

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



Versjon 1



Til bruk i in vitro-diagnostikk



971480



1061827NO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

TYSKLAND

R3

MAT

1061827NO



QIAGEN prøve- og analyseteknologier

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

QIAGEN setter standardene innen:

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

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

Innhold

Tiltenkt bruk	5
Sammendrag og forklaring	5
Prinsipp og prosedyre	6
Materialer som medfølger	8
Settets innhold	8
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	10
Advarsler og forholdsregler	11
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	12
Oppbevaring og håndtering av reagenser	13
Oppbevaring og håndtering av prøver	13
Prosedyre	14
Isolering av DNA	14
Protokoller	
■ 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet	15
■ 2: PCR ved bruk av PCR-reagenser som leveres sammen med <i>therascreen</i> EGFR Pyro-settet	18
■ 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler	21
■ 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q2423	
■ 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet	27
■ 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie	29
Tolkning av resultater	33
Tolkning av analyseresultater og deteksjon av mutasjoner med lavt nivå	33
Feilsøkingsveiledning	38
Kvalitetskontroll	41
Begrensninger	41
Ytelseskarakteristikker	43
Blank grense og deteksjonsgrense	43
Linearitet	46
Presisjon	47

Diagnostisk vurdering	47
Referanser	52
Symboler	53
Kontaktinformasjon	53
Vedlegg A: Oppsett av <i>therascreen</i> EGFR Pyro-analyser	54
Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar	59
Bestillingsinformasjon	60

Tiltenkt bruk

therascreen EGFR Pyro-settet er en nukleinsyretest til *in vitro*-diagnostisk bruk basert på sekvensdetektering og Pyrosequencing[®], til kvantitativ deteksjon av mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21 i humant EGFR-gen i genomisk DNA som stammer fra human vevsprøve.

therascreen EGFR Pyro-settet skal brukes for å gi leger informasjon som skal hjelpe dem å velge hvilke kreftpasienter som har best utbytte av anti-EGFR-behandling. Til bruk i *in vitro*-diagnostikk.

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

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

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

Sammendrag og forklaring

therascreen EGFR Pyro-sett er til kvantitative målinger av mutasjoner i kodon 719, 768, 790 og 858–861, i tillegg til delesjoner og komplekse mutasjoner i ekson 19 i humant EGFR-gen.

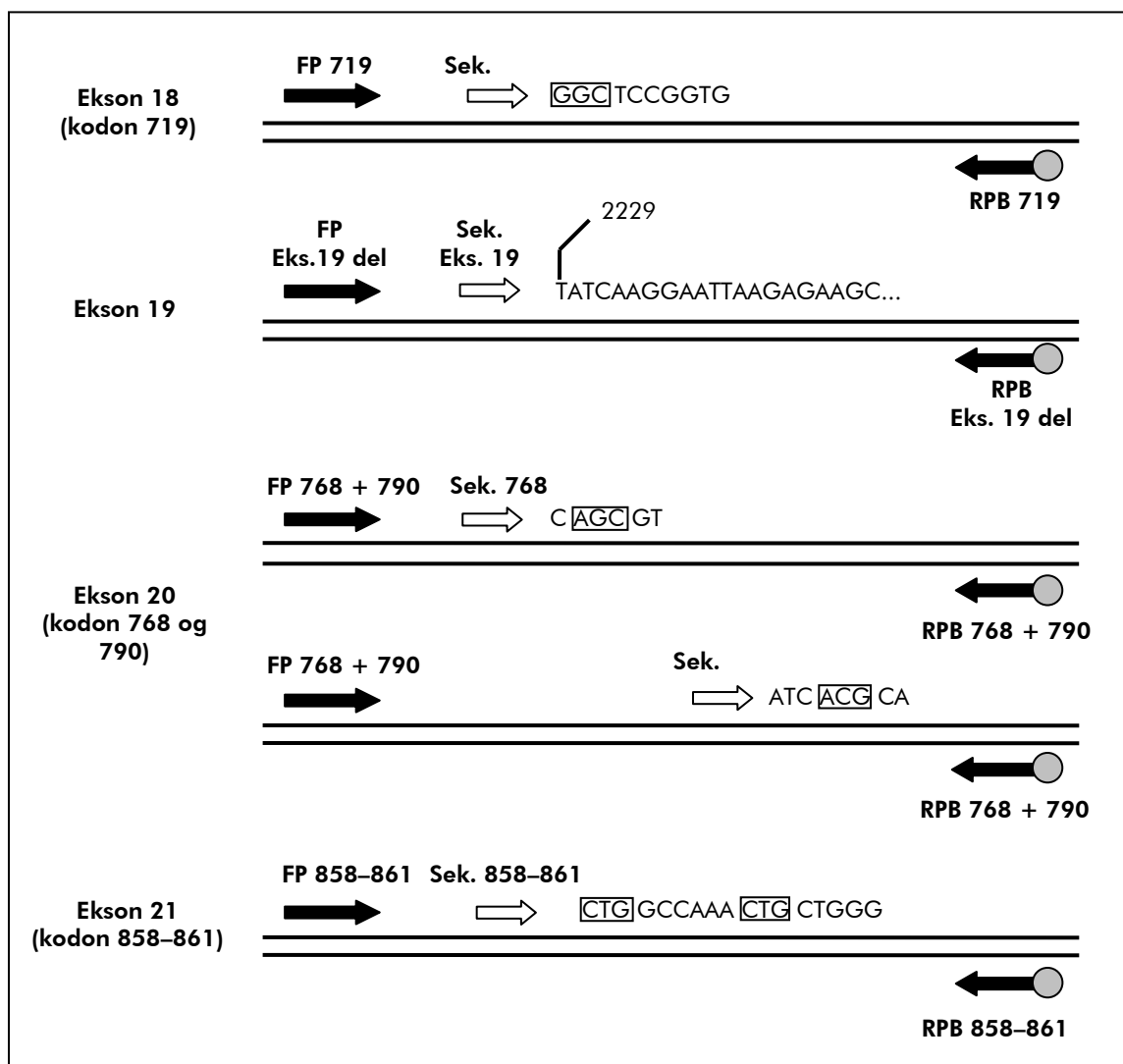
Settet består av fire PCR-analyser (figur 1) for detektering av:

- Mutasjoner i kodon 719 (ekson 18)
- Mutasjoner i kodon 768 og 790 (ekson 20)
- Mutasjoner i kodon 858 og 861 (ekson 21)
- Delesjoner og komplekse mutasjoner i ekson 19

De fire områdene amplifiseres separat av PCR og sekvenseres gjennom angitt område. Amplikonet som dekker kodon 768 og 790 deles inn i to sekvenseringsreaksjoner. Sekvenser som omgir de angitte posisjonene tjener som normaliserings- og referansetopper for kvantifisering og kvalitetsvurdering av analysen.

Alle analyser sekvenseres oppstrøms.

Produktet består av en PCR-primerblanding og sekvenseringsprimere for hver analyse. Primerne leveres i en løsning. Hver flaske inneholder 24 µl av hver primer eller primerblanding.



Figur 1. Illustrasjon av EGFR-analyse. Angitt sekvens er en analysert sekvens for en villtypeprøve. **FP:** Oppstrøms PCR-primere; **RPB:** Nedstrøms PCR-primere (B indikerer biotinylering); **Sek.:** Sekvenseringsprimere.

Prinsipp og prosedyre

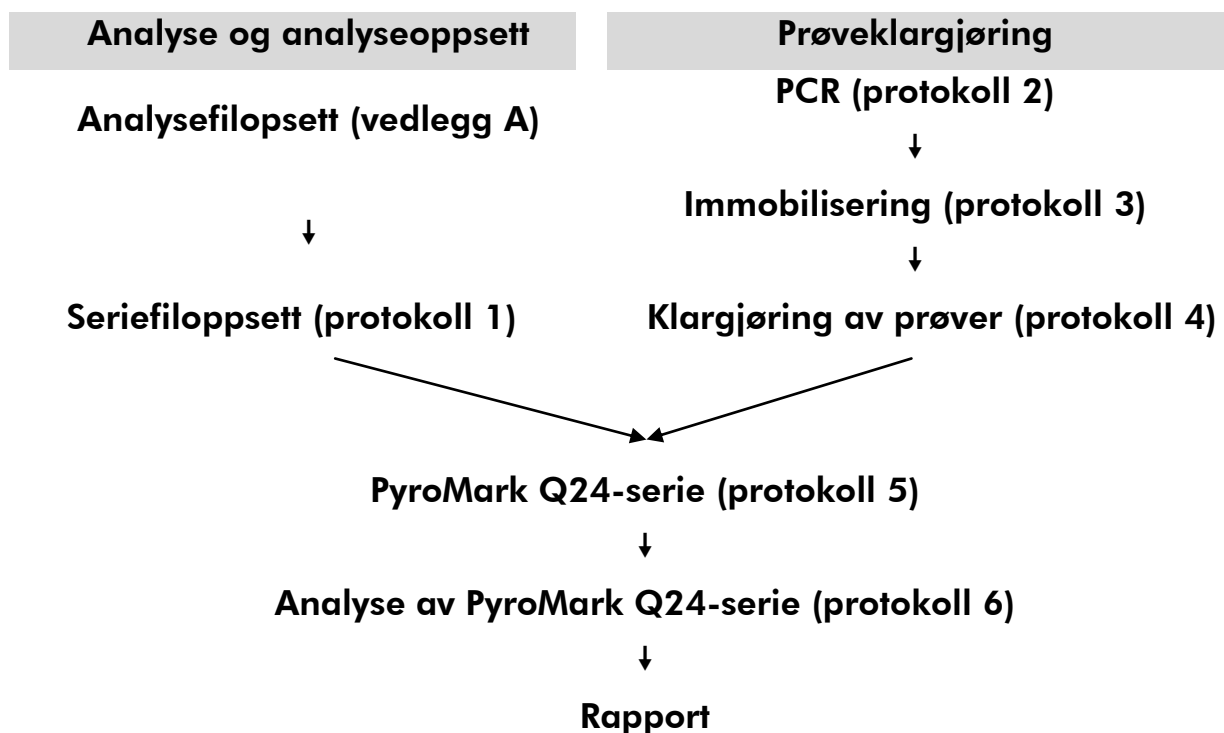
Arbeidsgangen illustrerer analyseprosedyren. Etter PCR med primere som har ekson 18, 19, 20 og 21 som mål, immobiliseres amplikonene på Streptavidin Sepharose® High Performance mikropartikler. Enkeltrådet DNA klargjøres, og de tilhørende sekvenseringsprimerne hybridiseres til DNA-et. Prøvene analyseres deretter i PyroMark Q24-systemet ved hjelp av en fil for å kjøre oppsettet og en fil for å kjøre analyse.

