

Handleiding *therascreen*[®] KRAS Pyro[®] Kit



Versie 1



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik



REF 971460

HB 1061825NL

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R3 **MAT** 1061825NL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster- en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN zet de toon voor:

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek met microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Het is ons doel om u in staat te stellen uitstekende resultaten en doorbraken te bereiken. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoud

Beoogd gebruik	5
Samenvatting en uitleg	5
Uitgangspunt van de procedure	6
Meegeleverde materialen	8
Inhoud van de kit	8
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	10
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	11
Veiligheidsinformatie	11
Algemene voorzorgsmaatregelen	12
Opslag en verwerking van reagentia	13
Opslag en verwerking van monsters	14
Procedure	15
DNA-isolatie	15
Protocol 1: Runconfiguratie voor het PyroMark Q24-systeem	16
Protocol 2: PCR met gebruik van de PCR-reagentia die zijn meegeleverd met de <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	19
Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance-korrels	22
Protocol 4: Bereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse met de PyroMark Q24	24
Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken	29
Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run	31
Interpretatie van de resultaten	35
Interpretatie van analyseresultaten en detectie van low-level mutaties	35
Problemen oplossen	40
Kwaliteitscontrole	44
Beperkingen	44
Prestatiekenmerken	45
Blancolimiet en detectielimiet	45
Lineariteit	47
Intermediaire nauwkeurigheid	47

Diagnostische evaluatie	48
Referenties	49
Symbolen	50
Contactgegevens	50
Appendix A: <i>therascreen</i> KRAS Pyro Assays configureren	51
Appendix B: De afvalcontainer en bakjes legen	54
Bestelgegevens	56

Beoogd gebruik

De *therascreen* KRAS Pyro Kit is een *in vitro*, sequentiegebaseerde nucleïnezuurdetectietest op basis van Pyrosequencing®-technologie voor de kwantitatieve detectie van mutaties in codon 12, 13 en 61 van het menselijke KRAS-gen in genomisch DNA afkomstig uit menselijke weefselmonsters.

De *therascreen* KRAS Pyro Kit is bedoeld als hulpmiddel bij het vaststellen of patiënten met colorectale kanker waarschijnlijk meer baat hebben bij anti-EGFR-behandelingen, zoals panitumumab en cetuximab. Voor in-vitrodiagnostisch gebruik.

Kan alleen worden gebruikt met het PyroMark® Q24-systeem. PyroMark Q24-systemen omvatten het volgende:

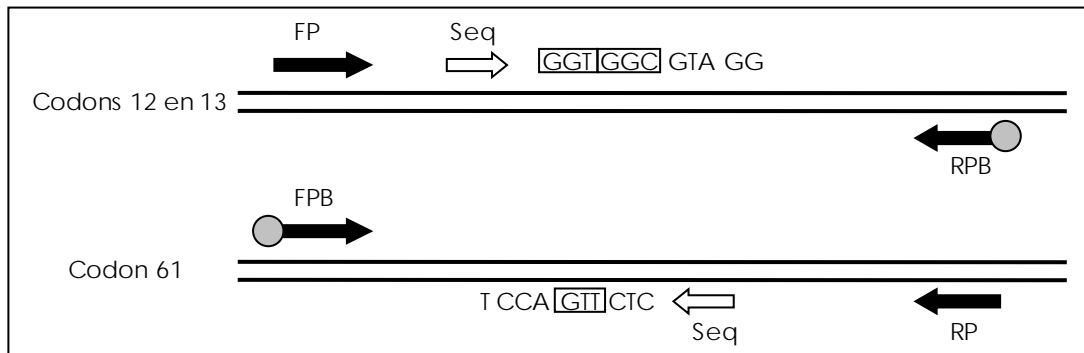
- Het PyroMark Q24-instrument en het PyroMark Q24 MDx-instrument.
- Het PyroMark Q24 Vacuum Workstation en het PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- De PyroMark Q24-software (versie 2.0) en PyroMark Q24 MDx-software (versie 2.0).

Dit product is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers, zoals analisten en artsen die zijn opgeleid op het gebied van in-vitrodiagnostiek, moleculair-biologische technieken en het PyroMark Q24-systeem.

Samenvatting en uitleg

Dankzij de goedkeuring van de Europese Commissie voor het in de handel brengen van panitumumab en cetuximab voor de behandeling van gemetastaseerde darmkanker bij patiënten met het niet-gemuteerde (wildtype) KRAS-gen wordt er in Europa veel aandacht besteed aan de analyse van KRAS-mutaties. Dit betekent dan panitumumab en cetuximab alleen kan worden gegeven aan patiënten van wie de KRAS-mutatiestatus is gescreend.

De *therascreen* KRAS Pyro Kit met CE-IVD-keurmerk is bedoeld voor kwantitatieve metingen van mutaties in codon 12, 13 en 61 van het menselijke KRAS-gen. Het product bestaat uit twee assays: een voor het detecteren van mutaties in codon 12 en 13 en de tweede voor het detecteren van mutaties in codon 61 (Afbeelding 1). De twee regio's worden afzonderlijk geamplificeerd met behulp van PCR en gesequenteerd door de opgegeven regio. De sequenties rondom de opgegeven posities dienen als normalisatie- en referentiepieken voor kwantificering en kwaliteitsbeoordeling van de analyse.



Afbeelding 1. Illustratie van de KRAS-assay. De aangegeven sequentie is de geanalyseerde sequentie voor een wildtype monster. FP en FPB: Forward PCR-primers (B duidt op biotinylering); RP en RPB: Reverse PCR-primers (B duidt op biotinylering); Seq: Sequentiëringsprimers.

Opmerking: codon 12 en 13 zijn gesequentieerd in voorwaartse richting en codon 61 in omgekeerde richting.

Het product bestaat uit een PCR-primermengsel en een sequentiëringsprimer voor elk assay. De primers worden geleverd in een oplossing. Elke flacon bevat 24 µl primer of primermengsel.

Uitgangspunt van de procedure

In het werkschema wordt de assayprocedure uitgebeeld. Na het uitvoeren van PCR met behulp van primers die zich richten op codon 12/13 en codon 61, worden de amplicons geïmmobiliseerd op Streptavidin Sepharose® High Performance-korrels. Daarna wordt enkelstrengs-DNA bereid en hybridiseren de overeenkomende sequentiëringsprimers aan het DNA. De monsters worden vervolgens geanalyseerd door het PyroMark Q24-systeem met behulp van een runconfiguratiebestand en een runbestand.

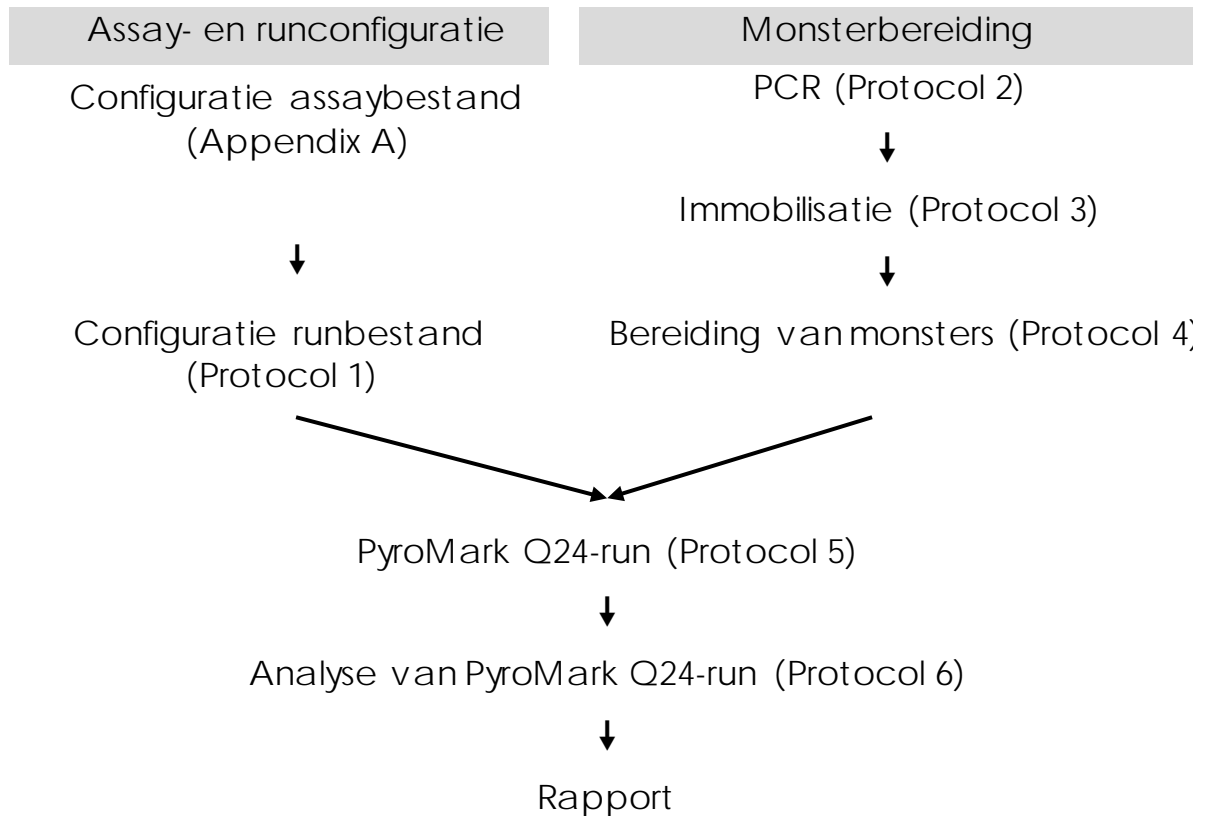
Voor het analyseren van de run wordt aanbevolen om het KRAS-invoegrapport te gebruiken. Het KRAS-invoegrapport kan per e-mail worden opgevraagd via pyro.plugin@qiagen.com.

De run kan echter ook worden geanalyseerd met behulp van het analysehulpmiddel van het PyroMark Q24-systeem. De 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) kan worden ingesteld voor het detecteren van verschillende mutaties na de run (zie 'Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run' op pagina 31).

Opmerking: het werkschema is iets aangepast ten opzichte van de *handleiding van de PyroMark KRAS Kit* en revisie R1 van de *handleiding van de KRAS Pyro Kit* (zie 'Protocol 2: PCR using the PCR reagents supplied with the *therascreen* KRAS Pyro Kit' op pagina 19 en 'Protocol

4: Bereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse met de PyroMark Q24' op pagina 24).

Werkschema van de *therascreen* KRAS Pyro-procedure



Controles

De kit bevat ongemethyleerd controle-DNA als positieve controle voor PCR- en sequentiëringsreacties. Dit controlemonster heeft een wildtype genotype in de regio's die zijn gesequenteerd met deze kit en is vereist voor adequate interpretatie van resultaten en identificatie van low-level mutaties (zie 'Interpretation of Results' op pagina 35). Verwerk in alle Pyrosequencing-runs voor elk assay een monster met ongemethyleerd controle-DNA.

