

therascreen[®] GIST RapidScreen Pyro[®] Kit Handbuch



Version 1

IVD

In-vitro-Diagnostikum



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, Deutschland

R2 **MAT** 1075556DE



QIAGEN Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in biologischen Proben. Unsere fortschrittlichen und qualitativ hochwertigen Produkte und Leistungen sind ein Garant für Erfolg – von der Probenvorbereitung bis hin zum Ergebnis.

QIAGEN setzt neue Maßstäbe in folgenden Bereichen:

- Reinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleinsäure- und Protein-Assays
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Arbeit zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie unter www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Verwendungszweck | 5 |
| Zusammenfassung und Erklärung | 5 |
| Testprinzip | 7 |
| Kontrollen | 8 |
| Mitgelieferte Materialien | 9 |
| Kit-Inhalt | 9 |
| Zusätzlich benötigtes Material | 10 |
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 13 |
| Sicherheitshinweise | 13 |
| Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen | 13 |
| Lagerung und Handhabung der Reagenzien | 14 |
| Lagerung und Handhabung der Proben | 14 |
| Verfahren | 15 |
| DNA-Isolierung | 15 |
| Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System | 17 |
| Protokoll 2: PCR unter Verwendung der PCR-Reagenzien des <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit | 20 |
| Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads | 23 |
| Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24 | 25 |
| Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System | 30 |
| Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs | 33 |
| Interpretation der Ergebnisse | 37 |
| Interpretation der Analyseergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen | 37 |
| Fehlerbehebung | 41 |
| Qualitätskontrolle | 44 |
| Anwendungseinschränkungen | 44 |
| Leistungsmerkmale | 45 |
| Leerwertgrenze und Nachweisgrenze | 45 |

| | |
|--|-----------|
| Linearität | 47 |
| Präzision | 48 |
| Bewertung der diagnostischen Leistung | 50 |
| Literatur | 51 |
| Symbole | 52 |
| Kontakt | 53 |
| Anhang A: Konfigurieren des <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Assays | 54 |
| Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs | 58 |
| Bestellinformationen | 60 |

Verwendungszweck

Der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit ist ein Nukleinsäuresequenz-basierter In-vitro-Nachweistest, der auf der Pyrosequencing® Technologie beruht und zum quantitativen Nachweis von Mutationen im Exon 9 des humanen KIT-Gens sowie im Exon 18 des humanen PDGFRA-Gens in genomischer DNA aus humanen Gewebeproben dient.

Die mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit ermittelten Informationen sollen Ärzte bei der Behandlung von Patienten mit diagnostiziertem gastrointestinalen Stromatumor (GIST) unterstützen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit von an Signalwegen ansetzenden Wirkstoffen wie Imatinib profitieren. Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Nur zur Verwendung mit dem PyroMark® Q24 System bestimmt. Das PyroMark Q24 System umfasst folgende Komponenten:

- Das PyroMark Q24 Gerät und das PyroMark Q24 MDx Gerät
- Die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation und die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation
- PyroMark Q24 Software (Version 2.0) und PyroMark Q24 MDx Software (Version 2.0)

Das Produkt darf nur von Fachpersonal wie z. B. technischen Angestellten oder Ärzten verwendet werden, die für die Anwendung in-vitro-diagnostischer und molekularbiologischer Verfahren sowie des PyroMark Q24 Systems geschult wurden.

Dieses Produkt ist nicht zur Analyse von Lungengewebe vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung

Der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit dient zur quantitativen Bestimmung von Mutationen im KIT-Exon 9 und im PDGFRA-Exon 18 (siehe Abbildung 1). Der Nachweis von Mutationen im KIT-Exon 9 ermöglicht die Anwendung von Imatinib in geeigneter Dosis, während der Nachweis von Mutationen im PDGFRA-Exon 18 dazu beiträgt, einen resistenten oder weniger empfindlichen Genotyp auszuschließen (1–3).

| | |
|--------------------|--|
| KIT- Exon 9 | ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG |
| PDGFRA- Exon 18 | TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT |

Abbildung 1. Genomkontext der sequenzierten Regionen des humanen KIT-Gens und des humanen PDGFRA-Gens (Ensembl-IDs ENSG00000157404 und ENSG00000134853).

Das Codon 503 im KIT-Gen und das Codon 842 im PDGFRA-Gen sind durch einen Rahmen hervorgehoben.

Der Kit umfasst zwei Assays: einen Assay zum Nachweis von Mutationen im KIT-Exon 9 und einen weiteren Assay zum Nachweis von Mutationen im PDGFRA-Exon 18 (siehe Abbildung 2). Die beiden Regionen werden mittels PCR separat amplifiziert und über die definierte Region sequenziert. Die Sequenzen um die definierten Positionen herum dienen bei der Quantifizierung und Qualitätsbewertung der Analyse als Normalisierungs- und Referenz-Peaks.

Hinweis: Beide Assays werden vorwärts sequenziert.

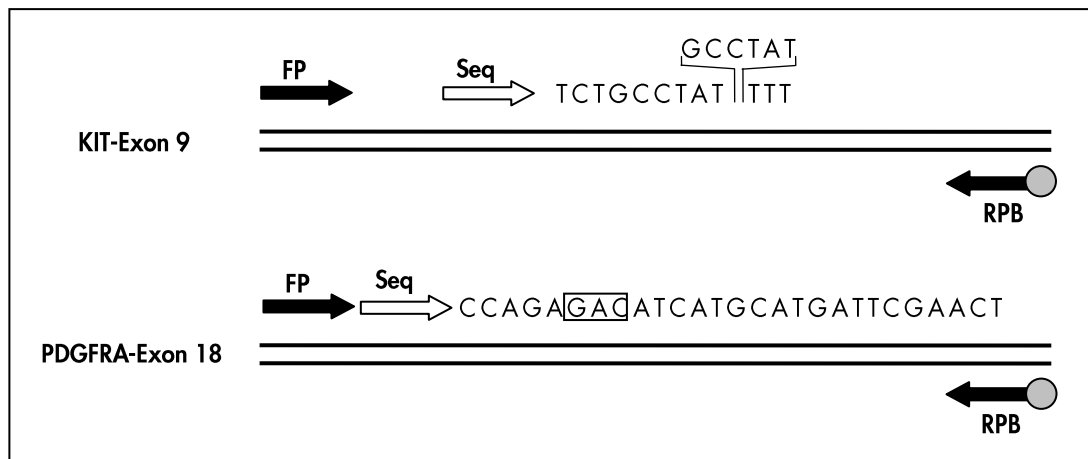


Abbildung 2. Illustration der KIT- und PDGFRA-Assays. Bei der dargestellten Sequenz handelt es sich um die Sequenz, die in einer Wildtyp-Probe analysiert wurde. Die Position und Sequenz der Duplikation von 6 bp im KIT-Exon 9 ist dargestellt. Der Rahmen markiert das Codon 842 des PDGFRA-Exons 18. **FP:** Forward-PCR-Primer; **RPB:** Reverse-PCR-Primer (B steht für Biotinylierung); **Seq:** Sequenzierungs-Primer.

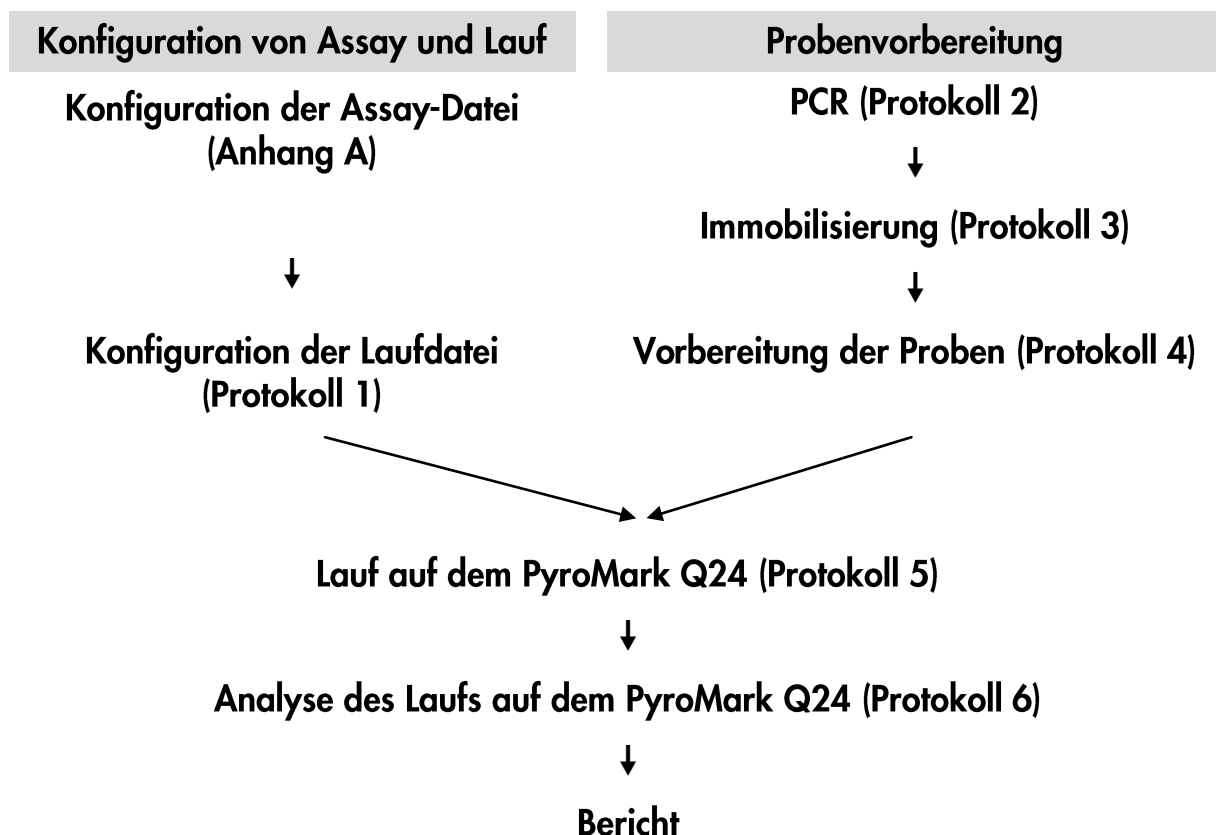
Das Produkt enthält für jeden Assay ein PCR-Primer-Gemisch und einen Sequenzierungs-Primer. Die Primer werden in Lösung ausgeliefert. Jedes Fläschchen enthält 32 µl des jeweiligen Primers oder Primer-Gemisches.

Testprinzip

Im folgenden Arbeitsablauf wird das Assay-Verfahren veranschaulicht. Nach der PCR mit Primern für das KIT-Exon 9 und das PDGFRA-Exon 18 werden die Amplifikate auf Streptavidin Sepharose® High Performance Beads immobilisiert. Einzelstrang-DNA wird hergestellt und die zugehörigen Sequenzierungs-Primer werden im Rahmen des Annealings mit der DNA hybridisiert. Anschließend werden die Proben auf dem PyroMark Q24 analysiert, und zwar unter Verwendung von Assaykonfigurationsdateien und einer Laufdatei.

Zur Analyse des Laufs sollte der GIST RapidScreen Plug-in Report verwendet werden. Der GIST RapidScreen Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden. Der Lauf kann jedoch auch mit Hilfe des im PyroMark Q24 System integrierten Analyse-Tools analysiert werden. Die Einstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) kann für den Nachweis seltener Mutationen nach dem Lauf angepasst werden (siehe „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 33 sowie „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Assays“ auf Seite 54).

Arbeitsablauf des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Verfahrens



Kontrollen

Dem Kit liegt unmethylierte Kontroll-DNA als Positivkontrolle für PCR- und Sequenzierungs-Reaktionen bei. Diese Kontroll-DNA weist in den Regionen, die mit diesem Kit sequenziert werden, einen Wildtyp-Genotyp auf und wird für die Interpretation der Ergebnisse und die Identifizierung schwacher Mutationen benötigt (siehe „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 33). Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA mit.