Det er anbefalt å bruke EGFR plug-in-rapporten for å analysere serien. Du kan be om EGFR plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com.

Serien kan også analyseres ved hjelp av analyseverktøyet integrert til PyroMark Q24-systemet. "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) kan deretter tilpasses til deteksjon av ulike delelesjoner i ekson 19 og av sjeldne mutasjoner i de andre eksonene etter analysen (se "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 29).

Merk: Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med versjon R1 av håndboken for *therascreen* EGFR Pyro-sett (se "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 23).

Arbeidsgang for *therascreen* EGFR Pyro-prosedyren



Kontroller

Umetylert kontroll-DNA er inkludert i settet som en positiv kontroll for PCR og sekvenseringsreaksjoner. Denne kontroll-DNA-en har en villtype genotype i områdene sekvensert med dette settet og er nødvendig for tilstrekkelig tolkning av resultatene og identifisering av mutasjoner med lavt nivå (se "Tolkning av resultater" på side 33). Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie.

I tillegg bør man alltid ta med en negativ kontroll (uten templat-DNA) i hvert PCR-oppsett for minst én analyse.


Materialer som medfølger

Settets innhold

therascreen EGFR Pyro-sett (eske 1/2)

<i>therascreen</i> EGFR Pyro-sett	(24)
Katalognr.	971480
Antall reaksjoner	24
Sekvenseringsprimer EGFR 719	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR Ex 19 Del	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR 768	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR 790	24 µl
Sekvenseringsprimer EGFR 858–861	24 µl
PCR-primer EGFR 719	24 µl
PCR-primer EGFR Ex19 Del	24 µl
PCR-primer EGFR 768+790	24 µl
PCR-primer EGFR 858–861	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	2 x 850 µl
CoralLoad®-konsentrat, 10 x	1,2 ml
H ₂ O	5 x 1,9 ml
Umetylert kontroll-DNA, 10 ng/µl	100 µl

therascreen buffere og -reagenser (eske 2/2)

therascreen buffere og reagenser		
PyroMark bindingsbuffer		2 x 10 ml
PyroMark hybridiseringsbuffer		2 x 10 ml
PyroMark denatureringsløsning*		2 x 250 ml
PyroMark vaskebuffer, 10 x		2 x 25 ml
Enzymblanding		2 flasker
Substratblanding		2 flasker
dATP α S		2 x 1180 μ l
dCTP		2 x 1180 μ l
dGTP		2 x 1180 μ l
dTTP		2 x 1180 μ l
Håndbok		1

* Inneholder natriumhydroksid.

Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende HMS-datablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet dersom du ønsker mer informasjon.

- DNA-isoleringssett (se "Isolering av DNA", på side 14)
- Pipetter (justerbare)*
- Sterile pipettespisser (med filter for PCR-oppsett)
- Bordsentrifuge*
- Termosykler* og egnede PCR-rør
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr. 175113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (kat.nr. 9001513 eller 9001514)*†
- PyroMark Q24 programvare (kat.nr. 9019063 eller 9019062)†
- PyroMark Q24-plate (kat.nr. 979301)†
- PyroMark Q24-kassett (kat.nr. 979302)†
- PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon (kat. nr. 9001515 eller 9001517)*†
- Varmeblokk* som kan oppnå 80 °C
- 24-brønners PCR-plate eller remser
- Korker
- Vann med høy renhetsgrad (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende).
Merk: Settet inneholder tilstrekkelig vann for PCR, DNA-immobilisering og til å løse opp enzymblandingen og substratblandingen. Det er nødvendig med ekstra vann med høy renhetsgrad for å fortynne PyroMark vaskebuffer, 10 x.
- Etanol (70%)‡

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

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

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

Anbefalte platemiksere

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

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

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

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk.

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende HMS-datablad (SDS) dersom du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige elektronisk i et praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety der du kan finne, vise og skrive ut datablad for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

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

PyroMark Denaturation Solution



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

PyroMark Enzyme Mixture



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

PyroMark Substrate Mixture



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

Generelle forholdsregler

Merk: Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Håndboken må følges nøyaktig for å få mest mulig optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.
- Arbeidsgangen er noe endret (se "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24" på side 23) sammenlignet med versjon R1 av håndboken for *therascreen* EGFR Pyro-sett.
- Komponentene i dette produktet er tilstrekkelige til å utføre 24 reaksjoner i opptil fem uavhengige serier.
- Bruk sterile pipettespisser med filter (for PCR-oppsett)
- Positivt materiell (prøver, positive kontroller og amplikoner) skal oppbevares og ekstraheres separat i forhold til alle andre reagenser, og tilsettes reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.

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

Oppbevaring og håndtering av reagenser

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

therascreen-bufferne og reagensene (eske 2/2) som inneholder buffere, enzymløsning, substratløsning, dATP α S, dCTP, dGTP og dTTP (reagenser for Pyrosequencing[®]-analyse), transporteres og leveres på kuldepakninger. Disse komponentene bør oppbevares ved 2–8 °C ved levering. Det kan være lurt å beholde enzymløsningen og substratløsningen i flaskene som følger med, for å redusere tap av aktivitet.

Rekonstituerte enzym- og substratløsninger er stabile i minst 10 dager ved 2–8 °C. Rekonstituerte enzym- og substratløsninger kan fryses og oppbevares i flaskene ved –30 til –15 °C. Frosne reagenser bør ikke utsettes for mer enn 3 fryse/tine-sykluser.

Merk: Nukleotider må ikke fryses.

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

Oppbevaring og håndtering av prøver

Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

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

Prøver fra personer som mottar heparinbehandling, skal ikke brukes.

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

Prosedyre

Isolering av DNA

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

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

Tabell 2. Sett for DNA-rensing er anbefalt for bruk med *therascreen* EGFR Pyro-sett

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

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

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

Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet

Viktige poeng før du starter

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

Dette må du gjøre før du starter:

- Hvis EGFR plug-in-rapporten ikke er installert, må du lage et analyseoppsett (se vedlegg A på side 54). Dette skal kun gjøres én gang, før du kjører *therascreen* EGFR Pyro-analysene første gang. Hvis EGFR plug-in-rapporten er installert, er forhåndsdefinerte analyseoppsett tilgjengelige i PyroMark Q24-programvarens snarveifunksjon under banen "Example Files/PyroMark Setups/EGFR" (Eksempelfiler/PyroMark-oppsett/EGFR). Du kan be om EGFR plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com.

Prosedyre

1. Klikk på på verktøylinjen.

En ny seriefil opprettes.

2. Skriv inn analyseparameterne (se "Run parameters" (Serieparametere), side 17).

3. Sett opp platen ved å legge til analyser for de 5 ulike sekvenseringsreaksjonene i brønner som samsvarer med prøvene som skal analyseres.

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

Merk: Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie (se "Kontroller" på side 11).

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

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

Merk: Informasjon før analyse som er skrevet ut kan brukes som en mal for prøveoppsettet (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler" på side 21).

Slik kjører du platen på PyroMark Q24, se "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 27.

“Run parameters” (Serieparametere)

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

Legge til analysefiler

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

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

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

Legg inn prøve-ID-er og merknader

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

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

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

Denne protokollen er for fire separate PCR-amplifikasjoner av områder som inneholder kodon 719 (ekson 18), kodon 768 og 790 (ekson 20), kodon 858–861 (ekson 21) eller delelesjoner og komplekse mutasjoner i ekson 19 ved hjelp av *therascreen* EGFR Pyro-primere.

Viktige poeng før du starter

- HotStarTaq[®] DNA-polymerase i PyroMark Master Mix krever et aktiveringstrinn på **15 minutter ved 95 °C**.
- Sett opp alle reaksjonsblandinger i et område som er skilt av fra det som brukes til DNA-rensing, tilsetning av DNA-templat til PCR, PCR-produktanalyse eller klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse.
- Bruk engangsspisser som inneholder vannavstøtende filter for å minimere faren for krysskontaminering.

Dette må du gjøre før du starter:

- Før du åpner rørene med PCR-primere, må disse sentrifugeres en kort stund for at innholdet skal samles i bunnen av rørene.
- Juster konsentrasjonen av kontrollen og prøve-DNA til 0,4–2 ng/μl ved behov.

Prosedyre

1. Tin alle nødvendige komponenter (se tabell 3).

Bland godt før bruk.

2. Klargjør en reaksjonsblanding for hvert PCR-primersett i henhold til tabell 3.

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

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

Tabell 3. Klargjøring av reaksjonsblanding for hver PCR-primerblanding

Komponent	Volum/reaksjon (μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2 x	12,5
CoralLoad-konsentrat, 10 x	2,5
PCR-primer EGFR 719 eller PCR-primer EGFR Ex 19 Del eller PCR-primer EGFR 768 og 790 eller PCR-primer EGFR 858–861	1,0
Vann (H_2O , følger med)	4,0
Totalt volum	20,0

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

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

4. Tilsett 5 μ l DNA-templat (2–10 ng av genomisk DNA) til hvert PCR-rør (se tabell 4), og bland grundig.

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

Merk: Ta med en prøve med umetylert kontroll-DNA for hver analyse i hver pyrosekvenseringsserie (se "Kontroller" på side 7).

