

November 2017

Håndbok for *therascreen*[®] PITX2 RGQ PCR-settet



Versjon 1

IVD

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til bruk med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrumentet

Til bruk med QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue-settet

Til bruk med EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite-settet

CE

REF

873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R1 **MAT**

1107245NO



Innhold

Tiltent bruk	5
Sammendrag og forklaring	5
Prosedyreprinsipp	6
Materialer som medfølger	11
Settets innhold	11
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	11
Advarsler og forholdsregler	14
Sikkerhetsinformasjon	14
Generelle forholdsregler	15
Oppbevaring og håndtering av reagenser	17
Forsendelsesbetingelser	17
Oppbevaringsforhold	18
Stabilitet	18
Håndtering og oppbevaring av prøver	19
Prosedyre	20
Genomisk DNA-rensing og -klargjøring	20
Deparafinering av FFPE-snitt med QIAGENS deparafineringsløsning	21
Manuell rensing av gDNA med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet	23
Kvantitering av DNA	26
gDNA-bisulfittkonvertering ved hjelp av EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet	26

Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	34
Tolkning av resultater	52
Dataanalyse	52
Resultatvisning.....	55
Flagg	57
Feilsøkningsveiledning	62
Kvalitetskontroll	66
Begrensninger	67
Ytelsesegenskaper	68
Grense for blank prøve	68
Deteksjonsgrense.....	69
DNA-input	70
Linearitet	70
Repeterbarhet og reproduserbarhet	71
Interfererende substanser.....	72
Krysskontaminering.....	72
Gjeldende tidsramme.....	73
Klinisk cut-off-validering	73
Referanser	75
Symboler	77
Kontaktinformasjon	78
Bestillingsinformasjon	79

Tiltenkt bruk

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet er en in vitro metyleringsspesifikk sanntids PCR-test som brukes til å bestemme prosentvis metyleringsratio (percent methylation ratio, PMR) i promotor 2 i hypofysens homeoboks 2 (PITX2). Testen bruker bisulfittkonvertert gDNA fra FFPE-vev fra brystkreftpasienter i høyrisikogruppen. PMR hjelper klinikere med å forutsi responsen på adjuvant antrasyklinbasert kjemoterapi med eller uten endokrin terapi hos lymfeknute-positive, østrogenreseptor-positive, HER2-negative brystkreftpasienter i høyrisikogruppen.

Produktet skal brukes av kvalifiserte brukere, f.eks. teknikere og leger, som har fått opplæring i molekylærbiologiske teknikker og in vitro-diagnostiske prosedyrer.

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet brukes sammen med QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-plattformen.

Sammendrag og forklaring

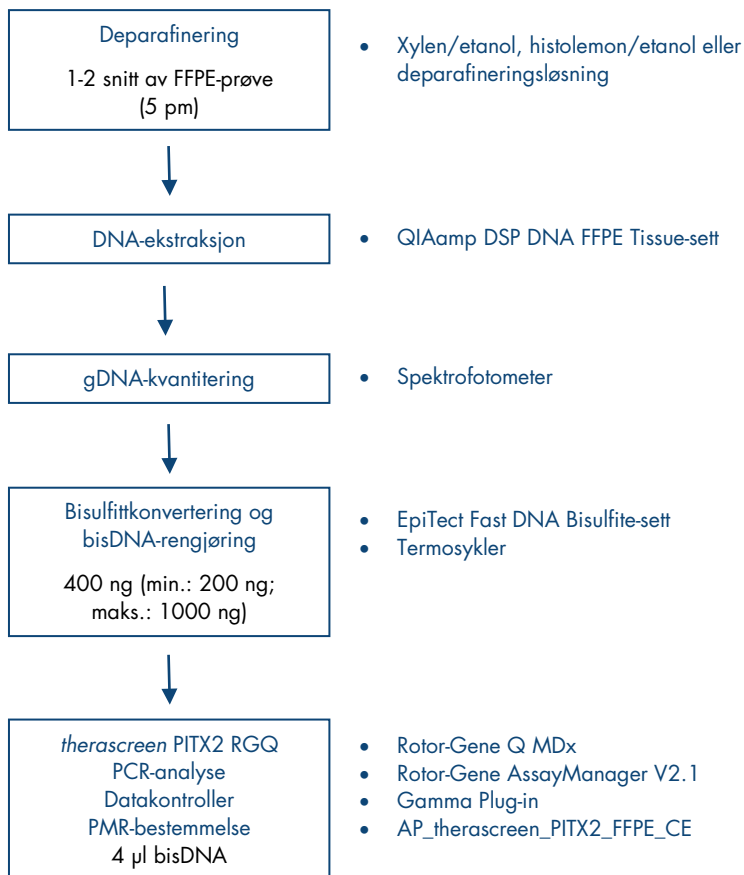
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet brukes til rensing av DNA fra FFPE-vev. Hypofysens homeoboks 2 (PITX2) er en transkripsjonsfaktor som er induisert av Wnt/ β -catenin-signalveien. PITX2 fungerer som en effektor for Wnt-signalisering ved å rekruttere og interagere med β -catenin for å øke ekspresjon av målgener involvert i celleproliferasjon, tumorprogresjon og kjemosensitivitet (1–6). Genekspresjonsaktiviteten til PITX2 reguleres av metylering i promotorregionen gjennom såkalt "epigenetisk modifisering". Små molekyler, såkalte "metylgrupper", er bundet til DNA-cytosinbasen i promotorregionen til et gen. Et slikt fullstendig eller delvis metylert gen har nedregulert aktivitet. Ved brystkreft er PITX2 blitt rapportert å være både en prognostisk markør og en prediktiv markør for respons på endokrin eller antrasyklinbasert kjemoterapi. Flere kliniske studier har vist en sterk statistisk korrelasjon mellom metylering i promotorregionen til PITX2-genet og kliniske utfallsmålinger som f.eks.

progresjonsfri overlevelse, metastasefri overlevelse, sykdomsfri overlevelse og generell overlevelse (7–12).

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet er en sanntids metyleringsspesifikk PCR-basert (qMSP) analyse. Prøvetypen er bisDNA, dvs. bisulfitt-konvertert genomisk DNA (gDNA). gDNA blir først rensset fra formalinfiksert parafininnstøpt (FFPE) vev fra lymfeknute-positive, østrogenreseptor-positive, HER2-negative brystkreftpasienter i høyrisikogruppen. Etter bisulfitteksponering for å skille mellom metylert og umetylert PITX2, blir prosentvis metyleringsratio (PMR) for tre CpG-motiver i PITX2-genets promotor 2 kvantitert med qMSP og beregnet med Rotor-Gene AssayManager[®]-programvaren ved hjelp av Gamma Plug-in og PITX2-analyseprofilen. Oppnådd PMR gir informasjon til behandlende lege om hvorvidt det er sannsynlig at en pasient vil respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi. Hvis oppnådd PMR er lik eller lavere enn 12, er det sannsynlig at pasienten vil respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi. Hvis derimot oppnådd PMR er høyere enn 12, kan man foreslå en alternativ behandling, ettersom pasienten har en lavere sannsynlighet for å respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi (se "Klinisk cut-off-validering", side 73).

Prosedyreprinsipp

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet bruker sanntids-PCR (qPCR) for å bestemme prosentvis metyleringsratio (PMR) i PITX2-promotor 2. Prøvetypen for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet er bisulfittkonvertert gDNA. Denne bisulfittkonverteringen utføres ved hjelp av EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet (QIAGEN, kat.nr. 59824 eller 59826). gDNA-et som brukes til denne konverteringen, er rensset fra FFPE-vev fra brystkreftpasienter i høyrisikogruppen ved hjelp av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet (kat.nr. 60404). Arbeidsflyten er som vist i figur 1.



Figur 1. Arbeidsflyt for *thescreen* PITX2 RGQ PCR-settet.

Bruk av qPCR muliggjør deteksjon av en målrettet bisDNA-sekvens under den eksponentielle fasen av amplifikasjonsprosessen. qPCR-data kan oppnås raskt, uten post-PCR-behandling, gjennom sanntidsdeteksjon av fluorescenssignaler under PCR-sykling.

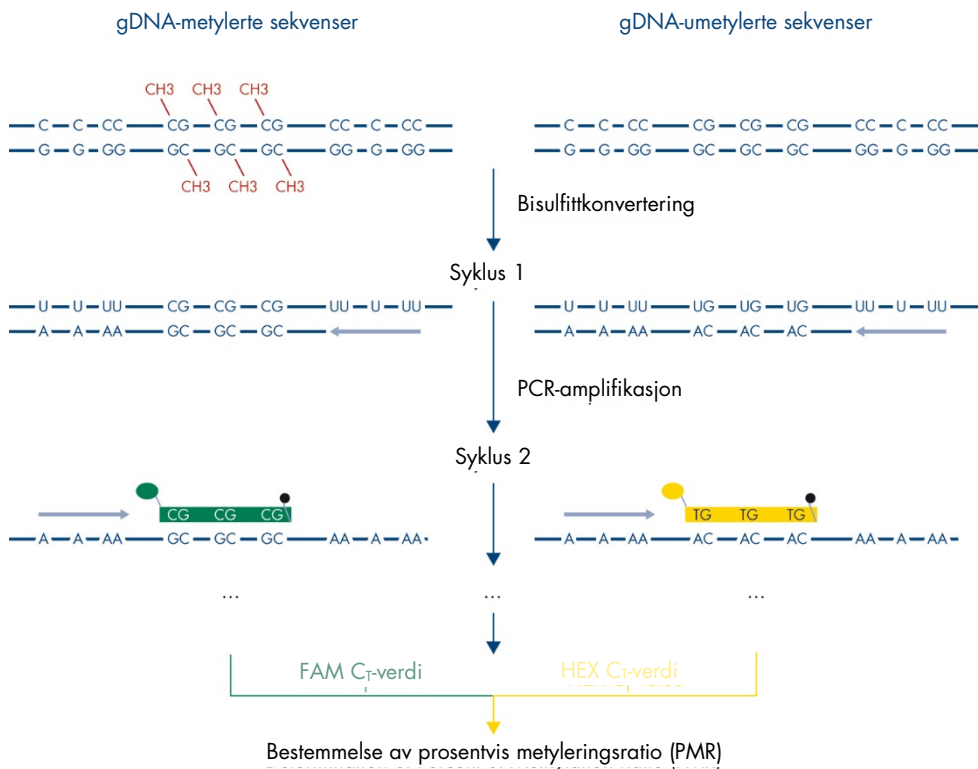
therascreen PITX2 RGQ PCR-settets analyse benytter qPCR-oligonukleotidhydrolyseprinsippet i TaqMan®-probene kombinert med metyleringsuspesifikke primere (Figur 2, neste side). Denne analysen bruker ett par med primere til å amplifisere alle bisulfittkonverterte målsekvenser. To ulike signaler oppnås fra denne amplifikasjonen ved hjelp av to TaqMan-prober som er merket med forskjellige fargestoff. Disse probene, som består av oligonukleotider merket med en 5'-rapporteringsfarge (FAM™ eller HEX™) og en nedstrøms 3'-fargeløs slukker, hybridiseres til målsekvensene i PCR-produktet. Én probe er spesifikk for bisDNA-sekvensene fra metylerte sekvenser, farget med FAM. Den andre er spesifikk for bisDNA-sekvensene fra umetylerte sekvenser, farget med HEX. Analysen med TaqMan qPCR benytter 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymerasen. Når proben er intakt, vil rapporteringsfargestoffets nærhet til slukkeren føre til suppresjon av rapporteringsfluorescensen primært ved energioverføring av Förster-typen. Dersom interessenmålet er til stede under PCR, hybridiseres både forover- og reversprimerstedene spesifikt og flankerer den hybridiserte proben. 3'-enden av proben blokkeres for å forhindre forlengelse av proben under PCR (Figur 3, side 10). Under polymeriseringsfasen spaltes proben av 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten til DNA-polymerasen, noe som fører til frigjøring av slukker og utslipp av rapporteringsfluorescenssignal. Probefragmentene flyttes deretter fra målet, og polymerisering av tråden fortsetter. Denne prosessen forekommer i hver syklus og forstyrrer ikke den eksponentielle produktakkumuleringen (Figur 3, side 10). Økningen i fluorescenssignal detekteres kun hvis målsekvensen er komplementær til primerne og proben og dermed amplifisert under PCR. PCR-syklusen der fluorescensen fra en bestemt reaksjon krysser de forhåndsdefinerte terskelverdiene (gitt av *therascreen* PITX2-analysepakken), er definert som C_T-verdien.

Resultatet av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settets analyse er to C_T-verdier, én for FAM og én for HEX. Fra ΔC_T-verdien mellom begge signaler beregnes det en PMR (Figur 2, neste side). PMR-beregningen er basert på følgende formel (11):

$$PMR = \frac{100}{1 + 2^{C_{T,FAM} - C_{T,HEX}}}$$

Oppnådd PMR gir informasjon til behandlende lege om hvorvidt det er sannsynlig at en pasient vil respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi. Hvis oppnådd PMR er lik eller lavere enn 12, er det sannsynlig at pasienten vil respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi. Hvis derimot oppnådd PMR er høyere enn 12, kan man foreslå en alternativ behandling, ettersom pasienten har en lavere sannsynlighet for å respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi.

Tiden det tar å gjennomføre alle oppgavene, fra gDNA-rensing til dataanalyse, er mindre enn to arbeidsdager.



Figur 2. Prinsippet for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settets analyse.

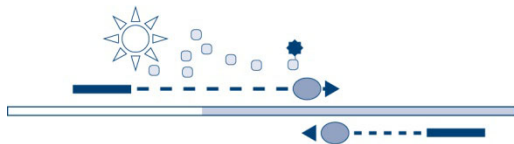


Hybridisering

Hybridisering av primere og probe

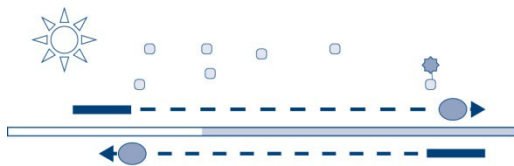


Polymerisering
Trådforskyvning



Spalting

Fører til frigjøring av slukkerfargestoff og utstråling av rapporteringsfluorescenssignal



Polymerisering fullført

PCR-produkt fullført og akkumulering av fluorescenssignal i hver syklus



Figur 3. Prinsippet for TaqMan sanntids PCR-analyse.

Materialer som medfølger

Settets innhold

<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit		(8)
Katalognr.		873211
Antall reaksjoner		8
Lilla	PITX2 RGQ PCR Master Mix	660 µl
Blå	PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix	192 µl
Gul	PITX2 RGQ PCR Reference 50 (PITX2 RGQ PCR-referanse 50)	12 µl
Oransje	PITX2 RGQ PCR Reference Low (PITX2 RGQ PCR-referanse lav)	12 µl
Grønn	PITX2 RGQ PCR Negative Control (PITX2 RGQ PCR negativ kontroll)	12 µl
Fargeløs	PITX2 RGQ PCR NTC (PITX2 RGQ PCR ikke-templat-kontroll)	12 µl
–	Instructions For Use (Handbook) (Bruksanvisning (engelsk))	1

Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheet, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger. Se til at alle settreagensene ikke er gått ut på dato, og at de har vært transportert og oppbevart under korrekte forhold.

Reagenser

- Etanol (molekylgrad 96–100 %)

Merk: Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer må ikke brukes, fordi det inneholder metanol eller metyletylketon.

Utstyr

- Termomikser, oppvarmet orbital inkubator, varmeblokk eller vannbad egnet til inkubering ved 56 °C og 90 °C.

Merk: Ta i betraktning termomikserens krav til rørform for å velge egnet rørstørrelse (f.eks. 2 eller 1,5 ml rør)

- Justerbare pipetter* beregnet på PCR (1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl)
Det anbefales at det benyttes minst to sett med pipetter, ett til klargjøring og distribusjon av PCR-reaksjonsblandinger og ett til håndtering av kontroller, inkludert innlasting av PCR-templat.
- Nukleasefrie, aerosolresistente, sterile PCR-pipettespisser med hydrofobe filtre (pipettespisser med aerosolbarrierer anbefales for å forhindre krysskontaminering).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (1,5 ml eller 2 ml mikrosentrifugerør)(1,5 ml rør, tilgjengelige fra Eppendorf, kat.nr. 0030120.086, eller Sarstedt, kat.nr. 72.690)
- Bordsentrifuge med rotor for 0,5 ml, 1,5 ml og 2,0 ml reaksjonsrør (som kan nå 20 000 x g)
- Vorteksblender
- Spektrofotometer, f.eks. NanoDrop®-instrument eller QIAxpert® (QIAamp plug-in: måling av total nukleinsyre)†
- Engangshansker

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

† Dette er ikke en fullstendig liste over leverandører.