Darüber hinaus sollte in jeder PCR-Konfiguration für mindestens einen Assay eine Negativkontrolle (ohne Template-DNA) mitgeführt werden.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit (Packung 1/2)

| | |
|--|---------------|
| <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24) | (24) |
| Katalog-Nr. | 971510 |
| Anzahl der Reaktionen | 24 |
| Seq Primer KIT exon 9 (Sequenzierungs-Primer KIT-Exon 9) | 32 µl |
| Seq Primer PDGRA exon 18 (Sequenzierungs-Primer PDGFRA-Exon 18) | 32 µl |
| PCR Primer Mix KIT exon 9 (PCR-Primer-Gemisch KIT-Exon 9) | 32 µl |
| PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (PCR-Primer-Gemisch PDGFRA-Exon 18) | 32 µl |
| PyroMark PCR Master Mix, 2x | 850 µl |
| CoralLoad® Concentrate, 10x (CoralLoad® Konzentrat, 10x) | 1,2 ml |
| H ₂ O | 3 x 1,9 ml |
| Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Unmethylierte Kontroll-DNA, 10 ng/µl) | 100 µl |

therascreen Pyro Puffer und Reagenzien (Packung 2/2)

| therascreen Pyro Puffer und Reagenzien | |
|--|---------------|
| PyroMark Binding Buffer (PyroMark Bindungspuffer) | 10 ml |
| PyroMark Annealing Buffer (PyroMark Annealing-Puffer) | 10 ml |
| PyroMark Denaturation Solution (PyroMark Denaturierungslösung)* | 250 ml |
| PyroMark Wash Buffer, 10x (PyroMark Waschpuffer, 10x) | 25 ml |
| Enzyme Mixture (Enzymgemisch) | 1 Fläschchen |
| Substrate Mixture (Substratgemisch) | 1 Fläschchen |
| dATP α S | 1 180 μ l |
| dCTP | 1 180 μ l |
| dGTP | 1 180 μ l |
| dTTP | 1 180 μ l |
| therascreen <i>GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (Englisch) | 1 |

* Enthält Natriumhydroxid.

Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen, die vom Hersteller des jeweiligen Produkts bereitgestellt werden.

Reagenzien

- Kit zur DNA-Isolierung (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 15)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, Katalog-Nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)

- Hochreines Wasser (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm oder gleichwertiges Produkt)
Hinweis: Im Lieferumfang des Kits ist ausreichend Wasser für die PCR, DNA-Immobilisierung und zum Auflösen des Enzym- und des Substratgemisches enthalten. Zur Verdünnung des PyroMark Waschpuffers (10x) wird zusätzliches hochreines Wasser benötigt.
- Ethanol (70 %)*

Verbrauchsmaterialien

- Sterile Pipettenspitzen (mit Filtern zur PCR-Einrichtung)
- PCR-Platten mit 24 Kavitäten (siehe „Empfohlene Platten mit 24 Kavitäten“, Seite 12)
- Klebefolie

Geräte

- (Einstellbare) Pipetten[†]
- Tisch-Mikrozentrifuge[†]
- Thermocycler[†] und entsprechende PCR-Röhrchen
- PyroMark Q24 (Katalog-Nr. 9001513 oder 9001514)^{†‡}
- PyroMark Q24 Software (Katalog-Nr. 9019063 oder 9019062)[‡]
- PyroMark Q24 Platte (Katalog-Nr. 979201)[‡]
- PyroMark Q24 Kartusche (Katalog-Nr. 979202)[‡]
- PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation (Katalog-Nr. 9001515 oder 9001517)^{†‡}
- Plattenmischer[†] für die Immobilisierung auf Beads (siehe „Empfohlene Plattenmischer“ auf Seite 12)
- Heizblock[†] (bis 80 °C)

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe, wie z. B. Methanol oder Methylethylketon, enthält.

[†] Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

[‡] CE-IVD-gekennzeichnet, entspricht der EU-Richtlinie 98/79/EG. Alle anderen aufgeführten Produkte sind nicht gemäß der EU-Richtlinie 98/79/EG CE-IVD-gekennzeichnet.

Empfohlene Platten mit 24 Kavitäten

Zur Verwendung mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit werden die in Tabelle 1 aufgeführten Platten mit 24 Kavitäten empfohlen.

Tabelle 1. Zur Verwendung mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit empfohlene Platten mit 24 Kavitäten

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

Empfohlene Plattenmischer

Zur Verwendung mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit werden die in Tabelle 2 aufgeführten Orbitalplattenmischer empfohlen.

Tabelle 2. Zur Verwendung mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit empfohlene Plattenmischer

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

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN® einsehen und ausdrucken.

Für die Bestandteile des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise:

PyroMark Denaturation Solution



Achtung! Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden. Nur im Originalbehälter aufbewahren. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Achten Sie stets auf folgende Punkte:

- Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen im Benutzerhandbuch genau befolgt werden. Eine Verdünnung der Reagenzien, die von den in diesem Handbuch beschriebenen Anweisungen abweicht, ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt.
- Die Bestandteile dieses Produkts sind ausreichend für 24 Reaktionen in bis zu 5 unabhängigen Läufen.
- Verwenden Sie sterile Pipettenspitzen (mit Filtern zur PCR-Konfiguration).
- Lagern und extrahieren Sie positive Materialien (Proben, Positivkontrollen und Amplifikate) getrennt von allen anderen Reagenzien und geben Sie sie in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzu.
- Lassen Sie vor der Durchführung eines Assays alle Komponenten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig auftauen.

- Mischen Sie nach dem Auftauen die Komponenten (durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch kurzes Mischen im Vortexer) und zentrifugieren Sie sie kurz.
- Fehlgeschlagene Ergebnisse stellen keine Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus dar.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit wird in zwei Packungen versandt. Der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit selbst (Packung 1/2) wird auf Trockeneis versandt. PyroMark PCR-Master-Mix, CoralLoad Konzentrat, unmethylierte Kontroll-DNA und alle Primer müssen direkt nach dem Empfang bei -15 bis -30 °C gelagert werden.

Die *therascreen* Pyro Puffer und Reagenzien (Packung 2/2), wozu Puffer, Enzymgemisch, Substratgemisch, dATP α S, dCTP, dGTP und dTTP (die für Pyrosequenzierungs-Analysen erforderlichen Reagenzien) gehören, werden auf Kühlelementen versandt. Diese Komponenten müssen direkt nach dem Empfang bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Um den Verlust der Aktivität so gering wie möglich zu halten, empfiehlt es sich, das Enzymgemisch und das Substratgemisch in den mitgelieferten Fläschchen aufzubewahren.

Rekonstituiertes Enzym- und Substratgemisch ist bei 2 bis 8 °C mindestens 10 Tage lang haltbar. Rekonstituiertes Enzym- und Substratgemisch kann eingefroren und in den Originalfläschchen bei -15 bis -30 °C gelagert werden. Gefrorene Reagenzien dürfen maximal 6-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Hinweis: Nukleotide dürfen nicht eingefroren werden.

Der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit ist bei Aufbewahrung gemäß den hier genannten Lagerungsbedingungen bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Lagerung und Handhabung der Proben

Alle Proben müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden.

Das Probenmaterial besteht aus humaner DNA, die aus Blut oder formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben extrahiert wurde.

Proben von Patienten, die mit Heparin behandelt werden, dürfen nicht verwendet werden. Blutproben, die in Röhrchen mit Heparin als Antikoagulans entnommen wurden, sollten ebenfalls nicht verwendet werden. Heparin beeinträchtigt die PCR.

Verfahren

DNA-Isolierung

Die Funktionalität des Systems wurde unter Verwendung des EZ1[®] DNA Tissue Kits und des QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kits zur Extraktion von humaner DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben getestet. Die Funktionalität des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit-Systems wurde unter Verwendung von Blutproben gesunder Spender getestet, von denen einige mit Tumorzellen versetzt wurden.

Die in Tabelle 3 aufgeführten Kits von QIAGEN wurden für die Reinigung von DNA aus den angegebenen Arten humaner Proben zur Verwendung mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit validiert. Die DNA-Reinigung ist gemäß den Anweisungen in den jeweiligen Kit-Handbüchern durchzuführen.

Tabelle 3. Kits zur DNA-Reinigung, die zur Verwendung mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit empfohlen werden

| Probenmaterial | Kit zur Nukleinsäure-Isolierung | Katalognummer (QIAGEN) |
|----------------------------------|--|-------------------------------|
| In Paraffin eingebettetes Gewebe | QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) | 56404 |
| | EZ1 DNA Tissue Kit (48)* | 953034 |
| Blut | QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit† | 61104 |

* Befolgen Sie das Protokoll für die Verwendung von in Paraffin eingebettetem Gewebe. Der EZ1 DNA Tissue Kit muss in Verbindung mit der EZ1 Advanced (Katalog-Nr. 9001410 oder 9001411) und der EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (Katalog-Nr. 9018298), mit der EZ1 Advanced XL (Katalog-Nr. 9001492) und der EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (Katalog-Nr. 9018700) oder mit der BioRobot® EZ1 (Katalog-Nr. 9000705, nicht mehr erhältlich) und der EZ1 DNA Paraffin Section Card (Katalog-Nr. 9015862) verwendet werden.

† CE-IVD-gekennzeichnet, entspricht der EU-Richtlinie 98/79/EG.

Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Bei Bedarf kann die Leerwertgrenze (LOB) dadurch bestätigt werden, dass die Ergebnisse einer vollständigen Platte mit einer Wildtyp-Probe bestimmt werden. Detaillierte Informationen hierzu finden Sie in der CLSI-Richtlinie EP17-A „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline“.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Falls der GIST RapidScreen Plug-in Report nicht installiert ist, konfigurieren Sie den Assay manuell (siehe „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Assays“ auf Seite 54). Dies darf vor der Durchführung des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Assays nur einmal vorgenommen werden. Ist der GIST RapidScreen Plug-in Report bereits installiert, sind in der Navigationsansicht der PyroMark Q24 Software unter dem Pfad „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ vordefinierte Assay-Konfigurationen verfügbar. Der GIST RapidScreen Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden.

Verfahren

1. Klicken Sie in der Symbolleiste auf .

Eine neue Laufdatei wird erstellt.

2. Geben Sie die Laufparameter ein (siehe „Laufparameter“ auf Seite 18).

3. Richten Sie die Platte ein, indem Sie den Kavitäten, die den zu analysierenden Proben entsprechen, Assays sowohl für das KIT-Exon 9 als auch das PDGFRA-Exon 18 zuweisen.

Hinweis: In jeder PCR-Konfiguration sollte für mindestens einen Assay eine Negativkontrolle (ohne Template-DNA) mitgeführt werden.

Hinweis: Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA mit (siehe „Kontrollen“ auf Seite 8).

4. Wenn der Lauf fertig konfiguriert und für die Durchführung auf dem PyroMark Q24 System bereit ist, drucken Sie eine Liste der für das Enzymgemisch, das Substratgemisch und die Nukleotide benötigten Volumina sowie die Plattenanordnung aus. Wählen Sie im Menü „Tools“ (Extras) die Option „Pre Run Information“ (Informationen vor dem Lauf). Wenn der Bericht angezeigt wird, klicken Sie auf .

5. Schließen Sie die Laufdatei und kopieren Sie sie über den Windows® Explorer auf einen USB-Stick (im Lieferumfang enthalten).

Die ausgedruckten Informationen vor dem Lauf können als Vorlage für die Probenkonfiguration verwendet werden (siehe „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 23).

Informationen zur Durchführung des Laufs auf dem PyroMark Q24 finden Sie unter „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 30.

Laufparameter

- „Run name“ (Laufname): Dem Lauf wird beim Speichern der Datei ein Name zugewiesen. Eine Umbenennung der Datei führt somit auch zur Umbenennung des Laufs.
- „Instrument method“ (Gerätemethode): Wählen Sie je nach Kartusche, die für den Lauf verwendet wird, die Gerätemethode aus (siehe Gebrauchsanleitung des jeweiligen Produkts).
- „Plate ID“ (Platten-ID): **Optional:** Geben Sie die ID der PyroMark Q24 Platte ein.
- „Bar code“ (Barcode): **Optional:** Geben Sie den Barcode der Platte manuell ein oder, falls Ihr Computer über einen integrierten Barcodeleser verfügt, setzen Sie den Mauscursor in das Textfeld „Barcode“ (durch Klicken in das Feld) und lesen Sie den Barcode ein.
- „Kit ID“ (Kit-ID) und „Reagent ID“ (Reagenz-ID): **Optional:** Geben Sie die jeweilige Chargennummer von Packung 1 und Packung 2 des zu verwendenden *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits ein. Diese ist auf dem Produktetikett angegeben.
Hinweis: Wir empfehlen die Eingabe beider Chargennummern, damit unerwartete Probleme mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit zurückverfolgt werden können.
- „Run note“ (Laufanmerkung): **Optional:** Geben Sie eine Anmerkung mit Informationen zum Inhalt oder Zweck des Laufs ein.

Zuweisen von Assay-Dateien

Für die Zuweisung eines Assays zu einer Kavität stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl:

- Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Kavität und wählen Sie im Kontextmenü die Option „Load Assay“ (Assay laden).
- Wählen Sie in der Navigationsansicht den Assay aus und ziehen Sie den Assay mit der Maus auf die Kavität.

Die Kavitäten sind je nach zugewiesenem Assay farbig markiert.