Tabell 4. Klargjøring av PCR

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

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

Tabell 5. Optimalisert syklusprotokoll

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

6. Sett inn PCR-rørene i den termiske sentrifugen og start syklusprogrammet.
7. Fortsett med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter til Streptavidin Sepharose High Performance mikropartikler", på side 21 etter amplifikasjonen.

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

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

Dette må du gjøre før du starter:

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

Prosedyre

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

Tabell 6. Master Mix for DNA-immobilisering

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

3. Tilsett 70 µl Master Mix til brønnene i en PCR-plate med 24 brønner eller remser, slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).
4. Tilsett 10 µl biotinyleret PCR-produkt fra protokoll 2 til hver brønn som inneholder Master Mix slik det er angitt i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15).

Merk: Det totale volumet per brønn skal være 80 µl etter at Master Mix og PCR-produktet er tilsatt.

5. Forsegl PCR-platen (eller remsene) ved hjelp av korker.

Merk: Se til at det ikke kan lekke mellom brønnene.

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

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

7. Fortsett umiddelbart med "Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24 " på side 23.

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

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

Protokoll 4: Klargjøring av prøver før pyrosekvenseringsanalyse på PyroMark Q24

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

Viktige poeng før du starter

- Før du åpner rørene med sekvenseringsprimere, må disse sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet i bunnen av rørene.
- Tilsett de fem ulike sekvenseringsprimerne i det samme mønsteret som er angitt for platen i analyseoppsettet (se "Protokoll 1: Analyseoppsett for PyroMark Q24-systemet" på side 15), avhengig av analyseområdet (kodon 719 [ekson 18], kodon 768 og 790 [ekson 20], kodon 858–861 [ekson 21] eller exon 19).
- Arbeidsgangen er noe endret sammenlignet med versjon R1 av håndboken for *therascreen* EGFR Pyro-sett (trinn 18). Ikke kort ned tiden for nedkjøling av prøvene etter oppvarming til 80 °C.
- Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 regelmessig og bytt filterprober når dette angis.

Dette må du gjøre før du starter:

- Sett én PyroMark Q24-plateholder på en forvarmet varmeblokk som holder 80 °C til bruk i trinn 17. Hold en andre PyroMark Q24-plateholder ved romtemperatur (15–25°C) for bruk i trinn 18.
- PyroMark vaskebuffer tilsettes som et 10 x-konsentrat. Før den brukes første gang skal den fortynnes til en 1 x aktiv løsning ved å tilsette 225 ml vann med høy renhetsgrad til 25 ml 10 x PyroMark vaskebuffer (endelig volum på 250 ml).

Merk: 1 x PyroMark vaskebuffer aktiv løsning er stabil ved 2–8 °C til den angitte utløpsdatoen.

Prosedyre

1. Fortynn en tilstrekkelig mengde av hver sekvenseringsprimer (sekvenseringsprimer EGFR 719, sekvenseringsprimer EGFR 768, sekvenseringsprimer EGFR 790, sekvenseringsprimer EGFR 858–861 og sekvenseringsprimer EGFR Exon 19 Del) i PyroMark hybridiseringsbuffer som vist i tabell 7.

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

Tabell 7. Eksempel på fortykning av sekvenseringsprimerne

Komponent	Volum/reaksjon (μl)	Volum til 9 + 1 reaksjoner (μl)
Sekvenseringsprimer EGFR 719 eller sekvenseringsprimer EGFR Ex 19 Del		
eller sekvenseringsprimer EGFR 768 eller sekvenseringsprimer EGFR 790 eller sekvenseringsprimer EGFR 858– 861	0,8	8
PyroMark hybridiseringsbuffer	24,2	242
Totalt volum	25	250

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

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

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

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



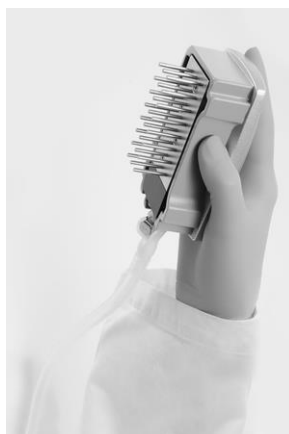
Figur 2. Plassering av PCR-plate (eller remsjer) og PyroMark Q24-plate på vakuumarbeidsstasjonen

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

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

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

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



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

10. Mens vakuumverktøyet holdes over PyroMark Q24-platen, skal vakuumbryteren på verktøyet slås av (Off).
11. Frigjør mikropartiklene i PyroMark Q24-platen ved å senke filterprobene i den fortynnede sekvenseringsprimeren og bevege verktøyet forsiktig frem og tilbake.
Merk: Vær forsiktig så du ikke skader overflaten på PyroMark Q24-platen ved å ripe den med filterprobene.
12. Overfør vakuumverktøyet til karet som inneholder vann med høy renhetsgrad (figur 2), og beveg verktøyet frem og tilbake i 10 sekunder.
13. Vask filterprobene ved å senke probene ned i vann med høy renhetsgrad (figur 2) og ved å tilføye vakuum. Skyll probene med 70 ml vann med høy renhetsgrad.
14. Løft vakuumverktøyet opp og bakover, mer enn 90° vertikalt, i 5 sekunder for å tørke av væske fra filterprobene (figur 3).
15. Slå av verktøyets vakuumbrytere (Off) og sett vakuumverktøyet i posisjon P (Parking).
16. Slå av vakuumpumpen.
Merk: Mot slutten av en arbeidsdag må væskeavfall og resterende løsninger kastes, og PyroMark Q24 vakuumarbeidsstasjon skal kontrolleres for støv og søl (se vedlegg B, side 59).
17. Varm opp PyroMark Q24-platen med prøvene ved 80 °C i 2 minutter med forhåndsoppvarmet PyroMark Q24 plateholder.
18. Fjern PyroMark Q24-platen fra den varme plateholderen og sett den på en andre PyroMark Q24 plateholder, som ble holdt ved romtemperatur (15–25 °C), for å la prøvene avkjøles til romtemperatur i 10–15 minutter.
19. Fortsett med "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet", side 27.

Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet

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

Viktige poeng før du starter

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

Dette må du gjøre før du starter:

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

Prosedyre

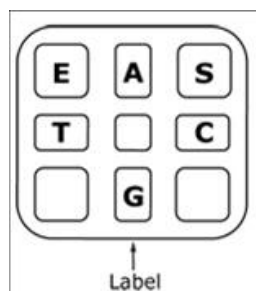
1. **Frysetørret enzym- og substratblanding skal oppløses i 620 μ l vann (H_2O , følger med).**
2. **Bland ved å bevege flasken forsiktig rundt.**
Merk: Ikke vorteks!

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

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

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

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende HMS-datablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet dersom du ønsker mer informasjon.



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

6. **Åpne kassettoppningen og sett inn den fylte reagenskassetten med etiketten vendt utover. Skyv kassetten helt inn og trykk den ned.**
7. **Pass på at linjen er synlig foran på kassetten, og lukk åpningen.**
8. **Åpne rammen som holder platen på plass, og plasser platen på varmeblokken.**
9. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
10. **Sett inn USB-enheten (som inneholder analysefilen) i USB-porten foran på instrumentet.**
Merk: USB-enheten må ikke fjernes før serien er fullført.
11. **Velg "Run" (Serie) i hovedmenyen (ved hjelp av skjermknappene ▲ og ▼) og trykk på "OK".**
12. **Velg seriefil ved hjelp av skjermknappene ▲ og ▼.**
Merk: Du kan se innholdet i en mappe ved å velge mappe og trykke på "Select" (Velg). Trykk på "Back" (Tilbake) for å gå tilbake til forrige visning.
13. **Når analysefilen er valgt, trykker du på "Select" (Velg) for å starte serien.**
14. **Når serien er fullført og instrumentet bekrefter at analysefilen er lagret på USB-enheten, trykker du på "Close" (Lukk).**
15. **Ta ut USB-enheten.**
16. **Åpne instrumentlokket.**
17. **Åpne kassettoppningen og ta ut reagenskassetten ved å løfte den opp og dra den ut.**
18. **Lukk åpningen.**
19. **Åpne rammen som holder platen på plass, og ta ut platen fra varmeblokken.**
20. **Lukk rammen og instrumentlokket.**
21. **Kast platen og rengjør kassetten i henhold til instruksjonene i produktarket som leveres med kassetten.**
22. **Analyser serien i henhold til "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 29.**

Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie

Denne protokollen beskriver mutasjonsanalysen til en fullført EGFR-serie ved bruk av Q24-programvare.