Ook moet er voor ten minste een assay een negatieve controle (zonder template-DNA) worden verwerkt in elke PCR-configuratie.


Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

therascreen KRAS Pyro Kit (doos 1/2)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
Catalogusnr.	971460
Aantalreacties	24
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Ongemethyleerd controle-DNA, 10 ng/µl)	100 µl

therascreen-buffers en -reagentia (doos 2/2)

<i>therascreen</i> -buffers en -reagentia		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 flacon
Substrate Mixture		1 flacon
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Handleiding		1

* Bevat natriumhydroxide.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

- DNA-isolatiekit (zie 'DNA-isolatie' op pagina 15)
- Pipetten (afstelbaar)*
- Steriele pipettips (met filters voor PCR-configuratie)
- Microcentrifuge werkbankmodel*
- Thermocycler* en geschikte PCR-buisjes
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, cat.nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (cat.nr. 9001513 of 9001514)*†
- PyroMark Q24 Software (cat.nr. 9019063 of 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (cat.nr. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (cat.nr. 979302)†
- PyroMark Q24-vacuümwerkstation (cat.nr. 9001515 of 9001517)*†
- Plaatmixer* voor immobilisatie aan korrels
- Verwarmingsblok* dat 80 °C kan bereiken
- PCR-plaat of -strips met 24 wells
- Stripdopjes
- Hoog-zuiver water (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm of vergelijkbaar).
Opmerking: in de kit wordt voldoende water meegeleverd voor PCR, DNA-immobilisatie en voor het oplossen van het enzymmengsel en het substraatmengsel; er is extra hoog-zuiver water nodig om PyroMark Wash Buffer 10x te verdunnen.
- Ethanol (70%)‡

* Controleer of de instrumenten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

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

‡ Gebruik geen gedenatureerde alcohol. Dit bevat namelijk andere stoffen, zoals methanol of methylethylketon.

Aanbevolen plaatmixers

De plaatmixers die worden weergegeven in tabel 1 worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Tabel 1. Plaatmixers die worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* KRAS Pyro Kit

Fabrikant	Product	Catalogusnummer
Eppendorf	Thermomixer comfort (Basisapparaat)	5355 000.011
	Thermoblok voor MTP	5363 000.012
	Adapterplaat voor PCR-buisjes van 96 x 0,2 ml die in blokken voor microtiterplaten kan worden geplaatst	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op onderdelen van de *therascreen* KRAS Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution



Waarschuwing! Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Kan bijtend zijn voor metalen. Voorkom morsen om schade aan het materiaal te voorkomen. Bewaar dit product uitsluitend in de originele verpakking. Draag beschermende handschoenen / beschermende kleding / oogbescherming / gezichtsbescherming.

PyroMark Enzyme Mixture



Bevat: (R*,R*)-1,4-dimercaptobutaan-2,3-diol; azijnzuur. Gevaar! Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogschade. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. NA (mogelijke) blootstelling: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Trek verontreinigde kleding uit en was deze voordat u ze opnieuw aantrekt. Draag beschermende handschoenen / beschermende kleding / oogbescherming / gezichtsbescherming.

PyroMark Substrate Mixture



Bevat: azijnzuur. Waarschuwing! Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen. Trek verontreinigde kleding uit en was deze voordat u ze opnieuw aantrekt. Draag beschermende handschoenen / beschermende kleding / oogbescherming / gezichtsbescherming.

Algemene voorzorgsmaatregelen

Opmerking: houd als gebruiker altijd rekening met de volgende punten:

- Om optimale resultaten te verkrijgen, moeten de instructies in de gebruikershandleiding strikt worden opgevolgd. Verdere verdunning van de reagentia dan de verdunning zoals die in deze handleiding wordt aangegeven, wordt niet aanbevolen en leidt tot slechtere prestaties.

- Het werkschema is iets aangepast (zie 'Protocol 2: PCR met gebruik van de *therascreen* KRAS Pyro Kit' op pagina 19 en 'Protocol 4: Bereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse met de PyroMark Q24' op pagina 24) ten opzichte van de *handleiding van de PyroMark KRAS Kit* en revisie R1 van de *handleiding van de theascreen KRAS Pyro Kit*.
- Dit product bevat voldoende onderdelen om de 24 reacties uit te voeren in maximaal 5 afzonderlijke runs.
- Gebruik steriele pipettips met filters (voor PCR-configuratie).
- Bewaar en extraheer positief materiaal (monsters, positieve controles en amplicons) apart van alle andere reagentia en voeg het in een ruimtelijk gescheiden faciliteit aan het reactiemengsel toe.
- Ontdooi alle bestanddelen volledig bij kamertemperatuur (15–25 °C) voordat u een assay start.
- Meng de ontdooide bestanddelen (door de pipet herhaaldelijk op en neer te bewegen of de bestanddelen te mengen met een pulse-vortexmixer) en centrifugeer ze kortdurend.
- Mislukte resultaten vormen geen basis voor het beoordelen van de mutatiestatus.

Opslag en verwerking van reagentia

De *therascreen* KRAS Pyro Kit wordt in 2 dozen verzonden. De *therascreen* KRAS Pyro Kit (doos 1/2) wordt verzonden op droogijs. PyroMark PCR-mastermengsel, CoralLoad-concentraat, ongemethyleerd controle-DNA en alle primers moeten direct na aankomst worden bewaard bij -30 °C tot -15 °C.

De doos met *therascreen*-buffers en reagentia (doos 2/2) met daarin *therascreen*-buffers, enzymmengsel, substraatmengsel, dATP α S, dCTP, dGTP en dTTP (de reagentia voor Pyrosequencing-analyse) worden verzonden met koelelementen. Deze onderdelen moeten direct na aankomst worden bewaard bij 2–8 °C. Om activiteitsverlies te beperken, wordt geadviseerd om zowel het enzymmengsel als het substraatmengsel in de meegeleverde flacons te bewaren.

Gereconstitueerde enzym- en substraatmengsels zijn ten minste 10 dagen stabiel bij 2–8 °C en kunnen worden ingevroren en bewaard in de flacons bij -30 tot -15 °C. Bevroren reagentia mogen niet vaker dan 3 keer worden bevroren en ontdooid.

Opmerking: nucleotiden mogen niet worden ingevroren.

Bij deze opslagcondities is de *therascreen* KRAS Pyro Kit stabiel tot de vermelde vervaldatum.

Opslag en verwerking van monsters

Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk besmettelijk materiaal.

Het monstermateriaal bestaat uit menselijk DNA dat is geëxtraheerd uit bloed of in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) monsters.

Gebruik geen monsters die afkomstig zijn van mensen die worden behandeld met heparine. Gebruik geen monsters die zijn afgenomen in buisjes met heparine als antistollingsmiddel. Heparine beïnvloedt de PCR.

Procedure

DNA-isolatie

De werking van het systeem is vastgesteld met behulp van de EZ1® DNA Tissue Kit en de QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit voor extractie van menselijk DNA uit in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde tumormonsters. De werking van het QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit-systeem is vastgesteld met behulp van bloedmonsters van gezonde donoren die gedeeltelijk zijn verrijkt met tumorcellen.

De QIAGEN®-kits die worden vermeld in tabel 2 worden aanbevolen voor het zuiveren van DNA uit de aangegeven types menselijke monsters. Dit DNA kan vervolgens worden gebruikt met de *therascreen* KRAS Pyro Kit. Zuiver het DNA volgens de instructies in de handleidingen van de betreffende kits.

Tabel 2. DNA-zuiveringskits die worden aanbevolen voor gebruik met de *therascreen* KRAS Pyro Kit

Monstermateriaal	Kit voor nucleïnezuurisolatie	Catalogusnummer (QIAGEN)
In paraffine ingebed weefsel	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Bloed	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Volg het protocol voor gebruik met in paraffine ingebed weefsel. De EZ1 DNA Tissue Kit moet worden gebruikt in combinatie met de EZ1 Advanced (cat.nr. 9001410 of 9001411) en de EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (cat.nr. 9018298), met de EZ1 Advanced XL (cat.nr. 9001492) en de EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (cat.nr. 9018700) of met de BioRobot® EZ1 (cat.nr. 9000705; niet meer verkrijgbaar) en de EZ1 DNA Paraffin Section Card (cat.nr. 9015862).

† Met CE-IVD-keurmerk volgens EU-richtlijn 98/79/EG.

Protocol 1: Runconfiguratie voor het PyroMark Q24-systeem


Wat u moet weten voordat u begint


- Indien vereist, kan de LOB worden bevestigd door een volledige plaat met resultaten te genereren met behulp van een wildtype monster. Raadpleeg de CLSI-richtlijn EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protocol voor het vaststellen van detectielimieten en kwantificeringslimieten; goedgekeurde richtlijn) voor meer informatie.

Wat u moet doen voordat u begint

- Maak een assayconfiguratie (zie appendix A, pagina 51) als het KRAS-invoegrapport niet is geïnstalleerd. Dit hoeft u maar een keer te doen voordat de *therascreen* KRAS Pyro-assays voor de eerste keer worden uitgevoerd. Als het KRAS-invoegrapport wel is geïnstalleerd, zijn er vooraf gedefinieerde assayconfiguraties beschikbaar via de snelkoppelingbrowser in de PyroMark Q24-software via het pad 'Example Files/PyroMark Setups/KRAS' (Voorbeeldbestanden/PyroMark-configuraties/KRAS). Het KRAS-invoegrapport kan per e-mail worden opgevraagd via pyro.plugin@qiagen.com.

Procedure

1. Klik op  in de werkbalk.
Er wordt een nieuw runbestand gemaakt.
2. Voer de runparameters in (zie 'Runparameters' op pagina 17).
3. Configureer de plaat door voor zowel codon 12/13 als codon 61 assays toe te voegen aan wells die overeenkomen met de monsters die u wilt analyseren.
Opmerking: in elke PCR-configuratie moet voor ten minste een assay een negatief controlemonster (zonder template-DNA) worden verwerkt.
Opmerking: verwerk in alle Pyrosequencing-runs voor elk assay een monster met ongemethyleerd controle-DNA (zie 'Controles' op pagina 7).
4. Druk een lijst af met de vereiste volumes voor enzymmengsel, substraatmengsel en nucleotiden en de plaatconfiguratie wanneer de run is geconfigureerd en kan worden uitgevoerd met het

PyroMark Q24-systeem. Selecteer 'Pre Run Information' (Pre-runinformatie) in het menu 'Tools' (Hulpmiddelen) en klik op  zodra het rapport wordt weergegeven.

5. Sluit het runbestand en kopieer dit met behulp van Windows® Verkenner naar een USB-stick (meegeleverd met het systeem).
Opmerking: de afgedrukte pre-runinformatie kan worden gebruikt als sjabloon voor de monsterconfiguratie (zie 'Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance-korrels' op pagina 22).

Zie 'Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken' op pagina 29 om de plaat uit te voeren met het PyroMark Q24-systeem.