Eingeben von Proben-IDs und Anmerkungen

Wählen Sie zum Eingeben einer Proben-ID oder Anmerkung die entsprechende Zelle aus und geben Sie den gewünschten Text ein.

Um eine Proben-ID oder Anmerkung zu bearbeiten, wählen Sie entweder die Zelle aus (der aktuelle Inhalt wird markiert) oder doppelklicken Sie auf die Zelle.

Protokoll 2: PCR unter Verwendung der PCR-Reagenzien des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit

Dieses Protokoll dient zur PCR-Amplifikation einer Region, die das KIT-Exon 9 enthält, und einer separaten PCR-Amplifikation einer Region, die das PDGFRA-Exon 18 enthält. Die Amplifikationen werden mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit durchgeführt.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Die HotStarTaq® DNA-Polymerase im PyroMark PCR Master-Mix muss **15 Minuten lang bei 95 °C** aktiviert werden.
- Bereiten Sie alle Reaktionsgemische vor. Führen Sie dies in einem Bereich durch, der von den Bereichen für die DNA-Reinigung, Zugabe des Template zur PCR, Analyse von PCR-Produkten und Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse getrennt ist.
- Verwenden Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen Einwegspitzen mit hydrophoben Filtern.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Bevor Sie die Röhren mit den PCR-Primern öffnen, zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhren absetzt.
- Passen Sie die Konzentration der Kontrolle und der Proben-DNA bei Bedarf auf 0,4 bis 2 ng/µl an.

Verfahren

1. Lassen Sie alle benötigten Komponenten auftauen (siehe Tabelle 4).

Mischen Sie diese vor der Verwendung gründlich.

2. Stellen Sie gemäß Tabelle 4 für jeden Satz von PCR-Primern ein Reaktionsgemisch her.

Das Reaktionsgemisch enthält mit Ausnahme der Probe normalerweise alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Stellen Sie eine größere Menge an Reaktionsgemisch her als insgesamt für alle durchzuführenden PCR-Assays benötigt wird.

Tabelle 4. Herstellung des Reaktionsgemisches für jedes PCR-Primer-Gemisch

| Komponente | Volumen/Reaktion |
|--|-------------------------|
| PyroMark PCR-Master-Mix, 2x | 12,5 µl |
| CoralLoad Konzentrat, 10x | 2,5 µl |
| PCR-Primer KIT-Exon 9 oder PCR-Primer PDGFRA-Exon 18 | 1 µl |
| Wasser (H ₂ O, im Lieferumfang enthalten) | 4 µl |
| Gesamtvolumen | 20 µl |

3. Mischen Sie das Reaktionsgemisch gründlich und geben Sie 20 µl in jedes PCR-Röhrchen.

Die PCR-Röhrchen müssen nicht auf Eis gelagert werden, da die HotStarTaq DNA-Polymerase bei Raumtemperatur inaktiv ist.

4. Geben Sie 5 µl Template-DNA (2 bis 10 ng genomische DNA) in die einzelnen PCR-Röhrchen (siehe Tabelle 5) und mischen Sie sie gründlich.

Hinweis: In jeder PCR-Konfiguration sollte für mindestens einen Assay eine Negativkontrolle (ohne Template-DNA) mitgeführt werden.

Hinweis: Führen Sie in jedem Pyrosequenzierungs-Lauf jedes Assays eine Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA mit (siehe „Kontrollen“ auf Seite 8).

Tabelle 5. Vorbereitung der PCR

| Komponente | Volumen/Reaktion |
|----------------------|-------------------------|
| Reaktionsgemisch | 20 µl |
| Proben-DNA | 5 µl |
| Gesamtvolumen | 25 µl |

5. Programmieren Sie den Thermocycler gemäß den Anweisungen des Herstellers und unter Verwendung der in Tabelle 6 aufgeführten Parameter.

Tabelle 6. Optimiertes Zyklusprotokoll

| | | | Kommentare |
|-----------------------------|-------------|-------|---|
| Erste Aktivierung: | 15 Minuten | 95 °C | In diesem Heizschritt wird die HotStarTaq DNA-Polymerase aktiviert. |
| 3-Schritt-Zyklus: | | | |
| Denaturierung | 20 Sekunden | 95 °C | |
| Annealing | 30 Sekunden | 53 °C | |
| Verlängerung | 20 Sekunden | 72 °C | |
| Anzahl der Zyklen | 42 | | |
| Letzte Verlängerung: | 5 Minuten | 72 °C | |

6. Setzen Sie die PCR-Röhrchen in den Thermocycler und starten Sie das Zyklusprogramm.
7. Fahren Sie nach der Amplifikation mit „Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads“ auf Seite 23 fort.

Die PCR-Proben können bis zu 3 Tage lang bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

Protokoll 3: Immobilisierung der PCR-Produkte auf Streptavidin Sepharose High Performance Beads

Dieses Protokoll dient zur Immobilisierung der Template-DNA auf Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) vor der Analyse mit dem PyroMark Q24 System.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Lassen Sie vor Beginn alle benötigten Reagenzien und Lösungen auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) temperieren.
- Schalten Sie den PyroMark Q24 mindestens 30 Minuten vor einem geplanten Lauf am Hauptschalter an der Geräterückseite ein.
- Setzen Sie einen PyroMark Q24 Plattenhalter auf einen vorgeheizten Heizblock mit 80 °C. Lassen Sie einen zweiten PyroMark Q24 Plattenhalter bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) stehen.
- Der PyroMark Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor. Verdünnen Sie diesen vor der ersten Verwendung zu einer 1x-Arbeitslösung, indem Sie 225 ml hochreines Wasser zu 25 ml 10x PyroMark Waschpuffer geben (Endvolumen beträgt somit 250 ml).

Hinweis: Die PyroMark Waschpuffer-Gebrauchslösung (1x) ist bei 2 bis 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil.

- Bereiten Sie die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation für die Probenvorbereitung vor (siehe PyroMark Q24 User Manual).

Verfahren

1. **Schwenken Sie die Flasche mit Streptavidin Sepharose High Performance vorsichtig, bis eine homogene Lösung vorliegt.**
2. **Stellen Sie gemäß Tabelle 7 einen Master-Mix zur Immobilisierung der DNA her.**

Stellen Sie eine größere Menge her als insgesamt für alle durchzuführenden Reaktionen benötigt wird (Menge für die tatsächliche Anzahl an Reaktionen + Menge für eine weitere Reaktion).

Tabelle 7. Master-Mix zur DNA-Immobilisierung

| Komponente | Volumen/Probe |
|--|----------------------|
| PyroMark Bindungspuffer | 40 µl |
| Streptavidin Sepharose High Performance | 1 µl |
| Wasser (H ₂ O, im Lieferumfang enthalten) | 29 µl |
| Gesamtvolumen | 70 µl |

Hinweis: Dieses Protokoll ist für Streptavidin Sepharose High Performance mit Chargennummer 10057037 oder höher vorgesehen. Bei Verwendung von Streptavidin Sepharose High Performance Beads mit einer Chargennummer unter 10057037 muss das Volumen der Beads pro Probe auf 2 µl erhöht und das Wasservolumen entsprechend reduziert werden.

- 3. Geben Sie 70 µl des Master-Mix in die Kavitäten einer PCR-Platte mit 24 Kavitäten (wie in der Laufkonfiguration festgelegt, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 17).**

Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Stellen Sie die Homogenität des Master-Mix sicher, indem Sie diesen häufig mithilfe einer Pipette oder durch Impuls-Vortexen mischen. Zentrifugieren Sie den Master-Mix nicht ab.

- 4. Geben Sie 10 µl biotinyliertes PCR-Produkt aus Protokoll 2 in jede Kavität, die Master-Mix enthält (wie in der Laufkonfiguration festgelegt, siehe „Protokoll 2: PCR unter Verwendung der PCR-Reagenzien des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit“ auf Seite 20).**

Das Gesamtvolumen pro Kavität soll nach der Zugabe des Master-Mix und des PCR-Produkts 80 µl betragen.

- 5. Verschließen Sie die PCR-Platte mit Klebefolie.**

Stellen Sie sicher, dass zwischen den Kavitäten keine Flüssigkeit verschleppt wird.

- 6. Schütteln Sie die PCR-Platte bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) 5 bis 10 Minuten lang bei 1400 U/min.**

Fahren Sie während des Vorgangs unverzüglich mit „Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24“ auf Seite 25 fort.

Protokoll 4: Vorbereitung der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24

Dieses Protokoll dient zur Vorbereitung einsträngiger DNA und zum Annealing des Sequenzierungs-Primers an das Template vor der Pyrosequenzierungs-Analyse auf dem PyroMark Q24.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Bevor Sie die Röhrchen mit den Sequenzierungs-Primern öffnen, zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhrchen absetzt.
- Geben Sie die 2 verschiedenen Sequenzierungs-Primer hinzu. Gehen Sie dabei je nach Analyse-Region (KIT-Exon 9 oder PDGFRA-Exon 18) nach dem in der Laufkonfiguration für die Platte festgelegten Schema vor (siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 17).
- Die Abkühlzeit der Proben nach dem Aufheizen auf 80 °C darf nicht verkürzt werden.
- Führen Sie wie im *PyroMark Q24 User Manual* beschrieben regelmäßige Funktionsprüfungen der Filternadeln durch und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus.

Verfahren

- 1. Verdünnen Sie eine ausreichende Menge jedes Sequenzierungs-Primers (Seq.-Primer KIT-Exon 9 und Seq.-Primer PDGFRA-Exon 18) in PyroMark Annealing-Puffer (siehe Tabelle 8).**

Stellen Sie eine größere Menge an verdünnten Sequenzierungs-Primern her als insgesamt für alle zu sequenzierenden Proben benötigt wird (Menge für die tatsächliche Anzahl an Proben + Menge für eine weitere Probe).

Es darf nicht mehr Sequenzierungs-Primer verdünnt und gelagert werden.

Tabelle 8. Beispiel zur Verdünnung der Sequenzierungs-Primer

| Komponente | Volumen/Probe | Volumen für 9 + 1 Reaktionen |
|--|---------------|---------------------------------|
| PyroMark Annealing-Puffer | 24,2 µl | 242 µl |
| Sequenzierungs-Primer KIT- Exon 9 oder Sequenzierungs-Primer PDGFRA-Exon 18 | 0,8 µl | 8 µl |
| Gesamtvolumen | 25 µl | 250 µl |

- Geben Sie 25 µl des verdünnten Sequenzierungs-Primers in jede Kavität der PyroMark Q24 Platte (gemäß der Laufkonfiguration, siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 17).**
Halten Sie einen der PyroMark Q24 Plattenhalter (im Lieferumfang der PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation enthalten) auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) und verwenden Sie diesen als Auflage beim Vorbereiten und Bewegen der Platte.
- Schalten Sie die Vakuumpumpe der PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation ein.**
- Stellen Sie die PCR-Platte aus Protokoll 3 und die PyroMark Q24 Platte in die Vakuum-Arbeitsstation (siehe Abbildung 3).**
Vergewissern Sie sich, dass die Sepharose-Beads in der PCR-Platte aufgelöst sind. Achten Sie dabei darauf, dass die Platte die gleiche Ausrichtung wie beim Laden der Proben hat.



Abbildung 3. Position der PCR-Platte und der PyroMark Q24 Platte in der Vakuum-Arbeitsstation

- 5. Legen Sie Unterdruck an den Saugkopf an, indem Sie den Vakuumschalter öffnen.**
- 6. Senken Sie die Filternadeln des Vakuum-Saugkopfes langsam in die PCR-Platte ab, um die Beads mit dem immobilisierten Template anzusaugen. Lassen Sie die Nadeln 15 Sekunden lang in dieser Position. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf vorsichtig wieder an.**

Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Der Bindungsschritt an die Beads sollte möglichst direkt nach dem Schütteln erfolgen. Wenn seit dem Schütteln der Platte mehr als 1 Minute vergangen ist, schütteln Sie sie vor der Bindung an die Beads erneut 1 Minute lang.

Vergewissern Sie sich, dass alle Proben in der PCR-Platte vom Vakuum-Saugkopf aufgenommen wurden.