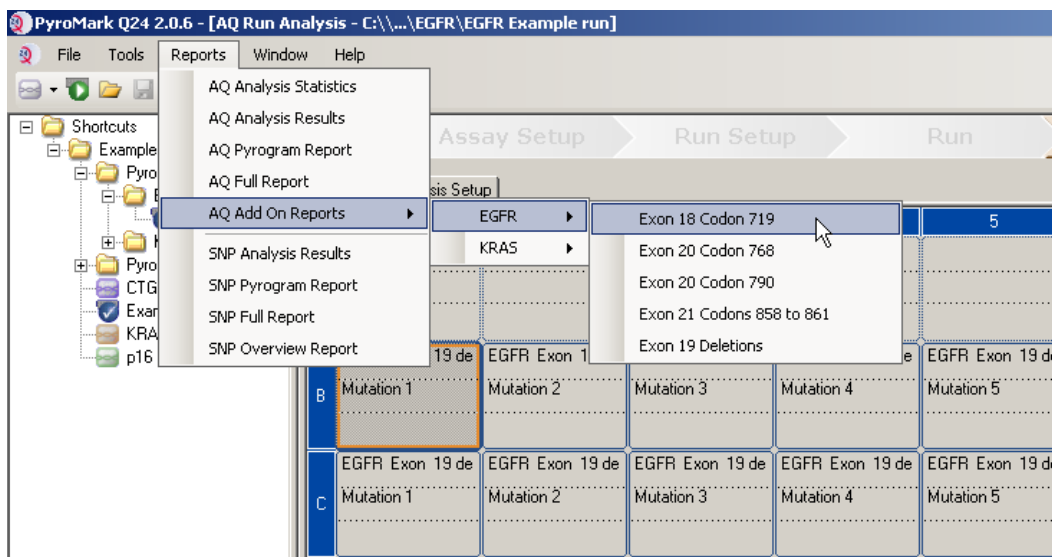
Prosedyre

1. Sett USB-enheten (som inneholder den behandlede seriefilen) inn i PC-ens USB-port.
2. Overfør seriefilen fra USB-enheten til ønsket plassering på datamaskinen ved hjelp av Windows Utforsker.
3. Åpne seriefilen i AQ-modus i PyroMark Q24 programvare ved å velge "Open" (Åpne) i menyen "File" (Fil) eller ved å dobbeltklikke på filen (📁) i snarveifunksjonen.
4. Det finnes to metoder for analysering. Gå til trinn 5 hvis du bruker EGFR plug-in-rapporten. Gå til trinn 6 hvis du bruker AQ-analyse integralt til PyroMark Q24-systemet.

Merk: Vi anbefaler på det sterkeste at du bruker EGFR plug-in-rapporten for tolkning av resultatene. Du kan be om EGFR plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com. Denne rapporten sikrer at de respektive LOD-verdiene og ulike "Sequences to Analyze" (Analysesekvenser) brukes for å detektere alle mutasjoner og delesjoner automatisk, inkludert identifisering av tjue ulike delesjoner og komplekse mutasjoner i ekson 19.

5. Bruk av EGFR plug-in-rapport:

SVelg "AQ Add On Reports/EGFR" (AQ legge til rapporter / EGFR) og "Exon 18 Codon 719" (Ekson 18, kodon 719) eller "Exon 19 Deletions" (Delesjoner i ekson 19) eller "Exon 20 Codon 768" (Ekson 20, kodon 768) eller "Exon 20 Codon 790" (Ekson 20, kodon 790) eller "Exon 21 Codons 858 to 961" (Ekson 21, kodon 858 til 961) fra "Reports" (Rapporter) i menyen (figur 5).



Figur 5. Skjermbildet AQ Run Analysis (AQ kjør analyse).

Brønnene vil automatisk bli analysert for alle mutasjoner der LOD er angitt i tabell 8. Resultatene vil bli presentert i en oversiktstabell (figur 6), etterfulgt av detaljerte resultater som f.eks. inneholder pyrogrammer og analysekvalitet.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	del E746-A750	
A2	B105072	Wildtype			
A3	B116390	Mutation	26.6	delL747-P753insS	
A4	B116389	Wildtype			
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	delK745-E749	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	del E746-A750	
A7	WT control	Wildtype			
A8	NTC	Failed Analysis			⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

Figur 6. Oppsummeringstabell for resultater.

6. Bruke AQ-analyse:

Klikk på en av analyseringsknappene for å analysere en EGFR-serie og for å få en oversikt over resultatene.



Analyser alle brønner.



Analyser den valgte brønnen.

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

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

Merk: Standard "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) som angitt i analyseoppsettet angår de hyppigste mutasjonene i kodon 719, 768, 790, 858 og 861 og den hyppigste delesjonen i ekson 19 (se vedlegg A, side 54). Hvis en prøve inneholder en mindre hyppig mutasjon, kan "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) endres slik at den også analyserer mutasjonsstatusen ved denne posisjonen, slik det er beskrevet i vedlegg A.

Oppdaterte mutasjonsfrekvenser i humant EGFR-gen er tilgjengelig elektronisk fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Merk: For å oppnå pålitelige resultater, anbefaler vi enkelttopphøyder over 20 RLU for analyse for kodon 768, og over 30 RLU for de resterende fire analysene. Henholdsvis 20 eller 30 RLU bør angis som "required peak height for passed quality" (nødvendig topp for godkjent kvalitet) i analyseoppsettet (se håndboken for PyroMark Q24 og vedlegg A).

Merk: Korrekt kvantifisering for kodon 719 og kodon 790 oppnås ved å justere høydene i histogram søylene i analyseoppsettet (se vedlegg A, side 54).

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

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

Ny analysering av prøver der det ikke er påvist mutasjon med standarden "Sequence to analyze" (Analysesekvens) eller med kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes).

Vi anbefaler på det sterkeste at du analyserer alle prøver der det ikke er påvist mutasjon med standarden "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), i tillegg til prøver med kvalitetsvurderingen "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes). Kvalitetsvurderingene "Check" (Kontroller) og "Failed" kan indikere en mutasjon i en annen posisjon, noe som fører til uventede referansetopper.

Mindre hyppige mutasjoner kan analyseres på nytt eller spores under "Analysis Setup" (Analyseoppsett) ved å endre "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) til varianter beskrevet i vedlegg A eller varianter for andre sjeldne eller uventede mutasjoner. Klikk på "Apply" (Bruk) og deretter på

"To All" (på alle) når vinduet "Apply Analysis Setup" (Bruk analyseoppsett) vises.

Merk: Etter at du har endret "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), må du se til at terskelen for enkelttopphøyder og høydene i histogram søylene justeres tilsvarende (se vedlegg A på side 54).

Merk: Hvis de målte toppene ikke stemmer overens med høydene på histogram søylene og ikke kan forklares av sjeldne eller uventede mutasjoner, danner ikke resultatet grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus. Det er anbefalt å kjøre prøven på nytt.

Tolkning av resultater

Tolkning av analyseresultater og deteksjon av mutasjoner med lavt nivå

Det anbefales på det sterkeste å ta med umetylert kontroll-DNA i hver analyseserie av sammenligningsårsaker og som en kontroll av bakgrunnsnivåer. Kontrollprøvenes målte frekvens skal være mindre enn eller lik blank grense (LOB).

Alle prøver skal undersøkes i forhold til deteksjonsgrensen (LOD, se tabell 8) og tolkes på følgende måte:

- Mutasjonsfrekvens $< \text{LOD}$: Villtype
- Mutasjonsfrekvens $\geq \text{LOD}$ og $\leq \text{LOD} + 3\%$ enheter: Potensiell mutasjon med lavt nivå

Merk: Hvis du bruker plug-in-rapporten (se trinn 5 i "Protokoll 6: Analyse av en PyroMark Q24-serie" på side 29) og dette skjer, vil et varsel bli vist.

Prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå skal bare betraktes som positive for mutasjonen hvis dette bekrefte ved å kjøre dem på nytt i duplikat sammen med en prøve med umetylert kontroll-DNA. Resultatet for begge duplikatene skal være $\geq \text{LOD}$ og forskjellig fra kontrollprøven. Hvis ikke, skal prøven anses som villtype.

- Mutasjonsfrekvens $\geq \text{LOD} + 3\%$ enheter: Mutasjon

Hvis du bruker EGFR plug-in-rapporten, blir dette gjort automatisk.

Merk: Det er anbefalt å bruke EGFR plug-in-rapporten for tolkning av resultatene. For en nærmere undersøkelse av prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå, anbefaler vi å tillegg analysere prøven manuelt i den brukerorienterte programvaren (f.eks. for å sammenligne med kontrollprøvens mutasjonsfrekvens).

Merk: En målt frekvens over LOB i kontrollprøven indikerer et høyere bakgrunnsnivå enn vanlig i den respektive serien, som kan påvirke allelkvantifisering, særlig for lave mutasjonsnivåer. I dette tilfellet danner ikke målte frekvenser i området fra LOD (tabell 8) til $\text{LOD} + 3\%$ enheter grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus. Det anbefales å kjøre prøver med en potensiell mutasjon med lavt nivå på nytt.

Merk: En behandlingsbeslutning for kreftpasienter må ikke bare baseres på EGFR mutasjonsstatus.

Tabell 8. LOB og LOD bestemt for spesifikke mutasjoner

Mutasjon	Aminosyre- substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V47)
Delesjoner i ekson 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] LOD for disse delesjonene i ekson 19 ble bestemt ved å legge til seks standardavvik for blanke målinger til LOB-verdien.

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabell 8. Forts.

