Reaktionsblandingen indeholder som regel alle de komponenter, der er nødvendige ved PCR, undtagen prøven.

Klargør en større mængde reaktionsblanding end den, der er nødvendig for det samlede antal PCR-analyser, som skal udføres.

Tabel 3. Forberedelse af reaktionsblanding

Komponent	Volumen/reaktion (μ l)
PyroMark PCR-masterblanding, 2x	12,5
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5
PCR-primerblanding MGMT	1,0
Vand (H ₂ O, medfølger)	4,0
Volumen i alt	20,0

3. Bland reaktionsblandingen grundigt, og dispenser 20 μ l i hvert PCR-rør.

Det er ikke nødvendigt at opbevare PCR-rørene på is, da HotStarTaq-DNA-polymerasen er inaktiv ved stuetemperatur.

4. Tilføj 5 μ l bisulfitkonverteret skabelon-DNA (10-50 ng genomisk DNA som målt før bisulfitkonvertering) til de individuelle PCR-rør (tabel 4), og rør grundigt.

Bemærk: Der bør bruges en negativ kontrol (uden skabelon-DNA) i enhver PCR-opsætning.

Bemærk: Det anbefales også at inkludere en kontrolprøve med DNA fra en sund bloddonor i hver pyrosekvenseringskørsel til sammenligning. En prøve med methyleret kontrol-DNA kan inkluderes som en positiv kontrol for PCR- og sekvenseringsreaktionerne (se "Kontroller", side 7).

Tabel 4. Klargøring af PCR

Komponent	Volumen/reaktion (μ l)
Reaktionsblanding	20
Prøve-DNA	5
Volumen i alt	25

5. Programmér termocykleren i henhold til producentens instruktioner og de betingelser, der er skitseret i tabel 5.

Tabel 5. Optimeret cyklusprotokol

			Kommentarer
Første aktiveringstrin:	15 minutter	95 °C	HotStarTaq-DNA-polymerasen aktiveres med dette opvarmningstrin.
3-trinscyklus:			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Afhærdning	30 sekunder	53 °C	
Udvidelse	20 sekunder	72 °C	
Antal cyklusser	42		
Endelig udvidelse:	5 minutter	72 °C	

6. Anbring PCR-rørene i termocykleren, og start cyklusprogrammet.
7. Efter forstærkning skal der fortsættes med "Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler", side 20.

Protokol 3: Immobilisering af PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler

Denne protokol er til immobilisering af skabelon-DNA på Streptavidin Sepharose High Performance-kugler (GE Healthcare) inden analyse på PyroMark Q24-systemet.

Vigtige anvisninger før start

- Lad de påkrævede reagenser og opløsninger nå stuetemperatur (15-25 °C) inden start.

Procedure

1. Ryst forsigtigt flasken med Streptavidin Sepharose High Performance fra side til side, til der opnås en homogen opløsning.
2. Klargør en masterblanding til DNA-immobilisering i henhold til **tabel 6**. Klargør et 10 % større volumen end det, der er nødvendigt for det samlede antal reaktioner, som skal udføres.

Tabel 6. Masterblanding til DNA-immobilisering

Komponent	Volumen/prøve (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark-bindingsbuffer	40
Vand (H ₂ O, medfølger)	28
Volumen i alt	70

3. Tilsæt 70 µl masterblanding i brøndene på en PCR-plade (eller strip) med 24 brønde, som dette er defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15).
4. Tilsæt 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokol 2 i hver brønd med masterblanding, som dette er defineret under kørselsopsætningen (se "Protokol 2: PCR ved hjælp af de reagenser, der medfølger i *therascreen* MGMT Pyro-kittet", side 17).

Det samlede volumen pr. brønd skal være 80 µl efter tilsætning af masterblanding og PCR-produkt.

5. **Forsegl PCR-pladen (eller strips) med strip-hætter.**
Kontrollér, at der ikke er risiko for lækage mellem brøndene.

6. Ryst PCR-pladen ved stuetemperatur (15-25 °C) i 5-10 minutter ved 1.400 o/min.

Under dette trin skal PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen klargøres til prøveforberedelse som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

7. Fortsæt straks til "Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24", side 22.

Bemærk: Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Opfangning af kuglerne skal ske umiddelbart efter omrystning.

Hvis der er gået mere end 1 minut, siden pladen (eller strips) blev rystet, rystes igen i 1 minut, før kuglerne opfanges.

Protokol 4: Klargøring af prøver inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24

Denne protokol er til klargøring af enkeltstrenget DNA og afhærdning af sekvenseringsprimeren til skabelonen inden pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24.

Vigtige anvisninger før start

- Tilføj sekvenseringsprimeren i det samme mønster som foruddefineret for pladen i kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15).
- Rutediagrammet er blevet ændret en smule sammenlignet med *PyroMark Q24-brugervejledningen* (trin 18). Undgå at afkorte nedkølingstiden efter opvarmning af prøverne til 80 °C.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen* med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, hvis det er påkrævet.

Ting, der skal gøres før start

- Inden røret med sekvenseringsprimer åbnes, skal de centrifugeres kortvarigt, så indholdet samles i bunden af rørene.
- Anbring én PyroMark Q24-pladeholder på en forvarmet varmeblok ved 80 °C til brug i trin 17. Lad en anden PyroMark Q24-pladeholder stå ved stuetemperatur (15–25 °C) til brug i trin 18.
- PyroMark-vaskebufferen leveres som 10x-koncentrat. Før brug første gang skal der tilføjes rektificeret vand til 25 ml 10x PyroMark-vaskebuffer for at opnå en endelig volumen på 250 ml og opnå en 1x-arbejdsopløsning.
1x PyroMark-vaskebufferopløsningen er stabil ved 2-8 °C indtil den anførte udløbsdato.

Procedure

1. Fortynd en tilstrækkelig mængde sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer MGMT, i PyroMark-afhærdningsbuffer som vist i tabel 7.

Klargør et større volumen fortyndet sekvenseringsprimer end det, der skal bruges til det samlede antal prøver, som skal sekvenseres (antallet af prøver + én ekstra).

Tabel 7. Eksempel på fortynding af sekvenseringsprimer

Komponent	Volumen/prøve (μl)	Volumen til 9 + 1 reaktioner (μl)
Sekvenseringsprimer MGMT	0,8	8,0
PyroMark- afhædningsbuffer	24,2	242,0
Volumen i alt	25,0	250,0

- 2. Tilsæt 25 μl fortyndet sekvenseringsprimer i hver brønd på PyroMark Q24-pladen i henhold til kørselsopsætningen (se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15).**

Lad én af PyroMark Q24-pladeholderne (leveres med PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen) være ved stuetemperatur (15-25 °C), og brug den som underlag under klargøring og flytning af pladen.