Runparameters

Run name (Runnaam):	De naam die de run krijgt als het bestand wordt opgeslagen. Als de naam van het bestand wordt gewijzigd, wordt de naam van de run ook gewijzigd.
Instrument method (Instrumentmethode):	Selecteer de instrumentmethode die hoort bij de cartridge die voor de run wordt gebruikt. Zie de instructies die zijn meegeleverd met de producten.
Plate ID (Plaat-ID):	Optioneel: voer de ID van de PyroMark Q24-plaat in.
Bar code (Streepjescode):	Optioneel: voer een streepjescodenummer voor de plaat in of, als u een streepjescodelezer op uw computer hebt aangesloten, plaats de muiscursor in het tekstvak 'Barcode' (Streepjescode) door op het vak te klikken en scan de streepjescode.
Kit-ID:	Optioneel: voer het partijnummer in van de <i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit die wordt gebruikt. Dit partijnummer vindt u op het productetiket. Opmerking: wij adviseren om zowel de reagens-ID als de kit-ID in te voeren, zodat eventuele onverwachte problemen met de reagentia kunnen worden getraceerd.
Run note (Runopmerking):	Optioneel: voer een opmerking in over de inhoud of doelstelling van de run.

Assaybestanden toevoegen

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

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

Elke well is voorzien van een kleurcodering volgens de assay die voor die well is geladen.

Monster-ID's en opmerkingen invoeren

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

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

Protocol 2: PCR met gebruik van de PCR-reagentia die zijn meegeleverd met de *therascreen* KRAS Pyro Kit

Dit protocol is bedoeld voor PCR-amplificaties van een regio met codon 12 en codon 13 en een aparte PCR-amplificatie van een regio met codon 61 met behulp van de *therascreen* KRAS Pyro Kit.

Wat u moet weten voordat u begint

- Het werkschema is iets aangepast ten opzichte van de *handleiding van de PyroMark KRAS Kit* (stap 5).
- De HotStarTaq®-DNA-polymerase in de PyroMark Master Mix moet 15 minuten bij 95 °C worden geactiveerd.
- Zet alle reactiemengsels klaar in een ruimte die is gescheiden van de ruimte die wordt gebruikt voor DNA-zuivering. Voeg voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse template-DNA toe aan de PCR, PCR-productanalyse of monsterbereidingen.
- Gebruik wegwerptips met hydrofobe filters om het risico op kruisbesmetting te minimaliseren.

Wat u moet doen voordat u begint

- Centrifugeer de buisjes met PCR-primers kortdurend voordat u ze opent om ervoor te zorgen dat alle inhoud onderin de buisjes terecht komt.
- Pas de concentratie van het controle-DNA en monster-DNA eventueel aan naar 0,4–2 ng/µl.

Procedure

1. Ontdooi alle benodigde reagentia (zie tabel 3).
Goed mengen voor gebruik.
2. Bereid een reactiemengsel voor elke PCR-primerset volgens tabel 3. Het reactiemengsel bevat doorgaans alle bestanddelen die nodig zijn voor PCR, behalve het monster.
Bereid een reactiemengsel met een volume dat groter is dan het vereiste volume voor het totale aantal PCR-assays dat wordt uitgevoerd.

Tabel 3. Bereiding van reactiemengsel voor elk PCR-primermengsel

Bestanddeel	Volume/reactie (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer KRAS 12/13 of PCR Primer KRAS 61	1,0
Water (H ₂ O, meegeleverd)	4,0
Totaal volume	20,0

- Meng het reactiemengsel grondig en breng 20 µl over naar elk PCR-buisje.

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

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

Opmerking: in elke PCR-configuratie moet voor ten minste een assay een negatief controlemonster (zonder template-DNA) worden verwerkt.

Opmerking: verwerk in alle Pyrosequencing-runs voor elk assay een monster met ongemethyleerd controle-DNA (zie 'Controles' op pagina 7).

Tabel 4. Bereiding van PCR

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

5. Programmeer de thermocycler volgens de instructies van de fabrikant onder de condities die worden beschreven in tabel 5.

Tabel 5. Geoptimaliseerd cyclusprotocol

			Opmerkingen
Eerste activatiestap:	15 minuten	95 °C	Door deze verhittingsstap wordt HotStarTaq-DNA-polymerase geactiveerd.
3-stapscyclus:			
Denaturatie	20 seconden	95 °C	
Hybridisatie	30 seconden	53 °C	
Verlenging	20 seconden	72 °C	
Aantal cycli	42		
Eindverlenging:	5 minuten	72 °C	

6. Plaats de PCR-buisjes in de thermocycler en start het cyclingprogramma.
7. Ga na de amplificatie verder met 'Protocol 3: Immobilisatie van PCR-producten aan Streptavidin Sepharose High Performance-korrels' op pagina 22.

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

Dit is het protocol voor de immobilisatie van template-DNA aan Streptavidin Sepharose High Performance-korrels (GE Healthcare) voorafgaand aan analyse met het PyroMark Q24-systeem.

Wat u moet doen voordat u begint

- Laat alle vereiste reagentia en oplossingen op kamertemperatuur (15–25 °C) komen voordat u begint.

Procedure

1. Schud de fles met Streptavidin Sepharose High Performance voorzichtig totdat de oplossing homogeen is.
2. Bereid een mastermengsel voor DNA-immobilisatie aan de hand van tabel 6. Bereid een volume dat 10% groter is dan het vereiste volume voor het totale aantal reacties dat wordt uitgevoerd.

Tabel 6. Mastermengsel voor DNA-immobilisatie

Bestanddeel	Volume/monster (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Water (H ₂ O, meegeleverd)	28
Totaal volume	70

3. Voeg 70 µl van het mastermengsel toe aan wells van een PCR-plaat of -strips met 24 wells, zoals vooraf gedefinieerd in de runconfiguratie (zie 'Protocol 1: Runconfiguratie voor het PyroMark Q24-systeem' op pagina 16).
4. Voeg 10 µl gebiotinyleerd PCR-product van protocol 2 toe aan elke well met mastermengsel zoals vooraf gedefinieerd in de runconfiguratie (zie 'Protocol 1: Runconfiguratie voor het PyroMark Q24-systeem' op pagina 16).
Opmerking: Het totale volume per well moet 80 µl zijn nadat het mastermengsel en PCR-product zijn toegevoegd.
5. Sluit de PCR-plaat of -strips af met behulp van stripdopjes.

Opmerking: zorg ervoor dat er geen lekkage mogelijk is tussen de wells.

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

Opmerking: bereid het PyroMark Q24-vacuümwerkstation tijdens deze stap voor op monsterbereiding zoals beschreven in de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24*.

7. Ga direct verder met 'Protocol 4: Bereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse met de PyroMark Q24' op pagina 24.

Opmerking: Sepharose-korrels sedimenteren snel. De korrels moet direct na het schudden worden gevangen.

Als er meer dan 1 minuut is verstreken sinds het schudden van de plaat (of strips), moet u de plaat of strips opnieuw 1 minuut schudden voordat u de korrels vangt.

Protocol 4: Bereiding van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse met de PyroMark Q24

Dit is het protocol voor het bereiden van enkelstrengs-DNA en het hybridiseren van de sequentiëringsprimer aan de template voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse met de PyroMark Q24.

Wat u moet weten voordat u begint

- Centrifugeer de buisjes met sequentiëringsprimers kortdurend voordat u ze opent om ervoor te zorgen dat alle inhoud onderin de buisjes terechtkomt.
- Voeg de 2 verschillende sequentiëringsprimers toe in hetzelfde patroon als vooraf voor de plaat is gedefinieerd in de runconfiguratie (zie 'Protocol 1: Run setup for the PyroMark Q24 system' op pagina 16), afhankelijk van het analysegebied (codon 12 en 13 of codon 61).
- Het werkschema is iets aangepast ten opzichte van revisie R1 van de *handleiding van de theascreen KRAS Pyro Kit* (stap 18). Verkort de tijd om de monsters te laten afkoelen niet nadat ze zijn verwarmd tot 80 °C.
- Voer regelmatig de functietest voor de filterprobes uit zoals wordt beschreven in de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* en vervang filterprobes wanneer dit wordt aangegeven.

Wat u moet doen voordat u begint

- Plaats een PyroMark Q24 Plate Holder op een voorverwarmd verwarmingsblok van 80 °C om te gebruiken in stap 17. Plaats een tweede PyroMark Q24 Plate Holder bij kamertemperatuur (15–25 °C) om te gebruiken in stap 18.
- PyroMark Wash Buffer wordt geleverd als een 10x concentraat. Verdun voorafgaand aan het eerste gebruik tot een 1x werkoplossing door 225 ml hoog-zuiver water toe te voegen aan 25 ml 10x PyroMark Wash Buffer (eindvolume van 250 ml).

Opmerking: de 1x PyroMark Wash Buffer-werkoplossing is stabiel bij 2–8 °C tot de aangegeven vervaldatum.

Procedure

1. Verdun voldoende van elke sequentiëringsprimer, Seq Primer KRAS 12/13 en Seq Primer KRAS 61 in PyroMark Annealing Buffer, zoals weergegeven in tabel 7.

Bereid een groter volume verdunde sequentiëringsprimer dan is vereist voor het totale aantal monsters dat moet worden gesequentieerd (voor het aantal reacties plus één extra).

Tabel 7. Voorbeeldverduunning van de sequentiëringsprimers

Bestanddeel	Volume/monster (µl)	Volume voor 9 + 1 reacties (µl)
Seq Primer KRAS 12/13 of Seq Primer KRAS 61	0,8	8
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
Totaal volume	25	250

2. Voeg 25 µl verdunde sequentiëringsprimer toe aan elke well van de PyroMark Q24 Plate, zoals aangegeven in de runconfiguratie (zie 'Protocol 1: Runconfiguratie voor het PyroMark Q24-systeem' op pagina 16).

Opmerking: houd een van de PyroMark Q24 Plate Holders (meegeleverd met het PyroMark Q24 Vacuum Workstation) op kamertemperatuur (15–25 °C) en gebruik deze als ondersteuning bij het voorbereiden en verplaatsen van de plaat.

3. Plaats de PCR-plaat (of -strips) uit protocol 3 en de PyroMark Q24 Plate op de werktafel (Afbeelding 2).

Opmerking: zorg ervoor dat de plaat in dezelfde richting is geplaatst als toen de monsters werden geladen.



Afbeelding 2. Plaatsing van de PCR-plaat (of -strips) en de PyroMark Q24 Plate op het vacuümwerkstation.

4. Activeer het vacuüm op het hulpmiddel door de vacuümschakelaar te openen.
5. Laat de filterprobes van het vacuümhulpmiddel voorzichtig in de PCR-plaat (of -strips) zakken om de korrels met geïmmobiliseerde template te vangen. Houd de probes 15 seconden op hun plaats. Haal het vacuümhulpmiddel er voorzichtig uit.

Opmerking: Sepharose-korrels sedimenteren snel. De korrels moet direct na het schudden worden gevangen.

Als er meer dan 1 minuut is verstreken sinds het schudden van de plaat (of strips), moet u de plaat of strips opnieuw 1 minuut schudden voordat u de korrels vangt.

6. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met 40 ml 70% ethanol (Afbeelding 2). Spoel de filterprobes gedurende 5 seconden.
7. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met 40 ml denaturatieoplossing (Afbeelding 2). Spoel de filterprobes gedurende 5 seconden.
8. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met 50 ml wasbuffer (Afbeelding 2). Spoel de filterprobes gedurende 10 seconden.
9. Breng het vacuümhulpmiddel gedurende 5 seconden omhoog en naar achteren, voorbij een hoek van 90°, om vloeistof uit de filterprobes te laten lopen (Afbeelding 3).



Afbeelding 3. Afbeelding van het vacuümhulpmiddel dat omhoog is gebracht tot een verticale hoek van meer dan 90°.

10. Houd het vacuümhulpmiddel boven de PyroMark Q24 Plate en zet de vacuümschakelaar op Off (Uit).
11. Zorg ervoor dat de korrels in de PyroMark Q24 Plate vrijkomen door de filterprobes in de verdunde sequentiëringsprimer te laten zakken en het hulpmiddel voorzichtig heen en weer te bewegen.
Opmerking: let op dat u het oppervlak van de PyroMark Q24-plaat niet bekrast met de filterprobes.
12. Breng het vacuümhulpmiddel over naar het bakje met hoog-zuiver water (Afbeelding 2) en schud het vacuümhulpmiddel gedurende 10 seconden.
13. Was de filterprobes door ze in hoog-zuiver water (bakje 2) te laten zakken en vacuüm toe te passen. Spoel de probes met 70 ml hoog-zuiver water.
14. Breng het vacuümhulpmiddel gedurende 5 seconden omhoog en naar achteren, voorbij een hoek van 90°, om vloeistof uit de filterprobes te laten lopen (Afbeelding 3).
15. Zet de vacuümschakelaar op Off (Uit) en zet het vacuümhulpmiddel in de parkeerstand (P).
16. Schakel de vacuümpomp uit.
Opmerking: Aan het einde van een werkdag moeten vloeibaar afval en resterende oplossingen worden afgevoerd en moet het PyroMark Q24 Vacuum Workstation worden gecontroleerd op stof en gemorste vloeistoffen (Zie bijlage B op pagina 54).
17. Verwarm de PyroMark Q24 Plate met de monsters gedurende 2 minuten op 80 °C met behulp van de voorverwarmde PyroMark Q24 Plate Holder.
18. Verwijder de PyroMark Q24 Plate van de hete plaathouder en plaats deze op een tweede PyroMark Q24 Plate Holder die op

kamertemperatuur (15–25 °C) is gehouden zodat de monsters gedurende 10–15 minuten tot kamertemperatuur kunnen afkoelen.

19. Ga verder met 'Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken' op pagina 29.

19. Protocol 5: De PyroMark Q24 gebruiken

In dit protocol worden het voorbereiden en laden van PyroMark Gold Q24-reagentia in de PyroMark Q24 Cartridge beschreven, alsmede het starten en beëindigen van een run op de PyroMark Q24. Raadpleeg de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* voor een uitgebreide omschrijving van het configureren van een run.

Wat u moet weten voordat u begint

- In het pre-runinformatierapport staat informatie over het volume van de nucleotiden, het enzymmengsel en de substraatbuffer die nodig zijn voor een specifieke run. Dit rapport vindt u bij de runconfiguratie in het menu 'Tools' (Hulpmiddelen) (zie 'Protocol 1: Runconfiguratie voor het PyroMark Q24-systeem' op pagina 16).

Wat u moet doen voordat u begint

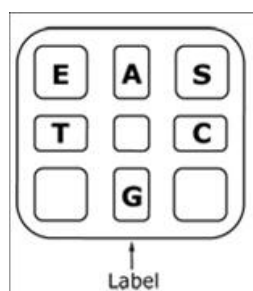
- Schakel de PyroMark Q24 in. De aan-uitschakelaar bevindt zich aan de achterzijde van het instrument.

Procedure

1. Los de gevriesdroogde enzym- en substraatmengsels elk op in 620 µl water (H₂O, meegeleverd).
2. Meng de inhoud door de flacon voorzichtig rond te draaien.
Opmerking: niet schudden!
Opmerking: laat het mengsel gedurende 5–10 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C) staan om ervoor te zorgen dat het mengsel volledig is opgelost. Controleer of de oplossing niet troebel is voordat u de PyroMark Q24 Cartridge vult. Plaats de flacons met reagentia op ijs of in een koelkast als deze niet direct worden gebruikt.
3. Laat de reagentia en de PyroMark Q24 Cartridge op omgevingstemperatuur (20–25 °C) komen.
4. Plaats de PyroMark Q24 Cartridge met het etiket naar u toe gericht.
5. Laad de PyroMark Q24 Cartridge met het juiste volume nucleotiden, enzymmengsel en substraatmengsel volgens afbeelding 4.
Zorg ervoor dat er geen luchtbelletjes worden overgedragen van de pipet naar de cartridge.

* Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de

desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.



Afbeelding 4. Bovenaanzicht van de PyroMark Q24 Cartridge. De bijschriften komen overeen met het etiket op de flacons met reagentia. Voeg enzymmengsel (E), substraatmengsel (S) en nucleotiden (A, T, C, G) toe en houd daarbij de volumes aan die staan vermeld in het pre-runinformatierapport. Dit rapport vindt u bij de runconfiguratie in het menu 'Tools' (Hulpmiddelen).

6. Open de klep van de cartridge en plaats het gevulde reagenscartridge met het etiket naar voren. Duw de cartridge volledig naar binnen en vervolgens omlaag.
7. Zorg ervoor dat de lijn zichtbaar is aan de voorzijde van de cartridge en sluit de klep.
8. Open het plaathoudende frame en leg de plaat op het verwarmingsblok.
9. Sluit het plaathoudende frame en het instrumentdeksel.
10. Plaats de USB-stick (met het runbestand) in de USB-poort aan de voorzijde van het instrument.
Opmerking: verwijder de USB-stick pas als de run is voltooid.
11. Selecteer 'Run' in het hoofdmenu (met behulp van de schermtuetsen ▲ en ▼) en druk op 'OK'.
12. Selecteer het runbestand met behulp van de schermtuetsen ▲ en ▼.
Opmerking: selecteer een map om de inhoud van die map te bekijken en druk op 'Select' (Selecteren). Druk op 'Back' (Terug) om terug te keren naar de vorige weergave.
13. Selecteer het runbestand en druk op 'Select' (Selecteren) om de run te starten.
14. Als de run is voltooid en het instrument bevestigt dat het runbestand op de USB-stick is opgeslagen, drukt u op 'Close' (Sluiten).
15. Verwijder de USB-stick.
16. Open het instrumentdeksel.
17. Open de klep van de cartridge en verwijder de reagenscartridge door deze omhoog te tillen en naar buiten te trekken.
18. Sluit de klep.

19. Open het plaathoudende frame en verwijder de plaat van het verwarmingsblok.
20. Sluit het plaathoudende frame en het instrumentdeksel.
21. Werp de plaat weg en reinig de cartridge volgens de instructies in het productblad dat met de cartridge is meegeleverd.
22. Analyseer de run volgens de instructies in 'Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run' op pagina 31.

Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run

In dit protocol wordt de mutatieanalyse beschreven van een voltooide KRAS-run met behulp van PyroMark Q24-software.

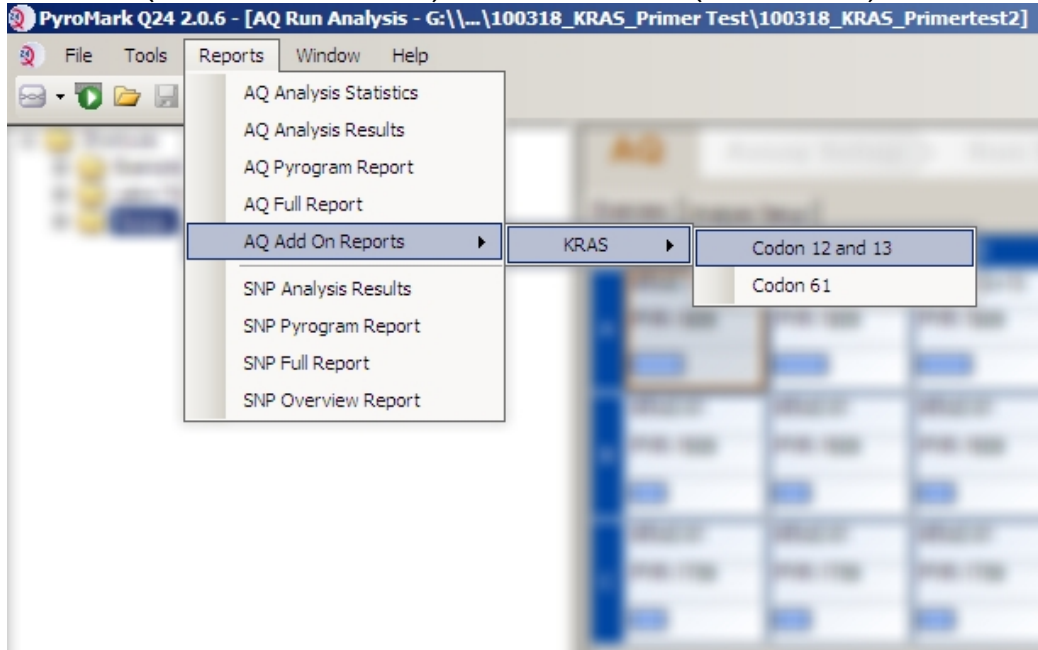
Procedure

1. Plaats de USB-stick met het verwerkte runbestand in de USB-poort van de computer.
2. Verplaats het runbestand met behulp van Windows Verkenner van de USB-stick naar de gewenste locatie op de computer.
3. Open het runbestand in de AQ-modus van de PyroMark Q24-software door 'Open' (Openen) te selecteren in het menu 'File' (Bestand) of door te dubbelklikken op het bestand (👉) in de snelkoppelingbrowser.
4. Er zijn 2 methoden beschikbaar om de run te analyseren. Ga verder met stap 5 als u gebruikmaakt van het KRAS-invoegrapport. Ga verder met stap 6 als u gebruikmaakt van de AQ-analyse op de PyroMark Q24.

Opmerking: wij adviseren dringend om het KRAS-invoegrapport te gebruiken voor het interpreteren van resultaten. Het KRAS-invoegrapport kan per e-mail worden opgevraagd via pyro.plugin@qiagen.com. Dit rapport zorgt ervoor dat de respectievelijke LOD-waarden (tabel 8) en verschillende instellingen voor 'Sequences to Analyze' (Te analyseren sequenties) worden gebruikt voor het automatisch detecteren van alle mutaties.

5. Als u gebruikmaakt van het KRAS-invoegrapport:
Ga in het menu naar 'Reports' (Rapporten) en selecteer 'AQ Add On Reports/KRAS' (AQ aanvullende rapporten/KRAS) en 'Codon 12

and 13' (Codons 12 en 13) of 'Codon 61' (Codon 61).



Afbeelding 5. Het scherm AQ Run Analysis (AQ-runanalyse).