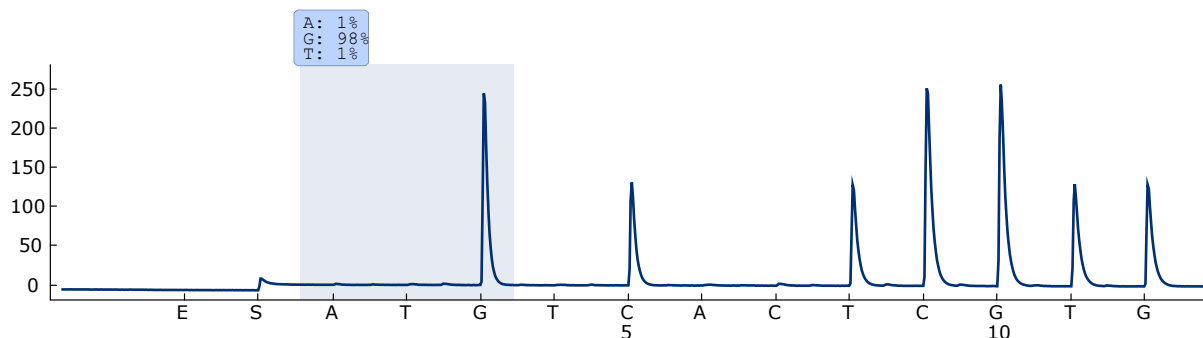
Mutasjon	Aminosyresubstitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V47)
Ekson 18, kodon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Ekson 20, kodon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Ekson 20, kodon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Ekson 21, kodon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [†]	6224
Ekson 21, kodon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

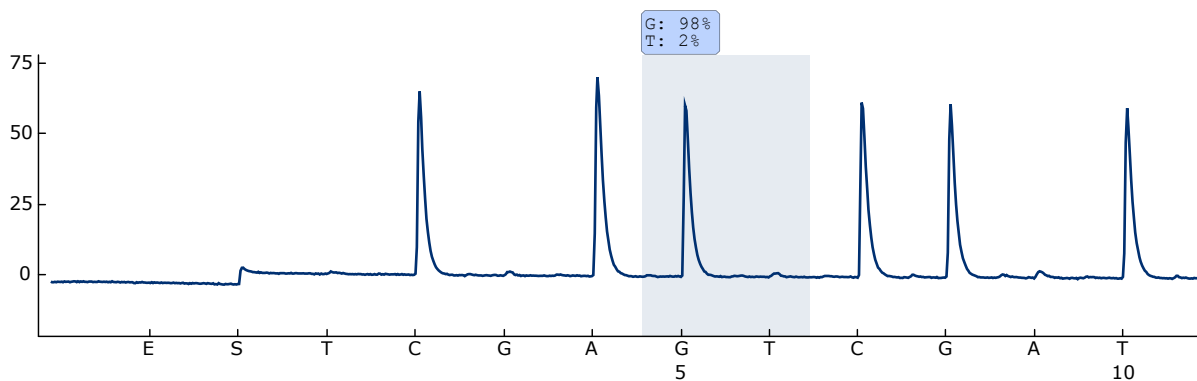
[†] Laveste mutasjonsnivå i en prøve som fører til en målt frekvens \geq LOD.

Representative resultater

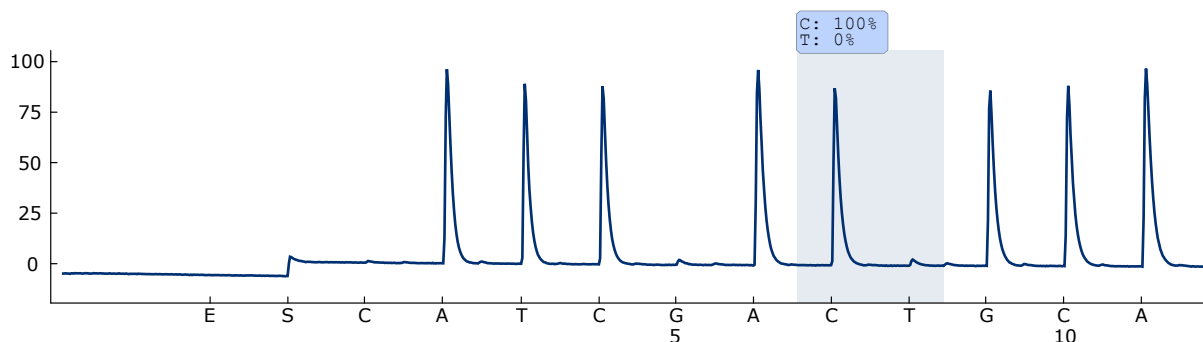
Representative Pyrogram-resultater er vist i figur 7–14.



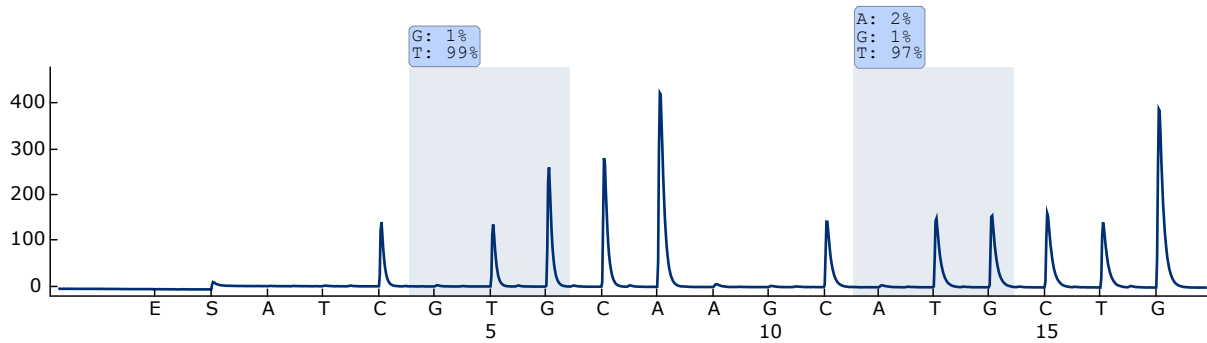
Figur 7. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i kodon 719 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) DGCTCCGGTGC.



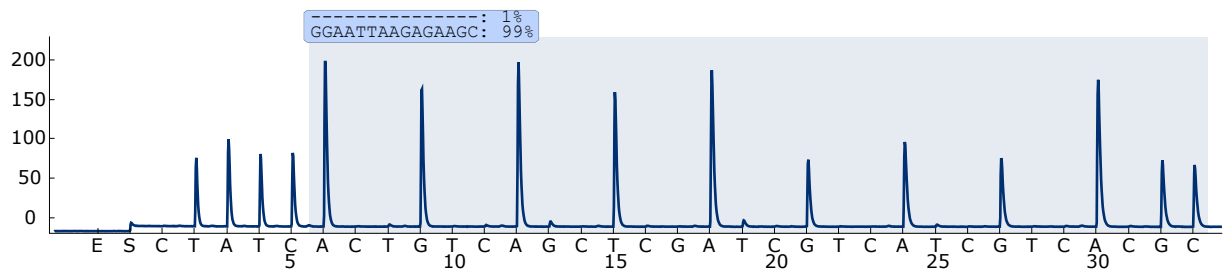
Figur 8. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i kodon 768 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CAKCGTG.



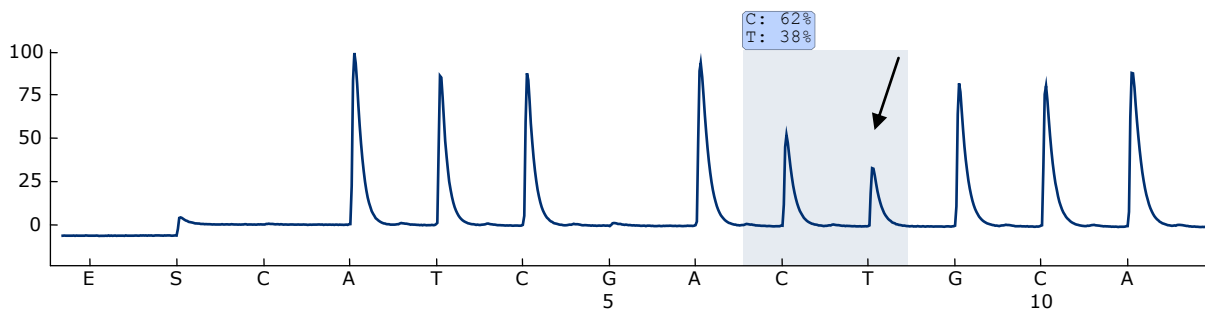
Figur 9. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i kodon 790 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) ATCAYGCAG.



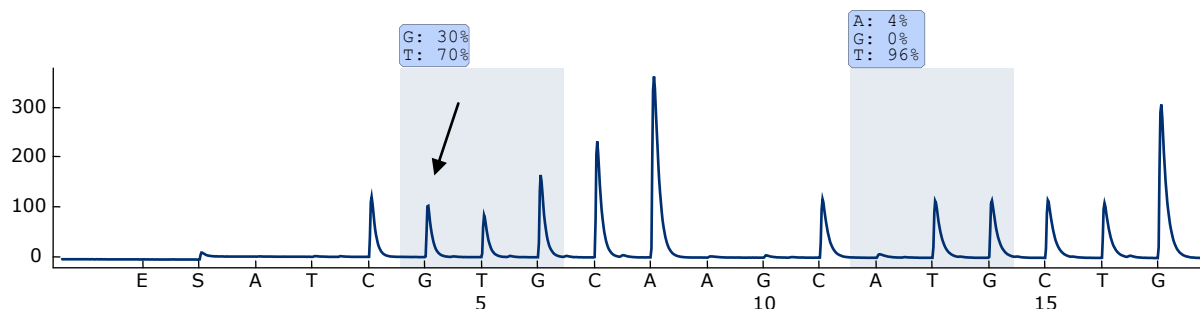
Figur 10. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en normal genotype i kodon 858–861 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CKGGCCAAACDGCTGGGT.



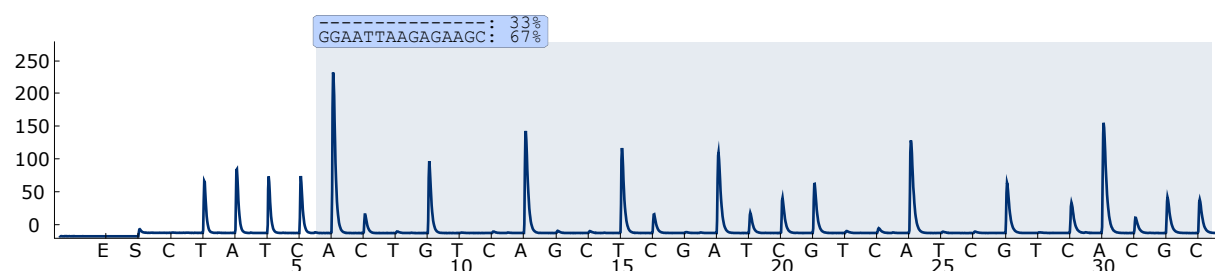
Figur 11. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en villtype genotype i kodon 19.