- 3. Anbring PCR-pladen (eller strips) fra protokol 3 og PyroMark Q24-pladen på arbejdsbordet (figur 2).**

Kontroller, at pladen vender samme vej, som da prøverne blev isat.



Figur 2. Placering af PCR-plade (eller strips) og PyroMark Q24-plade på vakuumarbejdsstationen.

- 4. Sæt vakuum på vakuumværktøjet ved at åbne på vakuumkontakten.**

5. Sænk forsigtigt filterproberne på vakuumværktøjet ned i PCR-pladen (eller strips) for at opfange kuglerne, der indeholder immobiliseret skabelon. Hold proberne på plads i 15 sekunder. Vær forsigtig, når vakuumværktøjet samles op.

Bemærk: Sepharose-kugler sedimenterer hurtigt. Opfangning af kuglerne skal ske umiddelbart efter omrystning.

Hvis der er gået mere end 1 minut, siden pladen (eller strips) blev rystet, rystes igen i 1 minut, før kuglerne opfanges.

6. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 40 ml 70 % ethanol (figur 2). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
7. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med 40 ml denatureringsopløsning (figur 2). Skyl filterproberne i 5 sekunder.
8. Overfør værktøjet til beholderen med 50 ml vaskebuffer (figur 2). Skyl filterproberne i 10 sekunder.
9. Løft vakuumværktøjet op og tilbage over 90° lodret i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (figur 3).



Figur 3. Illustration af vakuumværktøjet løftet til over 90° lodret.

10. Hold vakuumværktøjet over PyroMark Q24-pladen, og sluk for vakuumkontakten på værktøjet (Off).
11. Frigør kuglerne i PyroMark Q24-pladen ved at sænke filterproberne ned i den fortyndede sekvenseringsprimer og bevæge værktøjet forsigtigt fra side til side.
Pas på ikke at beskadige overfladen på PyroMark Q24-pladen ved at ridse den med filterproberne.
12. Overfør vakuumværktøjet til beholderen med rektificeret vand (figur 2), og ryst værktøjet i 10 sekunder.
13. Vask filterproberne ved at sænke proberne ned i rektificeret vand (figur 2) og sætte vakuum på. Skyl filterproberne med 70 ml rektificeret vand.
14. Løft værktøjet op og tilbage over 90° lodret i 5 sekunder for at dræne væsken fra filterproberne (figur 3).

- 15. Luk vakuumkontakten på værktøjet (Off), og sæt værktøjet i parkeringsstilling (P).**
- 16. Sluk for vakuumpumpen.**

Bemærk: Når arbejdsdagen er slut, skal flydende affald og eventuelle resterende opløsninger kasseres, og PyroMark Q24-vakuumarbejdsstationen skal kontrolleres for støv og spild (se bilag B, side 46).
- 17. Opvarm PyroMark Q24-pladen med prøverne ved 80 °C i 2 minutter ved hjælp af den foropvarmede PyroMark Q24-pladeholder.**
- 18. Fjern PyroMark Q24-pladen fra den varme pladeholder, og anbring den på den anden PyroMark Q24-pladeholder, som blev opbevaret ved stuetemperatur (15-25 °C), for at lade prøverne køle af til stuetemperatur i 10-15 minutter.**
- 19. Fortsæt med "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24", side 26.**

Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24

Denne protokol beskriver klargøring og isætning af PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-beholderen samt start og afslutning af en kørsel på PyroMark Q24. Detaljerede oplysninger om opsætning af en kørsel findes i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

Vigtig anvisning før start

- Rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), der findes i menuen "Tools" (Funktioner; se "Protokol 1: Kørselsopsætning for PyroMark Q24-systemet", side 15), indeholder information om den mængde nucleotider samt de enzym- og substratbufferne, som er nødvendige til en bestemt kørsel.

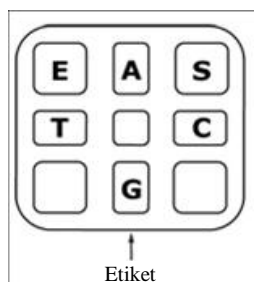
Ting, der skal gøres før start

- Tænd for PyroMark Q24. Tænd/sluk-knappen er placeret bag på instrumentet.

Procedure

- 1. Opløs hver af de frysetørrede enzym- og substratblandinger i 620 μ l vand (H_2O , medfølger).**
- 2. Bland ved at slynge hætteglasset forsigtigt rundt.**
Må ikke vortexes!
For at sikre, at blandingen er helt opløst, skal den stå ved stuetemperatur (15-25 °C) i 5-10 minutter. Sørg for, at opløsningen ikke er uklar, før PyroMark Q24-beholderen fyldes op. Hvis reagenserne ikke skal bruges med det samme, skal reagenshætteglassene lægges på is* eller sættes i køleskab.
- 3. Lad reagenserne og PyroMark Q24-beholderen nå stuetemperatur (20-25 °C).**
- 4. Anbring PyroMark Q24-beholderen, så etiketten vender ind mod dig.**
- 5. Isæt PyroMark Q24-beholderen med de korrekte mængder nucleotider samt enzym- og substratblandinger som vist i figur 4.**
Sørg for, at der ikke overføres nogen luftbobler fra pipetten til beholderen.

* Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.



Figur 4. Illustration af PyroMark Q24-beholderen set oppefra. Forklaringerne svarer til etiketten på reagenshætteglassene. Tilføj enzymblanding (**E**), substratblanding (**S**) og nucleotider (**A**, **T**, **C**, **G**) i overensstemmelse med den volumeninformation, der er oplyst i rapporten "Pre Run Information" (Information før kørsel), som findes i menuen "Tools" (Funktioner) ved kørselsopsætningen.