De wells worden automatisch geanalyseerd op alle mutaties waarvoor een LOD is opgegeven in tabel 8. De resultaten worden weergegeven in een overzichtstabel (afbeelding 6), gevolgd door de gedetailleerde resultaten, waaronder Pyrogrammen en analysekwaliteit.

Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	⚠
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				

⚠ See detailed results for further explanation.

Afbeelding 6. De resultatenoverzichtstabel.

- Als u gebruikmaakt van AQ-analyse:
Klik op een van de analysetoetsen om de run te analyseren en een overzicht te krijgen van de resultaten.



Alle wells analyseren.



De geselecteerde well analyseren.

De analyseresultaten (allelfrequenties) en kwaliteitsbeoordeling worden weergegeven boven de variabele positie in het Pyrogram[®]-spoor. Raadpleeg de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* voor meer informatie over het analyseren van een run.

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

Opmerking: de meest frequente mutaties in KRAS worden gevonden in nucleotide 35 (tweede base van codon 12). Om die reden richt de standaard 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) voor de KRAS-assay voor codon 12 en 13, zoals aangegeven in de analyseconfiguratie, zich op mutaties op deze positie (zie bijlage A op pagina 51). Als een monster een mutatie bevat op nucleotide 34 (eerste base van codon 12) kan de instelling 'Sequence to Analyze' (Te analyseren frequentie) worden gewijzigd, zodat ook de mutatiestatus op deze positie kan worden geanalyseerd, zoals beschreven in bijlage A. Op dezelfde manier kan de instelling 'Sequence to Analyze' (Te analyseren frequentie) worden veranderd voor de KRAS-assay voor codon 61, zoals beschreven in bijlage A.

Via de webpagina van het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ vindt u de bijgewerkte mutatiefrequenties in het menselijke KRAS-gen in codon 12/13 en codon 61.

Opmerking: voor betrouwbare resultaten worden enkele piekhoogten boven 30 RLU aanbevolen. Stel in de assayconfiguratie de optie 'required peak height for passed quality' (vereiste piekhoogte voor goedgekeurde kwaliteit) in op 30 RLU (zie bijlage A en de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24*).

Opmerking: het rapport 'AQ Analysis Results' (AQ-analyseresultaten) moet worden gebruikt voor de documentatie en interpretatie van allelkwantificering. De getallen die in het Pyrogram worden weergegeven, zijn afgerond en geven niet de exacte kwantificering weer.

Opmerking: het Pyrogram moet altijd worden vergeleken met het histogram, dat kan worden weergegeven door met de rechtermuisknop in het venster Pyrogram te klikken. De gemeten pieken moeten overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram.

Opnieuw analyseren van monsters waarin geen mutatie is gedetecteerd in nucleotide 35 (codon 12) of 183 (codon 61) of monsters met de kwaliteitsbeoordeling 'Check' (Controleren) of 'Failed' (Mislukt).

Wij raden ten zeerste aan om alle monsters waarbij met de standaard 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) geen mutatie is gedetecteerd en monsters met de kwaliteitsbeoordeling 'Check' (Controleren) of 'Failed' (Mislukt) opnieuw te analyseren. De kwaliteitsbeoordelingen 'Check' (Controleren) of 'Failed' (Mislukt) kunnen wijzen op een mutatie in een andere positie dan nucleotide 35 of 183, wat resulteert in afwijkende piekhoogten in de referentiedistributies. Zo betekent een piek in een van de eerste 3 distributies dat er een mutatie aanwezig is op nucleotide 34.

Ga naar 'Analysis Setup' (Analyseconfiguratie) en wijzig de optie 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) van *GNTGRCGTAGGC* in *NGTGRCGTAGGC* om mutaties op nucleotide 34 opnieuw te analyseren en onderzoeken. Klik op 'Apply' (Toepassen) en klik vervolgens op 'To All' (Op alle) als het venster 'Apply Analysis Setup' (Analyseconfiguratie toepassen) wordt weergegeven.

Wijzig de optie 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) van de assay voor codon 61 in de volgende sequentie om mutaties op nucleotide 182 (tweede positie van codon 61) opnieuw te analyseren en onderzoeken.

CTCTHGACCTG

Wijzig de optie 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) van de assay voor codon 61 in de volgende sequentie om mutaties op nucleotide 181 (eerste positie van codon 61) opnieuw te analyseren en onderzoeken.

CTCTTSACCTG

Opmerking: controleer of de drempel voor enkele piekhoogte is ingesteld op 30 RLU wanneer u de optie 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) heeft gewijzigd.

Opmerking: als de gemeten pieken niet overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram en niet kunnen worden verklaard door zeldzame of onverwachte mutaties, vormt het resultaat geen basis voor een oordeel over de mutatiestatus. Het

wordt aanbevolen om de run voor het monster opnieuw uit te voeren.

Interpretatie van de resultaten

Interpretatie van analyseresultaten en detectie van low-level mutaties

We raden sterk aan om ter vergelijking en controle van achtergrondkleuringsniveaus in elke run het ongemethyleerde controle-DNA te verwerken. De gemeten frequentie van het controlemonster moet kleiner zijn dan of gelijk zijn aan de blankolimiet (LOB, limit of blank).

Van alle monsters moet het verband met de detectielimiet (LOD, limit of detection, zie tabel 8) worden vastgesteld en als volgt worden geïnterpreteerd.

- Mutatiefrequentie $< \text{LOD}$: Wildtype
- Mutatiefrequentie $\geq \text{LOD}$ en $\leq \text{LOD} + 3\%$ eenheden: Potentiële low-level mutatie

Opmerking: als dit gebeurt terwijl u het invoegrapport gebruikt (stap 5 van 'Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run' op pagina 31), wordt er een waarschuwing gegeven.

Monsters waarbij een mogelijke low-level mutatie is gerapporteerd, mogen alleen positief worden beschouwd voor de mutatie als deze wordt bevestigd door een dubbele run met een monster met ongemethyleerd controle-DNA. De resultaten van beide duplicaten moeten $\geq \text{LOD}$ zijn en verschillen van het controlemonster, anders moet het monster worden beoordeeld als wildtype.

- Mutatiefrequentie $> \text{LOD} + 3\%$ eenheden: Mutatie

Als u gebruikmaakt van het KRAS-invoegrapport wordt dit automatisch uitgevoerd.

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

Opmerking: Een gemeten frequentie die hoger is dan de LOB in het controlemonster duidt op een hoger achtergrondkleuringsniveau dan

gebruikelijk is in de betreffende run. Dit kan van invloed kan zijn op allelkwantificering, vooral voor lage mutatieniveaus. In dat geval vormen gemeten frequenties binnen het bereik van de LOD (tabel 8) tot de LOD 3% eenheden geen basis voor het beoordelen van de mutatiestatus. Wij adviseren om de run te herhalen voor monsters met een mogelijke low-level mutatie.

Opmerking: het algoritme van het KRAS-invoegrapport is gebruikt om de gegevens van de LOB en LOD te genereren. Handmatige analyse met behulp van de PyroMark-toepassingssoftware, zoals beschreven in protocol 6 (pagina 31) kan resulteren in licht afwijkende waarden.

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

Tabel 8. LOB en LOD bepaald voor specifieke mutaties

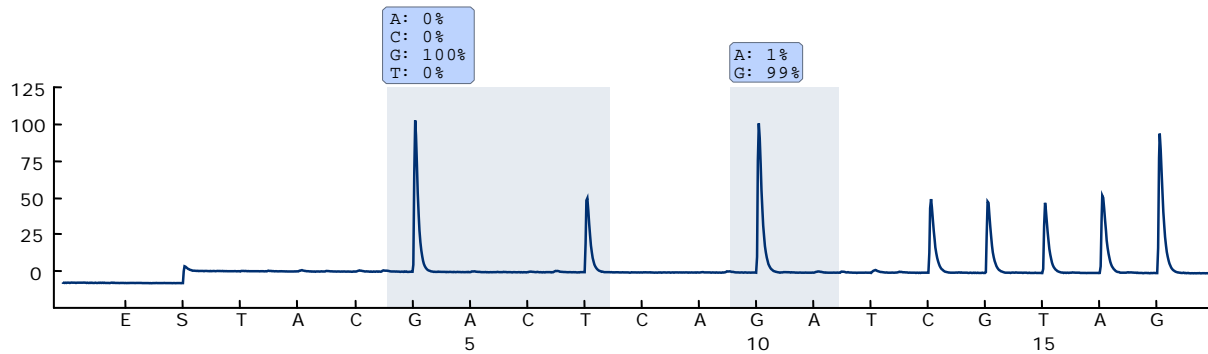
Substitutie nucleinezuur	Substitutie aminozuur	LOB (% eenheden)	LOD (% eenheden)	COSMIC ID* (V42)
Codon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA), getest in omgekeerde richting (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

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

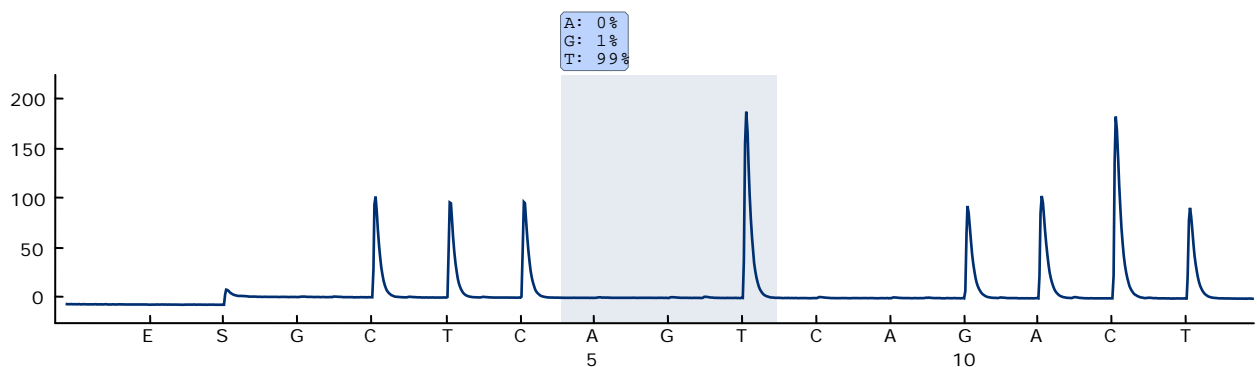
[†] Laagste mutatieniveau in een monster dat resulteert in een gemeten frequentie \geq LOD.