Valgfrie reagenser for arbeidsflytkontroll

- Én flaske som inneholder ett snitt (15 eller 20 µm) av KRAS G13D Reference Standard (KRAS G13D-referansestandard) (Horizon Discovery, kat.nr. HD216).

Til manuell DNA-rensing

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAamp DSP DNA FFPE-vevssett) (kat.nr. 60404)
- Deparaffinization Solution (Deparaffineringsløsning) (kat.nr. 19093) eller xylen eller histolemon (Carlo Erba, kat.nr. 454911)

Viktig: Deparaffineringsløsning, xylen eller histolemon følger ikke med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet og må bestilles separat.

Ytterligere materialer til bisulfittkonvertering

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (EpiTect hurtig DNA-bisulfittsett) (kat.nr. 59824 eller 59826)
- 0,2 ml reaksjonsrør eller rømsler med 8 brønner
- 0,2 ml mikrosentrifugerør
- Termosyklere med oppvarmet lokk (ettersom bisulfittreaksjonen ikke er belagt med mineralolje, er det kun termosyklere med oppvarmet lokk som egner seg for denne prosedyren)

Til PCR på Rotor Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat.nr. 9002032) og tilgjengelig tilbehør
- Rotor-Gene AssayManager-programvare, versjon 2.1.x (hvor x = 0 eller høyere)
- Gamma Plug-in, versjon 1.0.x (hvor x = 0 eller høyere), for Rotor-Gene AssayManager v2.1
- theascreen_PITX2_FFPE_CE -analyseprofil V1.0.x (hvor x = 1 eller høyere)
- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (Lasteblokk for 72 x 0,1 ml rør) (kat.nr. 9018901)
- 72-Well Rotor (Rotor med 72 brønner) (kat.nr. 9018903)

- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (Låsering til adapter for rotor med 72 brønner) (kat.nr. 9018904)
- Rotor Holder (Rotorholder) (kat.nr. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Remserør og lokk, 0,1 ml) for Rotor-Gene Q MDx (kat.nr. 981103 eller 981106)
- Is (eller en kjøleblokk)

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk bruk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (SDS). Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN®-sett og hver enkelt komponent.

For sikkerhetsinformasjon vedrørende deparafineringsløsning, xylene-etanol, histolemon-etanol, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet eller EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet, se de respektive håndbøkene. Se brukerhåndboken for det relevante instrumentet for sikkerhetsinformasjon vedrørende instrumenter.

Generelle forholdsregler

Bruk av qPCR-tester krever god laboratoriepraksis, inkludert sporing, vedlikehold av utstyr som er dedikert til molekylærbiologi og samsvar med gjeldende regelverk og relevante standarder.

Dette settet er beregnet til bruk i in vitro-diagnostikk. Reagenser og instruksjoner i dette settet er testet for optimal ytelse.

- Alle kjemikalier og biologiske materialer er potensielt farlige. Prøver kan være smittefarlige og må behandles som smittefarlig biologisk materiale.
- Kast prøver og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Reagensene for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet er optimalt fortynt. Ikke fortynn reagensene mer, ettersom det kan føre til tap av ytelse.
- Ikke bruk ikke reaksjonsvolumer (reaksjonsblanding pluss prøve) som er mindre eller mer enn 20 µl.
- Kvalitetskontrollprosedyrene ved QIAGEN benytter funksjonell release-testing av settene for hvert enkelt parti. Reagenser fra forskjellige partier må derfor ikke blandes, ettersom det kan påvirke ytelsen.
- Hele *therascreen* PITX2-arbeidsflyten krever overføring av prøver i ulike rør, og det er derfor viktig å påse at prøvenes sporbarhet opprettholdes i hvert trinn.
- Sørg for at PITX2-analyseprofilen og påkrevd Gamma plug-in for Rotor-Gene AssayManager v2.1 er installert.
- Se brukerhåndbøkene for Rotor-Gene Q MDx og Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonen (Rotor-Gene Q MDx User Manual og Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual) for mer informasjon om advarsler, forholdsregler og prosedyrer.
- Endring av inkubasjonstider og temperaturer kan føre til feilaktige eller uforenlige data.
- Tin alle *therascreen* PITX2 RGQ PCR-komponenter og prøver i et kjøleskap, på is, på en kjøleblokk eller ved romtemperatur så lenge som nødvendig.

Merk: Ved tining i romtemperatur må du regelmessig kontrollere om materialet er tint, særlig PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx), ettersom den inneholder dNTP-er som er følsomme for temperatur.

Merk: PITX2 RGQ PCR PPM skal beskyttes mot lys ettersom den inneholder fargestoffnukleotider.

Merk: Gjentatt tining og frysing bør unngås, og må ikke overskride maksimum fire fryse/tine-sykluser.

- Legg alle reagenser (reaksjonsblanding pluss prøve) på is eller i en kjøleblokk.
- Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.
- Reaksjonsblandinger kan forandres hvis de utsettes for lys.
- Reagens må ikke svelges.
- Bruk individuelle, dedikerte pipetter til klargjøring av reaksjonsblanding og tilsetning av templat.
- Ikke åpne Rotor-Gene Q MDx-instrumentet før kjøringen er ferdig.
- Ikke åpne Rotor-Gene Q MDx-rør etter at kjøringen er ferdig. Kast rørene i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.
- Det er viktig at prøvetesting utføres riktig og at man unngår feil ved innsetting av prøve, innlasting og pipettering.
- Sørg for at prøvene håndteres på en systematisk måte for å sikre riktig identifisering.
- Det er svært viktig å forhindre at reaksjonsblandingen kontamineres med materialene i kontrollreagensene i PITX2 RGQ PCR Reference 50 og PITX2 RGQ PCR Reference Low.
- Det er svært viktig å forhindre overføringskontaminering av DNA- eller PCR-produkt, som kan føre til et falskt positivt signal.
- Det er svært viktig å forhindre kontaminering med DNase, som kan forårsake degradering av templat-DNA.

Vi anbefaler derfor følgende:

- Bruk nukleasefritt laboratoriestyr (f.eks. pipetter, pipettespisser, reaksjonsflasker) og engangshansker når du utfører analysen.
- Bruk nye aerosolresistente pipettespisser ved alle pipetteringstrinn for å unngå krysskontaminering av prøvene og reagensene.

Klargjør PCR-reaksjonsblanding med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.) i et dedikert område hvor ingen DNA-matriser (DNA, plasmid- eller PCR-produkter) blir innført. Tilsett PITX2 RGQ PCR NTC i riktig rør i samme område (figur 4, side 36), men lukk dette røret etter innlasting av alle andre kontroller og prøver for å vurdere krysskontaminering. Tilsett prøver som skal testes, PITX2 RGQ PCR Reference 50, PITX2 RGQ PCR Reference Low og PITX2 RGQ PCR Negative Control i et separat rom med spesifikke materialer (pipetter, spisser osv.).

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Forsendelsesbetingelser

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet sendes på tørris. Hvis en komponent i *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet ikke er frosset ved ankomst, hvis ytteremballasjen er blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel eller reagenser, må du kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling eller lokale distributører (se www.qiagen.com).

Oppbevaringsforhold

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet må lagres umiddelbart etter mottak ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en mørk fryser med konstant temperatur.

For informasjon om oppbevaring og håndtering av deparafineringsløsning, xylene-ethanol, histolemon-ethanol, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet eller EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet, se de respektive håndbøkene.

Stabilitet

Når *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet oppbevares under de spesifiserte oppbevaringsforholdene, er settet stabilt frem til angitt utløpsdato.

Når reagenser er åpnet, kan de oppbevares i originalemballasjen ved -30 til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til utløpsdatoen som står på emballasjen. Gjentatt tining og frysing bør unngås, og må ikke overskride maksimum fire fryse/tine-sykluser.

For stabilitetsinformasjon vedrørende deparafineringsløsning, xylene-ethanol, histolemon-ethanol, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet eller EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet, se de respektive håndbøkene.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

Håndtering og oppbevaring av prøver

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet er beregnet for bruk med bisDNA-prøver. Det rensede og bisulfittkonverterte DNA-et er fra FFPE-tumorvev som er tatt fra primærlesjoner hos lymfeknutepositive, østrogenreseptor-positive, HER2-negative brystkreftpasienter i høyrisikogruppen. Fikser vevsprøver i formalin i henhold til laboratorieprotokoll (10 % nøytral bufret formalin er vanligvis akseptert) så raskt som mulig etter kirurgisk fjerning.

- Vevsprøven skal fikseres i 4–10 % formalin så raskt som mulig etter kirurgisk fjerning eller kjernebiopsi.
- Ideelt sett bør det brukes en fikseringstid på 14–24 timer (lengre fikseringstider fører til mer alvorlig DNA-fragmentering, noe som gir dårlig ytelse ved qPCR/qMSP-analyser).
- Dehydrer prøvene grundig før innstøping (resterende formalin kan hemme proteinase K-forbrenningen).
- Det skal skjæres 5 µm tykke snitt fra parafinblokken.
- For snitt som har et tumorareal <100 mm², anbefales det å analysere to snitt for å øke det totale tumorarealet til minst 100 mm².
- Merk, håndter og oppbevar tumorprøver, blokker, snitt og prøver som er klare for rensing på en kontrollert måte i henhold til lokale prosedyrer.
- Transporter og oppbevar FFPE-blokker og -snitt ved romtemperatur. Snitt kan brukes raskt til DNA-rensing.
- DNA som er renses med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet, kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 24 timer, eller ved –30 til –15 °C hvis langtidsoppbevaring er påkrevd.
- DNA som er bisulfittkonvertert med EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet, kan oppbevares ved –30 til –15 °C i minst 9 måneder uten reduksjon i kvalitet eller konvertering. Videre undersøkelser av langtidsoppbevaring pågår. Kontakt QIAGEN for mer informasjon.
- Arbeidsflytkontrollsnittet KRAS G13D Reference Standard (Horizon Discovery, kat.nr. HD216) kan oppbevares ved romtemperatur i 36 måneder fra produksjonsdato.

Prosedyre

Genomisk DNA-rensing og -klargjøring

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet er validert i kombinasjon med QIAGENs deparafineringsløsning (kat.nr. 19093) for deparafinering av FFPE-snitt, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet (kat.nr. 60404) for gDNA-rensing og EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet (kat.nr. 59824 eller 59826) for gDNA-bisulfittkonvertering.

Deparafinering av FFPE-snitt kan utføres med deparafineringsløsningen, xylene-etanol eller histolemon-etanol (ekvivalensen av disse tre deparafineringsmetodene ble påvist under produktutvikling).

Ved bruk av deparafineringsløsningen (kat.nr. 19093) starter du med prosedyren "Deparafinering av FFPE-snitt med QIAGENs deparafineringsløsning" på side 21.

Ved bruk av xylene-etanol eller histolemon-etanol går du direkte til prosedyren "Manuell rensing av gDNA med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet" på side 23.

Valgfritt: Hvis du vil vurdere om rensing eller bisulfittkonvertering er riktig utført, kan du bruke en arbeidsflytkontroll. Arbeidsflytkontrollen som er validert for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settets arbeidsflyt, er KRAS G13D Reference Standard-snittet (Horizon Discovery, kat.nr. HD216).

Se til at reagensene for gDNA-rensing ikke er gått ut på dato, og at de har vært transportert og oppbevart under korrekte forhold. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

Startmateriale

Startmateriale for DNA-rensing skal være nyskårne snitt av FFPE-vev. De kan om nødvendig oppbevares over natten ved romtemperatur. Opptil to snitt, hvert med en tykkelse på 5 µm og et samlet overflateareal på over 100 mm², må brukes som startmateriale for gDNA-rensing.

Deparafinering av FFPE-snitt med QIAGENs deparafineringsløsning

VIKTIG: Hvis deparafinering utføres med xylen-etanol eller histolemon-etanol, går du videre til "Manuell rensing av gDNA med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet" på side 23.

Viktige punkter før du starter

- Utfør alle sentrifugeringstrinn ved romtemperatur (15–25 °C).
- Stabiliser alle buffere til romtemperatur, og deparafineringsløsningen til 20–25 °C.
- Deparafineringsløsningen følger ikke med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet og må bestilles separat.

Ting du skal gjøre før du starter

- Varm opp en termoblander eller oppvarmet orbital inkubator til 56 °C for bruk i trinn 4 og 8. Hvis en termoblander eller oppvarmet orbital inkubator ikke er tilgjengelig, kan du bruke en varmeblokk eller et vannbad i stedet.
- Hvis buffer AL eller buffer ATL inneholder bunnfall, varmer du dem opp til 70 °C og rister lett for å løse det opp.
- Se til at buffer AW1 og buffer AW2 er klargjort i henhold til instruksjonene i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (*Håndboken for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet*).

Prosedyre (for opptil to snitt)

1. Trim av overflødig parafin fra prøveblokken med en skalpell. Skjær 5 µm tykke snitt.
Merk: Hvis prøveoverflaten er blitt utsatt for luft, kast de første 2-3 snittene.
2. Plasser snittet eller snittene umiddelbart i et 1,5 ml eller 2 ml mikrosentrifugerør (medfølger ikke).
3. Tilsett 160 µl deparafineringsløsning og bland kraftig i 10 sekunder ved hjelp av vorteksblending.
Sentrifuger kort for å samle prøven i bunnen av røret.
4. Inkuber ved 56 °C i 3 minutter, og la deretter røret avkjøles ved romtemperatur (15–25 °C).
5. Tilsett 180 µl buffer ATL og bland ved hjelp av vorteksblending.
6. Sentrifuger i 1 minutt ved 11 000 x g (10 000 o/min). Det dannes to faser (blå og klar).
7. Tilsett 20 µl proteinase K til den nedre, klare fasen ved å skyve pipetten gjennom den øvre fasen. Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.
8. Inkuber ved 56 °C ±3 °C i ≥1 time (eller til prøven er fullstendig lysert).
9. Inkuber ved 90 °C ±5 °C i 1 time ±5 minutter.
Inkuberingen ved 90 °C i buffer ATL reverserer delvis formaldehydmodifisering av nukleinsyrer. Lengre inkubasjonstider eller høyere inkubasjonstemperaturer kan føre til mer fragmentert DNA.
Merk: Hvis det brukes kun én varmeblokk, lar du prøven stå i romtemperatur (15–25 °C) etter 56 °C-inkuberingen i trinn 8 inntil varmeblokken har nådd 90 °C for trinn 9.
10. Sentrifuger 1,5 ml røret kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.
11. Overfør den nedre, klare fasen til et nytt 2 ml mikrosentrifugerør (medfølger ikke).
Merk: Ikke overfør noe av den blå fasen.
12. Gå videre til trinn 14 i "Manuell rensing av gDNA med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet" på side 23.

Manuell rensing av gDNA med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet

Manuell gDNA-rensing utføres med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet (kat.nr. 60404) som beskrevet i *Håndboken for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet*.

Viktige punkter før du starter

- Utfør alle sentrifugeringstrinn ved romtemperatur (15–25 °C).

Ting du skal gjøre før du starter

- Stabiliser alle buffere til romtemperatur.
- Still inn en termoblander eller oppvarmet orbital inkubator på 56 °C for bruk i trinn 12.
- Hvis en termoblander eller oppvarmet orbital inkubator ikke er tilgjengelig, kan du bruke en varmeblokk eller et vannbad i stedet.
- Hvis buffer AL eller buffer ATL inneholder bunnfall, varmer du dem opp til 70 °C og rister lett for å løse det opp.
- Se til at buffer AW1 og buffer AW2 er klargjort i henhold til instruksjonene i *Håndboken for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet*.

Prosedyre

Merk: Hvis du bruker QIAGENs deparafineringsløsning, må trinn 1 til 14 erstattes med prosedyren beskrevet i "Deparafineringsløsning av FFPE-snitt med QIAGENs deparafineringsløsning" på side 21.