Figur 12. Pyrogram-spor oppnådd etter analyse av prøver med en ACG → ATG-mutasjon i base 2 i kodon 790 (angitt med en pil).



Figur 13. Pyrogram-spor oppnådd etter analyse av prøver med en CTG → CGG-mutasjon i base 2 i kodon 858 (angitt med en pil).



Figur 14. Pyrogramspor oppnådd etter analyse av en prøve med en 2235del15-delesjon i ekson 19.

Feilsøkingsveiledning

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

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

Kommentarer og forslag

Signaler i ikke-templat-kontrollen (negativ kontroll)

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

Kommentarer og forslag

Dårlig eller uventet sekvens

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

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

- a) Lav topphøyde Håndteringsfeil i PCR-oppsettet eller prøveklargjøring før pyrosekvensering kan føre til lave topper. Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 regelmessig og bytt filterprober når dette angis.

Hvis advarselen "Check" (Kontroller) kommer opp, må du sammenligne pyrogrammet nøye med histogrammet, som kan vises med et høyreklikk i vinduet Pyrogram. Hvis de målte toppene stemmer overens med høydene på histogramsøylene, er resultatet gyldig. Hvis ikke, anbefales det å kjøre prøven på nytt.
- b) Mutasjon ikke angitt i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) Juster "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) i analyseoppsettet (se vedlegg A på side 54), og analyser serien på nytt.
- c) Uventet sjelden mutasjon Kvalitetsvurderinger som "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) kan forårsakes med et uventet mønster av topper. Dette kan indikere en uventet mutasjon, noe som ikke analyseres av den gitte "Sequence to Analyze" (Analysesekvens). Disse prøvene bør analyseres ved hjelp av alternativet "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) med vurdering av uventede mutasjoner.
- d) Advarsel om avvik for høy topphøyde ved fordeling x Pyrogrammet må sammenlignes nøye med histogrammet, som kan vises ved å høyreklikke på vinduet Pyrogram. Hvis de målte toppene ikke stemmer overens med høydene på histogramsøylene og ikke kan forklares av sjeldne mutasjoner, er det anbefalt å kjøre prøven på nytt.

Kommentarer og forslag

- e) Advarselen
"Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8"
(Usikker / ikke godkjent på grunn av avvik i høy topphøyde ved fordeling: 8) vises i analysen for kodon 790.
- Bakgrunnsstøy ved fordeling T8 ligger under forventet nivå. Juster høyden på histogram søylen til standardverdi (1,00) (dette er bare mulig ved hjelp av analyseverktøyet integralt til PyroMark Q24-programvaren).
- f) Advarselen
"Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10"
(Usikker / ikke godkjent på grunn av avvik i høy topphøyde ved fordeling: 10) vises i analysen for kodon 858-861.
- En CTG>CGG-mutasjon på høyt nivå i kodon 858 (L858R) kan føre til økt bakgrunn i fordelingene G-10 og A-12 og en frekvens over LOD for mutasjonen ATG>CAG i kodon 861 (L861Q). I dette tilfellet er bare den rapporterte L585R-mutasjonen gyldig og du kan se bort fra advarselen og kvaliteten "Check" (Kontroller).
- Merk:** EGFR plug-in-rapporten vil bare rapportere én mutasjon (dvs. mutasjonen med høyeste frekvens).
- g) Advarselen
"Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 23"
(Usikker / ikke godkjent på grunn av avvik i høy topphøyde ved fordeling: 23) vises når 2235del15-delesjonen rapporteres.
- En 2235del15-delesjon på høyt nivå kan føre til denne advarselen. I dette tilfellet er den rapporterte mutasjonen gyldig og du kan se bort fra advarselen og kvaliteten "Check" (Kontroller).

Kommentarer og forslag

Høy bakgrunn

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

Ingen signaler i positiv kontroll (umetylert kontroll-DNA)

- | | |
|---|--|
| a) Utilstrekkelig enzym eller substratblanding for alle brønner | Pass på å fylle PyroMark Q24-kassetten i henhold til "Pre Run Information" (Informasjon før analyse) i menyen "Tools" (Verktøy). |
| b) Feil oppbevaring eller fortykning av reagenser | Klargjør <i>therascreen</i> -reagenser i henhold til instruksjonene under "Protokoll 5: Kjøring av PyroMark Q24-systemet" på side 27. |
| c) Feil i PCR eller prøveklargjøring | Håndteringsfeil i PCR-oppsettet, programmering av PCR-syklere eller prøveklargjøring før pyrosekvensering kan føre til mangel på signaler. Utfør funksjonstesten av filterprobene som beskrevet i håndboken for PyroMark Q24 og bytt filterprober når dette angis. Gjenta PCR-en og pyrosekvenseringsanalysen. |

Kvalitetskontroll

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

Begrensninger

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

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

Ytelseskarakteristikk

Blank grense og deteksjonsgrense

Blank grense (LOB) og deteksjonsgrense (LOD) er bestemt for et antall mutasjoner ved hjelp av plasmidblandinger (tabell 9). LOB og LOD ble bestemt i henhold til anbefalinger fra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protokoller for å bestemme deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser. Godkjente retningslinjer). α - og β -feil (henholdsvis falske positive og falske negative) ble satt til 5 %. LOD for noen sjeldne delesjoner i ekson 19 ble bestemt ved å legge til seks standardavvik for blanke målinger til LOB-verdien.

LOB-verdier representerer den målte frekvensen som ble oppnådd med en villtypeprøve. LOD-verdier representerer det laveste signalet (målt frekvens) som kan betraktes som positivt for den aktuelle mutasjonen.

Mutasjonen CTG → CGG i kodon 858

Når det gjaldt CTG → CGG-mutasjonen i kodon 858, hadde målinger av prøver med lave mutasjonsnivåer en fordeling som ikke fulgte Gauss-kurven. LOD ble derfor bestemt med en annen metode i henhold til anbefalinger i CLSI Guideline EP17A. Det laveste signalet som angir tilstedeværelse av en mutasjon (LOD) i disse posisjonene, ble satt til 2 % enheter over det aktuelle baselinenivået som var definert av 95-persentilen for blanke målinger. Ved analysing av en prøve med et mutasjonsnivå på 5,5 %, avga 95 % av resultatene ($n = 72$) et signal som kan regnes som positivt (\geq LOD, dvs. $\geq 2,6$ % enhet).

Tabell 9. LOB og LOD bestemt for spesifikke mutasjoner

Mutasjon	Aminosyre- substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V47)
Delesjoner i ekson 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 [†]	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 [†]	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T [†]	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 [†]	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C [†]	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 [†]	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 [†]	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 [†]	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] LOD for disse delesjonene i ekson 19 ble bestemt ved å legge til seks standardavvik for blanke målinger til LOB-verdien.

Tabellen fortsetter på neste side.

Tabell 9. Forts.

Mutasjon	Aminosyresubstitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V47)
Ekson 18, kodon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Ekson 20, kodon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Ekson 20, kodon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Ekson 21, kodon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [‡]	6224
Ekson 21, kodon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[‡] Laveste mutasjonsnivå i en prøve som fører til en målt frekvens \geq LOD.

Merk: Disse verdiene var basert på serier der plasmidblandinger som bar villtypen eller respektive muterte sekvens ble brukt som templat for PCR-amplifikasjon.

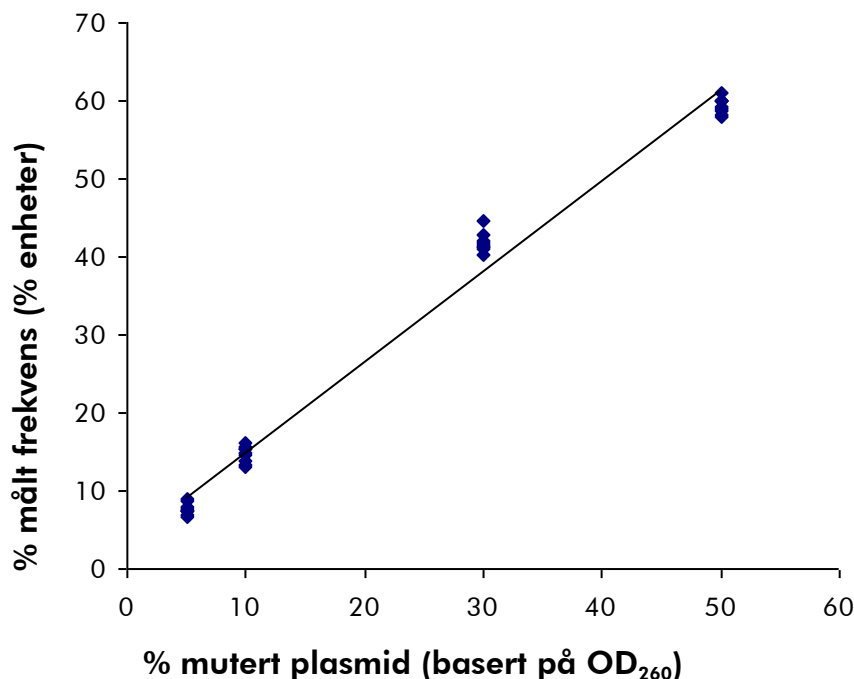
Merk: Det er anbefalt at metodeytelsen bekreftes i laboratoriet.

Linearitet

Linearitet ble bestemt ved å bruke plasmidblandinger som bar villtypen eller den muterte sekvensen for mutasjonene GGC>AGC i kodon 719, ACG>ATG i kodon 790, CTG>CGG i kodon 858 og delesjonene 2235del15 og 2236del15 i ekson 19. Plasmidene ble blandet i riktig forhold for å gi fire mutasjonsnivåer (5, 10, 30 og 50 %). Hver blanding ble analysert med tre forskjellige partier av *therascreen* EGFR Pyro-settet i tre pyrosekvenseringsserier med tre replikater hver.