- 7. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 40 ml 70 %igem Ethanol (Reservoir 1, siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 5 Sekunden lang.**
- 8. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 40 ml Denaturierungslösung (Reservoir 2, siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 5 Sekunden lang.**
- 9. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit 50 ml Waschpuffer (Reservoir 3, siehe Abbildung 3). Spülen Sie die Filternadeln 10 Sekunden lang.**
- 10. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 90° über die Senkrechte hinaus. Halten Sie ihn 5 Sekunden lang in dieser Position, um die Flüssigkeit aus den Filternadeln ablaufen zu lassen (siehe Abbildung 4).**



Abbildung 4. Saugkopf über die Senkrechte hinaus geschwenkt (über 90°)

11. Halten Sie den Vakuum-Saugkopf über die PyroMark Q24 Platte und schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf („Off“).
12. Setzen Sie die Beads in der PyroMark Q24 Platte frei, indem Sie die Filternadeln in den verdünnten Sequenzierungs-Primer absenken und den Vakuum-Saugkopf vorsichtig seitlich bewegen.
Achten Sie darauf, dass Sie die Oberfläche der PyroMark Q24 Platte nicht mit den Filternadeln zerkratzen.
13. Überführen Sie den Vakuum-Saugkopf in das Reservoir mit hochreinem Wasser (Reservoir 4, siehe Abbildung 3) und schütteln Sie den Saugkopf 10 Sekunden lang.
14. Spülen Sie die Filternadeln, indem Sie sie in hochreines Wasser (Reservoir 5, siehe Abbildung 3) eintauchen und Unterdruck anlegen. Spülen Sie die Filternadeln mit 70 ml hochreinem Wasser.
15. Heben Sie den Vakuum-Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 90° über die Senkrechte hinaus. Halten Sie ihn 5 Sekunden lang in dieser Position, um die Flüssigkeit aus den Filternadeln ablaufen zu lassen (siehe Abbildung 4).
16. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf („Off“) und bringen Sie den Saugkopf in die Parkposition (P).
17. Schalten Sie die Vakuumpumpe aus.
Am Ende jedes Arbeitstags sind der Flüssigabfall und alle verbleibenden Lösungen zu entsorgen und die PyroMark Q24 Vakuum-Arbeitsstation ist auf Staub und verschüttete Flüssigkeit zu untersuchen (siehe „Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs“ auf Seite 58).
18. Erhitzen Sie die PyroMark Q24 Platte mit den Proben unter Verwendung des vorgewärmten PyroMark Q24 Plattenhalters 2 Minuten lang bei 80 °C.

- 19. Nehmen Sie die PyroMark Q24 Platte vom heißen Plattenhalter herunter und stellen Sie sie auf den zweiten PyroMark Q24 Plattenhalter, der bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) stehen gelassen wurde, um die Proben 10 bis 15 Minuten lang auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen.**
- 20. Fahren Sie anschließend mit „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 30 fort.**

Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System

In diesem Protokoll wird die Vorbereitung und das Laden der PyroMark Gold Q24 Reagenzien in die PyroMark Q24 Kartusche sowie das Starten und Beenden eines Laufs auf dem PyroMark Q24 beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung zur Konfiguration eines Laufs finden Sie im *PyroMark Q24 User Manual*.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Der Bericht mit den Informationen vor dem Lauf, der bei der Konfiguration des Laufs über das Menü „Tools“ (Extras) aufgerufen wird (siehe „Protokoll 1: Konfiguration eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 17), enthält Informationen zu den Volumina von Nukleotiden, Enzym und Substratpuffer, die für einen bestimmten Lauf benötigt werden.
- Verwenden Sie zum Laden der Kartusche Einwegspitzen ohne hydrophobe Filter, um die korrekte Funktion der Kartusche sicherzustellen.

Verfahren

- 1. Lösen Sie die gefriergetrockneten Enzym- und Substratgemische jeweils in 620 µl Wasser auf (H₂O, im Lieferumfang enthalten).**
- 2. Mischen Sie die Lösungen durch vorsichtiges Umschwenken des Fläschchens.**
Nicht im Vortexer mischen!

Um sicherzustellen, dass das Gemisch vollständig aufgelöst ist, lassen Sie es 5 bis 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) stehen. Achten Sie darauf, dass die Lösung vor dem Befüllen der PyroMark Q24 Kartusche keine Trübung aufweist. Wenn die Reagenzien nicht direkt verwendet werden, lagern Sie die Reagenzfläschchen auf Eis oder in einem Gefrierschrank.

- 3. Die Reagenzien und die PyroMark Q24 Kartusche müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden (20 bis 25 °C).**
- 4. Drehen Sie das Etikett der PyroMark Q24 Kartusche zu sich hin.**
- 5. Beladen Sie die PyroMark Q24 Kartusche mit den entsprechenden Volumina an Nukleotiden sowie Enzym- und Substratgemisch, wie in Abbildung 5 dargestellt.**

Stellen Sie sicher, dass keine Luftblasen aus der Pipette in die Kartusche gelangen.

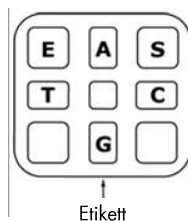


Abbildung 5. Grafische Darstellung der PyroMark Q24 Kartusche in der Draufsicht.

Die Buchstaben entsprechen denen auf den Etiketten der Reagenzfläschchen. Geben Sie Enzymgemisch (**E**), Substratgemisch (**S**) und Nukleotide (**A**, **T**, **C**, **G**) gemäß den Volumenangaben im Bericht mit den Informationen vor dem Lauf zu, der bei der Konfiguration des Laufs über das Menü „Tools“ (Extras) aufgerufen wird.

6. Öffnen Sie die Kartuschenverriegelung und setzen Sie die gefüllte Reagenzkartusche so ein, dass das Etikett nach außen zeigt. Setzen Sie die Kartusche vollständig ein und drücken Sie sie dann nach unten.
7. Vergewissern Sie sich, dass die Linie vorne an der Kartusche sichtbar ist und schließen Sie die Verriegelung.
8. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und stellen Sie die Platte auf den Heizblock.
9. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.
10. Stecken Sie den USB-Stick (auf dem die Laufdatei gespeichert ist) in den USB-Anschluss vorne am Gerät.
Der USB-Stick darf erst herausgezogen werden, wenn der Lauf abgeschlossen ist.
11. Wählen Sie im Hauptmenü (mit Hilfe der Tasten \blacktriangle und \blacktriangledown) die Option „Run“ (Lauf) und drücken Sie „OK“.
12. Wählen Sie mit Hilfe der Tasten \blacktriangle und \blacktriangledown die Laufdatei aus.
Um den Inhalt eines Ordners anzuzeigen, wählen Sie den Ordner aus und drücken Sie „Select“ (Auswählen). Um zur vorherigen Ansicht zurückzukehren, drücken Sie „Back“ (Zurück).
13. Drücken Sie nach Auswahl der Laufdatei „Select“ (Auswählen), um den Lauf zu starten.
14. Nachdem der Lauf abgeschlossen ist und das Gerät bestätigt hat, dass die Laufdatei auf dem USB-Stick gespeichert wurde, drücken Sie „Close“ (Schließen).
15. Ziehen Sie den USB-Stick heraus.
16. Öffnen Sie den Gerätedeckel.
17. Öffnen Sie die Kartuschenverriegelung und entnehmen Sie die Reagenzkartusche, indem Sie sie anheben und dann herausziehen.
18. Schließen Sie die Verriegelung.

19. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und nehmen Sie die Platte vom Heizblock.
20. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.
21. Entsorgen Sie die Platte und reinigen Sie die Kartusche gemäß den Anweisungen im der Kartusche beiliegenden Produktblatt.
22. Analysieren Sie den Lauf gemäß „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 33.

Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs

In diesem Protokoll wird die Mutationsanalyse eines abgeschlossenen GIST RapidScreen Laufs mit der PyroMark Q24 Software beschrieben.

Verfahren

1. **Stecken Sie den USB-Stick, auf dem die Laufdatei gespeichert ist, in den USB-Anschluss des Computers.**
2. **Verschieben Sie die Laufdatei über den Windows Explorer vom USB-Stick zum gewünschten Speicherort auf dem Computer.**
3. **Öffnen Sie die Laufdatei im AQ-Modus der PyroMark Q24 Software, indem Sie entweder im Menü „File“ (Datei) die Option „Open“ (Öffnen) auswählen oder in der Navigationsansicht auf die Datei doppelklicken (☑).**
4. **Für die Analyse des Laufs stehen zwei Methoden zur Auswahl: Wenn Sie mit dem GIST RapidScreen Plug-in Report arbeiten, fahren Sie mit Schritt 5 fort. Wenn Sie die AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software verwenden, fahren Sie mit Schritt 6 fort.**

Hinweis: Wir empfehlen dringend, für die Dokumentation und Interpretation der Ergebnisse den GIST RapidScreen Plug-in Report zu verwenden.

Der GIST RapidScreen Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden. Mit diesem Report wird sichergestellt, dass die jeweiligen Nachweisgrenzen (siehe Tabelle 9) und die verschiedenen zu analysierenden Sequenzen („Sequences to Analyze“) für den automatischen Nachweis aller Mutationen verwendet werden.

Hinweis: Zwei komplexe Mutationen im PDGFRA-Exon 18 (2526_2538>G und 2524_2526GAC>TAT) können mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software nicht analysiert werden. Wir empfehlen, für die Analyse der komplexen Mutationen im PDGFRA-Exon 18 den GIST RapidScreen Plug-in Report zu verwenden.

5. **Bei Verwendung des GIST RapidScreen Plug-in Reports:**
Um einen Bericht zu erstellen, wählen Sie im Menü „Reports“ (Berichte) die Option „AQ Add On Reports/GIST“ (AQ-Zusatzberichte/GIST) aus (siehe Abbildung 6).

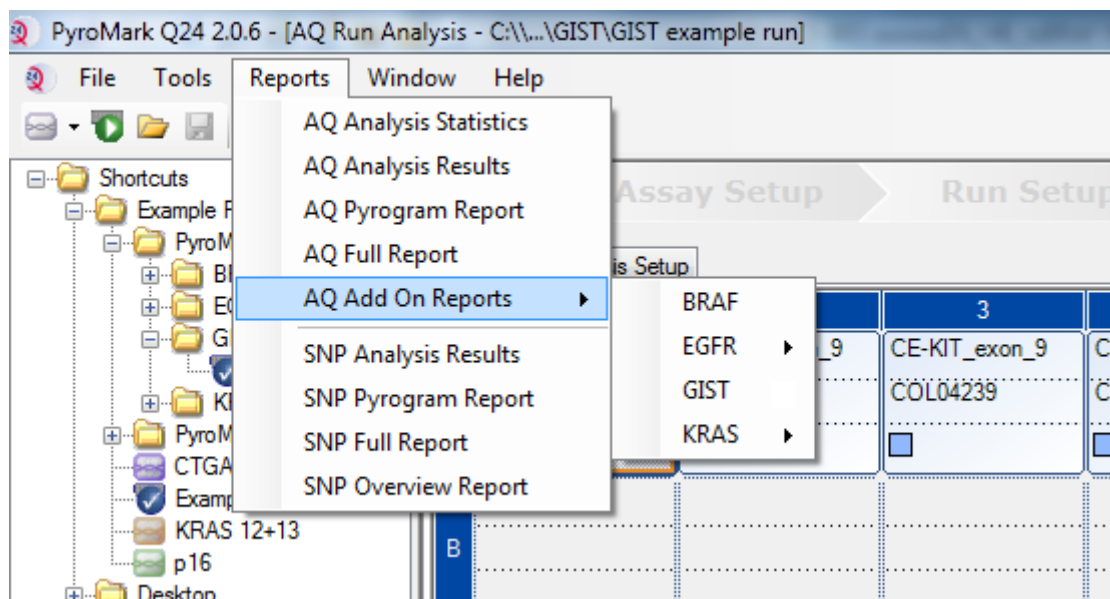


Abbildung 6. Menü mit dem GIST RapidScreen Plug-in Report

Es werden automatisch die Kavitäten für alle Mutationen analysiert, für die in Tabelle 9 Nachweisgrenzen angegeben sind. Die Ergebnisse werden in einer Übersichtstabelle zusammengefasst (siehe Abbildung 7); im Anschluss folgen die detaillierten Ergebnisse, wie z. B. Pyrogramme und Informationen zur Analysequalität.

Summary

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

⚠ See detailed results below.

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

Abbildung 7. GIST RapidScreen Plug-in Report

- Bei Verwendung der AQ-Analyse: Klicken Sie auf eine der beiden Analyse-Schaltflächen, um den Lauf zu analysieren und eine Übersicht der Ergebnisse anzuzeigen.



Analyse aller Kavitäten



Analyse der ausgewählten Kavität

Die Analyseergebnisse (Allelfrequenzen) und die Qualitätsbewertung werden über der variablen Position im Pyrogram[®] Diagramm angezeigt. Weitere Informationen zur Analyse eines Laufs finden Sie im *PyroMark Q24 User Manual*.

Um einen Bericht zu erstellen, wählen Sie im Menü „Reports“ (Berichte) die Option „AQ Full Report“ (Vollständiger AQ-Bericht) oder „AQ Analysis Results“ (AQ-Analyseergebnisse).