1. Trim av overflødig parafin fra prøveblokken med en skalpell.
2. Skjær 1 til 2 snitt med 5 µm tykkelse for å få en tumoroverflate på minst 100 mm² (se "Startmateriale", side 21).
Hvis prøveoverflaten er blitt utsatt for luft, kast de første 2-3 snittene.
3. Plasser snittene umiddelbart i et 1,5 ml eller 2 ml mikrosentrifugerør (medfølger ikke).

4. Tilsett 1 ml xylene eller histolemon til prøven. Lukk lokket og bland kraftig i ≥ 10 sekunder ved hjelp av vorteksblending.
5. Sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ± 30 sekunder ved romtemperatur.
6. Fjern supernatanten ved å pipettere. Ikke fjern noe av pelleten.
7. Tilsett 1 ml etanol (96–100 %) til pelleten og bland ved hjelp av vorteksblending.
Etanolen ekstraherer resterende xylene fra prøven.
8. Sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ± 30 sekunder ved romtemperatur.
9. Fjern supernatanten ved å pipettere. Ikke fjern noe av pelleten.
Fjern forsiktig all resterende etanol ved bruk av en fin pipettespiss.
10. Åpne røret og inkuber ved 15–40 °C. Inkuber i 10 minutter ± 1 minutt eller til all resterende etanol har fordampet.
11. Resuspender pelleten i 180 μ l buffer ATL. Tilsett 20 μ l proteinase K og bland ved hjelp av vorteksblending.
12. Inkuber ved 56 °C ± 3 °C i ≥ 1 time (eller til prøven er fullstendig lysert).
13. Inkuber ved 90 °C ± 5 °C i 1 time ± 5 minutter.
Inkuberingen ved 90 °C i buffer ATL reverserer delvis formaldehydmodifisering av nukleinsyrer. Lengre inkubasjonstider eller høyere inkubasjonstemperaturer kan føre til mer fragmentert DNA. Hvis det brukes kun én varmeblokk, la prøven stå i romtemperatur etter 56 °C-inkuberingen inntil varmeblokken har nådd 90 °C.
14. Sentrifuger røret kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.
Merk: Hvis du bruker deparafineringsløsning, går du videre til trinn 15.
15. Tilsett 200 μ l buffer AL til prøven, og bland godt ved hjelp av vorteksblending. Tilsett deretter 200 μ l etanol (96–100 %), og bland godt ved hjelp av vorteksblending.
Det er av avgjørende betydning at prøven, buffer AL og etanol blandes umiddelbart og grundig ved hjelp av vorteksblending eller pipettering for å gi en homogen løsning. Buffer AL og etanol kan blandes på forhånd og tilsettes sammen i ett trinn for å spare tid ved behandling av flere prøver. Et hvitt bunnfall kan dannes etter tilsetting av buffer AL og etanol. Dette bunnfallet påvirker ikke QIAamp-prosedyren.

16. Sentrifuger røret kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.
17. Overfør forsiktig hele lysatet til QIAamp MinElute®-kolonnen (i et 2 ml prøvetakingsrør) uten at kanten blir våt, lukk lokket og sentrifuger ved ca. $6000 \times g$ i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml prøvetakingsrør (medfølger), og kast prøvetakingsrøret som inneholder gjennomstrømning.
- Hvis lysatet ikke har passert helt gjennom membranet etter sentrifugering, sentrifuger på nytt ved høyere hastighet til QIAamp MinElute-kolonnen er tom.
18. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-kolonnen og tilsett 500 μ l buffer AW1 uten at kanten blir våt. Lukk lokket og sentrifuger ved ca. $6000 \times g$ i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml prøvetakingsrør (medfølger), og kast prøvetakingsrøret som inneholder gjennomstrømning.
19. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-kolonnen og tilsett 500 μ l buffer AW2 uten at kanten blir våt. Lukk lokket og sentrifuger ved ca. $6000 \times g$ i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml prøvetakingsrør (medfølger), og kast prøvetakingsrøret som inneholder gjennomstrømning.
- Det er viktig å unngå kontakt mellom QIAamp MinElute-kolonnen og gjennomstrømningen. Noen sentrifugerotorer kan vibrere etter deselerasjon, slik at gjennomstrømningen, som inneholder etanol, kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen. Vær forsiktig når du fjerner QIAamp MinElute-kolonnen og prøvetakingsrøret fra rotoren, slik at gjennomstrømningen ikke kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen.
20. Sentrifuger ved full hastighet (ca. $20\,000 \times g$) i ≥ 3 minutter for å tørke membranen helt. Dette trinnet er nødvendig, ettersom carryover av etanol i eluatet kan hemme qPCR-reaksjonene som skal utføres.
21. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 1,5 ml mikrosentrifugerør (medfølger), og kast prøvetakingsrøret som inneholder gjennomstrømning. Åpne forsiktig lokket på QIAamp MinElute-kolonnen og påfør 50 μ l buffer ATE i midten av membranen.
22. Lukk lokket og inkuber ved romtemperatur (15–25 °C) i 5 minutter. Sentrifuger ved full hastighet (ca. $20\,000 \times g$) i ≥ 1 minutt.

Kvantitering av DNA

Buffer ATE som brukes til eluering i gDNA-rensesett, inneholder konserveringsmiddelet natriumazid. Natriumazid absorberes ved 260 nm, og det bør derfor utføres en blank måling med buffer ATE for å kalibrere spektrofotometeret.

Konsentrasjonen av DNA bestemmes ved å måle absorbans ved 260 nm i samsvar med instrumentprosedyren ved hjelp av f.eks. QIAGENs QIAxpert (QIAamp plug-in: måling av total nukleinsyre) eller et NanoDrop-instrument*. Absorbansmålinger ved 260 nm skal vise mellom 0,1 og 1,0 for å være nøyaktige. En absorbans på 1 enhet ved 260 nm tilsvarer 50 µg DNA per ml ($A_{260} = 1 = 50 \text{ µg/ml}$). Total mengde rensed DNA (ng) = konsentrasjon av DNA (ng/µl) x prøvevolum (µl)

Merk: Hvis du bruker QIAamp plug-in, vil et internt ATE-blank-spekter automatisk subtraheres fra OD-verdiene, slik at det ikke er nødvendig med en ekstra blank ATE-prøve med denne konfigurasjonen.

Ideelt sett er minste gDNA-konsentrasjon 10 ng/µl[†], men prøver så lave som 5 ng/µl kan analyseres med risiko for ugyldige resultater av typen "Low input" (Lav input).

gDNA-bisulfittkonvertering ved hjelp av EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet

Denne protokollen muliggjør bisulfittkonvertering av DNA-mengder på 200, 400 eller opptil 1000 ng (målt ved hjelp av OD₂₆₀ nm-måling) i et volum på opptil 40 µl. Anbefalt DNA-input per bisulfittkonverteringsreaksjon er 400 ng. Ved lavt DNA-utbytte er det imidlertid mulig å bruke så lave DNA-input som 200 ng, og ved ny testing på grunn av flagget "Low input" (Lav

* Dette er ikke en fullstendig liste over mulige spektrofotometere for OD₂₆₀ nm-måling.

† 10 ng/µl for å få 400 ng gDNA-input (anbefalt input) for bisulfittkonvertering, ettersom maks. gDNA-volum for konvertering er 40 µl.

input) i qPCR-analysen (se "Flagg", side 57), bør det brukes 1000 ng eller så nært opptil denne mengden som mulig.

Merk: gDNA-input viser til gDNA-quantitering med OD 260-måling (dvs. ved hjelp av NanoDrop eller QIAxpert med QIAamp plug-in for måling av total nukleinsyre).

Startmateriale

- Det skal brukes genomisk DNA til bisulfittbehandling uten foregående begrensede forbrenningstrinn.

Viktige punkter før du starter

- Se til at reagensene for bisulfittkonvertering ikke er gått ut på dato, og at de har vært transportert og oppbevart under korrekte forhold. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.
- DNA-beskyttelsesbuffer skal endre farge fra grønn til blå etter tilsetning i DNA-bisulfittløsning-blandingen, noe som angir tilstrekkelig blanding og korrekt pH for bisulfittkonverteringsreaksjonen. Feil pH kan påvirke fikseringen av det konverterte DNA-et på kolonnen.
- Utfør alle sentrifugeringstrinn ved romtemperatur (15–25 °C).
- Bisulfittløsning kan oppbevares ved romtemperatur (15–25 °C) i minst 6 måneder.
- Hvitt bunnfall kan dannes i buffer BD-etanol-blandingen etter en viss oppbevaringstid. Dette bunnfallet påvirker ikke ytelsen til buffer BD. Det er imidlertid viktig å unngå overføring av bunnfall til MinElute DNA-spinnkolonnen.

Ting du skal gjøre før du starter

- Klargjør settreagensene som beskrevet i avsnittet om klargjøring av reagenser i EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook (*Håndboken for EpiTect hurtig bisulfittkonvertering*).
- Stabiliser prøver og buffere til romtemperatur.

- **Valgfritt:** Still inn en termoblander, varmeblokk eller oppvarmet orbital inkubator på 60 °C for å løse opp bisulfittløsningen.

Håndtering av MinElute DNA-spinnkolonner

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreamplifiseringsteknologi er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av MinElute DNA-spinnkolonner for å unngå krysskontaminering mellom prøveklargjøringer:

- Pipetter forsiktig prøven eller løsningen i Min Elute DNA-spinnkolonnen uten at kanten på kolonnen blir våt. Du må ikke berøre membranen på MinElute DNA-spinnkolonnen med pipettespissen.
- Skift alltid pipettespiss mellom væskeoverføringer. Vi anbefaler å bruke pipettespisser med aerosolbarrierer.
- Åpne kun én MinElute DNA-spinnkolonne om gangen, og vær forsiktig så du unngår å generere aerosoler.
- Bruk hansker gjennom hele prosedyren. Bytt hansker straks hvis de kommer i kontakt med prøven.

Sentrifugering

- MinElute DNA-spinnkolonner passer til de fleste standard 1,5–2 ml mikrosentrifugerør. Et sett med 2 ml prøvetakingsrør medfølger for tørkesentrifugeringstrinnet.
- Alle sentrifugeringstrinn skal utføres ved romtemperatur (15–25 °C).
- MinElute DNA-spinnkolonner skal prosesseres i en mikrosentrifuge.
- Du må alltid lukke MinElute DNA-spinnkolonner før du plasserer dem i mikrosentrifugen.
- For effektiv parallell behandling av flere prøver anbefaler vi at du fyller et stativ med prøvetakingsrør som MinElute DNA-kolonnene kan overføres til etter sentrifugering. Prøvetakingsrør kan brukes flere ganger.

Prosedyre

1. Tin DNA som skal brukes i bisulfittkonverteringsreaksjonene. Forsikre deg om at bisulfittløsningen er helt oppløst.

Merk: Varm om nødvendig opp bisulfittløsningen til 60 °C og bland ved hjelp av vorteksblending til alt bunnfall er løst opp.

Merk: Ikke plasser oppløst bisulfittløsning på is.

2. Klargjør bisulfittreaksjonene i 200 µl PCR-rør (medfølger ikke) i samsvar med Tabell 1 på neste side. Tilsett hver komponent i angitt rekkefølge.

Merk: Det kombinerte volumet av DNA og RNase-fritt vann må være totalt 40 µl.

Merk: Bruk følgende formel for å bestemme egnet volum for gDNA-interesseinput:

$$\text{Nødvendig gDNA-volum for en bisulfittkonvertering (}\mu\text{l)} = \frac{\text{Interesseinput (ng)}}{\text{Gjennomsnittlig gDNA-konsentrasjon (ng/}\mu\text{l)}}$$

Merk: Når du bruker *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet, må du alltid bruke protokollen "Low concentration" (Lav konsentrasjon) fra *Håndboken for EpiTect hurtig bisulfittkonvertering*, selv med input på 1000 ng, ettersom konsentrasjonen av rensset gDNA fra FFPE-prøver vanligvis er lav.

Merk: Bisulfittblandingen skal umiddelbart vorteksblendes i 5 sekunder etter tilsetning av DNA-beskyttelsesbuffer for å forhindre degradering av prøvene.

Tabell 1. Bisulfittreksjonens komponenter

Komponent	Volum per reaksjon (µl)
DNA	Variabel* (maks. 40 µl)
RNase-fritt vann	Variabel*
Bisulfittløsning	85
DNA-beskyttelsesbuffer	15
Totalt volum	140

* Det kombinerte volumet av DNA og RNase-fritt vann må være totalt 40 µl.

3. Lukk PCR-rørene og bland umiddelbart bisulfittreaksjonene grundig. Oppbevar rørene ved romtemperatur (15–25 °C).

Merk: DNA-beskyttelsesbuffer skal endre farge fra grønn til blå etter tilsetning i DNA-bisulfittløsning-blandingen, noe som angir tilstrekkelig blanding og korrekt pH for bisulfittkonverteringsreaksjonen, eller DNA-binding til MinElute DNA-spinnkolonnen.

4. Utfør DNA-bisulfittkonverteringen ved hjelp av en termosyklus. Programmer termosyklusen i henhold til Tabell 2 på neste side.

Hele syklusen skal ta ca. 30 minutter.

Merk: Hvis du bruker en termosyklus som ikke gir deg mulighet til å angi reaksjonsvolumet (140 µl), stiller du inn instrumentet på den største voluminnstillingen som er tilgjengelig.

Tabell 2. Betingelser for termosyklusering ved bisulfittkonvertering

Trinn	Klokkeslett	Temperatur
Denaturering	5 min	95 °C
Inkubering	10 min	60°C
Denaturering	5 min	95 °C
Inkubering	10 min	60°C
Hold	Ubestemt*	20°C

* Konvertert DNA kan stå i termosyklere over natten uten tap av ytelse.

5. Plasser PCR-rørene som inneholder bisulfittreaksjonene i termosyklere.

Start inkuberingen i termosyklere.

VIKTIG: Ettersom bisulfittreaksjonen ikke er belagt med mineralolje, er det kun termosyklere med oppvarmet lokk som egner seg for denne prosedyren. Det er viktig å bruke tettlukkende PCR-rør.

Merk: Konvertert DNA kan stå i termosyklere over natten uten tap av ytelse.

Rengjøring av bisulfittkonvertert DNA

6. Når bisulfittkonverteringen er fullført, sentrifuger kort PCR-rørene som inneholder bisulfittreaksjonene, og overfør deretter hele bisulfittreaksjonen til rene 1,5 ml mikrosentrifugerør.

Overføring av bunnfall i løsningen vil ikke påvirke reaksjonens ytelse eller utbytte.

7. Tilsett 310 µl buffer BL i hver prøve. Bland løsningen ved hjelp av vorteksblending, og sentrifuger kort.

8. Tilsett 250 µl etanol (96–100 %) i hver prøve. Bland løsningene ved hjelp av puls-vorteksblending i 15 sekunder, og sentrifuger kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.

9. Plasser det nødvendige antallet MinElute DNA-spinnkolonner og prøvetakingsrør i et egnet stativ. Overfør hele blandingen i hvert rør fra trinn 8 til den tilhørende MinElute DNA-spinnkolonnen.
10. Sentrifuger spinnkolonnene ved maksimal hastighet i 1 minutt. Fjern gjennomstrømningen, og sett spinnkolonnene tilbake i prøvetakingsrørene.
11. Tilsett 500 µl buffer BW (vaskebuffer) i hver spinnkolonne, og sentrifuger ved maksimal hastighet i 1 minutt. Fjern gjennomstrømningen, og sett spinnkolonnene tilbake i prøvetakingsrørene.
12. Tilsett 500 µl buffer BD (desulfoneringsbuffer) i hver spinnkolonne, og inkuber i 15 minutter ved romtemperatur (15–25 °C).
Unngå overføring av eventuelt bunnfall i buffer BD til spinnkolonnene.
VIKTIG: Flasken som inneholder buffer BD skal lukkes umiddelbart etter bruk for å unngå forsurening fra karbondioksid i luften.
Merk: Det er viktig å lukke lokkene på spinnkolonnene før inkubering.
13. Sentrifuger spinnkolonnene ved maksimal hastighet i 1 minutt. Fjern gjennomstrømningen, og sett spinnkolonnene tilbake i prøvetakingsrørene.
14. Tilsett 500 µl buffer BW i hver spinnkolonne, og sentrifuger ved maksimal hastighet i 1 minutt. Fjern gjennomstrømningen, og sett spinnkolonnene tilbake i prøvetakingsrørene.
15. Gjenta trinn 14 én gang.
16. Tilsett 250 µl etanol (96–100 %) i hver spinnkolonne, og sentrifuger ved maksimal hastighet i 1 minutt.
17. Plasser spinnkolonnene i nye 2 ml prøvetakingsrør (medfølger), og sentrifuger spinnkolonnene ved maksimal hastighet i 1 minutt for å fjerne eventuell resterende væske.
18. Plasser spinnkolonnene med åpne lokk i et rent 1,5 ml mikrosentrifugerør (medfølger ikke), og inkuber kolonnene i 5 minutter ved 60 °C i en varmeblokk. Dette trinnet sørger for at eventuell resterende væske fordampes.