Representatieve resultaten met behulp van de AQ-analyse op de PyroMark Q24

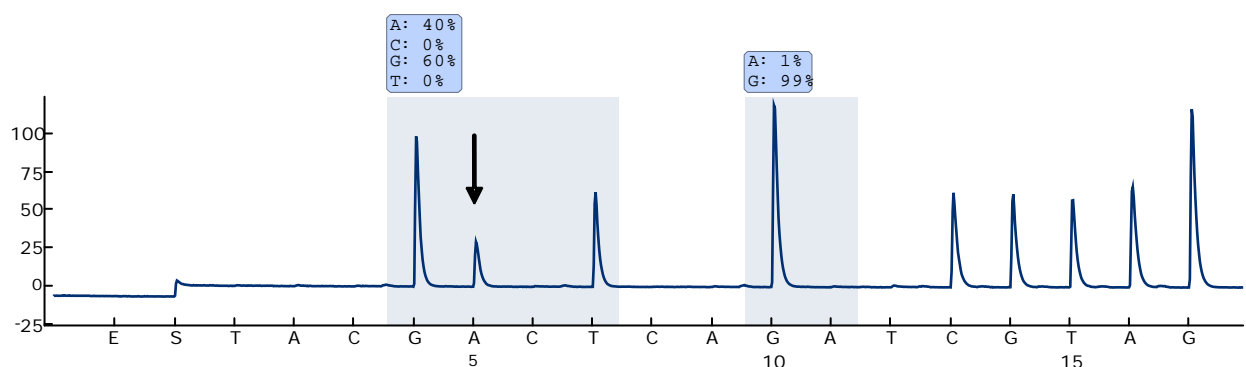
Representatieve Pyrogram-resultaten worden weergegeven in afbeelding 7-11.



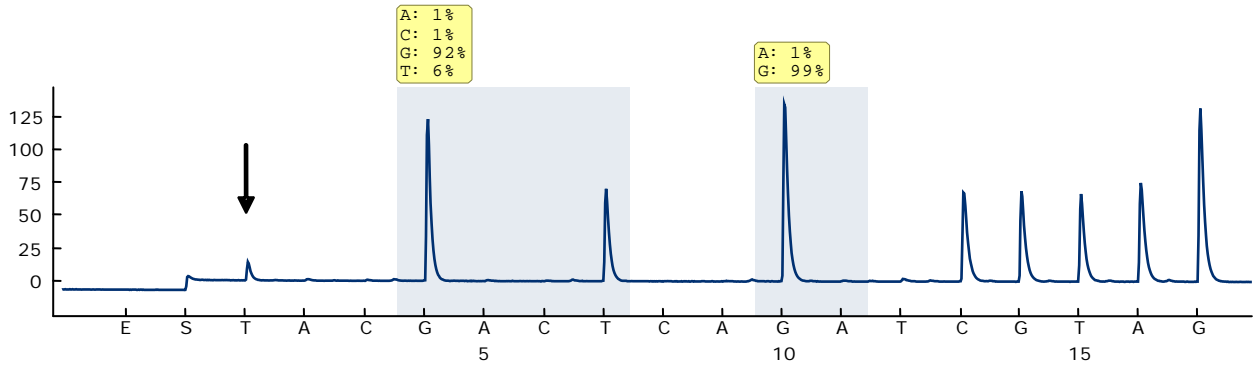
Afbeelding 7. Pyrogram-spoor verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype in codon 12 en 13.



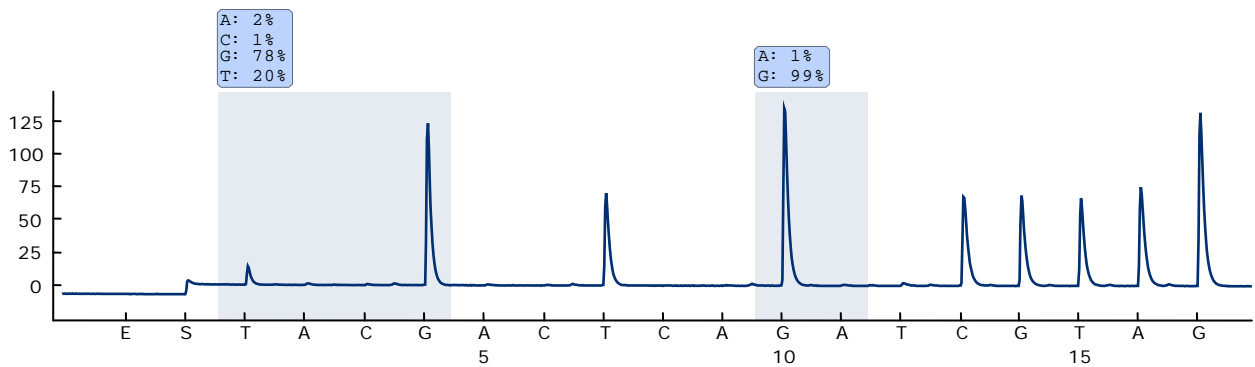
Afbeelding 8. Pyrogram-spoor verkregen na analyse van een monster met een wildtype genotype in codon 61.



Afbeelding 9. Pyrogram-spoor verkregen na analyse van monsters met een GGT → GAT-mutatie in base 2 van codon 12 (nucleotide 35, aangeduid met een pijl).



Afbeelding 10. Pyrogram-spoor verkregen na analyse van monsters met een GGT → TGT-mutatie in base 1 van codon 12 (nucleotide 34, aangeduid met een pijl) terwijl base 2 in codon 12 (nucleotide 35) wordt onderzocht met de 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) GNTGRCGTAGGC. Een gele kleur geeft aan dat deze sequentie onverwacht is en moet worden gecontroleerd.



Afbeelding 11. Pyrogram-spoor en -resultaat verkregen na opnieuw analyseren van het monster in afbeelding 10. De mutatie GGT → TGT is opnieuw geanalyseerd, waarbij de 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) NGTGRCGTAGGC is onderzocht op base 1 in codon 12 (nucleotide 34).

Problemen oplossen

Dit gedeelte is een hulpmiddel voor het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina Veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie voor contactgegevens de achterzijde van deze handleiding of ga naar www.qiagen.com).

Opmerking: raadpleeg de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* voor het oplossen van problemen met het instrument.

Opmerkingen en suggesties

Signalen in de controle zonder template (negatieve controle)

- | | |
|------------------------------|--|
| a) Kruiscontact tussen wells | Het signaal van een bepaalde well wordt gedetecteerd in een aangrenzende well. Plaats monsters met hoge signaalintensiteiten niet naast wells met controles zonder template. |
| b) Contaminatie van PCR | Gebruik steriele pipetpunten met filters. Bewaar en extraheer materialen zoals monsters, controles en amplicons gescheiden van PCR-reagentia. |

Slechte of onverwachte sequentie

- | | |
|--|--|
| a) Genomisch DNA van slechte kwaliteit | Genomisch DNA van slechte kwaliteit kan de oorzaak zijn van het mislukken van PCR. Analyseer PCR-monsters met behulp van een elektroforetische techniek (zoals het QIAxcel [®] -systeem of agarosegel-elektroforese). |
|--|--|

Resultaat 'Check' (Controleren) of 'Failed' (Mislukt)

Opmerkingen en suggesties

- a) Lage piekhoogte
- Verwerkingsfouten tijdens de PCR-configuratie of monsterbereiding voorafgaand aan Pyrosequencing kunnen leiden tot lage pieken. Voer regelmatig de functietest voor de filterprobes uit zoals beschreven in de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* en vervang filterprobes wanneer dit wordt aangegeven.
- Vergelijk het Pyrogram zorgvuldig met het histogram als de waarschuwing 'Check' (Controleren) wordt gegeven. Klik met de rechtermuisknop in het venster Pyrogram om het Pyrogram weer te geven. Als de gemeten pieken overeenkomen met de balken van het histogram, is het resultaat geldig. Zo niet, wordt aanbevolen om het monster opnieuw te analyseren.
- b) Mutatie die niet is gedefinieerd in 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie)
- Wijzig de te analyseren sequentie in de assayconfiguratie (zie bijlage A op pagina 51) en analyseer de run opnieuw.
- c) Onverwachte, zeldzame mutatie
- Een kwaliteitsbeoordeling 'Check' (Controleren) of 'Failed' (Mislukt) kan worden veroorzaakt door een onverwacht patroon van pieken. Dit kan duiden op een onverwachte mutatie die niet is geanalyseerd door het invoegrapport. Deze monsters moeten handmatig worden geanalyseerd met behulp van de PyroMark Q24-software, waarbij rekening moet worden gehouden met onverwachte mutaties.

Opmerkingen en suggesties

- d) Waarschuwing afwijking hoge piekhoogte voor een distributie
- Vergelijk het Pyrogram zorgvuldig met het histogram. Klik met de rechtermuisknop in het venster Pyrogram om het Pyrogram weer te geven. Als de gemeten pieken niet overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram en niet kunnen worden verklaard door zeldzame mutaties, wordt aanbevolen om het monster opnieuw te analyseren.

Sterke achtergrondkleuring

- a) Onjuiste opslag van nucleotiden
- Bewaar nucleotiden bij 2–8 °C. Opslag bij -15 tot -30 °C kan leiden tot een toename van achtergrondkleuring.
- b) Korte afkoeltijd van monsters voorafgaand aan Pyrosequencing-analyse
- Bewaar de monsters gedurende 10–15 minuten bij kamertemperatuur op een PyroMark Q24 Plate Holder. Verkort de afkoeltijd niet.
- c) Contaminatie van cartridge
- Reinig de cartridge zorgvuldig zoals in het productblad wordt beschreven. Bewaar de cartridge beschermd tegen licht en stof.

Geen signalen in positieve controle (ongemethyleerd controle-DNA)

- a) Onvoldoende enzym- of substraatmengsel voor alle wells
- Vul de PyroMark Q24-cartridge volgens de 'Pre Run Information' (Pre-runinformatie) in het menu 'Tools' (Hulpmiddelen).
- b) Reagentia onjuist opgeslagen of verdund
- Bereid de PyroMark Q24 Gold-reagentia volgens de instructies die zijn meegeleverd met de reagentia.
- c) De HotStarTaq-DNA-polymerase is onvoldoende geactiveerd.
- De HotStarTaq-DNA-polymerase in de PyroMark PCR Master Mix heeft een activatiestap nodig van 15 minuten bij 95 °C.

Opmerkingen en suggesties

d) Fouten bij PCR-
voorbereiding of
monsterbereiding

Verwerkingsfouten bij de PCR-configuratie, programmering van de PCR-cycler of monsterbereiding voorafgaand aan Pyrosequencing kunnen leiden tot geen signalen. Voer de functietest voor de filterprobes uit zoals beschreven in de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24* en vervang filterprobes wanneer dit wordt aangegeven. Herhaal de PCR- en Pyrosequencing-analyse.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij *therascreen* KRAS Pyro Kits getest aan de hand van vooraf vastgestelde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen.

Beperkingen

Gegenereerde diagnostische resultaten moeten in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen worden geïnterpreteerd.

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

Prestatiekenmerken

Blancolimiet en detectielimiet

De blancolimiet (limit of blank, LOB) en detectielimiet (limit of detection, LOD) zijn bepaald voor een aantal mutaties met behulp van plasmidemengsels (Tabel 9). De LOB en LOD zijn bepaald aan de hand van de aanbevelingen in de richtlijn EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protocol voor het vaststellen van detectielimieten en kwantificeringslimieten; goedgekeurde richtlijn) van het CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). α - en β -fouten (fout-positieven en fout-negatieven, respectievelijk) waren op 5% ingesteld.