Hinweis: Zur Erzielung zuverlässiger Ergebnisse empfehlen wir einzelne Peaks mit einer Höhe über 30 RLU zu verwenden. Bei der Assay-Konfiguration sollte als „Required peak height for passed quality“ (Erforderliche Peakhöhe für bestandene Qualität) der Wert 30 festgelegt werden (siehe „Anhang A: Konfigurieren des theascreen GIST RapidScreen Pyro Assays“ und *PyroMark Q24 User Manual*).

Hinweis: Für die Dokumentation und Interpretation der Allelquantifizierung sollte der Bericht „AQ Analysis Results“ (AQ-Analyseergebnisse) verwendet werden. Die Zahlen im Pyrogramm sind gerundet und geben somit nicht die genaue Quantifizierung an.

Hinweis: Das Pyrogramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Die gemessenen Peaks sollten mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen.

Erneute Analyse von Proben, bei denen mit der Standardeinstellung unter „Sequence to Analyze“ keine Mutation nachgewiesen wurde oder die die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) erhalten haben

Die in der Analysekonfiguration festgelegte Standardeinstellung für „Sequence to Analyze“ deckt die 6-bp-Duplikation im KIT-Exon 9 sowie die häufigste Punktmutation im Codon 842 (GAC>GTC) des PDGFRA-Exons 18 ab (siehe Anhang A auf Seite 54). Wenn eine Probe eine seltenere Mutation im PDGFRA-Exon 18 enthält, kann die Einstellung unter „Sequence to Analyze“ geändert werden, um den Mutationsstatus dieser Mutation zu analysieren (siehe Anhang A).

Zwei komplexe Mutationen im PDGFRA-Exon 18 (2526_2538>G und 2524_2526GAC>TAT) können mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24

Software nicht analysiert werden. Wir empfehlen, für die Analyse der komplexen Mutationen im PDGFRA-Exon 18 den GIST RapidScreen Plug-in Report zu verwenden.

Wir empfehlen, alle Proben, bei denen mit der Standardeinstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) keine Mutation nachgewiesen wurde, sowie Proben mit den Qualitätsbewertungen „Check“ oder „Failed“ unbedingt neu zu analysieren. Die Qualitätsbewertungen „Check“ und „Failed“ weisen möglicherweise auf eine seltene Mutation hin, die von der Standardeinstellung „Sequence to Analyze“ nicht abgedeckt wird, was zu unerwarteten Referenz-Peaks führen kann.

Um die Proben erneut zu analysieren und weniger häufige Mutationen nachzuweisen, ändern Sie unter „Analysis Setup“ (Analyse-Konfiguration) die Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) auf die in Anhang A beschriebenen Varianten oder Varianten für andere seltene oder unerwartete Mutationen. Klicken Sie auf „Apply“ (Übernehmen). Wenn das Fenster „Apply Analysis Setup“ (Analysekonfiguration übernehmen) angezeigt wird, klicken Sie auf „To All“ (Für alle).

Die aktualisierten Mutationsfrequenzen im humanen KIT/PDGFRA sind auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ verfügbar.

Hinweis: Vergewissern Sie sich nach der Änderung von „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz), dass der Schwellenwert für die einzelne Peakhöhe auf 30 RLU eingestellt ist.

Hinweis: Es können seltene oder unerwartete Mutationen in der sequenzierten Region vorhanden sein, die unter Berücksichtigung unerwarteter Mutationen mit einer anderen Einstellung für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) analysiert werden können.

Hinweis: Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene oder unerwartete Mutationen zurückgeführt werden können, ist das Ergebnis nicht als Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus geeignet. Es wird empfohlen die Probe erneut zu analysieren.

Interpretation der Ergebnisse

Interpretation der Analyseergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen

Wir empfehlen dringend, zu Vergleichszwecken und als Hintergrundkontrolle in jedem Lauf unmethylierte Kontroll-DNA mitzuführen. Die gemessene Häufigkeit in der Kontrollprobe darf nicht größer sein als die Leerwertgrenze (LOB).

Anhand der in den Handbüchern angegebenen Werte für die Leerwertgrenze (LOB: Limit of Blank) und die Nachweisgrenze (LOD: Limit of Detection) lässt sich bestimmen, ob eine Mutation vorliegt. Diese Werte wurden mit Plasmidgemischen aus dem Wildtyp bzw. der entsprechenden mutierten Sequenz gewonnen.

Nach der Analyse mit der PyroMark Q24 Software oder den Plug-in Reports sind drei Ergebnisse möglich.

- Mutationshäufigkeit < LOD: Mutation nicht nachgewiesen
- Mutationshäufigkeit > LOD + 3 Prozenteinheiten: Mutation
- Mutationshäufigkeit \geq LOD und \leq LOD + 3 Prozenteinheiten: potenzielle schwache Mutation

Hinweis: Wenn Sie mit dem GIST RapidScreen Plug-in Report arbeiten (siehe Schritt 5 von „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ auf Seite 33) und dieser Fall eintritt, wird eine Warnung ausgegeben.

Der Bereich zwischen LOD und LOD + 3 Prozenteinheiten ermöglicht unter optimalen Bedingungen die sensitive Detektion niedriggradiger Mutationen. Eine gemessene Häufigkeit über der Leerwertgrenze in der unmethylierten Kontrollprobe zeigt an, dass im jeweiligen Lauf ein ungewöhnlich hoher Hintergrund vorhanden ist, der die Allelquantifizierung insbesondere für schwache Mutationen beeinträchtigen kann. Daher sind Ergebnisse mit der Warnmeldung „potenzielle schwache Mutation“ sorgfältig zu evaluieren.

Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird, sollten nur dann als mutationspositiv betrachtet werden, wenn das Ergebnis durch die Wiederholung der Analyse in Doppelbestimmung mit der unmethylierten Kontroll-DNA bestätigt werden kann. Die Ergebnisse beider Bestimmungen müssen für dieselbe Mutation Werte \geq LOD ausgeben und das Ergebnis für die Kontrollprobe muss „No mutation detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) lauten. Anderenfalls ist die Probe als „No mutation detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) einzustufen.

Ob ein erhöhter Hintergrund für eine Mutation vorliegt, lässt sich durch den Vergleich der im Handbuch angegebenen Werte für die Leerwertgrenze mit den mit der unmethylierten Kontroll-DNA ermittelten Messwerten feststellen. Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird, können ohne Wiederholung als „Mutation nicht nachgewiesen“ eingestuft werden, wenn die gemessene Häufigkeit für die unmethylierte Kontroll-DNA über der im Handbuch angegebenen Leerwertgrenze (LOB) für die betreffende Mutation liegt. Es gibt also drei verschiedene mögliche Szenarien, in denen potenzielle schwache Mutationen angegeben werden.

1. Die gemessene Häufigkeit bei der unmethylierten Kontroll-DNA liegt über der Leerwertgrenze für diese Mutation: Die Probe kann ohne Wiederholung als „Mutation nicht nachgewiesen“ eingestuft werden.
2. Das Ergebnis kann in Doppelbestimmung nicht reproduziert werden: Die Probe ist als „Mutation nicht nachgewiesen“ einzustufen.
3. Das Ergebnis wurde in Doppelbestimmung reproduziert und bei der Wildtyp-Probe lag der Wert für die betreffende Mutation unter der Leerwertgrenze (LOB): Mutation nachgewiesen.

Hinweis: Das Pyrogramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Die gemessenen Peaks sollten mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen. Die Pyrogramm-Diagramme sollten auf unerwartete Peaks geprüft werden. Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene oder unerwartete Mutationen zurückgeführt werden können, sollte die Probe erneut analysiert werden. Ein fehlgeschlagenes Ergebnis stellt keine Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus dar. Bei einem gültigen Mutationsergebnis geht eine Änderung der Peakhöhe stets mit einer entsprechenden Änderung der Höhe eines anderen Peaks einher. Eine Änderung in der Höhe eines einzelnen Peaks sollte nicht als Hinweis auf eine Mutation betrachtet werden.

Hinweis: Wir empfehlen, für die Interpretation der Ergebnisse den GIST RapidScreen Plug-in Report zu verwenden. Für eine Untersuchung von Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wurde, empfehlen wir, die Probe in der Anwendungssoftware zusätzlich manuell zu analysieren (z. B. zum Vergleich mit der Mutationshäufigkeit der Kontrollprobe).

Hinweis: Eine Therapieentscheidung für Krebspatienten darf nicht ausschließlich auf Grundlage des Mutationsstatus des KIT-Exons 9 und PDGFRA-Exons 18 getroffen werden.

Tabelle 9. Leerwertgrenze und Nachweisgrenze für bestimmte Mutationen

| Nukleinsäuresubstitution | Aminosäuresubstitution | LOB (Prozent- einheiten) | LOD (Prozent- einheiten) | COSMIC- ID* (v58) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| KIT-Exon 9 | | | | |
| 1509_1510insGCCTAT | Y503_F504insAY | 1,9 | 4,9 | 1326 |
| PDGFRA-Exon 18 | | | | |
| 2525A>T | D842V | 0,6 | 3,6 | 736 |
| 2524G>T | D842Y [†] | 0,6 | 3,6 | 12396 |
| 2524_2535del12 oder [‡] | D842_H845del oder [‡] | 2,2 | 5,2 | 737 oder [‡] |
| 2526_2537del12 | I843_D846del [‡] | | | 96892 |
| 2527_2538del12 | I843_D846del [†] | 3,0 | 6,0 | 12400 |
| 2528_2539del12 | I843_S847>T | 4,2 | 7,2 | 12407 |
| 2530_2541del12 | M844_S847del | 3,2 | 6,2 | 12402 |
| 2524_2532del9 | D842_M844del | 1,5 | 4,5 | 12401 |
| 2524_2526delGAC | D842del | 0,9 | 3,9 | 12406 |
| 2526_2538>G [§] | D842_D846>E | 0,3 | 3,3 | 12408 |
| 2524_2526GAC>TAT | D842Y [†] | 0,9 | 3,9 | 12397 |

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic verfügbar ist.

[†] Die Mutationen 2524G>T und 2524_2526GAC>TAT bzw. 2526_2537del12 und 2527_2538del12 resultieren in derselben Aminosäuresubstitution.

[‡] Die Mutationen 2524_2535del12 und 2526_2537del12 resultieren in derselben Nukleinsäuresubstitution.

[§] Die Mutationen 2526_2538>G und 2524_2526GAC>TAT können nicht mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software analysiert werden.

Repräsentative Ergebnisse

Die Abbildungen 8 bis 11 zeigen repräsentative Pyrogramm-Ergebnisse.

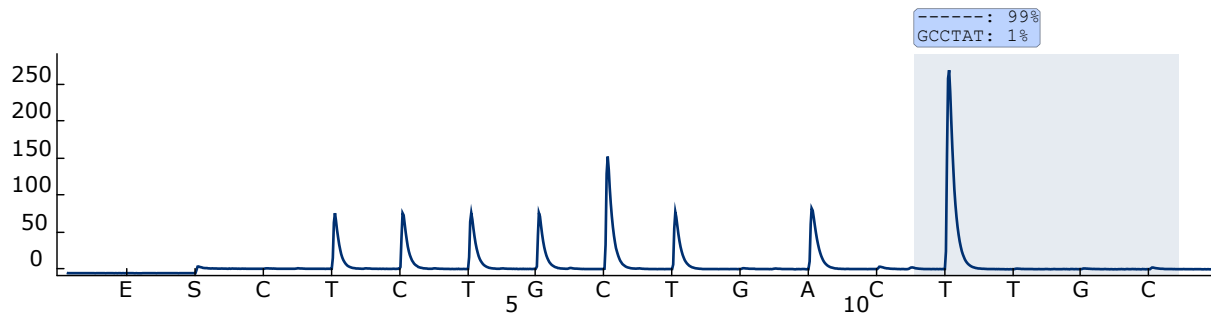


Abbildung 8. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp im KIT-Exon 9 mit *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* als „Sequence to Analyze“ für die 6-bp-Duplikation nach Codon 503

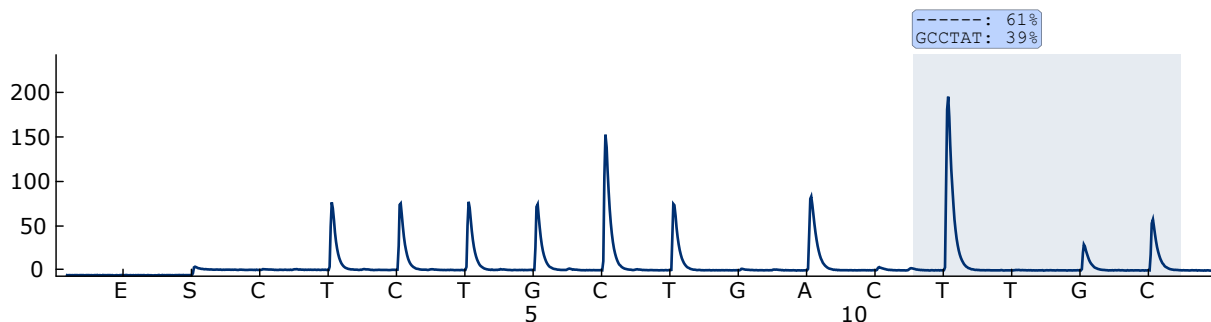


Abbildung 9. Pyrogramm einer Probe mit einer GCCTAT-Duplikation nach Codon 503 im KIT-Exon 9 mit *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* als „Sequence to Analyze“