19. Tilsett 15 µl buffer EB (elueringsbuffer) i midten av membranen på hver spinnkolonne og lukk lokkene forsiktig.

Merk: Ikke eluer med mindre enn 15 µl buffer, ettersom elueringsvolumet vil være for lite til å kunne gjennomføre qPCR-trinnet.

20. Inkuber spinnkolonnene ved romtemperatur i 1 minutt.

21. Sentrifuger ved 15 000 x g (12 000 o/min) i 1 minutt for å eluere DNA.

Merk: Vi anbefaler at rensset DNA oppbevares ved 2–8 °C i opptil 24 timer. Hvis rensset DNA skal oppbevares i mer enn 24 timer, anbefaler vi oppbevaring ved –30 til –15 °C.

Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet må kjøres på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet* ved bruk av automatisert tolkning av resultater med Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet og programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1 før du starter protokollen. Se brukerhåndbøkene for instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 og Gamma Plug-in for mer informasjon.

Viktig merknad: Hvis det er første gang du bruker programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in og analyseprofilen, se avsnittet "Installasjon av programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in og import av analyseprofil" på side 49 for instruksjoner om installasjon. Hvis programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in og analyseprofilen allerede er installert og importert til datamaskinen din, fortsetter du med instruksjonene nedenfor:

Sette opp qPCR-en

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet inneholder nok produkter til å teste åtte prøver i maksimalt tre kjøringar.

Ting du skal gjøre før du starter

- Avkjøl en lasteblokk for 72 x 0,1 ml rør i 10 minutter i en dypfryser, eller i minst 1 time ved kjøleskapstemperatur.

* Hvis aktuelt, Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter som er produsert i januar 2010 eller senere. Serienummeret på baksiden av instrumentet inneholder produksjonsdatoen. Serienummeret er i formatet "mmåånnn" der "mm" angir produksjonsmåneden i tall, "åå" angir de siste to tallene i produksjonsåret, og "nnn" angir den unike instrument-ID-en.

- Tin alle *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settkomponenter og prøver i et kjøleskap, på is, på en kjøleblokk eller ved romtemperatur så lenge som nødvendig.

Merk: Ved tining i romtemperatur må du regelmessig kontrollere om materialet er tint, særlig PITX2 RGQ PCR MMx, ettersom den inneholder dNTP-er som er følsomme for temperatur.

Merk: PITX2 RGQ PCR PPM skal beskyttes mot sollys ettersom den inneholder fargestoffnukleotider.

- Plasser de tinte produktene på is, på en kjøleblokk eller i et kjøleskap inntil du setter dem tilbake til -30 til -15 °C etter bruk.

Merk: Komponentene i *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet kan oppbevares mørkt ved $2-8$ °C i maks. 6 timer hvis de skal brukes flere ganger i løpet av en dag.

Merk: Komponentene i *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet kan fryses/tines maks. fire ganger.

- Rengjør benkeområdet som er dedikert for klargjøring av PCR-blandingen for å redusere risikoen for templat- eller nukleasekontaminering.
- Vorteksbland rørene (10–12 sekunder) og sentrifuger dem kort før bruk. Dette gjelder ikke PITX2 RGQ PCR MMx, som blandes ved å pipettere opp og ned ettersom den inneholder *Taq*-polymerase.

Prosedyre

1. Klargjør PITX2 qPCR-reaksjonsblanding på is (eller ved bruk av en kjøleblokk) i et 1,5 eller 2 ml rør (medfølger ikke) i henhold til antall prøver som skal behandles. Pipetteringsskjemaet for klargjøring av PITX2-reaksjonsblandingen, som vises i Tabell 3 (neste side), er beregnet for å oppnå et endelig reaksjonsvolum på 20 µl etter tilsetning av 4 µl bisDNA-prøve eller kontroll. Ekstra volum er inkludert for å kompensere for pipetteringsfeil og for å kunne klargjøre nok reaksjonsblanding til fire prøver testet i duplikat, pluss fire kontroller. Hvis færre prøver skal testes, kan reaksjonsblandingen klargjøres deretter. Husk å inkludere ekstra volum for å kompensere for pipetteringsfeil (én ekstra brønn for opptil 10 brønner, og to ekstra brønner for opptil 20 brønner).

Tabell 3. Klargjøring av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-reaksjonsblanding

Komponent	1 reaksjon (µl)	Eksempel for en plate med 12 brønner: 12 + 2 ekstra reaksjoner (µl)*
PITX2 RGQ PCR Master Mix	10	140
PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix	6	84
Totalt volum med qPCR-reaksjonsblanding (µl)	16	224
Distribusjon av qPCR-reaksjonsblanding	16 µl per rør	
Distribusjon av prøver	4 µl per rør	
Totalt volum med qPCR-reaksjon	20 µl	

* Ekstra volum er inkludert for å kompensere for pipetteringsfeil: én ekstra brønn for opptil 10 brønner, og to ekstra brønner for opptil 20 brønner.

- Vorteksbland (10–12 sekunder) og sentrifuger PITX2 qPCR-reaksjonsblandingen kort. Plasser qPCR-rømserørene på en forhåndsavkjølt lasteblokk for 72 rør og pipetter 16 µl PITX2 qPCR-reaksjonsblanding per rør i samsvar med eksempelet på lasteblokkoppsett som vises i Figur 4.

Merk: Det anbefales å pipettere de 16 µl av reaksjonsblandingen ved hjelp av revers pipettering.

1	REF50	9	Sample 3	17	NA	25	NA	33	NA	41	NA	49	NA	57	NA	65	NA
2	REFlow	10	Sample 3	18	NA	26	NA	34	NA	42	NA	50	NA	58	NA	66	NA
3	NC	11	Sample 4	19	NA	27	NA	35	NA	43	NA	51	NA	59	NA	67	NA
4	NTC	12	Sample 4	20	NA	28	NA	36	NA	44	NA	52	NA	60	NA	68	NA
5	Sample 1	13	NA	21	NA	29	NA	37	NA	45	NA	53	NA	61	NA	69	NA
6	Sample 1	14	NA	22	NA	30	NA	38	NA	46	NA	54	NA	62	NA	70	NA
7	Sample 2	15	NA	23	NA	31	NA	39	NA	47	NA	55	NA	63	NA	71	NA
8	Sample 2	16	NA	24	NA	32	NA	40	NA	48	NA	56	NA	64	NA	72	NA

Figur 4. Lasteblokkoppsett for et forsøk med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet, som tester fire prøver. Tallene angir posisjoner i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon. Posisjonene for kontrollene er angitt i PITX2-analyseprofilen og kan ikke endres. Hvis kontroller ikke plasseres som angitt, vil ikke den automatiserte resultatanalysen kunne utføres.

REF50: PITX2 RGQ PCR Reference 50; **REFlow:** PITX2 RGQ PCR Reference Low; **NC:** PITX2 RGQ PCR Negative Control, **NTC:** PITX2 RGQ PCR NTC (NTC); **Prøve 1 til 4:** bisDNA-prøver, **NA:** Tom brønn.

3. Vorteksblend (10–12 sekunder) og sentrifuger kort bisDNA-prøver, PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Ref50), PITX2 RGQ PCR Reference Low (ReFlow), PITX2 RGQ PCR Negative Control (NC) og PITX2 RGQ PCR NTC (NTC).
4. Tilsett 4 µl prøve- eller kontrollmateriale i tilhørende rør i henhold til oppsettet i Figur 4 for å oppnå et totalt volum på 20 µl. Bland forsiktig 5 ganger ved å pipettere opp og ned.
Merk: Vær nøye med å bytte spisser mellom hvert rør for å unngå falskt positive resultater som følge av kontaminering med uspesifikt templat.
5. Lukk alle rørene og kontroller at det ikke er bobler i bunnen av rørene.
6. Sett alle komponentene i *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet og prøvene tilbake til egnede oppbevaringsforhold for å unngå degradering av materiale.

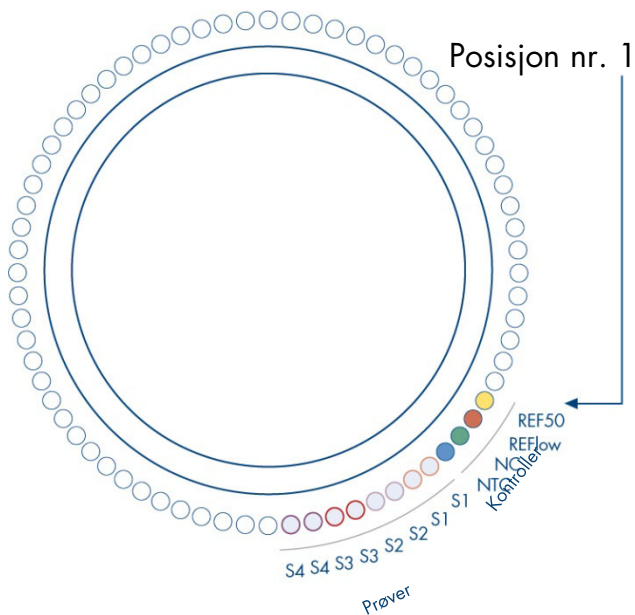
Klargjøring av Rotor-Gene MDx


Det anbefales sterkt å starte kjøringen så snart som mulig etter klargjøring, men hvis platen er klargjort og ikke kan kjøres direkte (fordi instrumentet ikke er tilgjengelig), er det mulig å oppbevare platen mørkt ved 2–8 °C i opptil 24 timer (se "Gjeldende tidsramme" på side 73).

7. Sett en rotor med 72 brønner på Rotor-Gene Q MDx-rotorholderen.
8. Fyll rotoren med remserør som er klargjort i henhold til de tilordnede posisjonene, fra posisjon 1, som vist i figur 5.
9. Sett tomme, lukkede rør i tomme posisjoner for å fylle rotoren helt.

Merk: Forsikre deg om at det første røret er satt inn i posisjon 1, og at remserørene er plassert i riktig retning og posisjon (viktig for kjøringens gyldighet og prøvens sporbarhet), som vist i figur 5.

Merk: Ha alltid de fire kontrollene (REF50, REFlow, NC og NTC) i posisjonene 1 til 4, slik at den optimale forsterkningen (utført på rørposisjon 1) alltid utføres med samme amplifikasjon. Forsikre deg om at kontroller lastes inn i riktig rekkefølge for den automatiserte analysen av kontrollene (ombytting av kontroller vil føre til at PITX2-analyseprofilen ugyldiggjør kjøringen).



Figur 5. Rotoroppsett for et forsøk med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet. REF50: PITX2 RGQ PCR Reference 50; **REFlow:** PITX2 RGQ PCR Reference Low; **NC:** PITX2 RGQ PCR Negative Control, **NTC:** PITX2 RGQ PCR NTC (NTC); **S1 til S4:** bisDNA-prøver. **Merk:** Alle de resterende posisjonene  må fylles med tomme rør.


10. Fest låseringen.

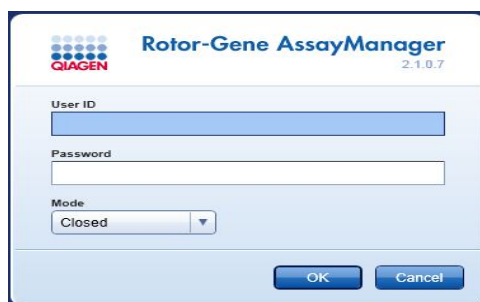
11. Last inn Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med rotor og låsering. Lukk instrumentlokket.

Opprette en arbeidsliste og starte qPCR-kjøringen

Merk: Arbeidslisten kan opprettes og lagres før klargjøring av prøvene, eller når forsøket er satt opp på instrumentet, som beskrevet i denne håndboken.

12. Slå på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.

13. Åpne programvaren Rotor-Gene AssayManager ved å klikke på ikonet:  . Rotor-Gene AssayManager-vinduet åpnes (figur 6).



Figur 6. Skjerm bilde for pålogging i Rotor-Gene AssayManager.

14. Logg inn som bruker med rollen "Operator" (Operatør) i lukket modus. Klikk på "OK".

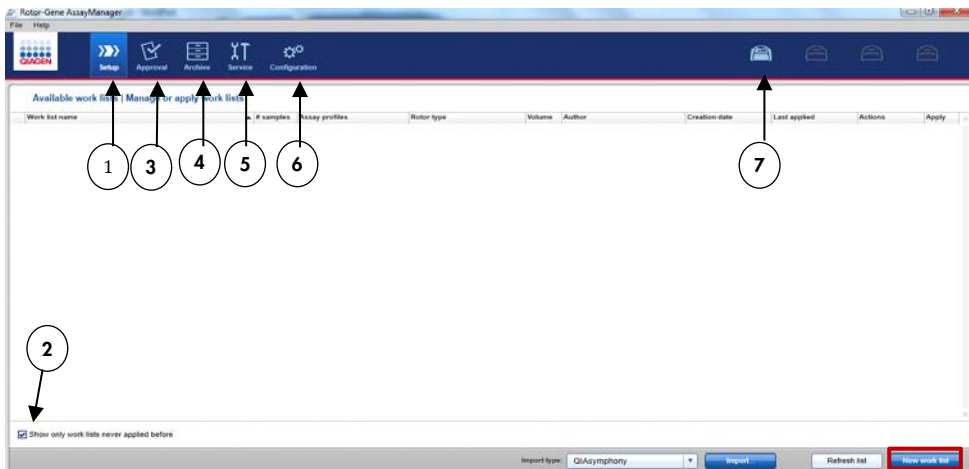
Skjerm bildet for Rotor-Gene AssayManager åpnes (Figur 7 på neste side).

15. Kontroller at RGQ er riktig detektert av programvaren før du starter kjøringen.







16. Velg fanen "Setup" (Oppsett).

Merk: Den generelle funksjonaliteten i "Setup"-miljøet (Oppsett) og i "Creating/Editing a Work List" (Opprette/redigere an arbeidsliste) er beskrevet i brukerhåndboken for *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonen).

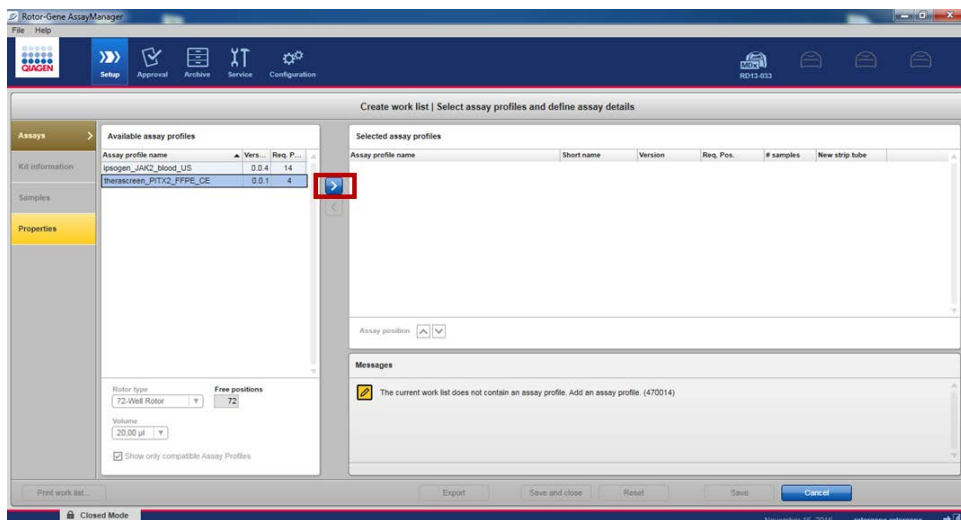
17. Klikk på "New work list" (Ny arbeidsliste) (Figur 7).



Figur 7. Beskrivelse av de ulike fanene i RGAM-programvaren.