Resultatene (n = 9 for hvert mutasjonsnivå) ble analysert i henhold til CLSI Guideline EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Evaluering av linearitet til kvantitative måleprosedyrer: En statistisk fremgangsmåte. Godkjente retningslinjer) ved å bruke Analyse-it[®]-programvaren v2.21 og vises i figur 15 for delesjonen 2235del15 i ekson 19.

Resultatene var lineære innen en tillatt ikke-linearitet på 5 % enheter i det testede området på 5 til 50 % mutasjonsnivå. Lignende resultater ble oppnådd for mutasjonene GGC>AGC i kodon 719, ACG>ATG i kodon 790, CTG>CGG i kodon 858 og delesjonen 2236del15 i ekson 19.



Figur 15. Linearitet for delesjon 2235del15 i ekson 19.

Presisjon

Presisjonsdataene gjør det mulig å bestemme analysenes totale variasjon og ble oppnådd på tre forskjellige nivåer ved å analysere de ovennevnte plasmidblandingene med tre replikater hver.

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

Presisjonsestimater uttrykkes som standardavvik for de målte mutasjonsfrekvensene i % enheter (tabell 10). Repeterbarheten, den intermediære presisjonen og reproduserbarheten for delesjonen 2235del15 i ekson 19 var henholdsvis 0,8–1,2, 0,7–2,9 og 0,7–1,8 % enheter i det målte området på 5 til 50 % mutasjonsnivå. Lignende resultater ble oppnådd for mutasjonene GGC>AGC i kodon 719, ACG>ATG i kodon 790, CTG>CGG i kodon 858 og delesjonen 2236del15 i ekson 19.

Tabell 10. Presisjon for delesjonen 2235del15 i ekson 19*

% mutert plasmid [†]	Repeterbarhet		Intermediær presisjon		Reproduserbarhet	
	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA	Gjennomsnitt	SA
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

* Alle verdier er angitt som % enheter. SD: standardavvik (n = 9).

[†] Basert på OD₂₆₀-måling.

Diagnostisk vurdering

therascreen EGFR Pyro-settet ble vurdert til sammenligning med Sanger-sekvensering og *therascreen* EGFR RGQ-settet. DNA ble ekstrahert fra 100 formalinfikserte, parafinlagrede (FFPE) tumorprøver fra ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) og analysert for mutasjoner i kodon 719, 768, 790 og 858–861, og delesjoner og komplekse mutasjoner i ekson 19.

DNA ble isolert ved å bruke QIAamp DNA FFPE Tissue-settet. Analyser ble utført med *therascreen* EGFR Pyro-settet på PyroMark Q24, med *therascreen* EGFR RGQ-settet på Rotor Gene-Q 5plex HRM serie II og Sanger-sekvensering ble utført på ABI® 3130 genanalyseapparat.

Blant 100 prøver som ble analysert, kunne mutasjonsstatus bestemmes for alle kodoner og eksoner 19 i 97 prøver med alle tre metoder. For to prøver kunne ikke mutasjonsstatus for kodon 768 bestemmes med pyrosekvensering, og én prøve ble ikke godkjent for de fleste kodoner med alle tre metoder, noe som kan tyde på at DNA-kvaliteten var for dårlig til at amplifikasjon var mulig.

Resistensmutasjon T790M ble detektert i én prøve med alle tre metoder, mens mutasjon L861Q ble detektert i én prøve bare med pyrosekvensering. Tretten, tolv og seksten delesjoner og komplekse mutasjoner i ekson 19 ble detektert med henholdsvis pyrosekvensering, Rotor-Gene Q og Sanger-sekvenseringsanalyse. Tre av delesjonene for ekson 19 som Sanger-sekvensering detekterte kunne ikke gjenskapes med både Rotor-Gene Q og Sanger-sekvenseringsanalyse. Mutasjon L858R ble detektert i tre prøver med alle tre metoder, i to prøver med pyrosekvensering og en av de andre metodene, i én prøve med bare pyrosekvensering og i én prøve med bare Rotor-Gene Q-analyse. Resultatene er illustrert i tabell 11–14.

Ingen mutasjoner ble detektert i kodon 719 og 768 i de 100 prøvene med noen av de tre metodene.

Med unntak av prøver som ikke ble godkjent i én eller flere metoder, viste *therascreen* EGFR Pyro-settet og Sanger-sekvenseringen 100 %, 98 %, 99% og 97 % overensstemmelse i resultater for henholdsvis kodon 790, 858, 861 og ekson 19, mens *therascreen* EGFR Pyro-settet og *therascreen* EGFR RGQ-settet viste 100 %, 97 %, 99 % og 99 % overensstemmelse i resultater for henholdsvis kodon 790, 858, 861 og ekson 19 (tabell 11–14).

Tabell 11. Resultater for de analyserte prøvene av hudtumor for kodon 790

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-sett	Mutant	1	0	1	2
	Villtype	0	98	0	98
	Ukjent	0	0	0	0
	Totalt	1	98	1	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ-sett			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-sett	Mutant	1	0	1	2
	Villtype	0	98	0	98
	Ukjent	0	0	0	0
	Totalt	1	98	1	100

Tabell 12. Resultater for de analyserte prøvene av hudtumorer for kodon 858

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro- sett	Mutant	4	2	0	6
	Villtype	0	93	0	93
	Ukjent	0	0	1	1
	Totalt	4	95	1	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ-sett			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro- sett	Mutant	4	2	0	6
	Villtype	1	92	0	93
	Ukjent	0	1	0	1
	Totalt	5	95	0	100

Tabell 13. Resultater for de analyserte prøvene av hudtumor for kodon 861

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-sett	Mutant	0	1	0	1
	Villtype	0	98	0	98
	Ukjent	0	1	0	1
	Totalt	0	100	0	100
		<i>therascreen</i> EGFR RGQ-sett			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Pyro-sett	Mutant	0	1	0	1
	Villtype	0	98	0	98
	Ukjent	0	0	1	1
	Totalt	0	99	1	100

Tabell 14. Resultater for de analyserte prøvene av hudtumor for kodon 19

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
therascreen EGFR Pyro-sett	Mutant	13	0	0	13
	Villtype	3	84	0	87
	Ukjent	0	0	0	0
	Totalt	16	84	0	100
		therascreen EGFR RGQ-sett			
		Mutant	Villtype	Ukjent	Totalt
therascreen EGFR Pyro-sett	Mutant	12	1	0	13
	Villtype	0	86	1	87
	Ukjent	0	0	0	0
	Totalt	12	87	1	100




Merk: I alle serier brukt til å bestemme ytelseskarakteristikker, ble signalet på over 20 RLU for analysen for kodon 768, og over 30 RLU for de fire resterende analysene, oppnådd fra 10 ng av DNA isolert fra formalinfiksert, parafinlagret (FFPE) vev. Pyrosekvenseringsdataene ble analysert ved å bruke EGFR plug-in-rapporten.

Referanser

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

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

Symboler

 Σ	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til $\langle N \rangle$ tester
	Skal brukes innen
IVD	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
REF	Katalognummer
LOT	Partinummer (lot)
MAT	Materialnummer
COMP	Komponenter
CONT	Innhold
NUM	Nummer
NaOH	Natriumhydroksyd
GTIN	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent
	Se informasjonen som gis i håndboken

Kontaktinformasjon

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

Vedlegg A: Oppsett av *therascreen* EGFR Pyro-analyser

Hvis EGFR plug-in-rapporten er installert, er forhåndsdefinerte analyseoppsett for kodon 719, 768, 790 og 858–861 og delesjoner i ekson 19 tilgjengelige i PyroMark Q24-programvarens snarveifunksjon under banen "Example Files/PyroMark Setups/EGFR" (Eksempelfiler/PyroMark-oppsett/EGFR).

Følgende trinn trenger ikke utføres: Du kan be om EGFR plug-in-rapporten ved å sende en e-post til pyro.plugin@qiagen.com.

Vi anbefaler på det sterkeste å bruke EGFR plug-in-rapporten fremfor manuell analyse. Komplekse mutasjoner kan ikke legges til manuelt til en "Sequence to Analyze" (Analysesekvens), men må analyseres ved hjelp av plug-in-rapporten. Etter installeringen av plug-in-rapporten eller hver gang en ny programvare installeres eller oppgraderes på datamaskinen, bør plug-in-funksjonene testes slik det er beskrevet i hurtigveiledningen for EGFR plug-In.

Hvis EGFR plug-in-rapporten ikke er installert, må analysefilen angis manuelt før *therascreen* EGFR Pyro-analysen kjøres første gang. Angi analyse for EGFR-kodon 719, -kodon 768, -kodon 790 og -kodon 858–861 og delesjoner i ekson 19 ved å bruke PyroMark Q24-programvaren som beskrevet nedenfor.

Prosedyre

EGFR-kodon 719

A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).

A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).

DGCTCCGGTGC

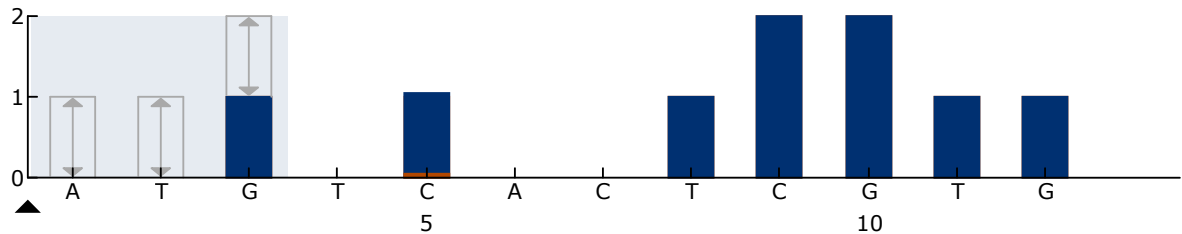
Merk: De hyppigste mutasjonene i kodon 719 vil bli påvist i nukleotid 2155 ved hjelp av "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).