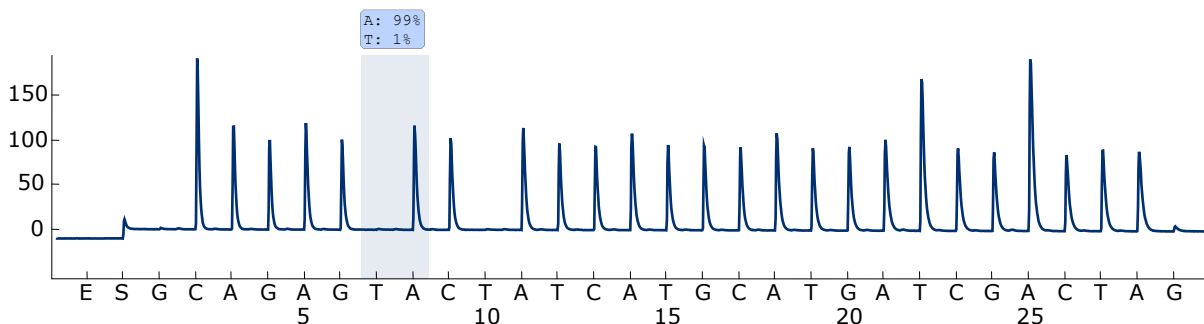


Abbildung 10. Pyrogramm einer Probe mit einem Wildtyp-Genotyp im PDGFRA-Exon 18 mit *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* als „Sequence to Analyze“ für die Mutation GAC>GTC in Codon 842 (Nukleotid 2525)

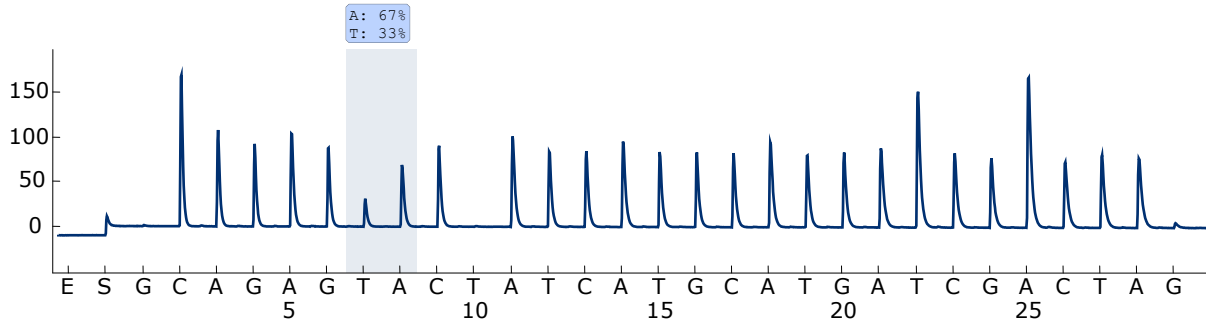


Abbildung 11. Pyrogramm einer Probe mit einer GAC>GTC-Mutation im Codon 842 (Nukleotid 2525) im PDGFRA-Exon 18 mit CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT als „Sequence to Analyze“

Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen) unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus steht Ihnen unser Technischer Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch haben sollten (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com). Das Team besteht aus erfahrenen Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Informationen zur allgemeinen Fehlerbehebung des Geräts finden Sie im *PyroMark Q24 User Manual*.

Kommentare und Vorschläge

Signale in der Nicht-Template-Kontrolle (Negativkontrolle)

- | | |
|--|---|
| a) Signalübersprechen („Crosstalk“) zwischen Kavitäten | Das Signal einer Kavität wird in einer benachbarten Kavität erfasst. Proben mit hohen Signalintensitäten sollten nicht in die Kavitäten neben den Nicht-Template-Kontrollen gegeben werden. |
| b) PCR-Kontamination | Verwenden Sie sterile Pipettenspitzen mit Filtern. Lagern und extrahieren Sie Materialien wie Proben, Kontrollen und Amplifikate getrennt von PCR-Reagenzien. |

Kommentare und Vorschläge

Schlechte oder unerwartete Sequenz

Genomische DNA schlechter Qualität

Genomische DNA schlechter Qualität kann dazu führen, dass die PCR fehlschlägt. Analysieren Sie PCR-Proben anhand eines elektrophoretischen Verfahrens (z. B. mit dem QIAxcel® System oder mittels Agarosegel-Elektrophorese).

Ergebnis „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen)

a) Geringe Peakhöhe

Fehler bei der PCR-Konfiguration oder Probenvorbereitung vor der Pyrosequenzierung können zu niedrigen Peaks führen.

Die Proben müssen unbedingt komplett vom Vakuum-Saugkopf aufgenommen werden. Achten Sie darauf, dass der Vakuum-Saugkopf langsam in die Proben eingetaucht wird und dass die Anordnung der zur Immobilisierung verwendeten PCR-Platten oder -Streifen die vollständige Aufnahme der Proben zulässt.

Führen Sie wie im *PyroMark Q24 User Manual* beschrieben regelmäßige Funktionsprüfungen der Filternadeln durch und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus.

Wenn die Warnung „Check“ (Überprüfen) angezeigt wird, vergleichen Sie das Pyrogramm mit dem Histogramm, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Wenn die gemessenen Peaks mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen, ist das Ergebnis gültig. Anderenfalls wird empfohlen, die Probe erneut zu analysieren.

b) Mutation in „Sequence to Analyze“ nicht definiert

Ändern Sie die Auswahl für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) in der Assay-Konfiguration (siehe „Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Assays“ auf Seite 54) und wiederholen Sie die Analyse des Laufs.

Kommentare und Vorschläge

- c) Unerwartete seltene Mutation
Die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) kann durch ein unerwartetes Peakmuster verursacht werden. Dies weist möglicherweise auf eine unerwartete Mutation hin, die mit der Einstellung unter „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) nicht analysiert wird. Diese Proben sollten mit der alternativen Einstellung unter „Sequence to Analyze“ analysiert werden, bei der unerwartete Mutationen berücksichtigt werden.
- d) Warnung über hohe Peakhöhenabweichung für eine Verteilung
Das Pyrogramm sollte genau mit dem Histogramm verglichen werden, das durch Klicken mit der rechten Maustaste auf das Pyrogrammfenster angezeigt werden kann. Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene Mutationen zurückgeführt werden können, sollte die Probe erneut analysiert werden.

Hoher Hintergrund

- a) Falsche Lagerung der Nukleotide
Bewahren Sie Nukleotide bei 2 bis 8 °C auf. Eine Lagerung bei -15 bis -30 °C kann zu einem erhöhten Hintergrund führen.
- b) Kurze Abkühlzeit der Proben vor der Pyrosequenzierungs-Analyse
Bewahren Sie die Proben 10 bis 15 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem PyroMark Q24 Plattenhalter auf. Die Abkühlzeit darf nicht verkürzt werden.
- c) Kontamination der Kartusche
Reinigen Sie die Kartusche gründlich wie im Produktblatt beschrieben. Bewahren Sie die Kartusche an einem vor Licht und Staub geschützten Ort auf.

Kommentare und Vorschläge

Keine Signale in der Positivkontrolle (unmethylierte Kontroll-DNA)

- | | |
|--|---|
| a) Unzureichendes Enzym- oder Substratgemisch in allen Kavitäten | Stellen Sie sicher, dass die PyroMark Q24 Kartusche gemäß den Angaben unter „Pre Run Information“ (Informationen vor dem Lauf) im Menü „Tools“ (Extras) beladen wird. |
| b) Falsche Lagerung oder Verdünnung von Reagenzien | Bereiten Sie die Reagenzien gemäß den Anweisungen unter „Protokoll 5: Durchführen eines Laufs auf dem PyroMark Q24 System“ auf Seite 30 vor. |
| c) Fehler bei der PCR oder Proben- vorbereitung | Fehler, die vor der Pyrosequenzierung bei der PCR-Konfiguration, Programmierung des PCR-Cyclers oder Probenvorbereitung auftreten, können dazu führen, dass die Signale ausbleiben. Führen Sie wie im <i>PyroMark Q24 User Manual</i> beschrieben regelmäßige Funktionsprüfungen der Filternadeln durch und wechseln Sie die Filternadeln bei Bedarf aus. Wiederholen Sie die PCR und Pyrosequenzierungs-Analyse. |

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Anwendungseinschränkungen

Alle diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

Zur Gewährleistung optimaler PCR-Ergebnisse müssen die Anweisungen im Benutzerhandbuch genau befolgt werden. Die Verfallsdaten, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, müssen unbedingt beachtet werden. Komponenten mit abgelaufenem Verfallsdatum nicht verwenden.

Leistungsmerkmale

Leerwertgrenze und Nachweisgrenze

Die Leerwertgrenze (LOB: Limit of Blank) und die Nachweisgrenze (LOD: Limit of Detection) wurden für eine Reihe von Mutationen unter Verwendung von Plasmidgemischen bestimmt (siehe Tabelle 10). Die Bestimmung der Leerwert- und der Nachweisgrenze erfolgte gemäß den Angaben in der CLSI-Richtlinie EP17-A „Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline“ (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute). α - und β -Fehler (falsch-positive bzw. falsch-negative) waren dabei auf 5 % eingestellt. Die Nachweisgrenze (LOD) für einige seltene Deletionen im PDGFRA-Exon 18 wurde durch die Addition von drei Standardabweichungen der Leerwertmessungen zur Leerwertgrenze (LOB) bestimmt. Die Nachweisgrenze wurde auf Werte mindestens drei Prozenteinheiten über dem LOB-Wert festgelegt.

Die Leerwertgrenze entspricht der Häufigkeit, die mit einer Wildtyp-Probe ermittelt wurde. Die Nachweisgrenze entspricht dem niedrigsten Signal (gemessene Häufigkeit), das für die jeweilige Mutation als positiv eingestuft werden kann.

Tabelle 10. Leerwertgrenze und Nachweisgrenze für bestimmte Mutationen

| Nukleinsäuresubstitution | Aminosäuresubstitution | LOB (Prozent- einheiten) | LOD (Prozent- einheiten) | COSMIC- ID* (v58) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| KIT-Exon 9 | | | | |
| 1509_1510insGCCTAT | Y503_F504insAY | 1,9 | 4,9 | 1326 |
| PDGFRA-Exon 18 | | | | |
| 2525A>T | D842V | 0,6 | 3,6 | 736 |
| 2524G>T | D842Y [†] | 0,6 | 3,6 | 12396 |
| 2524_2535del12 oder [‡] | D842_H845del oder [‡] | 2,2 | 5,2 | 737 oder [‡] |
| 2526_2537del12 | I843_D846del [†] | | | 96892 |
| 2527_2538del12 | I843_D846del [†] | 3,0 | 5,0 | 12400 |
| 2528_2539del12 | I843_S847>T | 4,2 | 7,2 | 12407 |
| 2530_2541del12 | M844_S847del | 3,2 | 6,2 [§] | 12402 |
| 2524_2532del9 | D842_M844del | 1,5 | 4,5 | 12401 |
| 2524_2526delGAC | D842del | 0,9 | 3,9 [§] | 12406 |
| 2526_2538>G [¶] | D842_D846>E | 0,3 | 3,3 [§] | 12408 |
| 2524_2526GAC>TAT | D842Y [†] | 0,9 | 3,9 [§] | 12397 |

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic verfügbar ist.

[†] Die Mutationen 2524G>T und 2524_2526GAC>TAT bzw. 2526_2537del12 und 2527_2538del12 resultieren in derselben Aminosäuresubstitution.

[‡] Die Mutationen 2524_2535del12 und 2526_2537del12 resultieren in derselben Nukleinsäuresubstitution.

[§] Die Nachweisgrenze (LOD) für diese Deletionen im PDGFRA-Exon 18 wurde durch die Addition von drei Standardabweichungen der Leerwertmessungen zur Leerwertgrenze (LOB) bestimmt.

[¶] Die Mutation 2526_2538>G kann nicht mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software analysiert werden.