- | | | | | | |
|---|--|--|----------------|--|-----------|
| <p>1 Fanen Setup (Oppsett). I denne fanen kan du administrere eller bruke arbeidslister.</p> <p>2 Kontrollere brukte arbeidslister. Viser kun nye arbeidslister. En "brukt arbeidsliste" var allerede utført.</p> <p>3 Fanen Approval (Godkjenning). I denne fanen kan du finne tidligere forsøk.</p> <p>4 Fanen Archive (Arkiv). Brukes til å finne gamle forsøk som allerede er godkjent.</p> | <p>5 Fanen Service. Viser en rapport med revisjonsspor for hver fil som er generert av programvaren.</p> <p>6 Fanen Configuration (Konfigurasjon). Gjør det mulig å konfigurere alle programvareparametere.</p> <p>7 Rotor-Gene Q MDx (RGQ)-ikoner:</p> <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="text-align: center;"></td> <td style="padding: 0 10px;">Ikke tilkoblet</td> <td style="text-align: center;"></td> <td style="padding: 0 10px;">Tilkoblet</td> </tr> </table> |  | Ikke tilkoblet |  | Tilkoblet |
|  | Ikke tilkoblet |  | Tilkoblet | | |

18. Velg PITX2-analyseprofilen fra listen over tilgjengelige analyseprofiler (figur 8).

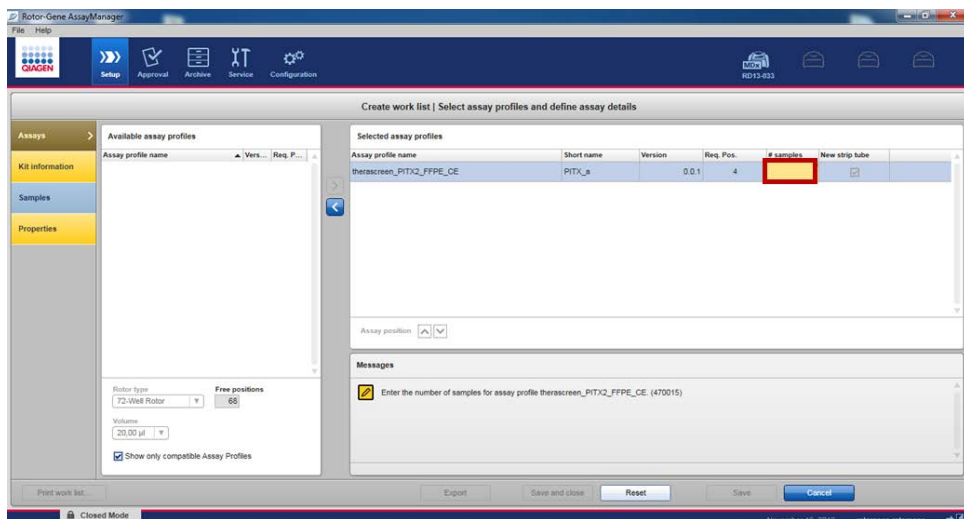


Figur 8. Import av analyseprofil.

19. Overfør den valgte analyseprofilen til listen over valgte analyseprofiler ved å klikke på pilen (til høyre for navnet på analyseprofilen). Analyseprofilen skal nå vises i listen over valgte analyseprofiler (figur 8).

20. I fanen "Assays" (Analyser) fyller du ut de gule feltene: Antall prøver (opptil 8) i henhold til plateoppsettet (Figur 9).

Merk: Antall prøver tilsvarer ikke antall brønner, og inkluderer ikke kontroller. Prøvene testes i duplikat, dvs. at én prøve tilsvarer to brønner. For eksempel, antall prøver som skal legges inn er 4 for platen med i 12 brønner som vises i Figur 4 (side 36).



Figur 9. Legge inn antall prøver.

21. Velg fanen "Kit Information" (Informasjon om settet). Legg inn informasjon om settet enten ved å velge "Use kit bar code" (Bruk strekkode for settet) og skanne strekkoden, eller ved å velge "Enter kit information manually" (Legg inn informasjon om settet manuelt) og manuelt legge inn informasjonen om settet som finnes på etiketten på esken med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet:



Materialnummer



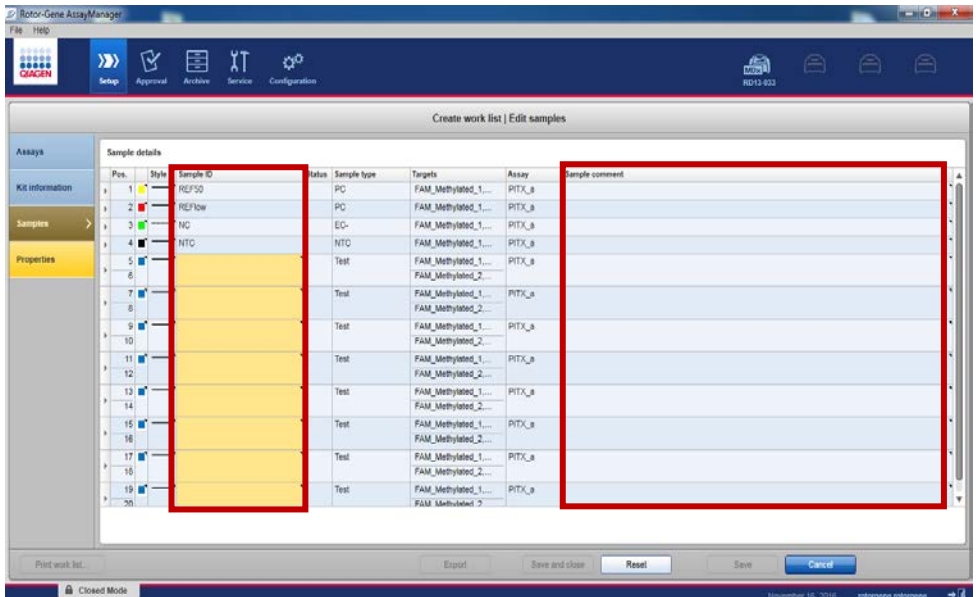
Utløpsdato



Partinummer

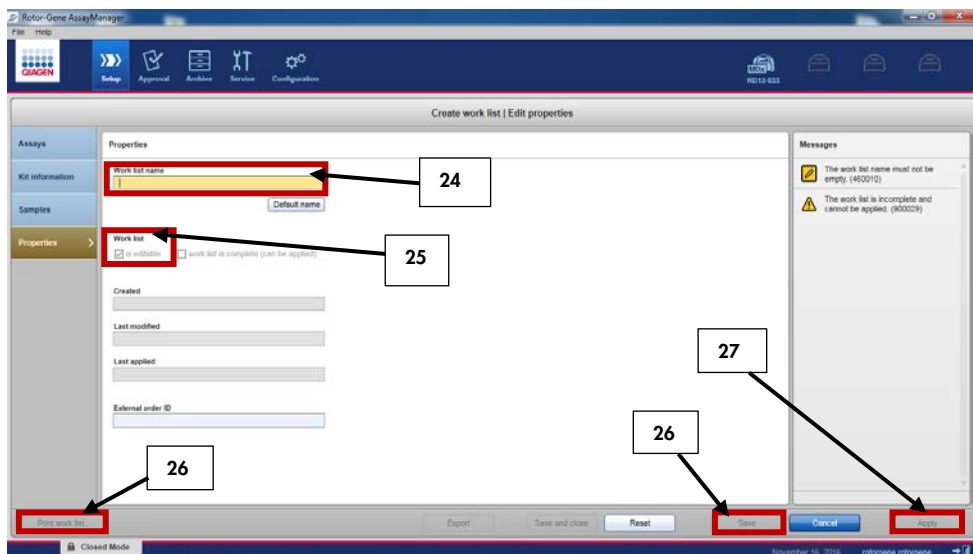
22. Velg fanen "Samples" (Prøver). En liste med detaljer om prøvene vises. Denne listen representerer det forventede oppsettet for rotoren.

23. Legg inn prøve-ID-en og eventuell valgfri prøveinformasjon som en kommentar til hver enkelt prøve (figur 10).



Figur 10. Legge inn prøvedetaljer.

24. Velg "Properties" (Egenskaper) og angi navn på arbeidslisten (figur 11).



Figur 11. Opprettelse av arbeidslisten.

25. Merk av i avmerkingsboksen "worklist is complete (can be applied)" (arbeidsliste er fullført (kan brukes)).

26. Lagre arbeidslisten ved å klikke på "Save" (Lagre).

Valgfritt: Trykk på "Print work list" (Skriv ut arbeidsliste) for å skrive ut arbeidslisten. Utskrift av arbeidslisten kan gjøre det enklere å klargjøre og sette opp kjøringen. Prøvedetaljer er inkludert som en del av arbeidslisten.

27. Velg tilhørende arbeidsliste fra arbeidslistebehandlingen, og klikk på "Apply" (Bruk). Alternativt, hvis arbeidslisten fortsatt er åpen, klikker du på "Apply" (Bruk).

Merk: Kontroller at Rotor-Gene Q MDx er riktig detektert av programvaren før du starter kjøringen.

28. Legg inn forsøkets navn.

29. Velg termosyklere som skal brukes i "Cycler Selection" (Valg av termosyklere).

Merk: Det må brukes en Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-termosyklere.

30. Kontroller at låseringen er festet riktig, og bekreft på skjermen at låseringen er festet.

31. Klikk på "Start run" (Start kjøring). Da skal qPCR-kjøringen starte.

Frigi og rapportere qPCR-resultater

Den generelle funksjonaliteten i "Approval"-miljøet (Godkjenning) er beskrevet i Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual (*Brukerhåndboken for Gamma Plug-in for Rotor-Gene AssayManager v2.1*).

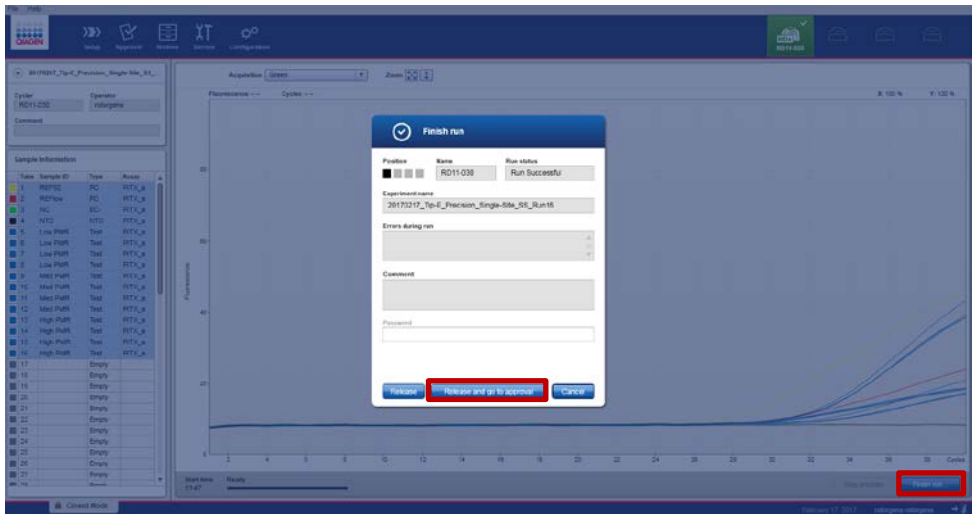
Når en kjøring er fullført og termosyklere er frigitt, lagres forsøket i den interne databasen. Analysen av de innhentede dataene utføres automatisk i henhold til reglene og parameterverdiene som er definert i analyseprofilen.

Merk: Brukerrollen "Approver" (Godkjenner) kreves for å godkjenne en kjøring.

1. Når kjøringen er ferdig, klikker du på "Finish run" (Avslutt kjøring) for å analysere og eksportere data.

Merk: Forsøket lagres ikke i den interne databasen før dette trinnet er fullført.

2. Når du har klikket på "Finish run", legger du inn passordet og klikker på "Release and go to approval" (Frigi og gå videre til godkjenning) (Figur 12).



Figur 12. Avslutte kjøringen.

Brukere som er logget inn med rollen "Approver" (Godkjenner), klikker på "Release and go to approval" (Frigi og gå videre til godkjenning).

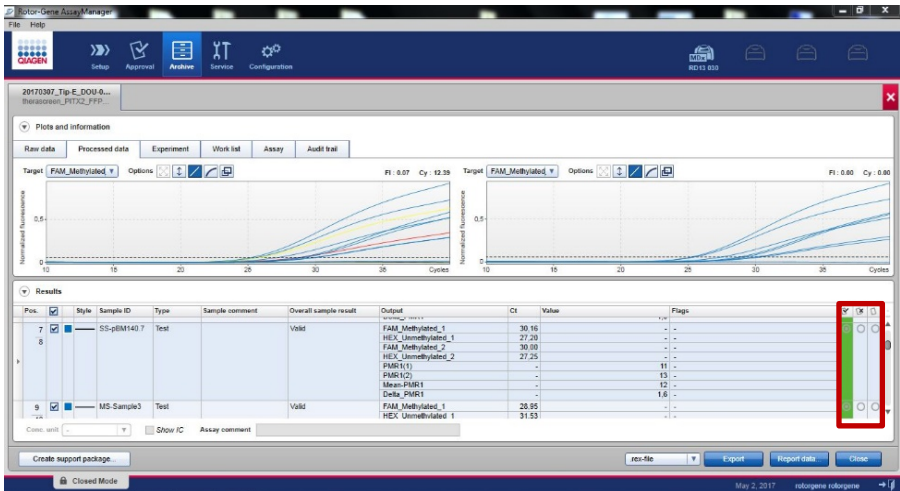
Brukere som er logget inn med rollen "Operator" (Operatør), klikker på "Release" (Frigi).

Hvis du klikket på "Release and go to approval", vises resultatene fra forsøket i "Approval"-miljøet (Godkjenning).

Hvis en bruker med rollen "Operator" klikket på "Release", må noen med "Approver"-rollen logge seg inn og velge "Approval"-miljøet.

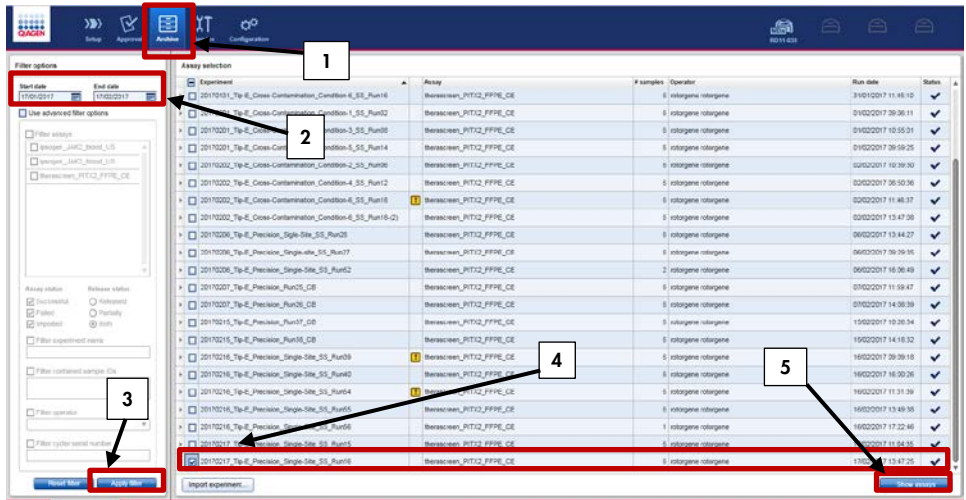
Merk: I fanen "Approval" (Godkjenning) kan forsøk analyseres ved å veksle mellom hver fane (dvs. forsøk, analyse, revisjonsspor, resultater fra kjøring av kontroll).

3. Kontroller amplifikasjonskurvene for hver prøve, og merk av i den første boksen til høyre for kolonnen "Flags" (Flagg) (boksen blir grønn) (figur 13).



Figur 13. Kontroll av amplifikasjonskurver.

4. Klikk på "Release/report data" (Frigi/rapporter data) (nederst til høyre i vinduet) for å opprette en .pdf-rapport og lagre LIMS-filen (en kopi lagres automatisk i C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports).
5. Lukk .pdf-filen og gå tilbake til Rotor-Gene AssayManager. Klikk på "OK" hver gang du blir spurt.
6. Gå til fanen "Archive" (Arkiv) for å eksportere .rex-filen. Kontroller at "Start date" (Startdato) og "End date" (Sluttdato) er riktige, og klikk på "Apply filter" (Bruk filter). Velg forsøket som skal eksporteres, og klikk på "Show assays" (Vis analyser) (figur 14).