6. **Åbn beholderåbningen, og isæt den fyldte reagensbeholder. Etiketten skal vende udad. Skub beholderen helt ind, og tryk den derefter nedad.**
7. **Kontrollér, at linjen er synlig foran beholderen, og luk lågen.**
8. **Åbn pladeholderrammen, og sæt pladen på varmeblokken.**
9. **Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**
10. **Sæt USB-nøglen (med kørselsfilen) i USB-porten på instrumentets forside.**
Tag ikke USB-nøglen ud, før kørslen er afsluttet.
11. **Vælg "Run" (Kør) i hovedmenuen (ved hjælp af skærmknapperne ▲ og ▼), og tryk på "OK".**
12. **Vælg kørselsfilen ved hjælp af skærmknapperne ▲ og ▼.**
For at se indholdet af en mappe markeres mappen, og der trykkes på "Select" (Vælg). For at vende tilbage til det foregående billede trykkes på "Back" (Tilbage).
13. **Når kørselsfilen er valgt, trykkes på "Select" (Vælg) for at starte kørslen.**
14. **Når kørslen er afsluttet, og instrumentet bekræfter, at kørselsfilen er gemt på USB-nøglen, trykkes på "Close" (Luk).**
15. **Fjern USB-nøglen.**
16. **Åbn instrumentlåget.**
17. **Åbn beholderåbningen, og tag reagensbeholderen ud ved at løfte den op og trække den ud.**
18. **Luk lemmen.**
19. **Åbn den ramme, der holder pladen, og tag pladen ud fra varmeblokken.**

- 20. Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**
- 21. Kassér pladen, og rengør beholderen i henhold til instruktionerne i produktarket til beholderen.**
- 22. Analysér kørslen i henhold til "Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel", side 29.**

Protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel

Denne protokol beskriver metyleringsanalyse for en afsluttet *therascreen* MGMT-kørsel ved hjælp af PyroMark Q24-software.

Procedure

1. Sæt USB-nøglen (med den behandlede kørselsfil) i USB-porten på computeren.
2. Flyt kørselsfilen fra USB-nøglen til den ønskede placering på computeren ved hjælp af Windows Stifinder.
3. Åbn kørselsfilen i CpG-tilstand i PyroMark Q24-softwaren ved enten at vælge "Open" (Åbn) i menuen "File" (Filer) eller dobbeltklikke på filen (✓) i genvejsbrowseren.
4. Klik på en af analyseknapperne for at analysere kørslen og få et overblik over resultaterne.



Analysér alle brønde.



Analysér den markerede brønd.

Analyseresultaterne (metyleringsfrekvenser) og kvalitetsvurderingen vises over den variable position i Pyrogram[®]-soringen. Yderligere oplysninger om analyse af en kørsel findes i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.

5. Vælg "CpG Full Report" (Fuld CpG-rapport) eller "CpG Analysis Results" (CpG-analyseresultater) i menuen "Reports" (Rapporter) for at oprette en rapport.

Bemærk: For at opnå pålidelige resultater anbefaler vi enkelte spidshøjder på over 30 RLU. "Required peak height for passed quality" (Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) skal indstilles til 30 RLU under analyseopsætningen (se bilag A, side 45 og *PyroMark Q24-brugervejledningen*).

Bemærk: Brug rapporten CpG Analysis results (CpG-analyseresultater) til dokumentation og fortolkning af metyleringskvantificering. De viste antal i pyrogrammet er afrundede og viser ikke den nøjagtige kvantificering.

Bemærk: Pyrogrammet skal altid sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. De målte spidser skal svare til højden af søjlerne i histogrammet.

Fortolkning af resultater

Det anbefales, at en DNA-prøve afledt af en sund bloddonor inkluderes i hver kørsel til sammenligning.

Bisulfitkonverteringskontrollen (mærket med en gul streg i pyrogramvinduet) angiver fuldførelsen af bisulfitkonverteringen. Et signal i bisulfitkonverteringskontrollen kan angive en ufuldstændig bisulfitkonvertering, hvilket kan resultere i påvirket methyleringskvantifikation og genererer en advarsel.

Værdierne for tomgrænsen (LOB) repræsenterer methyleringsfrekvenser opnået fra prøver fra sunde bloddonorer med en sandsynlighed på 95 % (se tabel 8 og "Brugsegenskaber", side 35).

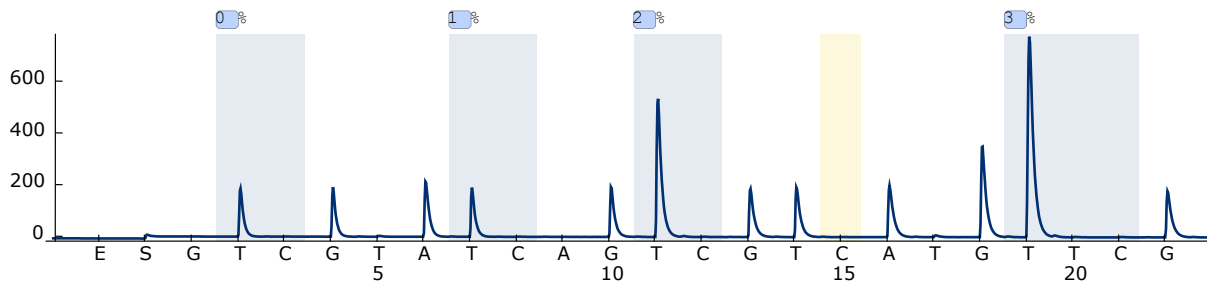
Tabel 8. LOB bestemt for specifikke methyleringssteder ved hjælp af prøver fra sunde bloddonorer

Position	LOB (procentenheder)
CpG-sted 1	1,5
CpG-sted 2	1,8
CpG-sted 3	3,2
CpG-sted 4	3,4
Gennemsnit for CpG-sted 1 til 4	2,1

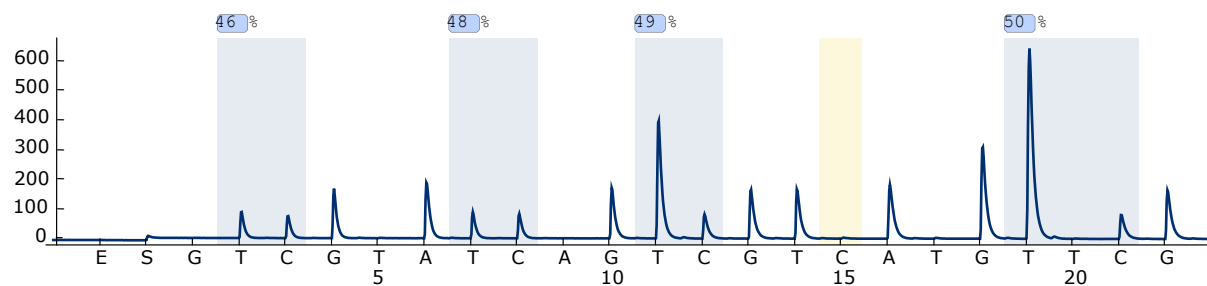
Bemærk: Disse værdier er baseret på kørsler, hvor signalet var over 30 relative lysenheder (RLU), der rutinemæssigt kan opnås med 10 ng DNA isoleret fra blod (målt før bisulfitkonvertering). Vi anbefaler, at metodens egnethed bekræftes i laboratoriet.