Linearität

Die Linearität wurde unter Verwendung von Plasmidgemischen bestimmt, die den Wildtyp oder die mutierte Sequenz für die Duplikation 1509_1510insGCCTAT im KIT-Exon 9 und die Mutation 2525A>T im PDGFRA-Exon 18 enthalten. Die Plasmide wurden in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt, um vier Mutationsgrade (5, 10, 30 und 50 %) zu erhalten. Jedes Gemisch wurde mit drei verschiedenen Chargen des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits in drei Pyrosequenzierungs-Läufen mit jeweils drei Replikaten analysiert.

Die Ergebnisse (n = 9 für jeden Mutationsgrad) wurden unter Verwendung der Analyse-it® Software v2.21 gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A „Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline“ analysiert und sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

Die Ergebnisse waren bei einer zulässigen Nichtlinearität von 5 Prozenteinheiten über den getesteten Mutationsgradbereich von 5 bis 50 % linear.

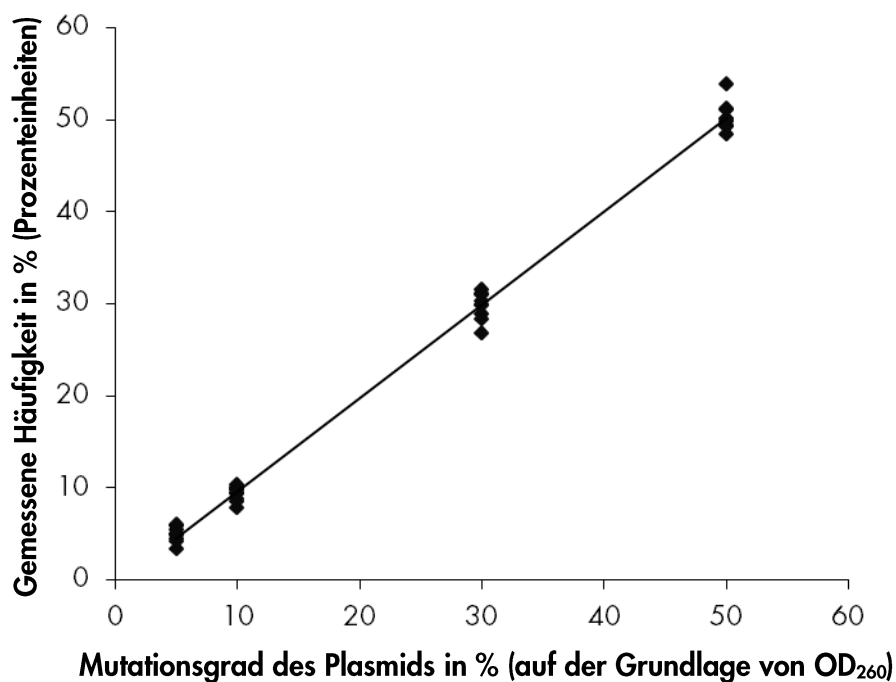


Abbildung 12. Linearität für die Duplikation 1509_1510insGCCTAT im KIT-Exon 9

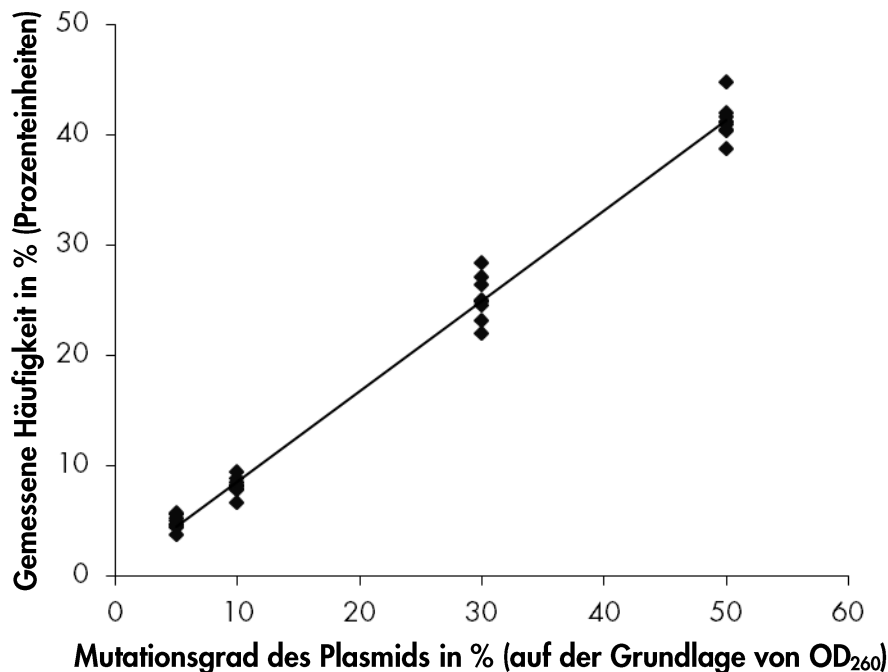


Abbildung 13. Linearität der Mutation 2525A>T im PDGFRA-Exon 18

Präzision

Die Präzisionsdaten ermöglichen die Bestimmung der Gesamtvariabilität der Assays und wurden durch die Analyse der oben beschriebenen Plasmidgemische mit jeweils drei Replikaten mit drei verschiedenen Mutationsgraden erhalten.

Die Wiederholbarkeit (Intra-Assay- und Inter-Chargen-Variabilität) wurde auf der Grundlage der Daten berechnet, die für die Bestimmung der Linearität verwendet wurden (drei Läufe an demselben Tag unter Verwendung verschiedener Chargen des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits). Die Laborpräzision (Intra-Labor-Variabilität) wurde an drei verschiedenen Tagen in drei Läufen in einem Labor mit verschiedenen Bedienern, PyroMark Q24 Geräten und Chargen des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits bestimmt. Die Reproduzierbarkeit (Inter-Labor-Variabilität) wurde von jeweils zwei Läufen in einem internen und externen Labor und unter Verwendung verschiedener Chargen des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kits berechnet.

Die Präzisionsergebnisse werden in Standardabweichungen der gemessenen Mutationshäufigkeiten in Prozenteinheiten angegeben (siehe Tabelle 11). Für die Duplikation 1509_1510insGCCTAT im KIT-Exon 9 betrug die Wiederholbarkeit 0,8 bis 1,6 Prozenteinheiten, die Laborpräzision 0,5 bis 1,5 Prozenteinheiten und die Reproduzierbarkeit 0,7 bis 1,9 Prozenteinheiten über den gemessenen Mutationsgradbereich von 5 bis 50 %. Für die Mutation 2525A>T

im PDGFRA-Exon 18 betrug die Wiederholbarkeit 0,6 bis 1,9 Prozenteinheiten, die Laborpräzision 0,6 bis 3,7 Prozenteinheiten und die Reproduzierbarkeit 0,5 bis 2,4 Prozenteinheiten über den gemessenen Mutationsgradbereich von 5 bis 50 %.

Tabelle 11. Präzision für die Duplikation 1509_1510insGCCTAT im KIT-Exon 9*

| Mutationsgrad des Plasmids in % [†] | Wiederholbarkeit | | Laborpräzision | | Reproduzierbarkeit | |
|--|------------------|-----|----------------|-----|--------------------|-----|
| | Mittel | SD | Mittel | SD | Mittel | SD |
| 5 | 4,9 | 0,8 | 4,6 | 0,5 | 4,6 | 0,7 |
| 10 | 9,3 | 0,8 | 9,3 | 1,2 | 9,3 | 0,9 |
| 30 | 29,7 | 1,5 | 29,2 | 1,2 | 29,2 | 1,7 |
| 50 | 50,3 | 1,6 | 50,2 | 1,5 | 49,7 | 1,9 |

* Alle Werte sind in Prozenteinheiten angegeben. SD: Standardabweichung (n=9).

† Auf der Grundlage von OD₂₆₀-Messungen.

Tabelle 12. Präzision für die Mutation 2525A>T im PDGFRA-Exon 18[‡]

| Mutationsgrad des Plasmids in % [§] | Wiederholbarkeit | | Laborpräzision | | Reproduzierbarkeit | |
|--|------------------|-----|----------------|-----|--------------------|-----|
| | Mittel | SD | Mittel | SD | Mittel | SD |
| 5 | 4,8 | 0,6 | 4,8 | 0,6 | 5,0 | 0,5 |
| 10 | 8,2 | 0,8 | 7,7 | 0,7 | 8,8 | 1,0 |
| 30 | 25,1 | 1,9 | 23,6 | 3,4 | 26,6 | 1,4 |
| 50 | 41,2 | 1,6 | 40,5 | 3,7 | 43,3 | 2,4 |

‡ Alle Werte sind in Prozenteinheiten angegeben. SD: Standardabweichung (n=9).

§ Auf der Grundlage von OD₂₆₀-Messungen.

Bewertung der diagnostischen Leistung

Der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit wurde im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung bewertet. Es wurde DNA aus 100 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) GIST-Proben extrahiert und für die Mutationen im KIT-Exon 9 und PDGFRA-Exon 18 analysiert.

Die DNA wurde unter Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits isoliert. Die Analysen wurden mit dem *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit auf dem PyroMark Q24 durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierung wurde auf dem Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer durchgeführt.

Bei allen 100 analysierten Proben konnte der Mutationsstatus des KIT-Exons 9 (Abbildung 13) und des PDGFRA-Exons 18 (Abbildung 14) mit beiden Methoden bestimmt werden.

Tabelle 13. Ergebnisse der analysierten GIST-Proben für KIT-Exon 9

| KIT-Exon 9 | | Sanger-Sequenzierung | | |
|--|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------|
| | | Keine Mutation nachgewiesen | 1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY | Gesamt |
| therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit | Keine Mutation nachgewiesen | 92 | 0 | 92 |
| | 1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY | 0 | 8 | 8 |
| | Gesamt | 92 | 8 | 100 |

Tabelle 14. Ergebnisse der analysierten GIST-Proben für PDGFRA-Exon 18

| PDGFRA-Exon 18 | | Sanger-Sequenzierung | | | | Gesamt |
|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------|------------|
| | | WT | 2530-2541del12 M844_S847del | 2526-2538>G D842_D846>E | 2525A>T D842V | |
| therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit | Keine Mutation nachgewiesen | 92 | 0 | 0 | 0 | 92 |
| | 2530-2541del12 M844_S847del | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | 2526-2538>G D842_D846>E | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | 2525A>T D842V | 1 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| | Gesamt | 93 | 2 | 3 | 2 | 100 |

Hinweis: Das Signal betrug in allen Läufen, die zur Bestimmung der Leistungsmerkmale durchgeführt wurden, über 30 RLU. Dazu wurden 10 ng DNA zugrunde gelegt, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe isoliert wurden. Die Pyrosequenzierungs-Daten wurden mit dem GIST RapidScreen Plug-in Report analysiert.

Literatur

QIAGEN unterhält eine umfangreiche und regelmäßig aktualisierte Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, die auf Grundlage von QIAGEN Produkte erstellt wurden. Mit Hilfe der zahlreichen Suchoptionen können Sie nach den gewünschten Beiträgen suchen – entweder mit der einfachen Stichwortsuche oder durch Angabe der Applikation, des Forschungsbereichs, des Titels etc.

Eine vollständige Liste der Referenzen finden Sie online in der Referenzdatenbank von QIAGEN unter www.qiagen.com/RefDB/search.asp. Sie können sich auch an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort wenden, um sie anzufordern.

In diesem Handbuch aufgeführte Literaturverweise

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

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:



<N>

Kit enthält Reagenzien für <N> Tests.



Verwendbar bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Chargennummer



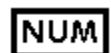
Materialnummer



Komponenten



Enthält



Anzahl



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Gebrauchsanleitung beachten



Vorsicht

Kontakt

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Anhang A: Konfigurieren des *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Assays

Ist der GIST RapidScreen Plug-in Report bereits installiert, sind in der Navigationsansicht der PyroMark Q24 Software unter dem Pfad „Example Files/PyroMark Setups/BRAF“ vordefinierte Assay-Konfigurationen für KIT-Exon 9 und PDGFRA-Exon 18 verfügbar. Die folgenden Schritte müssen in diesem Fall nicht durchgeführt werden. Der GIST RapidScreen Plug-in Report kann via E-Mail an pyro.plugin@qiagen.com angefordert werden.

Wir empfehlen, den GIST RapidScreen Plug-in Report der manuellen Analyse vorzuziehen. Komplexe Mutationen im PDGFRA-Exon 18 können einer zu analysierenden Sequenz nicht manuell hinzugefügt werden und müssen mit dem GIST RapidScreen Plug-in Report analysiert werden. Die korrekte Funktionsweise des Plug-ins sollte sowohl nach der Installation des Plug-ins selbst als auch nach jeder Installation einer neuen Software oder Aktualisierung einer Software auf dem Computer gemäß dem GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide überprüft werden.