Figur 14. Eksport av data fra kjøring.

7. Eksporter .rex-filen (filen lagres i C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments).

Merk: Programvaren genererer automatisk en LIMS-fil i C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS

8. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og kast remserørene henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Merk: Det kreves en støttepakke fra kjøringen for å få hjelp med feilsøking av QIAGEN Technical Support. Støttepakker kan genereres fra miljøene "Approval" (Godkjenning) eller "Archive" (Arkiv). For mer informasjon, se "Creating a support package" (Opprette en støttepakke) i Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual (*Brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonen*).

I tillegg til støttepakken vil et revisjonsspor fra ± 1 dag fra tidspunktet for hendelsen kunne være nyttig. Revisjonssporet kan hentes fra "Service"-miljøet. For mer informasjon, se Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual (*Brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonene*).

Installasjon av programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in og import av analyseprofil


Programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1 må være installert på datamaskinen som er koblet til Rotor-Gene Q MDx. Programvaren kan lastes ned fra "Operating Software" (Operativprogramvare) under fanen "Product Resources" (Produktressurser) på produktsiden for Rotor-Gene AssayManager v2.1: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

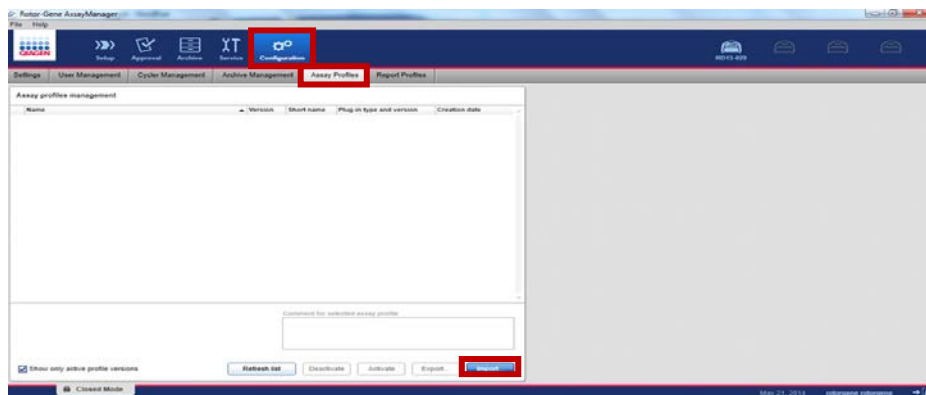
For detaljert informasjon om installasjon av Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneprogramvaren, se *Brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonen*. For detaljert informasjon om annen programvare på tilkoblede datamaskiner, se Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide (*Hurtigveiledningen for Rotor-Gene AssayManager v2.1*).

For automatisk tolkning av resultater med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet med Rotor-Gene AssayManager v2.1, må den nyeste versjonen av Gamma Plug-in være installert på din Rotor-Gene AssayManager v2.1. Se "Product Resources" (Produktressurser) på produktsiden for Rotor-Gene AssayManager v2.1: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx for å få tilgang til den nyeste plug-in-versjonen.

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet krever også en analyseprofil. Analyseprofilen inneholder alle nødvendige parametere for syklings og analysering av PITX2-analysen. Disse parametrene er låst for kjøringen. PITX2-analyseprofilen (AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE) er lagret i en ".iap"-fil som kan lastes ned fra produktsiden for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet: www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/ på fanen "Product Resources" (Produktressurser) under "Protocol Files" (Protokollfiler). Analyseprofilen må importeres til programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Fremgangsmåten ved installasjon av Gamma Plug-in og import av analyseprofilen til programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1 er som følger:

1. Last ned Gamma Plug-in fra **www.qiagen.com**.
2. Start installasjonsprosessen ved å dobbeltklikke på GammaPlugin.Installation.msi-filen, og følg installasjonsinstruksjonene. For en detaljert beskrivelse av denne prosessen, se avsnittet "Installing plug-ins" (Installere plug-in-er) i *Brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v2.1-kjerneapplikasjonen*.
3. Når plug-in-en er installert, må en person med administratorrettigheter for programvaren Rotor-Gene AssayManager importere den nødvendige analyseprofilen som følger:
4. Gå til Windows Explorer og lagre analyseprofilen (AP) i følgende mappe:
"C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\
Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles".
5. Åpne programvaren Rotor-Gene AssayManager ved å klikke på  ikonet.
6. Logg inn på Rotor-Gene AssayManager med bruker-ID og passord. Ikke endre "Closed mode" (Lukket modus). Klikk på "OK". Skjermbildet for Rotor-Gene AssayManager åpnes.
7. Velg miljøet Configuration (Konfigurasjon) (Figur 15).



Figur 15. Fanen Configuration (Konfigurasjon).

-
8. Velg fanen "Assay Profiles" (Analyseprofiler).
 9. Klikk på "Import" (Importer).
 10. Velg analyseprofilen AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE_V1.0.x.iap (hvor x = 1 eller høyere) som skal importeres i dialogboksen, og klikk på "Open" (Åpne).
 11. Når analyseprofilen er importert, kan den brukes i "Setup"-miljøet (Oppsett).

Tolkning av resultater

Dataanalyse

Analysen av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settets resultater for hver enkelt kontroll og prøve utføres automatisk av Rotor-Gene AssayManager v2.1 sammen med Gamma Plug-in v1.0 og PITX2-analyseprofilen, heretter kalt PITX2-analysepakken.

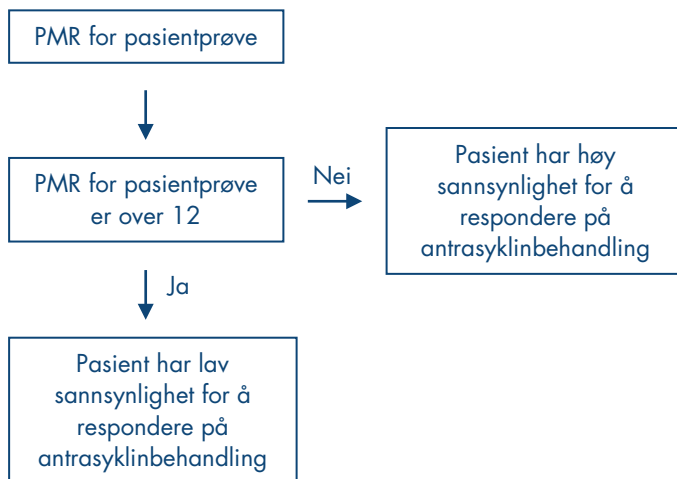
PITX2-analysepakken analyserer amplifikasjonskurver, og kan ugyldiggjøre feilaktige kurver, avhengig av form og støyamplitude. Hvis dette er tilfellet, vil et flagg bli knyttet til den ugyldige kurven. Varselflagg kan også vises for ikke-ugyldiggjørende kurveuregelmessigheter (se liste over flagg og detaljer i avsnittet "Flagg" på side 57).

For å bestemme analysegyldighet analyserer PITX2-analysepakken også kjøringens kontroller, dvs. PITX2 RGQ PCR Reference 50 (REF50), PITX2 RGQ PCR Reference Low (REFlow), PITX2 RGQ PCR Negative Control (NC) og PITX2 RGQ PCR NTC (NTC). Gyldigheten for hver kontroll er basert på samsvar mellom C_T og/eller PMR-verdier og forhåndsdefinerte spesifikasjoner (se "Generelle prøveresultater", side 55, og "Flagg", side 57).

Merk: Hvis minst én kontroll er ugyldig, blir resultatene for alle testprøvene vurdert som ugyldige, og ingen PMR-resultater vises.

PITX2-analysepakken analyserer også prøvene ved å kontrollere gyldigheten av duplikater og gyldigheten av input (se "Generelle prøveresultater", side 55, og "Flagg", side 57). I tillegg blir en PMR-verdi uten desimaltall tilordnet prøvene ved å beregne gjennomsnittet av de to PMR-resultatene som er oppnådd for hvert prøvereplikat. Oppnådd PMR for hver pasientprøve gir informasjon til behandlende lege om hvorvidt det er sannsynlig at en pasient vil respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi. Hvis oppnådd PMR er lik eller lavere enn 12, er det sannsynlig at pasienten vil respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi. Hvis derimot

oppnådd PMR er høyere enn 12, kan man foreslå en alternativ behandling, ettersom pasienten har en lavere sannsynlighet for å respondere på antrasyklinbasert kjemoterapi (figur 16).



Figur 16. Tolkning av PMR-resultater fra pasientprøver for *theascreen* PITX2 RGQ PCR-settet.

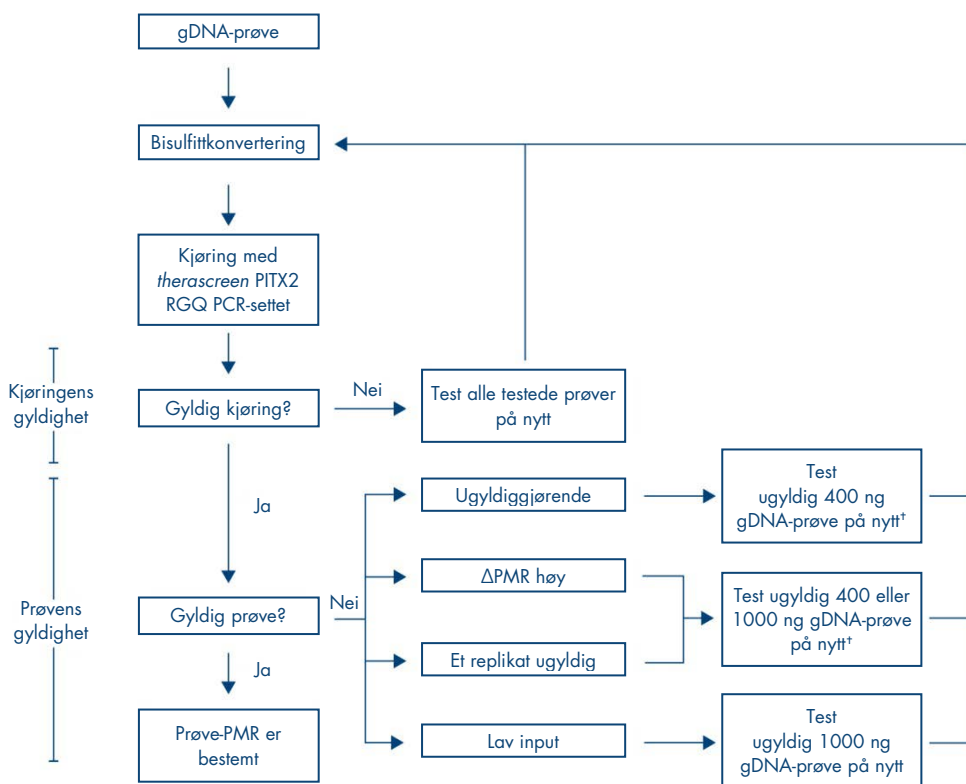
Resultatene av testprøvene som er automatisk analysert og bestemt av PITX2-analysepakken, må godkjennes og frigis av en bruker som er logget inn med rollen "Approver" (Godkjenner). Resultatene av prøvene som skal godkjennes, har tre ekstra godkjenningsknapper i enden av den dedikerte raden. Disse knappene brukes til interaktivt å godkjenne eller avvise resultatene av prøvene. For mer informasjon, se *Brukerhåndboken for Gamma Plug-in for Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Merknad om arbeidsflytkontroll: Prøven HD216 (arbeidsflytkontroll) skal ha en PMR-verdi på mellom 30 og 50. Hvis en slik PMR-verdi oppnås med denne arbeidsflytkontrollen, kan både gDNA-rensetrinnet og bisulfittkonverteringstrinnet godkjennes.

Ved ugyldige resultater, se "Feilsøkningsveiledning", side 62.

Nye tester

Ved ugyldige resultater, må prøvene testes på nytt. Hvis analysen er ugyldig, dvs. hvis én av de fire kontrollene er ugyldig, må hele kjøringen, inkludert alle testede prøver, testes på nytt. Hvis analysen er gyldig, men én eller flere prøver er ugyldige, må den eller de ugyldige prøvene testes på nytt etter å ha undersøkt typen feil (se "Flagg", side 57, Tabell 6 og Tabell 7, side 58–59). En arbeidsflyt for gjennomføring av nye tester vises i figur 17.



Figur 17. Arbeidsflyt for nye tester for theascreen PITX2 RGQ PCR-settet.

* Se Tabell 6 og Tabell 7, side 58–59.

† En input på 200 ng kan brukes hvis det ikke er nok gDNA tilgjengelig, men risikoen for ugyldig resultat flagget med "low input" (lav input) er høyere.

Resultatvisning

Mål og kombinerte mål

Resultatene for hver reaksjon i *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet vises under følgende navn på mål og kombinerte mål:

- "FAM_Methylated_1": Resultater fra grønn kanal for alle kontroller og for replikat 1 av testprøver.
- "FAM_Methylated_2": Resultater fra grønn kanal for replikat 2 av testprøver.
- "HEX_Unmethylated_1": Resultater fra gul kanal for alle kontroller og for replikat 1 av testprøver.
- "HEX_Unmethylated_2": Resultater fra gul kanal for replikat 2 av testprøver.
- "PMR": Disse målene er kombinerte mål, og tilhørende resultat tar i betraktning gyldigheten av kontroller. Disse målene vises for alle kontroller og testprøver hvis de er gyldige.
- "Mean_PMR": Disse målene er kombinerte mål, og tilhørende resultat tar i betraktning gyldigheten av kontroller. Disse målene vises for alle testprøver hvis de er gyldige.

Generelle prøveresultater

Konklusjonen av analysen for hver kontroll og prøve vises i kolonnen "Overall Sample Result" (Generelt prøveresultat) i rapporten (Tabell 4).

Tabell 4. Generelle prøveresultater og tiltak

Generelt prøveresultat	Prøvetype	Beskrivelse	Tiltak
Gyldig	REF50, REFlow, NC, NTC og testprøve*	Kontroll eller testprøve er gyldig	I/R
Ugyldig†	REF50, REFlow, NC, NTC og testprøve	Kontroll er ugyldig	Gjenta hele kjøringen
Ugyldig	Testprøve	Testprøve er ugyldig	Sett opp ny kjøring for å gjenta ugyldig(e) prøve(r)
Ugyldig, et replikat ugyldig	Testprøve	Hvis ett av målene (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 eller HEX_Unmethylated_2) er ugyldig, blir prøven vurdert som ugyldig	Sett opp ny kjøring for å gjenta ugyldig(e) prøve(r)
Ugyldig, delta-PMR høy‡	Testprøve	Hvis delta-PMR-verdien mellom første replikat og andre replikat er over en spesifikk verdi§, blir prøven vurdert som ugyldig	Sett opp ny kjøring for å gjenta ugyldig(e) prøve(r)

* Tolkning av gyldig PMR-resultat for testprøven er forklart tidligere (se figur 1 6).

† Når kontroller er ugyldige, vises de ugyldige C_T-verdiene og PMR-resultatene i hakeparenteser til informasjon.

‡ Når en prøve er ugyldiggjørende på grunn av en høy delta-PMR, vises C_T-verdiene og PMR-resultatene for begge replikatene samt gjennomsnittlig PMR til informasjon. Prøven må imidlertid testes på nytt for å få et gyldig resultat.

§ Spesifikk verdi varierer i henhold til PMR-verdien som oppnås for hver prøve (se Tabell 5, neste side).

Tabell 5. Kriterier for delta-PMR

Gj.sn. PMR	Delta-PMR-duplikater
0–1	≤1
1–5	≤5
5–10	≤7
10–15	≤9
15–35	≤13
35–65	≤15
65–85	≤18
85–100	≤6

Flagg

Flagg vises for å gi tilleggsinformasjon om oppnådde resultater, spesielt for ugyldige resultater. Uproblematiske uregelmessigheter kan bli flagget med et varselflagg som ikke fører til et ugyldig resultat. For informasjon om universelle flagg som er inkludert i Gamma Plug-in, se også *Brukerhåndboken for Gamma Plug-in for Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Den automatiserte analysen med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet kan generere både analysespesifikke flagg (Tabell 6, neste side) og generelle flagg (Tabell 7, side 59).