"Sequence to Analyze" (Analysesekvens) kan endres etter analysen for å analysere mutasjoner ved nukleotid 2156. Hvis du vil kontrollere om mutasjoner er til stede i nukleotid 2156, kan du endre "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) til følgende sekvens:

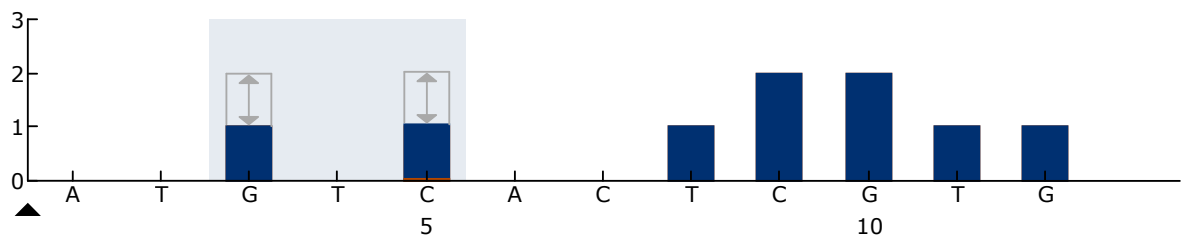
GSCTCCGGTGC

Merk: Se til at terskelen for enkelttopphøyder er angitt til 30 RLU. I tillegg kan du kontrollere at høydene på histogramøyene er justert riktig (se instruksjonene nedenfor).

**A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order"
(Fordelingsrekkefølge):
ATGTCACTCGTG**



Figur 16. Histogram for kodon 719 (nukleotid 2155) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) DGCTCCGGTGC. Det røde rektangelet nederst på søylen ved fordeling C5 illustrerer justeringen av høyder på histogrammsøylen.



Figur 17. Histogram for kodon 719 (nukleotid 2156) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) GSCTCCGGTGC. Det røde rektangelet nederst på søylen ved fordeling C5 illustrerer justeringen av høyder på histogrammsøylen.

A4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Toppghøydeterskel – Nødvendig toppghøyde for godkjent kvalitet) til 30.

A5. I histogrammet kan du bevege musemarkøren i den øvre delen av søylen ved fordeling C5, og klikke mens du holder nede "Ctrl"-knappen. Et lite vindu viser standardhøyden på histogrammsøylen (1,00). Øk nivået til 1,04 for "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) DGCTCCGGTGC og til 2,04 for "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) GSCTCCGGTGC.

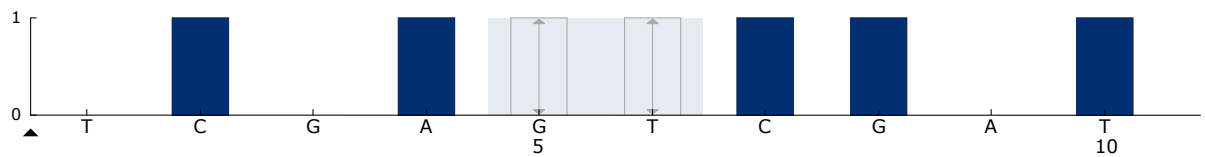
A6. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "EGFR codon 719".

EGFR-kodon 768

A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).

**A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).
CAKCGTG**

A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):
TCGAGTCGAT



Figur 18. Histogram for kodon 768 (nukleotid 2303) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CAKCGTG.

A4. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "EGFR codon 768".

EGFR-kodon 790

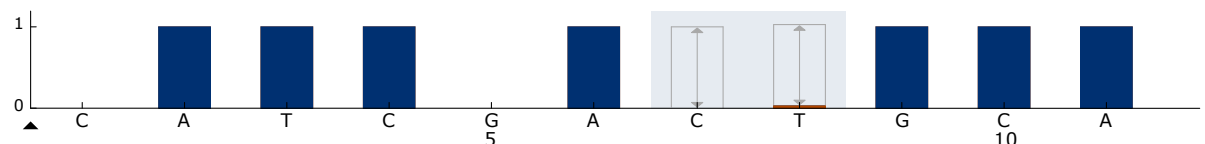
A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).

A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).

ATCAYGCAG

A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):

CATCGACTGCA




Figur 19. Histogram for kodon 790 (nukleotid 2369) med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) ATCAYGCAG. Det røde rektangelet nederst på søylen ved fordeling T8 illustrerer justeringen av høyder på histogrammsøylen.

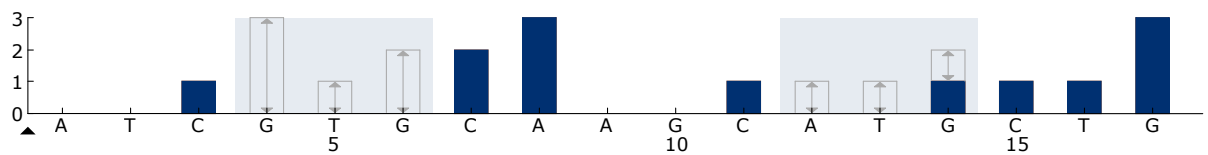
A4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Toppghøydeterskel – Nødvendig topphøyde for godkjent kvalitet) til 30.

A5. I histogrammet kan du bevege musemarkøren i den øvre delen av søylen ved fordeling T8, og klikke mens du holder nede "Ctrl"-knappen. Et lite vindu viser standardhøyden på histogrammsøylen (1,00). Øk nivået til 1,03.


A6. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "EGFR codon 790".

EGFR-kodon 858–861


- A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).
CKGGCCAAACDGCTGGGT
- A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order" (Fordelingsrekkefølge):
ATCGTGCAAGCATGCTG



Figur 20. Histogram for kodon 858–861 med "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) CKGGCCAAACDGCTGGGT.

- A4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Toppghøydeterskel – Nødvendig topphøyde for godkjent kvalitet) til 30.
- A5. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "EGFR codons 858–861".

EGFR delesjoner i ekson 19

- A1. Klikk på  i verktøylinjen og velg "New AQ Assay" (Ny AQ-analyse).
- A2. Skriv inn følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (Analysesekvens).

TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

Den hyppigste delesjonen i ekson 19 er 2235del15. Hvis du vil analysere andre delesjoner, må "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) endres i henhold til hver angitte delesjon.

Bruke villtypesekvensen:

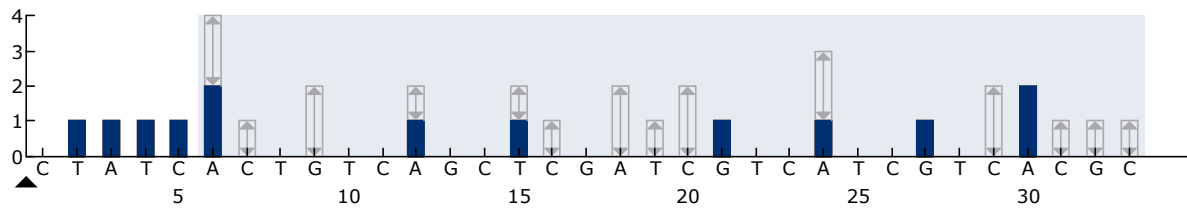
**TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA
ATCCTCGAT**, og legg til firkantparenteser der delesjonen starter og slutter.

Endre "Sequence to Analyze" (Analysesekvens) for den nest hyppigste delesjonen i ekson 19 (2236del15) til følgende sekvens:

TATCAAG[GAATTAAGAGAAGCA]ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

**A3. Legg inn manuelt følgende "Dispensation Order"
(Fordelingsrekkefølge):**

CTATCACTGTCAGCTCGATCGTCATCGTCACGC




Figur 21. Histogram for delesjoner i ekson 19.

A4. Klikk på fanen "Analysis Parameters" (Analyseparametere) og øk "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Topp høydeterskel – Nødvendig topphøyde for godkjent kvalitet) til 30.

A5. Klikk på  i verktøylinjen og lagre analysen som "EGFR Exon 19 del".

Vedlegg B: Tømming av avfallsbeholder og kar

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

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

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

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

Statlige og lokale miljøkrav til håndtering av laboratorieavfall må overholdes.

Viktige poeng før du starter

- Denne protokollen krever vann med høy renhetsgrad (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com eller tilsvarende).

Prosedyre

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

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit (24)	For 24 reaksjoner på PyroMark Q24-systemer: Sekvenseringsprimer, PCR-primere, umetylert kontroll-DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad-konsentrat, PyroMark bindingsbuffer, PyroMark hybridiseringsbuffer, PyroMark denatureringsløsning, PyroMark vaskebuffer, enzymblanding, substratblanding, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP og H ₂ O	971480
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbasert deteksjonsplattform for pyrosekvensering av 24 prøver parallelt	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumarbeidsstasjon (220 V) for klargjøring av 24 prøver parallelt, fra PCR-produkt til enkelttrådet templat	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Brukerorientert programvare	9019063
PyroMark Q24 Software	Analyseprogramvare	9019062
Tilbehør		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-brønners reaksjonsplate til sekvensering	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter til pipettering av nukleotider og reagenser	979302

* Kun Storbritannia

† Alle andre land

Produkt	Innhold	Katalognr.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Filterprober til flergangsbruk for PyroMark vakuumarbeidsstasjon Q96 og Q24	979010
PyroMark Control Oligo	For installasjonskontroll av systemet	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	For bekreftelse av systemytelse	979304
Tilknyttede produkter		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute [®] -kolonner, Proteinase K, buffere, prøverør (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Til 48 klargjøringer: Reagenskassetter (vev), filterspisser til engangsbruk, spissholdere til engangsbruk, prøverør (2 ml), elusjonsrør (1,5 ml), buffer G2, proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini Spin-kolonner, buffere, reagenser, rør, VacConnectors	61104

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

Denne siden skal være tom

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

Begrenset lisensavtale

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

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

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN. Med enerett.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