Repræsentative resultater

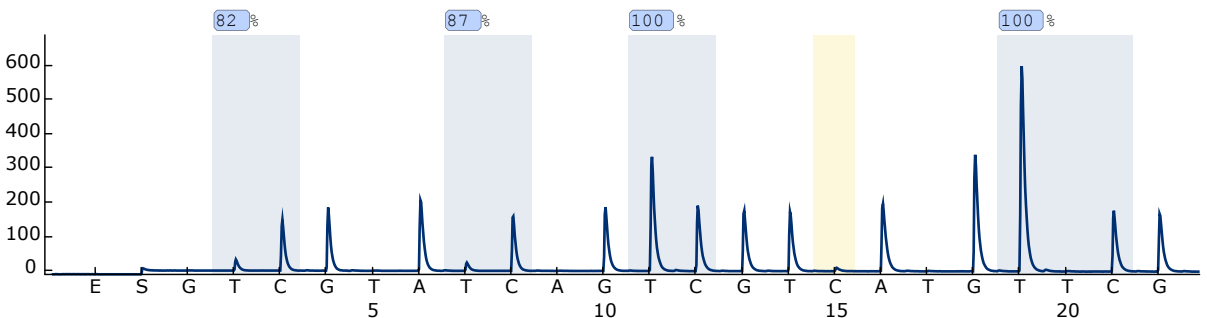
Figur 5-7 viser repræsentative pyrogramresultater.



Figur 5. Pyrogramsporing opnået efter analyse af umethyleret bisulfitkonverteret DNA for en prøve fra en sund bloddonor. Søjlen ved dispensering 15 repræsenterer kontrollen til fuldførelse af bisulfitkonvertering.



Figur 6. Pyrogramsporing opnået efter analyse af methyleret bisulfitkonverteret DNA. Søjlen ved dispensering 15 repræsenterer kontrollen til fuldførelse af bisulfitkonvertering.



Figur 7. Pyrogramsporing opnået efter analyse af særdeles methyleret bisulfitkonverteret DNA (methyleret kontrol-DNA, medfølger). Søjlen ved dispensering 15 repræsenterer kontrollen til fuldførelse af bisulfitkonvertering.

Fejludbedringsvejledning

Denne fejludbedringsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vores Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Bemærk: Se *PyroMark Q24-brugervejledningen* for at få en generel fejlfindingsguide for instrumentet.

Kommentarer og forslag

Der er signaler i kontrollen uden skabelon-DNA (negativ kontrol)

- | | |
|----------------------------|--|
| a) Krydstale mellem brønde | Signalet fra én brønd blev påvist i en brønd ved siden af. Undgå at placere prøver med høje signalintensiteter tæt på kontrolbrønde uden skabelon-DNA. |
| b) PCR-kontaminering | Brug sterile pipettespidser med filtre. Materialer som prøver, kontroller og amplikoner skal opbevares og ekstraheres separat fra PCR-reagenserne. |

Der blev påvist en dårlig eller uventet sekvens

- | | |
|---------------------------------|--|
| a) Lav kvalitet af genomisk DNA | Genomisk DNA af lav kvalitet kan få PCR til at mislykkes. Analysér PCR-prøverne ved hjælp af en elektroforeseteknik (f.eks. QIAxcel [®] -systemet eller agarose-gel-elektroforese). |
|---------------------------------|--|

Kommentarer og forslag

Resultatet var "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt)

- a) Lav spidshøjde
- Håndteringsfejl under PCR-opsætningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekvensering kan resultere i lave spidser.
- Det er vigtigt, at prøverne optages helt af vakuumværktøjet. Sørg for, at vakuumværktøjet sænkes langsomt i prøverne, og at geometrien for den PCR-plade eller strips, der anvendes til immobilisering, gør det muligt at optage prøverne helt.
- Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen* med regelmæssige mellemrum, og udskift filterproberne, når det er påkrævet.
- I tilfælde af en "Check"-advarsel skal pyrogrammet omhyggeligt sammenlignes med histogrammet, som kan vises ved at højreklikke i pyrogramvinduet. Hvis de målte spidser svarer til højden på søjlerne i histogrammet, er resultatet gyldigt. I modsat fald anbefales det at køre prøven igen.
- b) Advarslen "Uncertain/Failed bisulfite conversion at dispensation: 15" (Usikker/mislykket bisulfitkonvertering ved dispensation: 15) vises.
- Sørg for, at værdien for "Allowed percentage for passed quality" (Tilladt procent for godkendt kvalitet) og "Allowed percentage for check quality" (Tilladt procent for kontrolkvalitet) er angivet til henholdsvis 7,0 og 10,0.
- Bemærk:** Hvis kvalitetsvurderingen endte med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt), var bisulfitkonverteringen ikke fuldstændig, hvilket kan påvirke metyleringskvantificeringen.
- Det anbefales at anvende EpiTect Bisulfite Kit (katalognr. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (katalognr. 59144) eller EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (katalognr. 59124) fra QIAGEN og følge protokollen for konvertering nøjagtigt.

Kommentarer og forslag

Høj baggrund

- a) Nucleotider opbevaret forkert
Nucleotider skal opbevares ved 2-8 °C. Opbevaring ved -15 til -25 °C kan give anledning til en forøgelse af baggrunden.
- b) Kort afkølingstid for prøver forud for pyrosekvenseringsanalyse
Lad prøverne stå på en PyroMark Q24-pladeholder ved stuetemperatur i 10-15 minutter. Undgå at afkorte nedkølingstiden.
- c) Kontaminering af beholder
Sørg for at gøre beholderen grundigt ren som beskrevet i produktarket. Opbevar beholderen beskyttet mod lys og støv.

Ingen signaler i positive kontroller

- a) Utilstrækkelig enzym- eller substratblanding i alle brønde
PyroMark Q24-beholderen skal fyldes i henhold til "Pre Run Information" (Information før kørsel) i menuen "Tools" (Funktioner).
- b) Reagenser opbevaret eller fortyndet forkert
Klargør *therascreen*-reagenserne i overensstemmelse med instruktionerne i "Protokol 5: Kørsel af PyroMark Q24", side 26.
- c) Mislykket PCR eller prøveklargøring
Håndteringsfejl under PCR-opsætningen, programmering af PCR-cyklusanordningen eller prøveforberedelsen inden pyrosekvenseringsanalyse kan resultere i manglende signal. Udfør funktionstesten for filterproberne som beskrevet i *PyroMark Q24-brugervejledningen*, og udskift filterproberne, når det er påkrævet. Gentag PCR og pyrosekvenseringsanalysen.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *therascreen* MGMT Pyro-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af QIAGENs ydelsesundersøgelser.