Tabell 6. Analyse-spesifikke flagg

Analysespesifikt flagg	Prøvetype	Beskrivelse	Tiltak
Analysespesifikke flagg for kontroller			
BELOW_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	PMR-resultatet er under akseptert område (<36 for REF50, <2 for REFlow).	Gjenta hele kjøringen
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFlow	PMR-resultatet er over akseptert område (>65 for REF50, >13 for REFlow).	Gjenta hele kjøringen
NO_SIGNAL	REF50	C _T -verdien for målet "FAM_Methylated_1" og/eller "HEX_Unmethylated_1" er >32	Gjenta hele kjøringen
NO_SIGNAL	REFlow	C _T -verdien for målet "HEX_Unmethylated_1" er >32	Gjenta hele kjøringen
Analysespesifikke flagg for testprøver			
PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92*	Testprøve	PMR-resultatet er over deteksjonsgrensen (LoD) som er bestemt for proben som er rettet mot tidligere umetylerte sekvenser. Dette flagget er ikke ugyldiggjørende, men et varselflagg.	Ingen
PMR_BELOW_OR_EQUAL_4*	Testprøve	PMR-resultatet er under deteksjonsgrensen (LoD) som er bestemt for proben som er rettet mot tidligere metylerte sekvenser. Dette flagget er ikke ugyldiggjørende, men et varselflagg.	Ingen
LOW_INPUT_RETEST_NEEDED	Testprøve	C _T -verdien for målet "FAM_Methylated_1" og "HEX_Unmethylated_1" eller "FAM_Methylated_2" og "HEX_Unmethylated_2" er >32,5	Øk gDNA-input i bisulfittkonvertering en og gjenta kjøringen

* Eftersom PMR-resultater gis uten desimaltall, mens programvaren beregner PMR med desimaltall, kan flagget for deteksjonsgrense være til stede eller ikke for verdier ved PMR-grensen, dvs. 4 og 92. Flagg er altså til stede fra PMR-resultater >92 og <4. Det betyr for eksempel at et PMR-resultat på 4,1 eller 91,8 som er avrundet til henholdsvis 4 og 92, ikke vil bli flagget som henholdsvis under eller over deteksjonsgrensen.

Merk: Alle flagg ovenfor er ugyldiggjørende, bortsett fra de to som er knyttet til deteksjonsgrensen. Når replikater er ugyldige, vises C_T-verdiene i hakeparenteser til informasjon, men det ugyldige PMR-resultatet vises ikke. Heller ikke gjennomsnittlig PMR for de to replikatene vises.

Tabell 7. Generelle flagg

Generelt flagg	Atferd	Beskrivelse	Tiltak
CONSECUTIVE_FAULT	Ugyldig	Et mål som er brukt til beregning av dette målet er ugyldig.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen skyldes ugyldighet i en kontroll.
ASSAY_INVALID	Ugyldig	Analysen er ugyldig fordi minst én kontroll er ugyldig.	Gjenta hele kjøringen
ANALYSIS_FAILED	Ugyldig	Analysen er satt til ugyldig fordi analysen har feilet av ulike årsaker.	Kontakt QIAGENs tekniske tjenester
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Ugyldig	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
FLAT_BUMP	Ugyldig	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som en flat hump som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater (f.eks. feil bestemmelse av C_T -verdi).	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
INVALID_CALCULATION	Ugyldig	Beregning for dette målet mislyktes.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Advarsel	Den prosentvise fluorescensendringen for denne prøven i forhold til prøverøret med den største fluorescensendringen er lavere enn en definert grense.	Ingen
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Advarsel	Reaksjonseffektiviteten for denne prøven har ikke nådd en definert grense.	Ingen
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Ugyldig	Amplifikasjonskurven krysser terskelen mer enn én gang. En utvetydig C_T kan ikke bestemmes.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
NO_BASELINE	Ugyldig	Ingen innledende baseline er funnet. Den etterfølgende analysen kan ikke utføres.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
RUN_FAILED	Ugyldig	Analysen er satt til ugyldig på grunn av et problem med termosykleren eller termosyklarforbindelsen.	Gjenta hele kjøringen
RUN_STOPPED	Ugyldig	Analysen er satt til ugyldig fordi kjøringen er stoppet manuelt.	Gjenta hele kjøringen

SATURATION	Ugyldig	Rådatafluorescensen mettes i stor grad før amplifikasjonskurvens infleksjonspunkt.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
SATURATION_IN_PLATEAU	Advarsel	Rådatafluorescensen mettes i amplifikasjonskurvens platåfase.	Ingen
SPIKE	Advarsel	Et utslag er detektert i rådatafluorescensen i amplifikasjonskurven, men utenfor området hvor C_T bestemmes.	Ingen
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Ugyldig	Et utslag er detektert i amplifikasjonskurven i nærheten av C_T .	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
STEEP_BASELINE	Ugyldig	En bratt stigende baseline for rådatafluorescens er detektert i amplifikasjonskurven.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
STRONG_BASELINE_DIP	Ugyldig	Et stort fall i baseline for rådatafluorescens er detektert i amplifikasjonskurven.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
STRONG_NOISE	Ugyldig	Sterk støy er detektert utenfor vekstfasen i amplifikasjonskurven.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Ugyldig	Sterk støy er detektert i vekstfasen (eksponentiell fase) i amplifikasjonskurven.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Ugyldig	En bølgeformet baseline for rådatafluorescens er detektert i amplifikasjonskurven.	Gjenta prøven eller kjøringen hvis feilen er observert i en kontroll.

Merk: For prøvereplikater som har et ugyldiggjørende flagg, vises C_T -verdiene i hakeparenteser til informasjon, men det ugyldige PMR-resultatet vises ikke. Heller ikke gjennomsnittlig PMR for de to replikatene vises.

Feilsøkingsveiledning

Denne veiledningen for feilsøking kan være nyttig for å løse eventuelle problemer som oppstår ved bestemmelse av PMR for PITX2-promotor 2 ved bruk av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og/eller protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, besøk www.qiagen.com).

For informasjon om feilsøking knyttet til deparafineringsløsningen (kat. nr. 19093), QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet (kat.nr. 60404) og EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet (kat.nr. 59824 eller 59826), se håndbøkene for de respektive settene.

For informasjon om feilsøking knyttet til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet og programvaren Rotor-Gene AssayManager v2.1, se de respektive brukerhåndbøkene.

Kommentarer og forslag

Lavt utbytte av gDNA

Den rensede gDNA-mengden er under 400 ng som er anbefalt for å utføre arbeidsflyten for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet

En input på 200 ng kan brukes, men risikoen for et ugyldig resultat flagget med "low input" (lav input) er høyere.

Analyse er ugyldig fordi REFlow og/eller REF50 er ugyldig(e)

- | | |
|---|---|
| a) En komponent i reaksjonsblandingen er ikke tilsatt | Kontroller at reaksjonsblandingen er klargjort riktig (Tabell 3, side 36).
Kontroller at alle komponenter i qPCR-reaksjonsblandingen er tilsatt. Gjenta PCR-kjøringen. |
| b) Feil med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet | Kontroller instrumentets vedlikeholdslogger.
Skjevt innstilt linse kan for eksempel føre til høyere bakgrunn. Hvis innretting av linsen ikke er en del av din vedlikeholdsplan, kontakt QIAGENs tekniske service for mer informasjon og eventuelle tiltak. |
| b) Feil med Rotor-Gene Q MDx-instrumentets tilbehør | Rotoren med 72 brønner kan være låst på feil måte. Gjenta PCR-kjøringen. |

Kommentarer og forslag

- | | |
|---|--|
| d) Reaksjonsblandingen er degradert | Settet er blitt frosset/tint mer enn fire ganger, eller komponentene i settet har ikke vært oppbevart ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, eller PPM eller reaksjonsblanding har ikke vært beskyttet mot lys.
Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk et nytt sett. Gjenta PCR-kjøringen. |
| e) Ombytting av remserør og/eller prøve-ID | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
| f) Kontroller mangler eller er lastet inn i feil posisjon | Kontroller at riktig kontroll er lastet inn i riktig posisjon. |
| g) Dårlig blanding av kontrollprøver | Kontrollene var ikke helt tint før innlasting, eller blanding av kontroller med reaksjonsblandingen (pipettering opp og ned) ble ikke utført riktig. Gjenta PCR-kjøringen. |
| h) Feil pipetteringsvolum | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Kontroller at det er tilsatt et volum på $4\text{ }\mu\text{l}$ kontroll og $16\text{ }\mu\text{l}$ qPCR-reaksjonsblanding. Utfør en visuell inspeksjon av alle pipetterte volumer.
Kontroller pipettene og kalibrer dem om nødvendig på nytt før du gjentar qPCR-trinnet. |
| i) Rør ikke ordentlig lukket | Røret ble ikke lukket ordentlig, noe som førte til fordamping under qPCR-kjøringen. |

Analyse ugyldig fordi ikke-templat-kontroll (NTC) eller negativ kontroll (NC) er ugyldig(e)

- | | |
|---|--|
| a) Krysskontaminering eller kontaminering av reagensene | Sørg alltid for at prøver, settkomponenter og forbruksartikler håndteres i samsvar med anbefalt praksis for å forhindre kontamineringsoverføring.
Sørg for at spissene skiftes ut mellom pipettering av forskjellige reagenser eller ved innlasting av andre rør. Klargjør qPCR-reaksjonsblandingen med dedikert materiale (pipetter, spisser osv.).
Klargjør qPCR-reaksjonsblandingen og NTC-reaksjonen i et dedikert område hvor ingen DNA-matriser (DNA, plasmid- eller PCR-produkter) blir innført.
Gjenta PCR-kjøringen. |
| b) En komponent i reaksjonsblandingen er ikke tilsatt | Kontroller at reaksjonsblandingen er klargjort riktig (Tabell 3, side 36).
Kontroller at alle komponenter i qPCR-reaksjonsblandingen er tilsatt. Gjenta PCR-kjøringen. |
| c) Ombytting av remserør og/eller prøve-ID | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta qPCR-kjøringen. |
| d) Reaksjonsblanding eller prober er degradert | Oppbevar settets innhold ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, og beskytt PPM-røret mot lys.
Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk et nytt sett. Gjenta PCR-kjøringen. |

Kommentarer og forslag

-
- | | |
|--|---|
| e) Feil amplifikasjonskurve (artefakter) | Kontroller gjeldende amplifikasjon, og se etter uvanlige kurver (f.eks. rett linje). Gjenta qPCR-kjøringen. |
|--|---|

Ugyldig prøve på grunn av flagget "low input"

- | | |
|---|--|
| a) FFPE-blokkens omgivelsesforhold | Kontroller transport-/oppbevaringsforhold for FFPE-blokken som er brukt. |
| b) Klargjøring av FFPE-blokk | Kontroller at prøven ble fiksert i 4–10 % formalin. Kontroller at det ble skåret ett eller to snitt med en tykkelse på 5 µm for å oppnå en vevsoverflate på 100 mm ² som sikrer nok celler. |
| c) Pipetteringsvolumet kan være feil | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Kontroller at det er tilsatt et volum på 4 µl prøve og 1 ó µl qPCR-reaksjonsblanding. Utfør en visuell inspeksjon av alle pipetterte volumer.

Kontroller pipettene og kalibrer dem om nødvendig på nytt før du gjentar qPCR-trinnet. |
| d) gDNA-rensing eller bisulfittkonvertering mislyktes | Kontroller om arbeidsflytkontrollen ga forventede resultater. Kontroller at arbeidsflytprotokollen for <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR-settet ble fulgt, som beskrevet ovenfor. Kontroller at sett ikke er utløpt, at reagenser er klargjort riktig (f.eks. etanol tilsatt, ikke overføring av bunnfall til MinElute DNA-spinnkolonnen). Kontroller at romtemperatur ikke er under 15 °C under håndtering for å unngå krystallisering av buffere. Kontroller transport- og oppbevaringsforhold.

Gjenta hele arbeidsflyten. |
| e) Ombytting av rømsør og/eller prøve-ID | Kontroller pipetteringsskjemaet eller om et tomt rør er i riktig posisjon, og kontroller reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
| f) Dårlig kvalitet på gDNA-prøve | Gjenta med mer materiale. Det kan brukes opptil 1000 ng DNA-input målt med en OD 260 nm-metode. |
| g) Rør ikke ordentlig lukket | Røret ble ikke lukket ordentlig, noe som førte til fordamping under qPCR-kjøringen. |
| h) Prøve ikke lastet inn | Kontroller at prøven ble lastet inn i begge brønner. |

Kommentarer og forslag

Ugyldig prøve på grunn av "delta PMR high" (delta-PMR høy)

- | | |
|--|--|
| a) Reaksjonsblandingen er degradert | Oppbevar settets innhold ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ og beskytt reaksjonsblandingen mot lys.
Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til reagensene, og bruk et nytt sett. Gjenta PCR-kjøringen. |
| b) Pipetteringsvolumet kan være feil | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Kontroller at det er tilsatt et volum på $4\text{ }\mu\text{l}$ kontroll/prøve og et volum på $16\text{ }\mu\text{l}$ qPCR-reaksjonsblanding. Utfør en visuell inspeksjon av alle pipetterte volumer.
Kontroller pipettene og kalibrer dem om nødvendig på nytt før du gjentar qPCR-trinnet. |
| c) Ombytting av remserør og/eller prøve-ID | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
| d) Amplifikasjonskurven kan være feil | Kontroller gjeldende amplifikasjonsplott, og se etter uvanlige kurver.
Gjenta den ugyldige prøven. |
| e) Forsinket signal på grunn av lav mengde som fører til mer variable PMR-resultater | Gjenta med mer materiale. Det kan brukes opptil 1000 ng DNA-input målt med en OD 260 nm-metode. |
| f) Dårlig blanding av kontrollprøver | Kontrollen var ikke helt tint før innlasting, eller blanding av kontroll med reaksjonsblandingen (pipettering opp og ned) ble ikke utført riktig. Gjenta PCR-kjøringen. |
| g) Rør ikke ordentlig lukket | Røret ble ikke lukket ordentlig, noe som førte til fordamping under qPCR-kjøringen. |

Ugyldig prøve på grunn av "one replicate invalid" (et replikat ugyldig)

- | | |
|--|--|
| a) Ikke nok materiale (nær grensen) | Gjenta med mer materiale. Det kan brukes opptil 1000 ng DNA-input målt med en OD 260 nm-metode. |
| b) Pipetteringsvolumet kan være feil | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Kontroller at det er tilsatt et volum på $4\text{ }\mu\text{l}$ kontroll/prøve og et volum på $16\text{ }\mu\text{l}$ qPCR-reaksjonsblanding. Utfør en visuell inspeksjon av alle pipetterte volumer.
Kontroller pipettene og kalibrer dem om nødvendig på nytt før du gjentar qPCR-trinnet. |
| c) Ombytting av remserør og/eller prøve-ID | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
| d) Amplifikasjonskurven kan være feil | Kontroller gjeldende amplifikasjonsplott, og se etter uvanlige kurver.
Gjenta PCR-kjøringen. |

Kommentarer og forslag

- | | |
|--|---|
| e) Dårlig blanding av kontrollprøver | Kontrollen var ikke helt tint før innlasting, eller blanding av kontroll med reaksjonsblandingen (pipettering opp og ned) ble ikke utført riktig. Gjenta PCR-kjøringen. |
| f) Rør ikke ordentlig lukket | Røret ble ikke lukket ordentlig, noe som førte til fordamping under qPCR kjøringen. |
| g) Én av de to prøvebrønnene ble ikke lastet inn | Kontroller at prøven ble lastet inn i begge brønner. |

Feil med kjøring på grunn av inkonsistent fluorescenssignal i kontroller og/eller prøver (i alle rør)

- | | |
|--|--|
| Feil med Rotor-Gene Q MDx-instrumentets tilbehør | Kontroller instrumentets vedlikeholdslogger.
Det kan være en feil med rotoren med 72 brønner. |
|--|--|

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hver lot med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Kvalitetskontroll for hele settet ble utført på et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Dette settet er produsert i henhold til ISO 13485-standarden. Analysesertifikater er tilgjengelige på forespørsel på www.qiagen.com/support.

Begrensninger

Settet er beregnet for profesjonell bruk. Systemytelsen er etablert utelukkende ved bruk av formalinfiksert, parafininnstøpt brystkreftvev (FFPE-vev).