Falls der GIST RapidScreen Plug-in Report nicht installiert ist, müssen die Assay-Dateien vor der ersten Durchführung der *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Assays manuell konfiguriert werden. Konfigurieren Sie den Assay für das KIT-Exon 9 und das PDGFRA-Exon 18 wie nachfolgend beschrieben mit der PyroMark Q24 Software.

Verfahren

KIT-Exon 9

A1. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und wählen Sie „New AQ Assay“ (Neuer AQ-Assay).

A2. Geben Sie für „Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge) Folgendes manuell ein:
CTCTGCTGACTTGC

A3. Geben Sie für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) die folgende Sequenz ein:
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA

Die 6-bp-Duplikation GCCTAT nach Codon 503 im KIT-Exon 9 wird bei Verwendung dieser zu analysierenden Sequenz nachgewiesen.

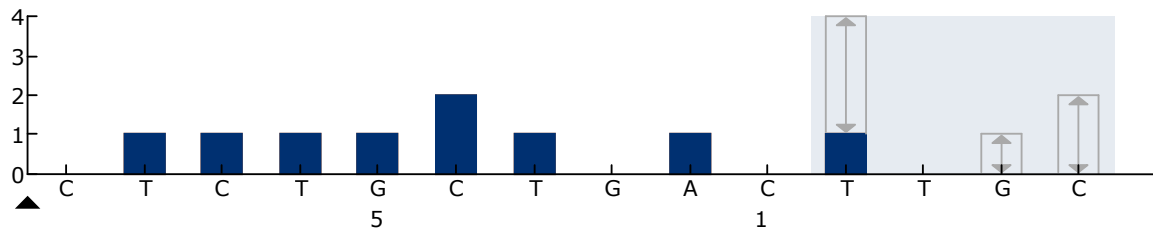


Abbildung 14. Histogramm des KIT-Exons 9 mit *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* als „Sequence to Analyze“ zum Nachweis der 6-BP-Duplikation nach Codon 503

- A4.** Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Parameters“ (Analyseparameter) und erhöhen Sie den Wert für „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality“ (Peakhöhen-Schwellenwert - Erforderliche Peakhöhe für bestandene Qualität) auf 30.
- A5.** Klicken Sie in der Symbolleiste auf und speichern Sie den Assay unter „KIT exon 9“.

PDGFRA-Exon 18

- A1.** Klicken Sie in der Symbolleiste auf und wählen Sie „New AQ Assay“ (Neuer AQ-Assay).
- A2.** Geben Sie für „Dispensation Order“ (Verteilungsreihenfolge) Folgendes manuell ein:
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3.** Geben Sie für „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) die folgende Sequenz ein:
CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT

Die häufigste Mutation GAC>GTC im Codon 842 (Nukleotid 2525) des PDGFRA-Exons 18 wird unter Verwendung dieser zu analysierenden Sequenz nachgewiesen.

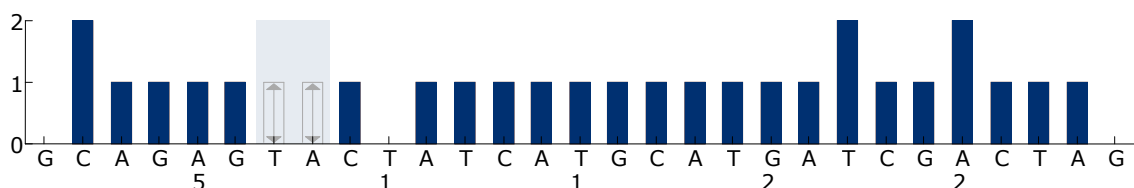


Abbildung 15. Histogramm des PDGFRA-Exons 18 mit *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* als „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) für die Mutation GAC>GTC in Codon 842 (Nukleotid 2525).

Die zu analysierende Sequenz kann nach dem Lauf geändert werden, um zusätzlich Mutationen im Nukleotid 2524 (Codon 842) sowie 9 Deletionen und komplexe Mutationen innerhalb der Region Codon 842 bis 847 zu analysieren.

Zur Analyse, ob die folgenden Mutationen vorliegen, ändern Sie „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) wie in Tabelle 15 angegeben.

Hinweis: Die Warnung „Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations“ (Quantifizierung möglicherweise unsicher: Die variable Position erfordert mehr als eine Verteilung) während der Assay-Konfiguration kann ignoriert werden.

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass der Schwellenwert für die einzelne Peakhöhe auf 30 RLU eingestellt ist.

A4. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Parameters“ (Analyseparameter) und erhöhen Sie den Wert für „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality“ (Peakhöhen-Schwellenwert - Erforderliche Peakhöhe für bestandene Qualität) auf 30.

A5. Klicken Sie in der Symbolleiste auf  und speichern Sie den Assay unter „PDGFRA exon 18“.

Tabelle 15. Häufige Mutationen, die vom *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit unter Verwendung einer anderen zu analysierenden Sequenz nachgewiesen werden

| Nukleinsäure-substitution | Aminosäure-substitution | „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz) |
|---|--|--|
| KIT-Exon 9 | | |
| 1509_1510 insGCCTAT | Y503_F504insAY | TCTGCCTAT[GCCTAT] TTTAA* |
| PDGFRA-Exon 18 | | |
| 2525A>T | D842V | CCAGAGWCATCATGC ATGATTCTGAACTAT* |
| 2524G>T | D842Y [†] | CCAGAKACATCATGCAT GATTCTGAACTAT |
| 2524_2535del12 oder [†] 2526_2537del12 | D842_H845del oder [†] I843_D846del [†] | CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT |
| 2527_2538del12 | I843_D846del [†] | CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT |

| | | |
|------------------|--------------|---|
| 2528_2539del12 | I843_S847>T | CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT |
| 2530_2541del12 | M844_S847del | CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT |
| 2524_2532del9 | D842_M844del | CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT |
| 2524_2526delGAC | D842del | CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT |
| 2526_2538>G | D842_D846>E | –§ |
| 2524_2526GAC>TAT | D842Y† | –§ |


* Standardmäßige „Sequence to Analyze“ (Zu analysierende Sequenz)

† Die Mutationen 2524G>T und 2524_2526GAC>TAT bzw. 2526_2537del12 und 2527_2538del12 resultieren in derselben Aminosäuresubstitution.

‡ Die Mutationen 2524_2535del12 und 2526_2537del12 resultieren in derselben Nukleinsäuresubstitution und werden anhand derselben zu analysierenden Sequenz analysiert.

§ Die Mutationen 2526_2538>G und 2524_2526GAC>TAT können nicht mit der AQ-Analyse der PyroMark Q24 Software analysiert werden.

Anhang B: Leeren der Abfallbehälter und Reservoirs

| | |
|---|---|
| WARNUNG  | Gefährliche Chemikalien Die für die Vakuum-Arbeitsstation verwendete Denaturierungs- lösung enthält Natriumhydroxid, das die Augen und die Haut reizt. Tragen Sie stets Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Die verantwortliche Person (z. B. der Laborleiter) muss alle erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen ergreifen, um sicherzustellen, dass der Arbeitsbereich sicher ist. Die Bediener der Geräte dürfen keinen toxischen (chemischen oder biologischen) Stoffen ausgesetzt sein, die die in den entsprechenden Sicherheitsdaten- blättern (Safety Data Sheets, SDS) oder in den OSHA-*, ACGIH-† oder COSHH-‡-Dokumenten festgelegten Grenzwerte überschreiten. Bei der Abführung von Dämpfen und der Entsorgung von Abfällen müssen alle geltenden nationalen und regionalen Sicherheitsvorschriften und Gesetze eingehalten werden. |
|---|---|

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Vereinigte Staaten von Amerika)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Vereinigte Staaten von Amerika)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Vereinigtes Königreich)

Stellen Sie sicher, dass bei der Entsorgung von Laborabfällen alle geltenden nationalen und regionalen Umweltauflagen eingehalten werden.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Für dieses Protokoll wird hochreines Wasser benötigt (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com oder gleichwertiges Produkt).

Verfahren

- B1. Stellen Sie sicher, dass am Vakuum-Saugkopf kein Unterdruck anliegt. Stellen Sie sicher, dass der Vakuumschalter geschlossen („Off“) und die Vakuumpumpe ausgeschaltet ist.**
- B2. Entsorgen Sie alle in den Reservoirs verbliebenen Reste an Lösungen.**
- B3. Spülen Sie die Reservoirs mit hochreinem Wasser aus oder ersetzen Sie sie, falls erforderlich.**

B4. Entleeren Sie den Abfallbehälter.

Der Deckel kann abgenommen werden, ohne vorher die Schlauchverbindungen zu trennen.

B5. Falls die Vakuum-Arbeitsstation gereinigt werden muss (z. B. von Staub oder verschütteter Flüssigkeit), gehen Sie bitte nach den Anweisungen im *PyroMark Q24 User Manual* vor.

Bestellinformationen

| Produkt | Inhaltsverzeichnis | Kat.-Nr. |
|---|---|----------------------|
| <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24) | Für 24 Reaktionen auf PyroMark Q24 Systemen: Seq.-Primer, PCR-Primer, Unmethylierte Kontroll-DNA, PyroMark PCR-Master-Mix, CoralLoad Konzentrat, PyroMark Bindungspuffer, PyroMark Annealing-Puffer, PyroMark Denaturierungslösung, PyroMark Waschpuffer, Enzymgemisch, Substratgemisch, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP und H ₂ O | 971510 |
| PyroMark Q24 MDx | Plattform für die sequenzbasierte Detektion zur Pyrosequenzierung von 24 Proben gleichzeitig | 9001513 |
| PyroMark Q24 | Plattform für die sequenzbasierte Detektion zur Pyrosequenzierung von 24 Proben gleichzeitig | 9001514 |
| PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation | Vakuum-Arbeitsstation (220 V) zur Verarbeitung von 24 Proben gleichzeitig, vom PCR-Produkt bis hin zum Einzelstrang-Template | 9001517* 9001515† |
| PyroMark Q24 Vacuum Workstation | Vakuum-Arbeitsstation zur Verarbeitung von 24 Proben gleichzeitig, vom PCR-Produkt bis hin zum Einzelstrang-Template | 9001518 |
| PyroMark Q24 MDx Software | Anwendungssoftware | 9019063 |
| PyroMark Q24 Software | Analysesoftware | 9019062 |

* Nur UK.

† Alle anderen Länder.

| Produkt | Inhaltsverzeichnis | Kat.-Nr. |
|---|---|----------|
| Zubehör | | |
| PyroMark Q24 Plate (100) | Reaktionsplatten mit 24 Kavitäten für die Sequenzierung | 979301 |
| PyroMark Q24 Cartridge (3) | Kartuschen zur Dispensierung von Nukleotiden und Reagenzien | 979302 |
| PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100) | Wiederverwendbare Filternadeln für die PyroMark Vakuum-Arbeitsstation Q96 und Q24 | 979010 |
| PyroMark Control Oligo | Zur Überprüfung der Systeminstallation | 979303 |
| PyroMark Q24 Validation Oligo | Zur Bestätigung der Systemleistung | 979304 |
| Verwandte Produkte | | |
| QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) | Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp MinElute® Säulen, Proteinase K, Puffer, Entnahmeröhrchen (2 ml) | 56404 |
| EZ1 DNA Tissue Kit (48) | Für 48 Präparationen: Reagenzkartuschen (Gewebe), Einweg-Filterspitzen, Einweg-Spitzenhalter, Probenröhrchen (2 ml), Elutionsröhrchen (1,5 ml), Puffer G2, Proteinase K | 953034 |
| QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit | Für 50 Präparationen: QIAamp Mini Spin-Säulen, Puffer, Reagenzien, Röhrchen, VacConnectors | 61104 |

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem Händler vor Ort angefordert werden.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

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

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für *therascreen* GIST RapidScreen Pyro Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

HB-1 547-002 © 2013-2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australia ▪ techservice-au@qiagen.com

Austria ▪ techservice-at@qiagen.com

Belgium ▪ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ▪ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ▪ techservice-ca@qiagen.com

China ▪ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ▪ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ▪ techservice-nordic@qiagen.com

France ▪ techservice-fr@qiagen.com

Germany ▪ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ▪ techservice-hk@qiagen.com

India ▪ techservice-india@qiagen.com

Ireland ▪ techservice-uk@qiagen.com

Italy ▪ techservice-it@qiagen.com

Japan ▪ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ▪ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ▪ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ▪ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ▪ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ▪ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ▪ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ▪ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ▪ techservice-ch@qiagen.com

UK ▪ techservice-uk@qiagen.com

USA ▪ techservice-us@qiagen.com