Brugsegenskaber

Tomgrænse

Tomgrænsen (LOB, tabel 9) er blevet bestemt for de fire CpG-steder, der analyseres af *therascreen* MGMT Pyro-kittet ved hjælp af DNA-prøver fra sunde bloddonorer i overensstemmelse med anbefalingerne i Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) retningslinje EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". α - og β -fejlene (hhv. falsk-positiv- og falsk-negativ-fejl) blev indstillet til 5 %.

LOB-værdierne repræsenterer metyleringsfrekvenser, der er indhentet fra prøver fra sunde bloddonorer med en sandsynlighed på 95 %.

Tabel 9. LOB bestemt for specifikke metyleringssteder ved hjælp af prøver fra sunde bloddonorer

Position	LOB (procentenheder)
CpG-sted 1	1,5
CpG-sted 2	1,8
CpG-sted 3	3,2
CpG-sted 4	3,4
Gennemsnit for CpG-sted 1 til 4	2,1

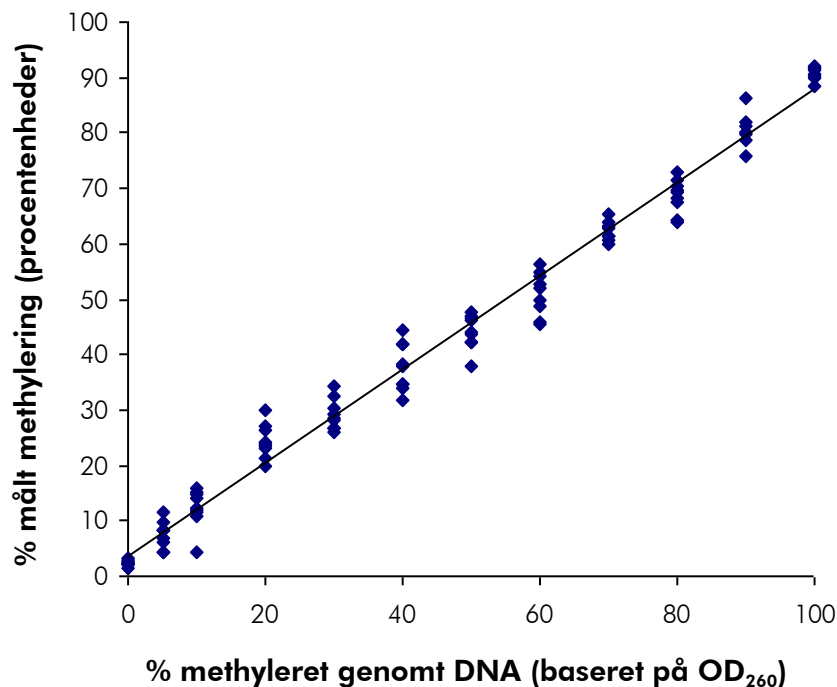
Bemærk: Det anbefales, at metodens egnethed bekræftes i laboratoriet.

Linearitet

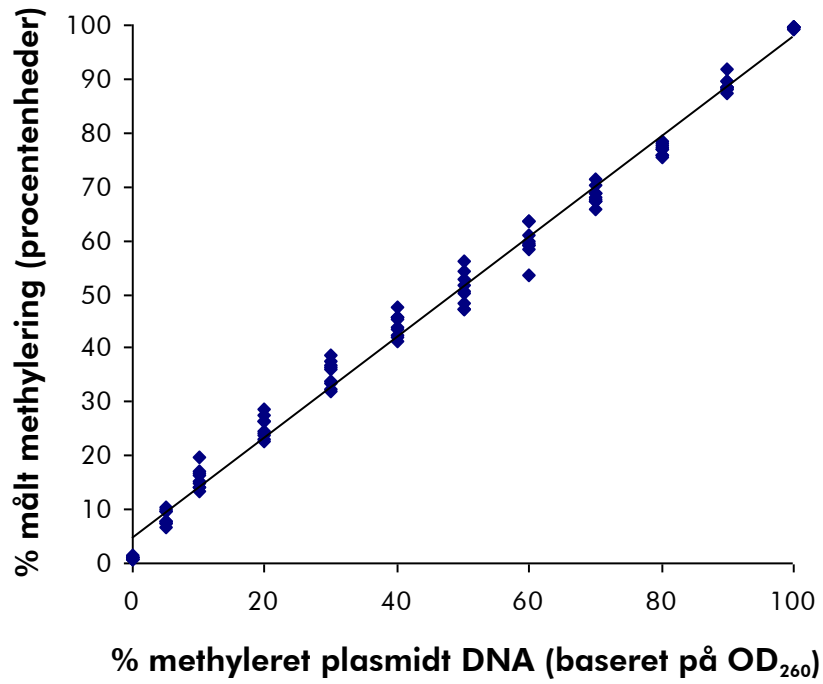
Lineariteten blev bestemt ved hjælp af blandinger af umethyleret og methyleret bisulfitkonverteret genomt DNA fra EpiTect PCR Control DNA-sættet (katalognr. 59104) og parallelt ved hjælp af blandinger af plasmider, der indeholdt den respektive bisulfitkonverterede sekvens af en umethyleret eller methyleret prøve (dvs. indeholder henholdsvis C- og T-nucleotider i CpG-steder). De genomiske henholdsvis DNA'er og plasmider blev blandet i forhold for at opnå tolv niveauer af methylering (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 og 100 %). Hver af blandingerne blev analyseret med tre forskellige lot af *therascreen* MGMT Pyro-kittet i tre pyrosekvenseringskørsler hver med tre replikater.

Resultaterne ($n=9$ for hvert mutationsniveau) blev analyseret i henhold til CLSI's retningslinje EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" ved hjælp af Analyse-it® Software v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) og vises i figur 8 og 9 for den gennemsnitlige methylering af CpG-sted 1 til 4 ved hjælp af henholdsvis genomisk eller plasmid DNA som skabelon.

Resultaterne var lineære med en tilladt nonlinearitet på 5 % enheder over analyseområdet for 0 til 100 % methyleringsniveau for hver enkelt methyleringssted og for gennemsnittet af de fire methyleringssteder.



Figur 8. Linearitet af den gennemsnitlige methylering af CpG-sted 1 til 4 ved hjælp af blandinger af EpiTect-kontrol-DNA.



Figur 9. Linearitet af den gennemsnitlige methylering af CpG-sted 1 til 4 ved hjælp af blandinger af plasmid DNA.