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet er kun validert for FFPE-vev fra østrogenreseptor-positive, HER2-negative, lymfeknute-positive brystkreftpasienter i høyrisikogruppen.

Produktet skal kun brukes av kvalifiserte brukere, f.eks. teknikere og leger, som har fått opplæring i molekylærbiologiske teknikker og in vitro-diagnostiske prosedyrer.

Dette settet skal brukes i henhold til instruksjonene i denne håndboken, i kombinasjon med godkjente instrumenter som er oppført i "Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger", side 11.

Alle reagenser som leveres med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet, er utelukkende beregnet for bruk med de andre reagensene i det samme settet.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er angitt på eskens etikett. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato.

therascreen PITX2 RGQ PCR-settet er kun validert for bruk med deparafineringsløsningen (kat.nr. 19093), eller xylen-etanol eller histolemon-etanol, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-settet (kat.nr. 60404) og EpiTect Fast DNA Bisulfite-settet (kat.nr. 59824 eller 59826).

Det er kun Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (for PCR) som er blitt validert.

Annen bruk av dette produktet enn det som angis på etikettene, og/eller modifisering av komponentene, vil annullere QIAGENs ansvar.

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

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGENs ytelsesundersøkelser.

Ytelsesegenskaper

Ettersom biologiske prøver ble brukt i alle studiene i dette avsnittet, ble deparafineringsstrinnet før gDNA-ekstraksjonen utført ved bruk av QIAGENs deparafineringsløsning. Vær imidlertid oppmerksom på at ekvivalensen mellom deparafineringsløsning og xylen eller histolemon er påvist.

Grense for blank prøve

Grense for blank prøve (limit of blank, LoB) ble bestemt basert på datapunktet som svarer til nedre og øvre 95 % prosentil av resultatene oppnådd med henholdsvis PMR 0 og PMR 100 prøver, som beskrevet i CLSI/NCCLS EP17-A2 (14). Testede prøver svarer til artifiiselle prøver generert med ulike kopinumre (100, 200, 500 og 750 kopier) av ikke-målplasmid (mål for den andre proben) i en bakgrunn av ukonvertert gDNA. LoB-resultatene er basert på 64 og 63 målinger for probene som er rettet mot tidligere metylerte sekvenser, og 64 og 61 målinger for probene som er rettet mot tidligere umetylerte sekvenser, per parti, ved hjelp av to ulike pilotpartier av settet. LoB-resultatene er oppsummert i Tabell 8.

Tabell 8. Oppsummering av LoB-resultater

	PMR 0 prøver		PMR 100 prøver	
	Målt LoB, PMR	Endelig LoB, PMR	Målt LoB, PMR	Endelig LoB, PMR
Parti 1	0		99	
Parti 2	0	0	98	98

Deteksjonsgrense

I henhold til Probit-metoden beskrevet i CLSI/NCCLS EP17-A2 (14), er deteksjonsgrensen (limit of detection, LoD) den PMR-verdien hvor 95 % av målingene overskrider LoB. LoD ble bestemt for hver probe ved minste gDNA-input på 200 ng og ved anbefalt gDNA-input på 400 ng ved hjelp av to ulike pilotpartier av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet. Tre prøver ble testet per input (200 ng og 400 ng) og for hver probe. Disse prøvene ble produsert ved ulike totalt amplifiserbare kopinumre, dvs. 50, 100 og 150 kopier for 200 ng gDNA-input og 100, 200 og 300 kopier for 400 ng gDNA-input. Det ble følgelig produsert totalt 60 prøver for LoD-studien. Testede prøver svarer til artfisielle prøver produsert fra blandinger av mål- og ikke-målplasmider (som gir fem forskjellige teoretiske PMR-nivåer per prøve) i en bakgrunn av ukonvertert gDNA. For hver prøve som er testet ved hver input, er LoD-resultater oppnådd fra minst 20 målinger per pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet for hvert PMR-nivå av hver prøve. LoD for lav PMR-prøver er 4, og LoD for høy PMR-prøver er 92 (Tabell 9).

Tabell 9. Oppsummering av LoD-resultater

Prøve	Input (ng)	Parti	LOD-verdi	Nedre grense	Øvre grense
Lav PMR-prøve	200	Parti 1	3	3	5
	200	Parti 2	3	3	4
	400	Parti 1	3	2	6
	400	Parti 2	4	3	6
Høy PMR-prøve	200	Parti 1	92	92	92
	200	Parti 2	>92	I/R	I/R
	400	Parti 1	94	93	95
	400	Parti 2	95	93	95

I/R Ikke relevant.

DNA-input

Fem ulike gDNA-input (50, 100, 200, 400 og 1000 ng) ble testet, der hver presenterte sju ulike PMR-nivåer (0, 5, 10, 25, 40, 50 og 75). Maksimalt gDNA-input ble definert ved 1000 ng av tekniske årsaker, ettersom det ville ha vært vanskelig å oppnå en høyere kvantitet i virkeligheten. Det akseptable området for gDNA-input for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet ble bestemt med Deming-regresjon ved bruk av ett pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet og ett Rotor-Gene Q MDx-instrument.

Studien påviste:

- Anbefalt gDNA-input som skal brukes med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet er 400 ng gDNA
- Minste akseptable gDNA-input er 200 ng gDNA, og maksimal gDNA-input er 1000 ng.
- Minste akseptable gDNA-input skal testes kun hvis det ikke er mulig å oppnå anbefalt input, ettersom risikoen for å få et ugyldig resultat som følge av lav input øker, noe som øker sjansen for nye tester. Maksimal gDNA-input anbefales testet når en gDNA-input på 400 ng gir et ugyldig PMR-resultat, for eksempel på grunn av et flagg for lav input.

Linearitet

Linearitetsstudien ble utført i samsvar med CLSI/NCCLS EP6-A (15). Lineariteten til *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet ble bestemt på sju prøver ved ulike nivåer av PMR (0, 5, 10, 25, 40, 50 og 75) klargjort fra fem ulike gDNA-input (inkludert 200, 400 og 1000 ng). Studien ble utført ved bruk av ett pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet på ett Rotor-Gene Q MDx-instrument av én operatør. Studien viste at linearitet bekreftes med prøver der PMR er mellom 5 og 50 ved akseptable gDNA-input (dvs. 200–1000 ng).

Repeterbarhet og reproducerbarhet

Repeterbarhet og reproducerbarhet for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet ble bestemt i forbindelse med en presisjonsstudie på ett sted og en presisjonsstudie på flere steder, som begge ble utført i samsvar med CLSI/NCCLS EP5-A3 (16), se Tabell 10 og Tabell 11. Presisjonsstudiene ble utført på tre biologiske prøver som ga en svært lav, lav og høy PMR (henholdsvis 9, 16 og 77). I presisjonsstudien på ett sted ble variasjonskildene vurdert på 23 ikke-etterfølgende arbeidsdager av tre operatører som brukte tre ulike pilotpartier av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet og tre Rotor-Gene Q MDx-instrumenter. To målinger per prøve ble oppnådd på hver kjøring. Det ble utført to identiske kjøring per dag med minst to timer mellom kjøringene. Tidspunktet for kjøringene har variert i løpet av arbeidsdagen, og opprettholdelse av minst to timer mellom kjøringene introduserte noe mer vilkårlighet i testingen. Presisjonsstudien på flere steder ble utført på tre ulike steder, der én enkelt operatør brukte ett enkelt pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet på ett enkelt Rotor-Gene Q MDx-instrument. Fem målinger per prøve ble oppnådd på hver kjøring. Det ble utført én kjøring per dag på hvert sted, der man vekslet mellom morgen og ettermiddag.

Tabell 10. Oppsummering av resultater fra presisjonsstudien på ett sted

Prøve	Variasjonskilde (%)						Totalt
	Intra-kjøring	Kjøring	Parti	Instrument	Operatør	Dag	
Svært lav PMR	12,29	4,20	0,00	12,54	0,00	9,49	20,39
Lav PMR	19,99	0,00	0,00	3,09	0,00	8,04	21,76
Høy PMR	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	4,23

Tabell 11. Oppsummering av resultater fra presisjonsstudien på flere steder

Prøve	Variasjonskilde (%)			Totalt
	Inter-kjøring	Dag	Sted	
Svært lav PMR	13,90	8,43	4,72	16,93
Lav PMR	28,72	0,00	0,00	28,72
Høy PMR	4,25	0,00	1,77	4,61

Interfererende substanser

Studien av interfererende substanser ble utført i samsvar med CLSI/NCCLS EP7-A2 (17). Den endelige konsentrasjonen av hver substans som brukes gjennom hele arbeidsflyten for prøveklargjøring, ble først evaluert (iberegnet fortynningseffekten ved hvert trinn). Basert på relevansen av den endelige konsentrasjonen av hver substans i startmaterialet for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet (dvs. bisDNA), ble alle potensielle interfererende substanser testet ved bruk av ett pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet. Resultater har ikke vist noen interfererende innvirkning fra substansene som brukes gjennom hele arbeidsflyten for *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet (Tabell 12).

Tabell 12. Interfererende substanser som ble testet

Substans som ble testet	Endelig volum testet i 30 µl
Deparafineringsløsning	$1,4 \times 10^{-15}$
Histolemon	$2,10 \times 10^{20}$
Etanol (96–100 %)	0,50
Bisulfittløsning	$7,2 \times 10^{09}$
DNA-beskyttelsesbuffer	$2,26 \times 10^{10}$
Buffer BL	$3,44 \times 10^{08}$
Buffer BW	0,1102
Buffer BD	0,002

Krysskontaminering

Krysskontamineringen mellom negative og positive prøver ble vurdert ved hjelp av ett pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet og to Rotor-Gene Q MDx-instrumenter. Seks forhold ble testet med NTC og/eller negativ kontroll som negative prøver med eller uten en bisDNA-prøve, og ga en lav PMR som positiv prøve. Krysskontamineringen ble evaluert ved 1,3 %.

Gjeldende tidsramme

Den maksimale tidsrammen mellom plateklargjøring og starten på qPCR-kjøringen ble bestemt ved bruk av ett pilotparti av *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet og én artifiell prøve generert fra mål- og ikke-målplasmider som ga en middels PMR. Maksimal akseptabel tidsramme er 24 timer. Det anbefales imidlertid å starte qPCR-kjøringen med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settet så snart som mulig etter klargjøring av platen (dvs. etter innlasting av alle prøver som skal testes).

Klinisk cut-off-validering

Prospektiv analyse ble utført for å validere *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settets kliniske cut-off med FFPE-vev fra 145 lymfeknute-positive, østrogenreseptor-positive, HER2-negative brystkreftpasienter i høyrisikogruppen. Prøver inkludert i studien var arkivert FFPE-vev som oppfylte følgende kriterier:

- Histologisk bekreftet invasiv brystkreft
- Primærtumorstadiet pT1, pT2 og pT3
- Histologisk bekreftet lymfeknuteinvolvering ($\geq N1$)
- Standard adjuvant antrasyklinbasert kjemoterapi
- Ingen doseintens terapi
- Ingen annen primær systemisk kjemoterapi (ingen ytterligere taksaner), bortsett fra hormonterapi

PMR ble målt for hver prøve ved hjelp av det endelige settformatet og instruksjonene i håndboken.

Sykdomsfri overlevelse (DFS) var det primære endepunktet, og var definert som tiden fra primær kirurgi til den første dokumenterte DFS-hendelsen. Datoen for primær kirurgi ble vurdert som indeksdato for oppfølging. DFS-hendelser inkluderte tilbakefall av kreft (lokalt tilbakefall eller distant metastase), sekundære maligniteter vurdert som livstruende, og dødsfall av enhver årsak. For pasienter som døde uten tilbakefall av kreft, ble det brukt konkurrerende risikoanalyser i henhold til Fine og Gray (13).

Analysen ble utført ved en oppfølgingstid av DFS på 10 år. Overlevelseskurver ble beregnet i henhold til insidensfunksjonen (13). PITX2 forhåndsdefinerte cut-off-verdi på PMR 12 viste et statistisk signifikant avvik mellom de to gruppene for det primære endepunktet DFS med et signifikant nivå $p < 0,05$ (tosidig; alfaverdi). Metyleringstilstanden til PITX2-promotoren vurdert med *therascreen* PITX2 RGQ PCR-settets analyse har derfor vist prediktiv verdi for antrasyklinbasert kjemoterapi hos lymfeknute-positive, østrogenreseptor-positive, HER2-negative brystkreftpasienter i høyrisikogruppen.















Referanser

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ β -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H., et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iHepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prosperi, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015) β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (no. 1 Supplement), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T., et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A., et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N., et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S., et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (supplement), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T., et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. European Patent 2011; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R., et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. Article ID 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (tidligere NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; approved Guideline, first edition. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (tidligere NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Approved Guideline, third edition. CLSI Document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (tidligere NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (tidligere NCCLS).

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:

Symbol	Symboldefinisjon
 Σ <N>	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Brukes innen
	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
	CE-merket for samsvar med EU-direktiver
	Katalognummer
	Partinummer (lot)
	Materialnummer
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Revisjon av håndboken, hvor n er revisjonsnummeret
	Produsent
	Se bruksanvisningen
	Må beskyttes mot sollys
	Forsiktig

Kontaktinformasjon

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportcenter på **www.qiagen.com/Support**, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til **www.qiagen.com**).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR-settet – for bestemmelse av prosentvis metyleringsratio (PMR) i PITX2-promotor 2		
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit (8)	Til 8 reaksjoner: PITX2 RGQ PCR Master Mix, PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix, PITX2 RGQ PCR Reference 50, PITX2 RGQ PCR Reference Low, PITX2 RGQ PCR Negative Control og PITX2 RGQ PCR NTC	873211
Rotor-Gene Q MDx-plattform, programvare og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-termosykler i sanntid og HRM-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare og tilbehør: inkluderer 1 års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-termosykler i sanntid og HRM-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare og tilbehør: inkluderer 1 års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring	9002033

Produkt	Innhold	Katalognr.
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Programvare for rutinemessig testing i kombinasjon med Rotor-Gene Q- og Rotor-Gene Q MDx-instrumenter.	9024203
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
72-Well Rotor	Til holding av remserør og lokk 0,1 ml; krever bruk av Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	For låsing av remserør og lokk 0,1 ml, i 72 Well Rotor	9018904
Rotor Holder	Frittstående holder i metall for montering av rør og rotorplater Rotor-Discs® i rotorer	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner	981106
Tilknyttede produkter		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute-kolonner, Proteinase K, buffere, prøvetakingsrør	60404
Deparaffinization Solution (16 ml)	16 ml deparafineringsløsning	19093

Produkt	Innhold	Katalognr.
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200)	Til 200 DNA-konverteringer: Bisulfittløsning, DNA-beskyttelsesbuffer, MinElute DNA-spinnkolonner, bærer-RNA og buffere	59826
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50)	Til 50 DNA-konverteringer: Bisulfittløsning, DNA-beskyttelsesbuffer, MinElute DNA-spinnkolonner, bærer-RNA og buffere	59824

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

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

Dette settet er beregnet til bruk i in vitro-diagnostikk. QIAGEN-produkter kan ikke selges videre, modifiseres for videresalg eller brukes til å produsere kommersielle produkter uten skriftlig godkjenning fra QIAGEN.

Informasjon i dette dokumentet kan endres uten forvarsel. QIAGEN påtar seg ikke ansvar for noen feil som kan forekomme i dette dokumentet. Dette dokumentet anses å være fullstendig og nøyaktig på utgivelsestidspunktet. QIAGEN er under ingen omstendigheter ansvarlig for tilfældige, spesielle eller flere skader eller følgeskader i forbindelse med eller som resultat av bruken av dette dokumentet.

QIAGEN-produkter er garantert å oppfylle de spesifikasjonene som er angitt. QIAGENS eneste forpliktelse og kundens eneste botemiddel er begrenset til vederlagsfri erstating av produkter i tilfelle produktene ikke oppfyller garantien.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], QIAxpert[®], EpiTect[®], MinElute[®], theascreen[®], Rotor-Disc[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™], NanoDrop[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan[®] (Roche Group).

Begrenset lisensavtale for håndbok for *theascreen* PITX2 RGQ PCR-settet

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i panelet. QIAGEN gir ingen lisens for noen av sine årsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette panelet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette panelet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem, og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette panelet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette panelet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydning, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av panelet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med panelet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Nov.-17 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN. Med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettside www.qiagen.com