LOB-waarden vertegenwoordigen de gemeten frequentie die is verkregen met een wildtype monster. LOD-waarden vertegenwoordigen het laagste signaal (gemeten frequentie) dat als positief kan worden beschouwd voor de respectievelijke mutatie.

De mutaties GGT → GTT in codon 12

Voor deze mutatie waren blanco metingen consistent dicht bij 0% eenheden (n=72), wat resulteerde in een niet-Gaussiaanse verdeling. De LOD is daarom vastgesteld met behulp van een andere methode, volgens de aanbevelingen in de CLSI-richtlijn EP17-A. Het laagste signaal dat de aanwezigheid van een mutatie (LOD) in deze positie aangeeft, was ingesteld op 1% eenheden. Dit is beduidend hoger dan de consistente basisniveau (LOB) van 0% eenheden. Bij het analyseren van een monster met een mutatieniveau van 7%, gaf 95% van de resultaten (n=89) een signaal dat kan worden beschouwd als positief (\geq LOD, d.w.z., ≥ 1 % eenheden).

Tabel 9. LOB en LOD bepaald voor specifieke mutaties

Substitutie nucleinezuur	Substitutie aminozuur	LOB (% eenheden)	LOD (% eenheden)	COSMIC ID* (V42)
Codon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	0,0	1,0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA), getest in omgekeerde richting (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

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

[†] Laagste mutatieniveau in een monster dat resulteert in een gemeten frequentie \geq LOD.

Opmerking: deze waarden zijn gebaseerd op runs waarbij plasmidemengsels die de wildtype of mutante sequentie bevatten, zijn gebruikt als template voor PCR-amplificatie.

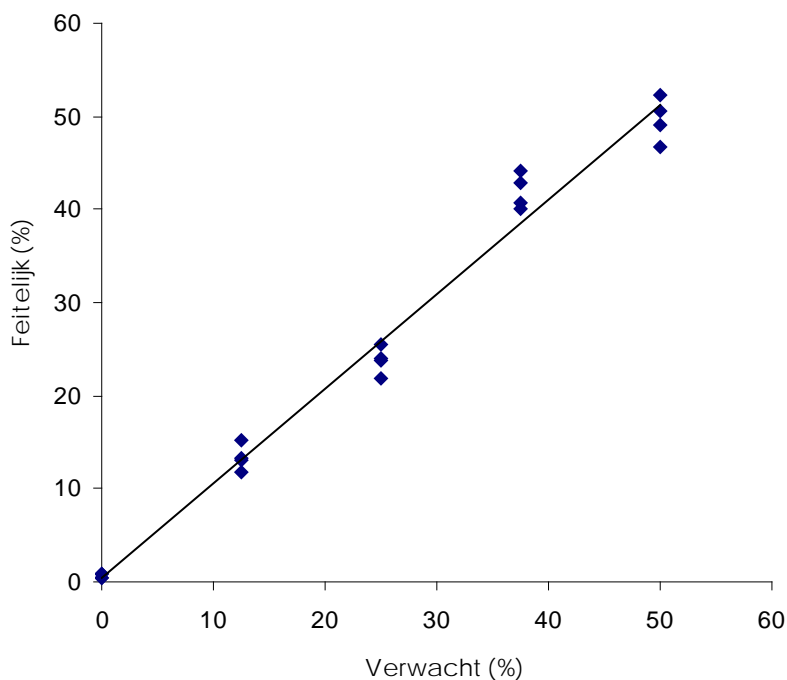
Opmerking: het algoritme van het KRAS-invoegrapport is gebruikt om de gegevens van de LOB en LOD te genereren. Handmatige analyse met behulp van de PyroMark Q24-toepassingssoftware, zoals beschreven in protocol 6 (pagina 31) kan resulteren in licht afwijkende waarden.

Opmerking: het wordt aanbevolen om de effectiviteit van de methode te bevestigen in het laboratorium.

Lineariteit

De lineariteit is gemeten aan de hand van de CLSI-richtlijn EP6-A 'Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline' (Beoordeling van de lineariteit van kwantitatieve meetprocedures: een statistische benadering; goedgekeurde richtlijn).

Plasmiden met wildtype en mutante sequenties werden gemengd in verschillende verhoudingen, zodat de volgende mutatieniveaus werden verkregen: 0, 12,5, 25, 37,5 en 50%. Er werden vier replica's van de mengsels in een willekeurig patroon op een plaat geplaatst en geanalyseerd. De resultaten voor de mutatie GGT → TGT in codon 12 werden geanalyseerd met Analyse-it[®]-software v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) en worden weergegeven in afbeelding 12.



Afbeelding 12. Lineariteit van mutatie GGT → TGT in codon 12.

De totale herhaalbaarheid was 1,64% eenheden en de resultaten waren lineair binnen een toegestane niet-lineariteit van 3% eenheden. Voor de mutatie GGC → GAC in codon 13 werden vergelijkbare resultaten verkregen.

Intermediaire nauwkeurigheid

De lineariteit van mutatie GGT → TGT in codon 12 is opnieuw vastgesteld door 3 operators op 3 verschillende dagen met behulp van verschillende combinaties van PyroMark Q24-instrumenten en

reagentia. De resultaten van de 3 runs worden weergegeven in tabel 12.

Tabel 12. Intermediaire nauwkeurigheid*

% gemuteerde plasmide†	Run 1		Run 2		Run 3		Samenvatting	
	Gemiddelde	SD	Gemiddelde	SD	Gemiddelde	SD	Gemiddelde	SD
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

* Alle waarden worden weergegeven als % eenheden. SD: standaarddeviatie.

† Gebaseerd op een meting van de OD₂₆₀.

De waarden voor de intermediaire nauwkeurigheid (SD) waren daarom 0,6–2,0% eenheden in het gemeten bereik van 0–50% mutatieniveau.

Diagnostische evaluatie

De *therascreen* KRAS Pyro Kit is vergeleken met de DxS KRAS Mutation Kit. Daarvoor is DNA geëxtraheerd uit 100 prospectieve in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde (FFPE) monsters van darm- en rectumkankertumoren en geanalyseerd op mutaties in codon 12 en 13.

Het onderzochte DNA is geïsoleerd met behulp van de EZ1 DNA Tissue Kit en geanalyseerd met de *therascreen* KRAS Pyro Kit op de PyroMark Q24 en met de DxS KRAS Mutation Kit op de ABI PRISM® 7900HT SDS.

Bij 91 van de 100 geanalyseerde monsters kon de mutatiestatus worden vastgesteld met de DxS KRAS Mutation Kit. Met de *therascreen* KRAS Pyro Kit kon de mutatiestatus bij 94 monsters worden vastgesteld.

Uitgezonderd voor monsters waarvan de analyse met een of beide kits was mislukt, kwamen de resultaten van de *therascreen* KRAS Pyro Kit en DxS KRAS Mutation Kit 100% overeen.

De diagnostische gevoeligheid van de *therascreen* KRAS Pyro Kit was 100% en diagnostische specificiteit was 100% (tabel 13).

Tabel 13. Resultaten van de geanalyseerde prospectieve monsters van darm- en rectumkankertumoren voor codon 12 en 13.

		DxS KRAS Mutation Kit			
		Mutant	Wildtype	Onbekend	Totaal
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Mutant	33	0	1	34
	Wildtype	0	57	3	60
	Onbekend	0	1	5	6
	Totaal	33	58	9	100

Analyse van codon 61

Dezelfde 100 monsters zijn geanalyseerd voor mutaties in codon 61 met de *therascreen* KRAS Pyro Kit. Slechts een monster gaf een mislukte kwaliteitsbeoordeling voor de assay voor codon 61. De analyse van dit monster mislukte ook met de *therascreen* KRAS Pyro Kit en de DxS-assays voor codon 12 en 13, wat aantoont dat de kwaliteit van het DNA te laag was. Het hogere slagingspercentage bij de assay voor codon 61 toont aan dat het slagen van de analyse minder afhankelijk is van de kwaliteit van het DNA dan van de *therascreen* KRAS Pyro Kit en de DxS-assays voor codon 12 en 13. Omdat de DxS-assay niet op mutaties in codon 61 test, kunnen de assays niet rechtstreeks worden vergeleken.

Bij 4 van de 99 monsters werden mutaties gedetecteerd in codon 61. Drie monsters bevatten frequente mutaties (CAC, CAT, CTA) in codon 61 en het vierde monster bevatte mutaties in zowel codon 60 (GGT→GGA) als codon 61 (CAA→AAA).

Opmerking: in alle runs die zijn gebruikt voor het bepalen van prestatiekenmerken was het signaal meer dan 60 RLU, zoals normaal wordt verkregen uit 10 ng DNA dat is geïsoleerd uit in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (FFPE) weefsel.

Referenties

QIAGEN onderhoudt een grote, actuele online database van wetenschappelijke publicaties waarin producten van QIAGEN zijn gebruikt. Uitgebreide zoekopties stellen u in staat om de artikelen die u nodig hebt te vinden, door eenvoudig te zoeken op trefwoord of door de toepassing, het onderzoeksgebied, een titel, etc. op te geven.

Kijk voor een volledige lijst met referenties in de online QIAGEN Reference Database op www.qiagen.com/RefDB/search.asp, of neem contact op met de technische dienst van QIAGEN of met uw plaatselijke leverancier.

Symbolen



Bevat voldoende reagentia voor <N> tests

<N>



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Partijnummer



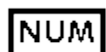
Materiaalnummer



Bestanddelen



Bevat



Nummer



Global Trade Item Number



Temperatuurbepering



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

Contactgegevens

Ga voor technische ondersteuning en voor meer informatie naar ons centrum voor technische ondersteuning op www.qiagen.com/Support of bel één van de afdelingen voor technische diensten of plaatselijke

leveranciers van QIAGEN (zie de achterzijde van deze handleiding of kijk op www.qiagen.com).

Appendix A: *therascreen* KRAS Pyro Assays configureren


Als het KRAS-invoegrapport wel is geïnstalleerd, zijn er vooraf gedefinieerde assayconfiguraties voor codon 12, 13 en 61 beschikbaar via de snelkoppelingbrowser in de PyroMark Q24-software via het pad 'Example Files/PyroMark Setups/KRAS' (Voorbeeldbestanden/PyroMark-configuraties/KRAS). De volgende stappen hoeven niet te worden uitgevoerd. Het KRAS-invoegrapport kan per e-mail worden opgevraagd via pyro.plugin@qiagen.com.

Het wordt sterk aanbevolen om het KRAS-invoegrapport te gebruiken in plaats van handmatig te analyseren. Controleer na installatie van de invoegtoepassing of elke keer dat er nieuwe software op de computer wordt geïnstalleerd of bijgewerkt of de invoegtoepassing goed werkt volgens de instructies in de beknopte handleiding van de invoegtoepassing.

Als het KRAS-invoegrapport niet is geïnstalleerd, moet het assaybestand handmatig worden geconfigureerd voordat de *therascreen* KRAS Pyro assay voor de eerste keer wordt verwerkt. Configureer de assays voor KRAS-codons 12 en 13 en KRAS-codon 61 met behulp van de PyroMark Q24-software volgens onderstaande instructies.