Præcision

Data for præcision gør det muligt at bestemme analysernes samlede variabilitet og blev opnået på tre forskellige niveauer ved at analysere ovennævnte blandinger af genomt og plasmid DNA med tre replikater hver.

Repetierbarhed (variabilitet inden for samme analyse og mellem batches) blev beregnet på basis af data til bestemmelse af linearitet (tre kørsler på samme dag med forskellige lot af *therascreen* MGMT Pyro-kittet).

Laboratorienøjagtighed (variabilitet inden for samme laboratorium) blev bestemt i tre kørsler på ét laboratorium på tre forskellige dage med forskellige operatører, PyroMark Q24-instrumenter og lot af *therascreen* MGMT Pyro-kittet.

Reproducerbarhed (variabilitet mellem laboratorier) blev beregnet ud fra to kørsler henholdsvis på et internt og et eksternt laboratorium og ved hjælp af forskellige lot af *therascreen* MGMT Pyro-kittet.

Den estimerede præcision udtrykkes som standardafvigelse i forhold til de målte metyleringsfrekvenser for CpG-sted 1 til 4 i procentenheder (tabel 10 og 11). Repetierbarhed, laboratorienøjagtighed og reproducerbarhed ved hjælp af blandinger af genomt DNA var inden for henholdsvis 0,5-4,3, 0,4-4,0 og 0,4-4,4 procentenheder i det målte område af 0-100 % metyleringsniveau. Lignende resultater blev opnået ved hjælp af blandinger af plasmid DNA (se tabel 11).

Tabel 10. Præcision af den gennemsnitlige methylering af CpG-sted 1 til 4 ved hjælp af EpiTect-kontrol-DNA*

% methyleret EpiTect-kontrol-DNA [†]	Repeterbarhed		Laboratorienøjagtighed		Reproducerbarhed	
	Gns.	SD [‡]	Gns.	SD	Gns.	SD
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

* Alle værdier er anført som procentenheder.

[†] Baseret på OD₂₆₀ måling.

[‡] SD: standardafvigelse (n=9 for repeterbarhed og laboratoriepræcision, n=12 for reproducerbarhed).

Tabel 11. Præcision for den gennemsnitlige af CpG-sted 1 til 4 ved hjælp af blandinger af plasmid DNA*

Plasmid DNA- blanding (%) [†]	Repeterbar- hed		Laboratorienøjagtig- hed		Reproducerbar- hed	
	Gns.	SD [‡]	Gns.	SD	Gns.	SD
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

* Alle værdier er anført som procentenheder.

[†] Baseret på OD₂₆₀ måling. 0-100 % værdierne angiver forholdet af plasmid, der indeholder C-nucleotider i CpG-steder (der repræsenterer methylerede C-nucleotider) i en blanding med plasmid, der bærer T-nucleotider i CpG-steder (der repræsenterer umethylerede C-nucleotider).

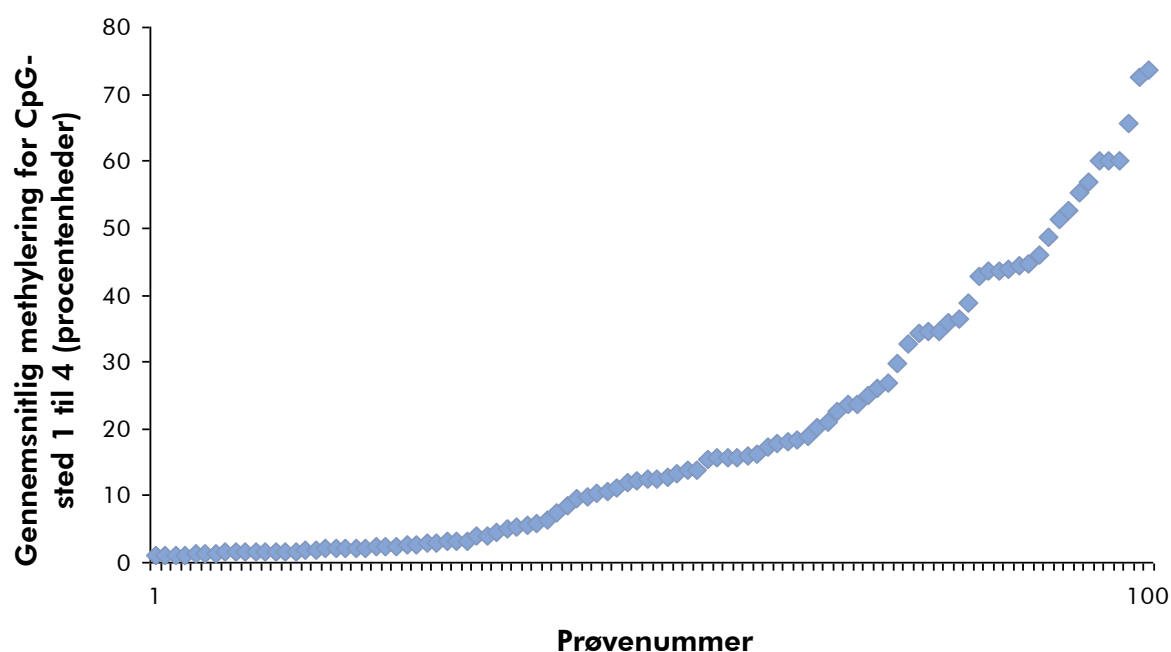
[‡] SD: standardafvigelse (n=9 for repeterbarhed og laboratoriepræcision, n=12 for reproducerbarhed).

Diagnostisk evaluering

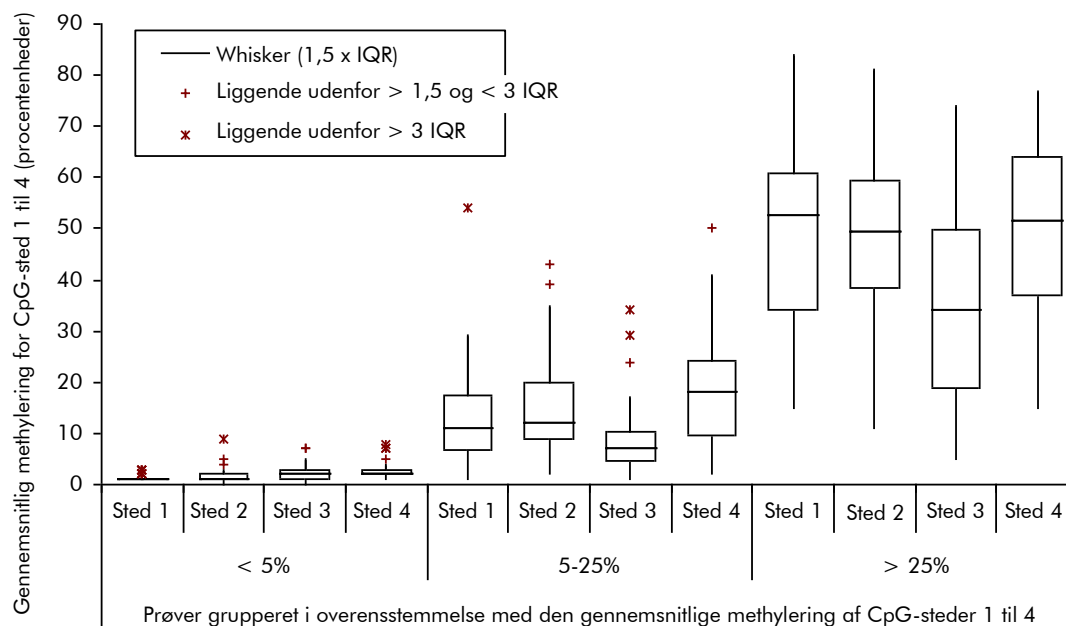
therascreen MGMT Pyro-kittet blev evalueret i sammenligning med Sanger-sekvensering. DNA blev udtrukket fra 100 formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) vævsprøver fra glioblastom og analyseret for methylering i de fire CpG-steder, der analyseres af *therascreen* MGMT Pyro-kittet.

DNA blev isoleret ved hjælp af QIAamp DNA FFPE Tissue-kittet og bisulfitkonverteret ved hjælp af Epiect Bisulfite-kittet. Pyrosekvenseringsanalyse blev udført med *therascreen* MGMT Pyro-kittet på PyroMark Q24 og Sanger-sekvensering på ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Af 100 prøver analyseret af Sanger-sekvensering kunne methyleringsstatus bestemmes i 49 prøver, hvor det med *therascreen* MGMT Pyro-kittet var muligt at bestemme methyleringsniveauet i alle prøver. Gennemsnitlige methyleringsniveauer mellem 1 og 74 procentenheder blev sporet i 100 prøver af pyrosekvenseringsanalyse (figur 10). Fordelingen af methyleringsniveauer for individuelle steder er vist i figur 11.



Figur 10. Gennemsnitlig methylering af CpG-sted 1 til 4 opnået for 100 glioblastomprøver ved hjælp af *therascreen* MGMT Pyro-kittet. Prøver sorteres efter stigende methyleringsniveau.



Figur 11. Fordeling af individuel CpG-stedmethylering i 100 glioblastoprøver ved hjælp af *therascreen* MGMT Pyro-kittet. Prøverne er grupperet efter den gennemsnitlige methylering af CpG-steder 1 til 4. Felterne repræsenterer de øvre og nedre kvartiler (25. og 75. percentiler) som adskilt af medianen (50. percentil, vist som vandret linje). Data, der falder uden for dette område, vises som whiskers og liggende udenfor som angivet i forklaringen til feltet. IQR: Interkvartil område.

Til metodesammenligning blev en umethyleret eller methyleret status tildelt til resultaterne af pyrosekvenseringsanalysen ved hjælp af 5 procentenheder gennemsnitlig methylering af CpG-sted 1 til 4 som cutoff, hvorimod Sanger-sekvenseringsresultater blev manuelt allokeret til umethyleret eller methyleret status.

Toogtredive prøver blev påvist som methyleret af Sanger-sekvensering. I alle tilfælde kunne methyleringsstatussen gengives med *therascreen* MGMT Pyro-kittet. To yderligere prøver blev rapporteret som methyleret af pyrosekvensering, mens methylering ikke blev påvist for disse af Sanger-sekvensering. Ud af 19 umethylerede prøver som påvist af Sanger-sekvensering blev det samme resultat rapporteret for 17 prøver ved hjælp af *therascreen* MGMT Pyro-kittet. Resultaterne er opsummeret i tabel 12.

Når prøver, der mislykkedes i Sanger-sekvenseringsanalyse udelades, viste *therascreen* MGMT Pyro-kittet og Sanger-sekvensering 96 % overensstemmelse i resultater (tabel 12).

Tabel 12. Resultater af methyleret analyse i CpG-sted 1 til 4 for de analyserede glioblastoprøver

		Sanger-sekvensering			
		Umethyleret	Methyleret	Ukendt	I alt
therascreen MGMT Pyro-kit	Umethyleret	17	0	18	35
	Methyleret	2	32	31	65
	Ukendt	0	0	0	0
	I alt	19	32	49	100






Bemærk: I samtlige kørsler, der blev brugt til bestemmelse af ydelseskarakteristika, var signalet over 30 RLU, der rutinemæssigt kan opnås med 10 ng DNA isoleret fra blod (målt før bisulfitkonvertering).

Referencer

QIAGEN opretholder en stor, opdateret online-database over videnskabelige publikationer, der benytter QIAGENS produkter. Omfattende søgemuligheder gør det nemt at finde de artikler, der er brug for, enten ved en enkel søgning på nøgleord eller ved at specificere anvendelse, forskningsområde, titel, etc.

En fuldstændig referenceliste kan fås ved at besøge QIAGENS reference-database online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakte QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler.

Symboler

 Σ	Indeholder tilstrækkelige reagenser til $\langle N \rangle$ prøvepræparationer
	Anvendes inden
IVD	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
REF	Katalognummer
LOT	Lotnummer
MAT	Materialenummer
COMP	Komponenter
CONT	Indeholder
NUM	Antal
NaOH	Natriumhydroxid
GTIN	Globalt varenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Se de informationer, der er angivet i håndbogen



Kontaktoplysninger

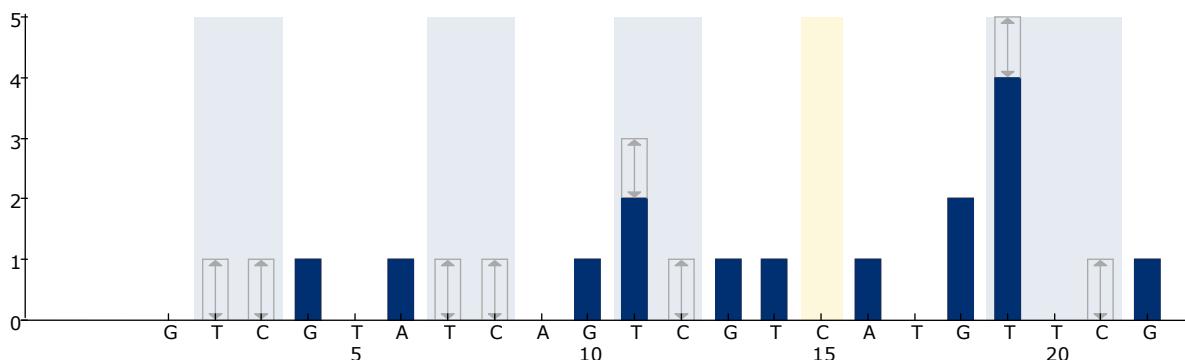
For teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, eller ring til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Bilag A: Opsætning af MGMT-analysen

Inden *therascreen* MGMT-analysen køres første gang, skal analysefilen konfigureres. Opsæt MGMT-analysen ved hjælp af PyroMark Q24-softwaren som beskrevet nedenfor.