Procedure

KRAS-codons 12 en 13

1. Klik in de werkbalk op  en selecteer 'New AQ Assay' (Nieuw AQ-assay).
2. Voer in het veld 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) de volgende sequentie in.

GNTGRCGTAGGC

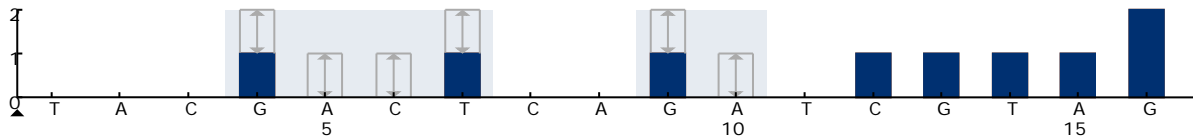
Opmerking: met deze 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) worden de meest voorkomende mutaties in codon 12 gedetecteerd in nucleotide 35 (tweede positie). Wijzig de 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) in de volgende sequentie om te controleren of er mutaties aanwezig zijn in nucleotide 34 (eerste positie).

NGTGRCGTAGGC

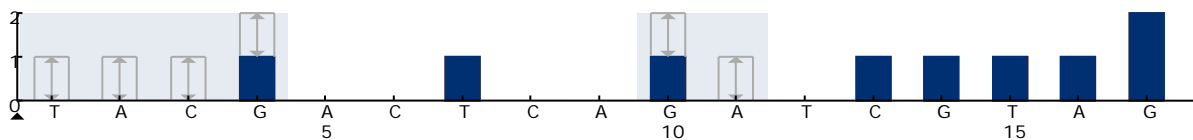
Opmerking: controleer of de drempel voor enkele piekhoogte is ingesteld op 30 RLU.

3. Voer de volgende 'Dispensation Order' (Distributievolverde) handmatig in.


TACGACTCAGATCGTAG




Afbeelding 13. Histogram voor codon 12 (nucleotide 35) en 13 (nucleotide 38) met *GNTGRCGTAGGC* als 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie).



Afbeelding 14. Histogram voor codon 12 (nucleotide 34) en 13 (nucleotide 38) met *NGTGRCGTAGGC* als 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie).

4. Klik op het tabblad 'Analysis Parameters' (Analyseparameters) en verhoog de 'Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:' (Drempel piekhoogte — Vereiste piekhoogte voor geslaagde kwaliteit:) naar 30.
5. Klik in de werkbalk op  en sla de assay op als 'KRAScodon 12+13'.

KRAS-codon 61

6. Klik in de werkbalk op  en selecteer 'New AQ Assay' (Nieuw AQ-assay).
7. Voer in het veld 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) de volgende sequentie in.

CTCDTGACCTG

Opmerking: met deze 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) worden de meest voorkomende mutaties in codon 61 gedetecteerd in nucleotide 183 (derde positie). Wijzig de 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) in de volgende sequentie om te controleren of er mutaties aanwezig zijn in nucleotide 182 (tweede positie).

CTCTHGACCTG

Wijzig de 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie) in de volgende sequentie om te controleren of er mutaties aanwezig zijn

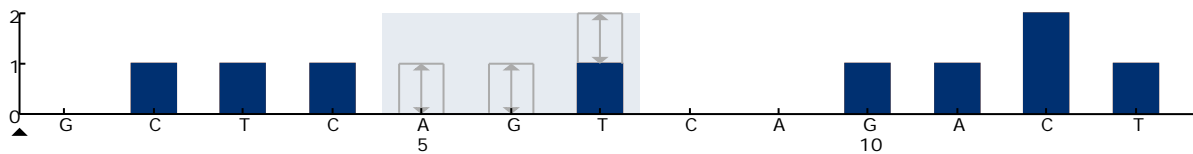
in nucleotide 181 (eerste positie).

CTCTTSACCTG

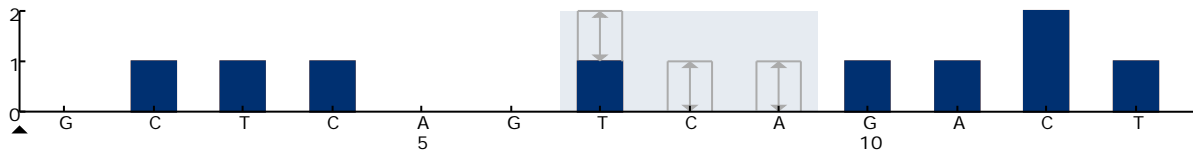
Opmerking: controleer of de drempel voor enkele piekhoogte is ingesteld op 30 RLU.

8. Voer de volgende 'Dispensation Order' (Distributievolvergord) handmatig in.

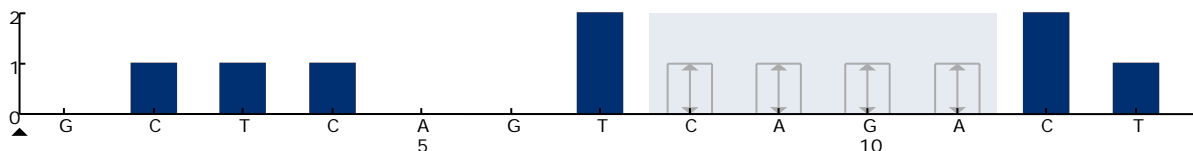
GCTCAGTCAGACT




Afbeelding 15. Histogram voor codon 61 (nucleotide 183) met *CTCDTGACCTG* als 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie).




Afbeelding 16. Histogram voor codon 61 (nucleotide 182) met *CTCTHGACCTG* als 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie).



Afbeelding 17. Histogram voor codon 61 (nucleotide 182) met *CTCTTSACCTG* als 'Sequence to Analyze' (Te analyseren sequentie).

9. Klik op het tabblad 'Analysis Parameters' (Analyseparameters) en verhoog de 'Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:' (Drempel piekhoogte — Vereiste piekhoogte voor geslaagde kwaliteit:) naar 30.
10. Klik in de werkbalk op  en sla de assay op als 'KRAScodon 61'. ■

Appendix B: De afvalcontainer en bakjes legen

<p>WAARSCHUWING</p> 	<p>Gevaarlijke chemicaliën</p> <p>De denaturatieoplossing die bij het vacuümwerkstation wordt gebruikt, bevat natriumhydroxide, dat irriterend is voor de ogen en de huid.</p> <p>Draag altijd een veiligheidsbril, handschoenen en een laboratoriumjas.</p> <p>Het verantwoordelijke orgaan (bijv. de laboratoriumbeheerder) moet alle noodzakelijke voorzorgsmaatregelen treffen om ervoor te zorgen dat de werkomgeving veilig is en de gebruikers van dit instrument niet worden blootgesteld aan gevaarlijke niveaus van toxische (chemische of biologische) stoffen, volgens de specificaties in de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) en OSHA-,* ACGIH-,† of COSHH-‡documenten.</p> <p>Dampafzuiging en afvoer van afvalmaterialen moet plaatsvinden in overeenstemming met alle landelijke, regionale en plaatselijke wet- en regelgeving met betrekking tot gezondheid en veiligheid.</p>
---	--

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

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

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

Volg alle nationale, provinciale en plaatselijke milieuvorschriften op voor de afvoer van laboratoriumafval.

Wat u moet weten voordat u begint

- Voor dit protocol is hoog-zuiver water vereist (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, of vergelijkbaar).

Procedure

1. Zorg dat er geen vacuüm wordt toegepast op het vacuümhulpmiddel. Zorg dat het vacuüm is gesloten (Off) en dat de vacuümpomp is uitgeschakeld.

2. Gooi alle oplossingen die in de bakjes zijn overgebleven weg.
3. Spoel de bakjes met hoog-zuiver water of vervang ze als dat nodig is.
4. Leeg de afvalcontainer.
Opmerking: de dop kan worden verwijderd zonder de slang los te koppelen.
5. Als het vacuümwerkstation moet worden gereinigd (bijvoorbeeld wegens stof of gemorste vloeistoffen), volgt u de instructies in de *gebruikershandleiding van de PyroMark Q24*.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	Voor 24 reacties op PyroMark Q24-systemen: Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, enzymmengsel, substraatmengsel, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP, and H ₂ O	971460
PyroMark Q24 MDx	Sequentiegebaseerd detectieplatform voor gelijktijdige Pyrosequencing van 24 monsters	9001513
PyroMark Q24	Sequentiegebaseerd detectieplatform voor gelijktijdige Pyrosequencing van 24 monsters	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Vacuümwerkstation (220 V) voor het gelijktijdig bereiden van 24 monsters, van PCR-product tot enkelstrengs template	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vacuümwerkstation (220 V) voor het gelijktijdig bereiden van 24 monsters, van PCR-product tot enkelstrengs template	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Applicatiesoftware	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysesoftware	9019062
Accessoires		
PyroMark Q24 Plate (100)	Sequentiëringreactieplaat met 24 wells	979301

* Alleen voor het VK.

† Voor overige landen.

Product	Inhoud	Cat.nr.
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartridges voor het distribueren van nucleotiden en reagentia	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Herbruikbare filterprobes voor het PyroMark Vacuum Workstation Q96 en Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Voor installatiecontrole van het systeem	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Voor prestatiebevestiging van systeem	979304
Verwante producten		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: 50 QIAamp MinElute®-kolommen, proteïnase K, buffers, afnamebuisjes (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Voor 48 bereidingen: Reagenscartridges (weefsel), wegwerpbare filtertips, wegwerpbare tiphouders, monsterbuisjes (2 ml), elutiebuisjes (1,5 ml), buffer G2, proteïnase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Voor 50 bereidingen: QIAamp Mini Spin Columns, buffers, reagentia, buisjes, VacConnectors	61104

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN Kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De (gebruikers)handleidingen van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen bij de afdeling Technical services van QIAGEN of bij uw plaatselijke leverancier worden aangevraagd.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

Voor landen waarop dit van toepassing is:

DE AANKOOP VAN DIT PRODUCT GEEFT DE KOPER HET RECHT OM HET PRODUCT TE GEBRUIKEN VOOR HET UITVOEREN VAN DIAGNOSTISCHE DIENSTEN VOOR HUMANE IN-VITRODIAGNOSTIEK. HIERBIJ WORDT DOOR DE AANSCHAF GEEN ALGEMEEN OCTROOI OF ANDERE LICENTIE VAN ENIGE AARD VERLEEND ANDERS DAN DIT SPECIFIEKE RECHT VAN GEBRUIK.

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

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *therascreen* KRAS Pyro Kit zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. De *therascreen* KRAS Pyro Kit mag alleen worden gebruikt in overeenstemming met de *handleiding* van de *therascreen* KRAS Pyro Kit en voor toepassing met uitsluitend de componenten die in de kit zitten. QIAGEN verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de *handleiding* bij de *therascreen* KRAS Pyro Kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn via www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de componenten ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord geen stappen te ondernemen of niemand anders stappen te laten ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of die deze mogelijk kunnen maken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke rechtshandeling om deze beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Zie www.qiagen.com voor de meest actuele licentievoorwaarden.

© 2015 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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)