Procedure

1. Klik på  på værktøjslinjen, og vælg "New CpG Assay" (Ny CpG-analyse).
2. Angiv sekvensen i "Sequence to Analyze" (Sekvens, der skal analyseres):
YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT
3. Indtast manuelt følgende "Dispensation Order" (Dispensationsrækkefølge):
GTCGTATCAGTCGTCATGTTCCG
4. Klik på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre), og øg "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Tærskelværdi for spidshøjde – Påkrævet spidshøjde til godkendt kvalitet) til 30.
5. Under fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametre) skal "Allowed percentage for passed quality" (Tilladt procent for godkendt kvalitet) og "Allowed percentage for check quality" (Tilladt procent for kontrolkvalitet) angives til henholdsvis 7,0 og 10,0.
6. Klik på  på værktøjslinjen, og gem analysen under navnet "MGMT".



Figur 12. Histogram for MGMT-analysen. Søjlen ved dispensering 15 angiver kontrollen til fuldførelse af bisulfitkonvertering.

Bilag B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere

ADVARSEL 	Sundhedsfarlige kemikalier Den denatureringsopløsning, der anvendes sammen med vakuumarbejdsstationen, indeholder natriumhydroxid, som virker irriterende på øjne og hud. Brug altid sikkerhedsbriller, handsker og en laboratoriekittel. Den ansvarlige person (for eksempel laboratorielederen) skal træffe de nødvendige forholdsregler for at sikre, at den omgivende arbejdsplads er sikker, og at de, der betjener udstyret, ikke udsættes for sundhedsfarlige niveauer af giftige stoffer (kemiske eller biologiske) som defineret i de relevante sikkerhedsdatablade (SDS'er) eller OSHA [*] -, ACGIH [†] - eller COSHH [‡] -dokumenter. Udluftning af gasser og bortskaffelse af affald skal ske ifølge alle gældende sundheds- og sikkerhedsregler og love.
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Arbejdssikkerheds- og Sundhedsadministrationen, USA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Amerikansk Konference for Statslige Industrihygienikere, USA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrol af sundhedskadelige stoffer, UK)

Sørg for at overholde alle nationale, regionale og lokale miljøbestemmelser for bortskaffelse af laboratorieaffald.

Vigtig anvisning før start

- Denne protokol kræver rektificeret vand.

Procedure

- B1. Kontrollér, at der ikke sættes vakuum på vakuumværktøjet. Vakuumkontakten skal være lukket (Off), og der skal være slukket for vakuumpumpen.**
- B2. Kasser eventuelle opløsninger, der er tilbage i beholderne.**
- B3. Skyl beholderne med rektificeret vand, eller udskift dem om nødvendigt.**
- B4. Tøm affaldsbeholderen.**
- B5. Hætten kan tages af uden at afbryde slangen.**
- B6. Hvis vakuumarbejdsstationen skal rengøres (f.eks. for støv eller spild), følges anvisningerne i *PyroMark Q24-brugervejledningen*.**

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	Til 48 reaktioner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenseringsprimere, PCR-primere, methyleret kontrol-DNA, PyroMark PCR-masterblanding, CoralLoad-koncentrat, PyroMark-bindingsbuffer, PyroMark-afhærdningsbuffer, PyroMark-denatureringsopløsning, PyroMark-vaskebuffer, enzymløsning, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP og H ₂ O	971061
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	Sekvensreaktionsplade med 24 brønde	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Beholdere til dispensering af nucleotider og reagenser	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Genanvendelige filterprober til PyroMark-vakuumarbejdsstation Q96 og Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Til installationskontrol af systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Til ydelseskontrol af systemet	979304
Relaterede produkter		
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekvensering af 24 prøver	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaseret påvisningsplatform til parallel pyrosekvensering af 24 prøver	9001514

Produkt	Indhold	Katalognr.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumarbejdsstation (220 V) til parallel klargøring af 24 prøver fra PCR-produkt til enkeltstrengt skabelon	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbejdsstation (220 V) til parallel klargøring af 24 prøver fra PCR-produkt til enkeltstrengt skabelon	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Program	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysesoftware	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-forberedelser: 50 QIAamp MinElute®-kolonner, proteinase K, buffere og indsamlingsrør (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Til 48 forberedelser: Reagensbeholdere (væv), engangsfilterspidser, engangsspidsholdere, prøverør (2 ml), vaskerør (1,5 ml), buffer G2, proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til 50 forberedelser: QIAamp Mini Spin-kolonner, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104
EpiTect Bisulfite Kit	Til 48 forberedelser: EpiTect Bisulfite Spin-kolonner, reaktionsblanding, DNA-beskyttelsesbuffer, bærer-RNA, buffere	59104

* Kun Storbritannien.

† Resten af verden.

Produkt	Indhold	Katalognr.
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Til 48 forberedelser: MinElute DNA-spin-kolonner, bisulfitblanding, DNA-beskyttelsesbuffer, bærer-RNA, buffere, deparaffineringsopløsning, lysebuffer-FTB	59144
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Til 48 forberedelser: MinElute DNA-spin-kolonner, bisulfitblanding, DNA-beskyttelsesbuffer, bærer-RNA, buffere	59124
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Humant kontrol-DNA-sæt (indeholder både bisulfitkonverteret methyleret og umethyleret DNA og ikke-konverteret umethyleret DNA) for 100 kontrol-PCR'er	59695

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller brugervejledning. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGEN Technical Services eller den lokale distributør.

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

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af *therascreen* MGMT Pyro-kittet accepterer følgende vilkår:

1. *therascreen* MGMT Pyro-kittet må kun bruges i overensstemmelse med *therascreen* MGMT Pyro Kit-håndbogen og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i *therascreen* MGMT Pyro Kit-håndbogen og yderligere protokoller, som fås på www.qiagen.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt, der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

© 2015 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

